

FABIANA GOULART MARCONDES BRAGA

**Acetona exalada como novo biomarcador do diagnóstico de  
insuficiência cardíaca**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia  
Orientador: Prof. Dr. Fernando Bacal

São Paulo

2012

FABIANA GOULART MARCONDES BRAGA

**Acetona exalada como novo biomarcador do diagnóstico de  
insuficiência cardíaca**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia  
Orientador: Prof. Dr. Fernando Bacal

São Paulo

2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Marcondes-Braga, Fabiana Goulart

Acetona exalada como novo biomarcador do diagnóstico de insuficiência  
cardíaca / Fabiana Goulart Marcondes Braga. -- São Paulo, 2012.

**Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.**

Programa de Cardiologia.

Orientador: Fernando Bacal.

Descritores: 1.Insuficiência cardíaca 2.Acetona 3.Marcadores biológicos  
4.Diagnóstico/métodos 5.Metabolismo 6.Expiração 7.Espectrofotometria

USP/FM/DBD-031/12

*Dedicatória*

*Aos meus pais, **Edson Fortes Marcondes e Maria Cristina Goulart** que sempre acreditaram, incentivaram e investiram em mim; concluir este trabalho só foi possível tendo como base os valores e princípios que me ensinaram.*

*À minha irmã **Luciana Goulart Marcondes Calixto**  
por sua constante torcida, apoio e amizade.*

*Ao meu esposo **Leonardo Inácio Marcondes Braga** por seu apoio, carinho, companheirismo e cumplicidade, mas principalmente por seu amor incondicional, que sempre me deu força para vencer qualquer obstáculo em minha vida.*

*Agradecimentos*

---

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Fernando Bacal** por sua incrível percepção clínica, que deu origem à idéia aparentemente “maluca” deste projeto; por ter acreditado que eu poderia colocá-lo em prática e, por fim, por sempre me incentivar e possibilitar meu crescimento não só como pesquisadora, mas também como médica.

Ao **Prof. Ivano G. R. Gutz**, que apesar de seus inúmeros compromissos e afazeres contribuiu em todas as etapas de nosso trabalho desde a elaboração do dispositivo de coleta e o desenvolvimento do método de análise química até a elaboração do artigo científico.

Ao **Prof. Dr. Paulo H. N. Saldiva** por ter acreditado e investido na idéia que originou nosso estudo e por sua contribuição para a análise estatística dos dados e elaboração do artigo científico.

Ao colega **Guilherme Lopes Batista** pelo desenvolvimento e execução das análises químicas, mas especialmente por sua dedicação irrestrita ao nosso trabalho.

Ao **Prof. Dr. Edimar Alcides Bocchi**, diretor da Unidade de Insuficiência Cardíaca e Transplante, que permitiu e colaborou para a realização do estudo.

Aos assistentes da Unidade de Insuficiência Cardíaca e Transplante, **Dr<sup>a</sup>. Silvia Moreira Ayub-Ferreira**, **Dr. Victor Sarli Issa**, **Dr. Paulo Roberto Chizzola**, **Dr. Germano Emílio Conceição Souza**, **Dr<sup>a</sup>. Fátima das Dores Cruz** e **Prof. Guilherme Vieira Guimarães** pelo apoio e, especialmente, à **Dr<sup>a</sup>. Silvia Moreira Ayub-Ferreira** e ao **Dr. Victor Sarli Issa** pela contribuição para as análises estatísticas.

Ao **Dr. Múcio Tavares**, **Dr<sup>a</sup>. Danielle Menosi Gualandro**, **Dr. Luis Fernando B. C. Seguro**, **Dr<sup>a</sup>. Tânia Marie Ogawa**, **Dr. Sérgio Jallad**, **Dr<sup>a</sup> Michele Zanotti Galon**, **Dr<sup>a</sup> Lais Vissoto Garchet Santos Reis**, **Dr<sup>a</sup> Mônica Samuel Ávila**, **Dr<sup>a</sup>. Priscila G. Goldstein**, **Mariana Moreira Lensi** e a todos os médicos da Unidade Clínica de Emergência pelo apoio e contribuição na seleção de pacientes candidatos ao estudo.

Aos meus colegas de pós-graduação **Dr. Sandrigo Mangini, Dr. Odilson Silvestre, Dr. Jefferson Luís Vieira, Dr. Abrão Abuhab, Dr. Miguel Morita e Dr. Paulo Cury Rezende** por dividir as angústias e incertezas desta fase de nossa formação.

Às secretárias **Ana Carolina Rezende e Maria de Lourdes Ribeiro** pelo constante apoio e torcida e à **Maria Cecília Alves Lima** pelo apoio e disponibilidade para a realização dos testes cardiopulmonares.

À todos os enfermeiros, técnicos e auxiliares de enfermagem por sua ajuda na coleta de exames dos pacientes e, especialmente, à **Kauana, Soraya, Ana Cláudia, Priscila e Silvana** pela indicação de voluntários para participar do grupo controle.

Aos **pacientes**, que em meio ao sofrimento causado pela própria doença que os aflige, em nenhum momento hesitaram em participar e colaborar com a pesquisa.

À Central Analítica do Instituto de Química da USP, em especial ao **Márcio Nardelli, à Adriana, à Cristiane e à Alessandra** pelas análises cromatográficas.

Ao Centro de Tecnologia Biomédica (Divisão de Bioengenharia) do InCor, em especial à **Dr<sup>a</sup>. Idágene A. Cestari** e ao engenheiro **Simão Bacht** por sua contribuição no desenvolvimento do primeiro dispositivo de coleta de ar exalado.

Aos membros participantes da minha banca de qualificação, **Prof. Dr. Antonio Carlos Pereira Barreto, Prof. Dr. Bruno Caramelli e Dr. Alexandre da Costa Pereira** pelas valiosas sugestões que contribuíram para a finalização desta tese.

À Comissão de Pós-graduação e a **Sra. Neusa Rodrigues Dini, Sra. Juliana Lattari Sobrinho e Sra. Eva Malheiros Guiss de Oliveira** pela atenção e orientação.

À **Fundação do Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão do auxílio à pesquisa e o apoio financeiro para a realização deste projeto.

*Sumário*

## SUMÁRIO

### LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

### LISTA DE SÍMBOLOS

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE GRÁFICOS

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Biomarcadores</b> .....	<b>3</b>
1.1.1 Conceito .....	<b>3</b>
1.1.2 Biomarcadores de insuficiência cardíaca .....	<b>3</b>
1.1.3 Racional da busca por novos biomarcadores .....	<b>8</b>
1.1.4 Biomarcador ideal .....	<b>10</b>
<b>1.2 Análise do ar exalado como método diagnóstico</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 Análise do ar exalado em indivíduos saudáveis .....	<b>12</b>
1.2.2 Análise do ar exalado em doenças do trato respiratório .....	<b>13</b>
1.2.3 Análise do ar exalado em doenças metabólicas .....	<b>14</b>
1.2.4 Análise do ar exalado em doenças cardiovasculares .....	<b>14</b>
1.2.5 Análise do ar exalado na insuficiência cardíaca .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Primário</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 Secundários</b> .....	<b>18</b>
<b>3 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 Desenho e população do estudo</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2 Coleta do ar exalado</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3 Determinação por cromatografia gasosa e espectrometria de</b> <b>massas: análise química qualitativa</b> .....	<b>28</b>
3.3.1 Cromatografia gasosa .....	<b>28</b>

3.3.2 Espectrometria de massas .....	30
3.3.3 Determinação por GC-MS .....	31
<b>3.4 Determinação espectrofotométrica: análise química     quantitativa .....</b>	<b>34</b>
<b>3.5 Tamanho amostral e análise estatística .....</b>	<b>37</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Análise do grupo CONTROLE versus grupo IC .....</b>	<b>41</b>
4.1.1. Características gerais da população .....	41
4.1.2. Determinação de acetona exalada por GC-MS .....	44
4.1.3. Determinação de acetona exalada por Espectrofotometria ...	45
<b>4.2 Análise do grupo ICCOMP versus ICDESCOMP .....</b>	<b>49</b>
4.2.1. Características gerais da população .....	49
4.2.2. Determinação de acetona exalada por GC-MS .....	53
4.2.3. Determinação de acetona exalada por Espectrofotometria .....	54
<b>4.3 Análise do grupo ICCONG versus ICBXDB .....</b>	<b>58</b>
4.3.1. Características gerais da população .....	59
4.3.2. Determinação de acetona exalada por GC-MS .....	63
4.3.3. Determinação de acetona exalada por Espectrofotometria .....	64
<b>4.4 Variáveis clínicas e laboratoriais associadas à acetona .....</b>	<b>66</b>
4.4.1. Análise univariada .....	66
4.4.2. Análise multivariada – Regressão Linear Múltipla .....	69
4.4.3. Correlação entre acetona exalada e BNP .....	71
4.4.4. Correlação entre acetona exalada e catecolaminas séricas ...	72
4.4.5. Relação entre acetona exalada e classe funcional (NYHA) .....	73
<b>4.5 Evolução dos pacientes incluídos .....</b>	<b>74</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>5.1 Grupo controle versus grupo IC .....</b>	<b>77</b>
<b>5.2 Grupo IC compensada versus grupo IC descompensada .....</b>	<b>81</b>
<b>5.3 Grupo IC com congestão versus IC com hipoperfusão .....</b>	<b>84</b>
<b>5.4 Correlações e interferentes na acetona exalada .....</b>	<b>86</b>

<b>5.5 Explicações fisiopatológicas para o aumento da acetona exalada na IC .....</b>	<b>88</b>
<b>5.6 Acetona exalada e gravidade da IC .....</b>	<b>92</b>
<b>5.7 Limitações do estudo .....</b>	<b>93</b>
<b>5.8 Considerações finais e implicações clínicas .....</b>	<b>93</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>7 ANEXOS .....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO A - Dispositivo inicial de coleta do ar exalado .....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....</b>	<b>100</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>104</b>

## **APÊNDICE**

**APÊNDICE A – Fichas dos pacientes incluídos**

**APÊNDICE B – Petição de depósito de patente nos Estados Unidos**

**APÊNDICE C – Cessão de direitos dos inventores para a USP**

**APÊNDICE D – Cessão de direitos dos inventores para a FAPESP**

**APÊNDICE E – Petição de depósito de patente no PCT**

**(Patent Cooperation Treaty)**

**APÊNDICE F – Decisão editorial do *CHEST***

*Lista de  
Abreviaturas*

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADHERE	<i>Acute Decompensated Heart Failure National Registry</i>
AGL	ácidos graxos livres
AIT	acidente isquêmico transitório
ANP	peptídeo natriurético atrial
ATP	trifosfato de adenosina
AUC	área sob a curva
AVC	acidente vascular cerebral
BNP	peptídeo natriurético do tipo B
bpm	batimentos por minuto
BRA	bloqueadores dos receptores de angiotensina II
DDVE	diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
et al	e outros
FEVE	fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FC	freqüência cardíaca
FR	freqüência respiratória
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GGT	gama-glutamilttransferase
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HC.FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IAM	infarto agudo do miocárdio
IC	insuficiência cardíaca
ICBXDB	insuficiência cardíaca descompensada por baixo débito
ICCOMP	insuficiência cardíaca compensada
ICCONG	insuficiência cardíaca descompensada por congestão
ICDESCOMP	insuficiência cardíaca descompensada
IC95%	intervalo de confiança 95%
IECA	inibidores da enzima de conversão da angiotensina II

IMC	índice de massa corporal
InCor	Instituto do Coração
irm	incursões respiratórias por minuto
MR-proADM	<i>midregional-proadrenomedullin</i>
NGAL	<i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NO	óxido nítrico
NT-proBNP	fração N-terminal do pro-hormônio do peptídeo natriurético tipo B
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OR	<i>odds ratio</i>
PAS	pressão arterial sistólica
PAD	pressão arterial diastólica
ppb	partes por bilhão
ROC	<i>Receiver-operator-characteristic</i>
SPSS	<i>Software Statistical Package for the Social Science</i>
TEC	tempo de enchimento capilar
USP	Universidade de São Paulo
VD	ventrículo direito
VE	ventrículo esquerdo

*Lista de  
Símbolos*

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{cm}^3$	centímetros cúbicos
$\text{g/dL}$	gramas por decilitro
$\text{kg}$	quilograma
$\text{m}$	metros
$\text{mL}$	mililitros
$\text{mL/kg/min}$	mililitros por quilo por minuto
$\text{mL/min}$	mililitros por minuto
$\text{mEq/L}$	mEq por litro
$\text{mg/dL}$	miligrama por decilitro
$\text{mg/L}$	miligramas por litro
$\text{mg\%}$	miligrama por cento
$\text{mL/min}$	mililitros por minuto
$\text{mm}$	milímetros
$\text{mmHg}$	milímetros de mercúrio
$\text{mol/L}$	mol por litro
$\text{mol L}^{-1} \text{atm}^{-1}$	mol por litro por atmosfera
$\text{m/z}$	relação massa/carga
$\mu\text{L}$	microlitros
$\mu\text{g/kg/min}$	microgramas por quilo por minuto
$\mu\text{g/L}$	microgramas por litro
$n$	número de pacientes
$\text{ng/mL}$	nanogramas por mililitro
$\text{nm}$	nanômetros
$\text{nmol/L}$	nanomol por litro
$p$	significância estatística
$\text{pg/mL}$	picogramas por ml
$\text{pmol/L}$	picomol por litro
$\text{ppb}$	partes por bilhão
$r$	correlação
$r^2$	r quadrado

U/L	unidades por litro
x	versus
%	porcentagem
°C	graus Celsius
°C/min	graus Celsius por minuto
$\beta$	coeficiente beta
<	menor
>	maior
$\geq$	maior ou igual
$\leq$	menor ou igual
-	menos
=	igual
$\pm$	mais ou menos

*Lista de  
Tabelas*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características gerais dos controles e de pacientes com IC .....	43
Tabela 2 -	Características gerais dos pacientes com IC compensada e IC descompensada .....	51
Tabela 3 -	Características ecocardiográficas, laboratoriais e medicações em uso dos pacientes com IC compensada e IC descompensada .....	52
Tabela 4 -	Acurácia da acetona para o diagnóstico de IC .....	58
Tabela 5 -	Características gerais dos pacientes dos grupos ICCONG e ICBXDB .....	61
Tabela 6 -	Características ecocardiográficas, laboratoriais e medicações em uso dos pacientes dos grupos ICCONG e ICBXDB .....	62
Tabela 7 -	Análise univariada das variáveis contínuas em relação à acetona exalada .....	67
Tabela 8 -	Análise univariada das variáveis categóricas em relação à acetona exalada .....	68
Tabela 9 -	Análise univariada das medicações utilizadas em relação à acetona exalada .....	69
Tabela 10 -	Regressão Linear Múltipla para acetona exalada .....	70
Tabela 11 -	Evolução dos pacientes com IC .....	74

*Lista de  
Figuras*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Produção do peptídeo natriurético do tipo B (BNP). O BNP é produzido a partir do pre-pro-BNP, um precursor de 134 aminoácidos liberado diante do estresse de parede o cardiomiócito. O peptídeo sinal de 26 aminoácidos é removido do pre-pro-BNP e dá origem ao pro-BNP, uma seqüência de 76 aminoácidos que é então clivada na fração N-terminal do proBNP (NT-proBNP) biologicamente inativo e no BNP, uma molécula biologicamente ativa de 32 aminoácidos .....	4
Figura 2 -	Relação: genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma .....	9
Figura 3 -	Desenho do estudo .....	25
Figura 4 -	Dispositivo de coleta do ar exalado.....	27
Figura 5 -	Diagrama esquemático do sistema GC-MS.....	30
Figura 6 -	Cromatógrafo a gás acoplado (GC17A) a espectrômetro de massas (QP5050A) .....	32
Figura 7 -	Representação típica do cromatograma da amostra de ar exalado de um dos pacientes com insuficiência cardíaca descompensada, visualizado pelo software CLASS-GC5000. Painel A: Separação de componentes da amostra de acordo com a afinidade pela fase estacionária. Painel B: espectro de massa característico da acetona .....	33
Figura 8 -	Representação da reação de salicilaldeído com acetona em meio básico .....	34
Figura 9 -	Painel A: Coloração da solução após reação da acetona com salicilaldeído. Concentrações de acetona: 0,0 (branco); 0,7; 1,7; 2,8 e 3,4 mg/L. b) Curva de calibração obtida por espectrofotometria a 474 nm, após 10h de reação .....	35

Figura 10 - Representação da acetona (propanona): modelo, fórmula estrutural e fórmula molecular .....	41
Figura 11 - Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de um indivíduo do grupo controle. O painel superior indica a separação dos componentes da amostra e o painel inferior o espectro de massas da acetona que produziu o pico cromatográfico observado no painel superior .....	44
Figura 12 - Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de um paciente do grupo IC. O painel superior indica a separação dos componentes da amostra e o painel inferior o espectro de massas da acetona que produziu o pico cromatográfico observado no painel superior .....	45
Figura 13 - Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de um paciente do grupo IC compensada. O painel superior indica a separação dos componentes da amostra e o painel inferior o espectro de massas da acetona que produziu o pico cromatográfico observado no painel superior .....	53
Figura 14 - Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de um paciente do grupo IC descompensada. O painel superior indica a separação dos componentes da amostra e o painel inferior o espectro de massas da acetona que produziu o pico cromatográfico observado no painel superior .....	54
Figura 15 - Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de um paciente do grupo IC descompensada com congestão (ICCONG). O painel superior indica a separação dos componentes da amostra e o painel inferior o espectro de massas da acetona que produziu o pico cromatográfico observado no painel superior .....	63
Figura 16 - Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de um paciente do grupo IC descompensada com hipoperfusão /baixo débito (ICBXDB). O painel superior indica a separação dos componentes da amostra e o painel inferior o espectro de massas da acetona que produziu o pico cromatográfico observado no painel superior .....	64

Figura 17 - Alterações metabólicas sistêmicas na IC avançada .....	90
Figura 18 - Metabolismo da célula miocárdica normal .....	91
Figura 19 - Dispositivo inicial de coleta de ar exalado .....	98

*Lista de  
Gráficos*

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Concentração de Acetona exalada nos grupos controle e insuficiência cardíaca .....	46
Gráfico 2 -	Concentração de BNP plasmático nos grupos controle e insuficiência cardíaca .....	47
Gráfico 3 -	Curvas ROC da Acetona exalada e do BNP plasmático para o diagnóstico de IC .....	48
Gráfico 4 -	Concentração de Acetona exalada nos grupos IC compensada e IC descompensada .....	55
Gráfico 5 -	Concentração de BNP plasmático nos grupos IC compensada e IC descompensada .....	56
Gráfico 6 -	Curvas ROC de Acetona exalada e BNP plasmático para o diagnóstico de IC descompensada .....	57
Gráfico 7 -	Concentração de Acetona exalada nos grupos IC com congestão e IC com hipoperfusão .....	65
Gráfico 8 -	Concentração de BNP plasmático nos grupos IC com congestão e IC com hipoperfusão .....	66
Gráfico 9 -	Correlação entre Acetona exalada e BNP plasmático ...	71
Gráfico 10 -	Correlação entre acetona exalada e catecolaminas séricas .....	72
Gráfico 11 -	Correlação entre Acetona exalada e diferentes classes funcionais .....	73

*Resumo*

## RESUMO

Marcondes-Braga FG. Acetona exalada como novo biomarcador do diagnóstico de insuficiência cardíaca [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica de alta morbimortalidade e por este motivo é crescente o interesse em se estudar novos biomarcadores da doença visando buscar caminhos para novas estratégias terapêuticas. Neste contexto, a análise do ar exalado pode ser promissora. Baseado nestes dados e na observação de que pacientes com insuficiência cardíaca grave exalam odor peculiar, ainda em estudo piloto, nós identificamos acetona no ar exalado de pacientes com insuficiência cardíaca. Assim, nosso estudo teve por objetivo primário avaliar o papel da acetona exalada como biomarcador do diagnóstico de insuficiência cardíaca e de insuficiência cardíaca descompensada. Como objetivo secundário, avaliar sua relação com a classe funcional segundo a classificação da *New York Heart Association (NYHA)* e sua correlação com o peptídeo natriurético do tipo B (BNP). Entre maio de 2009 e setembro de 2010, pacientes consecutivos com disfunção sistólica (grupo IC) admitidos na emergência (insuficiência cardíaca descompensada – grupo ICDESCOMP) e pacientes estáveis nos últimos três meses encaminhados para o teste cardiopulmonar (insuficiência cardíaca compensada – grupo ICCOMP) foram submetidos à coleta de ar exalado (extração em água) para posterior análise qualitativa por cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas e quantificação por espectrofotometria de absorção, através da reação com salicilaldeído. Entre os 235 pacientes avaliados, 89 foram incluídos (59 com insuficiência cardíaca descompensada e 30 com insuficiência cardíaca compensada), 61% do sexo masculino e com mediana de idade de 52 anos. Vinte indivíduos saudáveis (grupo controle) pareados por idade participaram do estudo. O valor mediano (intervalo interquartil) de acetona exalada foi maior no grupo IC em relação ao controle [3,70 µg/L (1,69-10,45 µg/L) versus 0,39

$\mu\text{g/L}$  (0,30-0,79  $\mu\text{g/L}$ ),  $p < 0,001$ ]. O valor mediano de acetona em pacientes com insuficiência cardíaca descompensada foi maior do que no grupo com insuficiência cardíaca compensada [7,80  $\mu\text{g/L}$  (3,60-15,20  $\mu\text{g/L}$ ) versus 1,22  $\mu\text{g/L}$  (0,68–2,19  $\mu\text{g/L}$ ),  $p < 0,001$ ]. A acurácia do método tanto para o diagnóstico de insuficiência cardíaca (acetona  $\geq 1,16 \mu\text{g/L}$ ; área sob a curva = 0,94) quanto para o diagnóstico de insuficiência cardíaca descompensada (acetona  $\geq 2,50 \mu\text{g/L}$ ; área sob a curva = 0,93) foi aproximadamente 85 %, semelhante à acurácia do BNP (BNP  $\geq 42 \text{ pg/mL}$ ; área sob a curva = 0,97 e BNP  $\geq 424 \text{ pg/mL}$ ; área sob a curva = 0,94, respectivamente). Houve correlação positiva entre acetona exalada e BNP ( $r = 0,772$ ,  $p < 0,001$ ). Observamos aumento progressivo nas concentrações de acetona exalada de acordo com a piora da classe funcional segundo *NYHA* ( $p < 0,001$ ). Assim, podemos concluir que nosso estudo revelou a acetona exalada como um novo biomarcador do diagnóstico de insuficiência cardíaca e de insuficiência cardíaca descompensada, que está associado à maior gravidade da doença e que apresenta correlação positiva com BNP. Sua dosagem é um novo método de diagnóstico não invasivo que pode ser realizado à beira leito, cuja acurácia é semelhante à do BNP.

Descritores:

1. Insuficiência cardíaca
2. Acetona
3. Marcadores Biológicos
4. Diagnóstico/método
5. Metabolismo
6. Expiração
7. Espectrofotometria

*Abstract*

## **ABSTRACT**

Marcondes-Braga FG. Exhaled breath acetone as a new biomarker of heart failure diagnosis [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

Heart failure (HF) is a condition associated with high mortality and frequent hospital admissions. In this context, multiple biomarkers of heart failure severity have emerged recently. However, the usefulness of most of these biomarkers has not been fully established. Exhaled breath has been considered a suitable tool (biomarker) to evaluate different diseases. Based on the clinical observation that patients with acute decompensated heart failure (ADHF) exhale a distinct odor, in a pilot study we have identified acetone in exhaled breath of heart failure patients and this study aimed to evaluate the role of acetone as a new biomarker of heart failure and ADHF disease. As secondary aims, we intended to analyze the relation to New York Heart Association (NYHA) class and the correlation with B-Type Natriuretic Peptide (BNP). Patients with systolic dysfunction (HF group) admitted consecutively at the emergency room (ADHF group) and stable patients referred to the cardiopulmonary test (chronic HF – CHF group) between May 2009 and September 2010 were submitted to exhaled breath collection (extraction into water). Acetone identification was done by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and its determination by absorption spectrophotometry after reaction with salicylaldehyde. Twenty healthy subjects matched for age were enrolled (control group). Among 235 patients with HF, 89 were included in the study (59 ADHF and 30 CHF), 61% male, with median age of 52 years. Median exhaled breath acetone value (interquartile range) was higher in the HF group when compared to control group [3.7 µg/L (1.69-10.45 µg/L) versus 0.39 µg/L (0.30-0.79 µg/L),  $p < 0.001$ ] and also higher in ADHF when compared to CHF group [7.80 µg/L (3.60-15.20 µg/L) versus 1.22 µg/L (0.68–2.19 µg/L),  $p < 0,001$ ]. The accuracy of the method to diagnose CHF (Acetone  $\geq 1.16$  µg/L; AUC = 0.94) and ADHF (Acetone  $\geq 2.5$  µg/L; AUC = 0.93) was similar to the accuracy of

BNP (BNP > 42 pg/mL; AUC = 0.97 and BNP > 424 pg/mL; AUC = 0.94, respectively). There was a positive correlation between exhaled breath acetone and plasmatic BNP ( $r = 0.772$ ,  $p < 0.001$ ). Levels of exhaled breath acetone were different among the four different NYHA classes ( $p < 0.001$ ). In summary, we can conclude that our study showed exhaled breath acetone as a new biomarker of heart failure and ADHF. It is associated with heart failure severity and has a good correlation with BNP. This is a promising non-invasive diagnostic method of heart failure, whose accuracy is equivalent to BNP.

Descriptors:

1. Heart Failure
2. Acetone
3. Biological markers
4. Diagnosis/methods
5. Metabolism
6. Exhalation
7. Spectrophotometry

## *Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento da população gera mudança no cenário das doenças cardiovasculares em nosso país e em todo o mundo. Tal fato, de certa forma contribui para o aumento na prevalência da insuficiência cardíaca (IC). A IC é a via final comum da maioria das doenças que acometem o coração, sendo o mais importante desafio clínico atual na área da saúde.

Apesar dos avanços no tratamento medicamentoso e nos cuidados multidisciplinares observados nas últimas duas décadas, a IC ainda é uma síndrome clínica associada à alta mortalidade. Episódios de descompensação da doença seguidos de admissões hospitalares são freqüentes e implicam em pior prognóstico e maior custo.<sup>1,2</sup> Segundo dados do DATASUS de 2011,<sup>3</sup> as doenças do sistema circulatório são a principal causa de mortalidade no Brasil (21 %), sendo a IC a principal responsável pelos óbitos de origem cardiovascular neste período (28 %) e a principal causa cardiovascular de internação hospitalar (22 %). Diante da alta morbimortalidade da IC, há grande interesse em se encontrar biomarcadores da doença que possam auxiliar no seu manejo clínico e, desta forma, gerar maior eficiência na decisão terapêutica.

Ao avaliarmos pacientes com IC em nossa instituição, observamos que muitos pacientes internados por IC descompensada exalam odor peculiar, sendo o odor mais evidente entre pacientes mais graves, muitas vezes dependentes de drogas vasoativas. A presença de tal odor é menos freqüente, embora não ausente, entre pacientes ambulatoriais. Assim, postulamos que a substância responsável por tal odor poderia ser um bom biomarcador de IC e de sua gravidade.

## **1.1 Biomarcadores**

### 1.1.1 Conceito

Biomarcadores são marcadores biológicos que podem ser objetivamente medidos e quantificados como indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas a intervenções terapêuticas.<sup>4</sup> Apresentam uma variedade de funções que pode corresponder a diferentes estágios do desenvolvimento da doença e podem ser utilizados para pacientes que aparentemente não apresentam doença (biomarcador de triagem diagnóstica); para pacientes com suspeita de doença (biomarcador diagnóstico) e para aqueles sabidamente portadores da doença (biomarcador prognóstico).<sup>5</sup> Desta forma, biomarcadores podem ser usados tanto para determinar a susceptibilidade à determinada doença como definir a elegibilidade para terapias específicas.

### 1.1.2 Biomarcadores de insuficiência cardíaca

Dispnéia aguda é um sintoma comum em pacientes atendidos na sala de emergência, apresenta fisiopatologia complexa e pode ser causada por mais de 30 doenças diferentes, sendo as doenças inflamatórias pulmonares e a IC as causas mais freqüentes.

Até o presente momento, os peptídeos natriuréticos são os mais estudados biomarcadores de diagnóstico de IC e compreendem o peptídeo natriurético do tipo B (BNP), a fração N-terminal do pró-hormônio BNP (NT-proBNP) e o peptídeo natriurético atrial (ANP).

O BNP foi descrito pela primeira vez em 1988 e foi chamado originalmente de peptídeo natriurético cerebral por ter sido isolado do tecido cerebral porcino. Apenas posteriormente descobriu-se que seu principal efeito estava relacionado ao estresse hemodinâmico do miócito ventricular e seu nome foi então modificado. O BNP é produzido a partir do pre-pro-BNP, um precursor de 134 aminoácidos liberado diante do estresse de parede do cardiomiócito. Um peptídeo sinal de 26 aminoácidos é removido do pre-pro-BNP e dá origem ao proBNP, uma seqüência de 76 aminoácidos que é então clivada na fração N-terminal do proBNP (NT-proBNP), uma molécula biologicamente inativa e no BNP, uma molécula biologicamente ativa de 32 aminoácidos (figura 1).<sup>6</sup> O ANP é um peptídeo preferencialmente sintetizado e secretado pelos átrios, é estocado em grânulos e liberado na corrente sanguínea diante de estímulos específicos.<sup>6</sup>

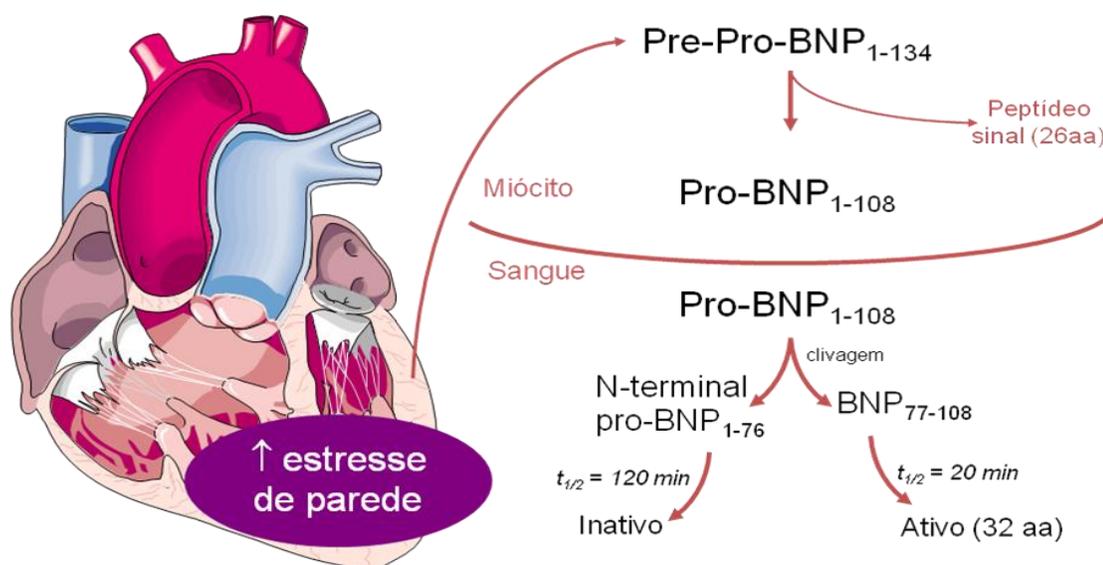


Figura 1 - Produção do peptídeo natriurético do tipo B (BNP). O BNP é produzido a partir do pre-pro-BNP, um precursor de 134 aminoácidos liberado diante do estresse de parede o cardiomiócito. Um peptídeo sinal de 26 aminoácidos é removido do pre-pro-BNP e dá origem ao pro-BNP, uma seqüência de 76 aminoácidos que é então clivada na fração N-terminal do proBNP (NT-proBNP) biologicamente inativa e no BNP, uma molécula biologicamente ativa de 32 aminoácidos

Estes peptídeos são liberados na corrente sanguínea em resposta ao aumento do volume ventricular e agem suprimindo o sistema renina-angiotensina-aldosterona e o sistema nervoso simpático. Desta forma, induzem vasodilatação, natriurese e diurese, mantendo a homeostase de sódio por estimular excreção de sódio e água pelos rins.<sup>6,7</sup>

O estudo clínico que demonstrou a importância do BNP para o diagnóstico de IC foi “Breathing Not Properly Study”. Neste estudo, 1 586 pacientes com dispnéia aguda foram avaliados e o ponto de corte de BNP de 100 pg/mL conferiu 90 % de sensibilidade e 76 % de especificidade para o diagnóstico de IC em pacientes que se apresentavam à sala de emergência com dispnéia aguda.<sup>8</sup> Muller et al<sup>9</sup> mostraram que o uso do BNP em associação com variáveis clínicas auxilia na avaliação diagnóstica e no tratamento dos pacientes com dispnéia aguda, podendo reduzir o tempo de internação, porém não afeta a mortalidade destes pacientes.

O papel do NT-proBNP no diagnóstico de IC em pacientes com dispnéia aguda também foi estudado. O estudo PRIDE<sup>10</sup> mostrou que o NT-proBNP sozinho ou em associação com variáveis clínicas é superior ao uso apenas de variáveis clínicas para o diagnóstico de IC e que valores de NT-proBNP menores que 300 pg/mL são ótimos para afastar IC como causa da dispnéia aguda na sala de emergência.

Apesar das evidências favoráveis em relação ao BNP e NT-proBNP no diagnóstico de IC, ainda há limitações ao seu uso na prática clínica, pois estes peptídeos podem elevar-se na presença de anemia,<sup>11</sup> insuficiência renal crônica,<sup>12,13</sup> obesidade<sup>14</sup> e idade avançada.<sup>15</sup>

Em estudo com 541 pacientes com IC, Hogenhuis et al<sup>11</sup> mostraram que tanto os níveis séricos de hemoglobina quanto a taxa de filtração glomerular estiveram independentemente associados aos níveis de BNP e NT-proBNP. Inúmeros estudos avaliaram a relação entre níveis de BNP/NT-proBNP e função renal. Os achados de Tsutamoto et al<sup>12</sup> sugerem que a redução na taxa de filtração glomerular contribui para elevação de BNP, especialmente em

pacientes com taxa de filtração glomerular menor que 60 ml/min. McCullough et al<sup>13</sup> também demonstraram que alteração da função renal influencia no ponto de corte de BNP para o diagnóstico de IC.

Os níveis de BNP sofrem ainda influência da idade (níveis mais elevados em idosos), do gênero (níveis mais elevados nas mulheres)<sup>15</sup> e do índice de massa corporal (IMC) (níveis mais baixos em obesos). Em estudo realizado por Daniels et al,<sup>14</sup> sugere-se alteração dos pontos de corte de BNP para 170 pg/mL para o diagnóstico de IC em pacientes com peso normal; 110 pg/mL para pacientes obesos e 54 pg/mL para pacientes com obesidade grau 3.

Vale ainda ressaltar que níveis elevados de BNP e NT-proBNP não são patognomônicos do diagnóstico da IC. Embora o valor preditivo negativo tanto de BNP < 100 pg/mL quanto de NT-proBNP < 300 pg/mL sejam altos e, portanto, excelentes métodos para afastar o diagnóstico de IC, o valor preditivo positivo de ambos é menos robusto e só auxilia o clínico a afastar outras causas de dispnéia e definir o diagnóstico de IC quando BNP > 500 pg/mL e NT-proBNP > 900 pg/mL. A faixa intermediária é considerada zona cinzenta e não permite o diagnóstico de certeza de IC.<sup>16,17</sup>

Recentemente, novos imunoenaios que permitem a detecção de fragmentos estáveis de pró-hormônios como reflexo da liberação de hormônios maduros têm sido desenvolvidos. Neste contexto, a mensuração da região média do pró-hormônio do ANP (MR-proANP) pode ser realizada. Estudo recente, envolvendo 1641 pacientes, mostrou que o ponto de corte de MR-proANP de 120 pmol/L conferiu 97 % de sensibilidade e 59,9 % de especificidade para o diagnóstico de IC, além de forte correlação com BNP ( $r = 0,919$ ;  $p < 0,001$ ). A MR-proANP parece ter ainda papel relevante no diagnóstico de IC em situações de maior limitação no uso do BNP, tais como obesidade ou quando BNP encontra-se na zona cinzenta (entre 100 e 500 pg/mL), porém não há valor adicional do uso de MR-proANP em pacientes idosos ou com insuficiência renal.<sup>18</sup>

Assim, apesar do relevante papel dos peptídeos natriuréticos para o diagnóstico de IC ainda há limitações que servem de motivação para a busca de biomarcadores mais apropriados em situações específicas como, por exemplo, a proteína S100B, um biomarcador de injúria cerebral que foi isolado em miocárdio de ratos e apresenta níveis elevados em pacientes com IC quando comparados a indivíduos saudáveis, além de apresentar correlação positiva com NT-proBNP.<sup>19</sup> Os peptídeos natriuréticos são também os biomarcadores de prognóstico mais amplamente estudados até o presente momento. Entre pacientes com IC crônica, grandes estudos mostram que níveis elevados de BNP estão associados à maior morbidade e mortalidade<sup>20,21</sup> e que BNP é preditor independente de morte súbita.<sup>22</sup> Entre pacientes com IC admitidos na sala de emergência, níveis elevados de BNP estiveram associados à maior taxa de eventos (admissão hospitalar ou morte por todas as causas) em 90 dias em estudo envolvendo 464 pacientes com IC<sup>23</sup> e maior mortalidade cardiovascular em 1 ano em estudo envolvendo 91 pacientes com IC aguda.<sup>24</sup> Metanálise recente incluiu estudos que avaliaram o valor do BNP ou NT-proBNP na admissão hospitalar para predizer prognóstico. A conclusão da metanálise foi de que estes biomarcadores reduzem tempo de hospitalização, mas não afetam a mortalidade intra-hospitalar.<sup>25</sup>

O uso de BNP e NT-proBNP para guiar terapêutica também tem sido avaliado em diversos estudos, porém os resultados ainda são controversos.<sup>26,27</sup> Recentemente, duas metanálises sugeriram redução de mortalidade no grupo cujo tratamento foi guiado pelo BNP ou NT-proBNP.<sup>28,29</sup> No entanto, seus resultados não podem ser considerados definitivos uma vez que se baseiam apenas em dados sumarizados publicados de cada estudo e não em dados individuais dos pacientes envolvidos nos respectivos estudos.<sup>30</sup>

Diante das limitações já pontuadas e da persistente alta morbimortalidade da IC, nos últimos anos múltiplos biomarcadores de diagnóstico e prognóstico da IC têm sido descritos:<sup>7</sup> MR-proANP,<sup>18</sup> proteína S100B,<sup>19</sup> MR-proADM (*midregional-proadrenomedullin*),<sup>18,31</sup> NGAL (*neutrophil*

*gelatinase-associated lipocalin*),<sup>32,33</sup> coceptina,<sup>34,35</sup> troponina<sup>36</sup> e proteína ST2 solúvel.<sup>37</sup>

No entanto, devido à alta complexidade que envolve a fisiopatologia da doença, não há até o presente momento um biomarcador que, simultaneamente, reflita a avaliação clínica da IC e permita maior conhecimento sobre mecanismos fisiopatológicos da doença.

### 1.1.3 Racional da busca por novos biomarcadores

Os biomarcadores de IC atuais, em sua maioria, foram descobertos como extensão de estudos fisiológicos que investigaram vias conhecidas da doença. No entanto, o conhecimento de mecanismos moleculares de diferentes doenças é essencial no campo biomédico. Desta maneira, um biomarcador ideal deve permitir o reconhecimento inequívoco de mecanismos específicos da doença em questão.

Novas tecnologias, tais como a espectrometria de massas, que permite determinar peptídeos e metabólitos com alta precisão até mesmo em fluidos complexos, estão começando a possibilitar a caracterização sistemática de variações em genes, ácido ribonucléico, proteínas e metabólitos associados a doenças específicas. Estudos genéticos identificarão indubitavelmente variantes que podem ser os próprios biomarcadores ou que irão apontar marcadores circulantes para posterior exploração. No entanto, dentro deste novo conceito que envolve a descoberta de novos biomarcadores, maior atenção tem sido dada ao estudo de proteômica e metabolômica, pois estas tecnologias fornecem informações complementares sobre a complexidade do fenótipo de uma doença. A Figura 2 ilustra este processo.

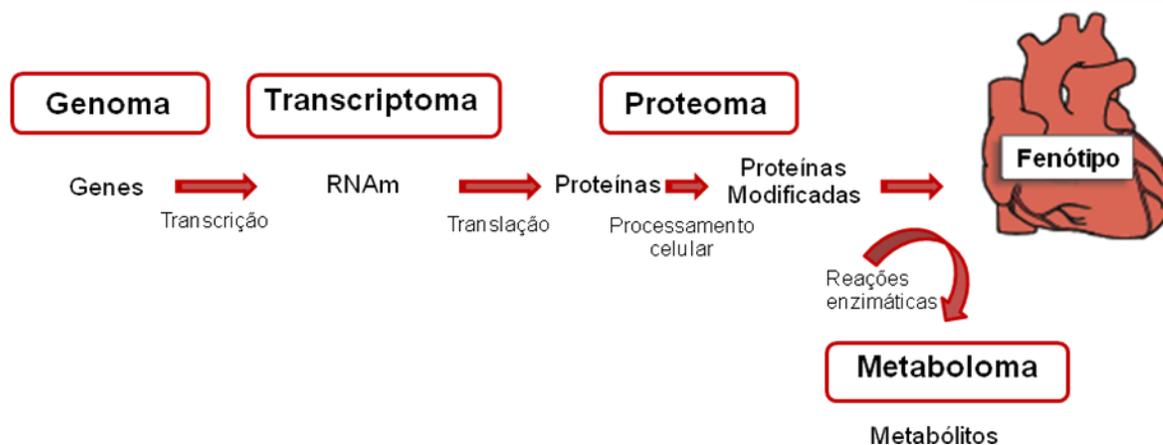


Figura 2 - Relação: genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma (Modificado de Gerszten et al, 2008)

A seqüência de proteínas e metabólitos em uma célula pode mudar rapidamente em resposta a alterações ambientais, assim proteoma (proteínas) e metaboloma (bioquímica – lípides, açúcares, nucleotídeos, aminoácidos ou aminas) refletem o estado de uma célula ou grupo de células em determinado momento.<sup>5</sup> Muitas das moléculas biologicamente relevantes para doenças em humanos são proteínas encontradas em baixas concentrações, cuja determinação exige técnicas específicas. A baixa sensibilidade e especificidade dos testes de determinação da maioria das proteínas humanas é a maior barreira técnica para a inclusão na prática clínica de novos biomarcadores.<sup>38</sup> Nos últimos cinco anos, a metabolômica (estudo de pequenas moléculas) passou de uma subárea pouco conhecida da química analítica para a principal descoberta praticada por centenas de laboratórios em todo o mundo. Recentes estudos sugerem que o metaboloma humano compreende cerca de 3000 moléculas e esforços têm sido feitos para catalogar todo o metaboloma humano.<sup>39,40</sup>

Este progresso tanto nos estudos de proteômica quanto de metabolômica deve-se aos avanços nas técnicas de espectroscopia por

ressonância e espectrometria de massas, que permitem hoje a identificação de centenas de metabólitos a partir de diferentes tipos de amostras biológicas e, conseqüentemente, a identificação de novos biomarcadores, a descoberta de novas drogas e etc. Quando combinado à genômica, transcriptômica e proteômica, o estudo do metaboloma pode ser útil na interpretação e compreensão de processos biológicos complexos.

Assim, a busca por novos biomarcadores da IC deve guiar-se pelo uso de novas tecnologias que permitam melhor entendimento da doença e, conseqüentemente, melhora no manejo clínico da mesma.

#### 1.1.4 Biomarcador ideal

A alta complexidade das alterações bioquímicas e neuro-hormonais envolvidas na fisiopatologia da IC claramente sugere que dificilmente um único biomarcador isolado será capaz de refletir todas as características desta doença. No entanto, para que um biomarcador seja útil na prática clínica, algumas características são necessárias. É preciso que o novo biomarcador:

- seja determinado de forma rápida e acurada, com custo razoável;
- forneça informações adicionais à avaliação clínica;
- forneça informações que permitam melhor entendimento da doença;
- seja elemento relevante para a decisão terapêutica.

## 1.2 Análise de ar exalado como método diagnóstico

Recentemente tem sido crescente o interesse na investigação dos pulmões de forma não invasiva incluindo a identificação de biomarcadores no ar

exalado como o óxido nítrico (NO) ou aqueles encontrados no condensado do ar exalado. Dados obtidos através de técnicas como a espectrometria de massas sugerem que o ar exalado contém cerca de 400 componentes, embora aproximadamente 30 tenham sido especificamente identificados. Os componentes mais comumente identificados no condensado do ar exalado são adenosina, amônia, acetona, peróxido de hidrogênio, isoprostanos, leucotrienos, óxidos nitrogenados, peptídeos, citocinas, prótons e vários íons.<sup>41</sup>

A análise do ar exalado tem sido considerada ferramenta promissora na avaliação de diferentes doenças por ter o potencial de responder às necessidades médicas de expandir o número de ensaios não invasivos para compreender os múltiplos mecanismos patológicos que envolvem doenças respiratórias e/ou sistêmicas.<sup>41,42</sup> No entanto, o estudo do ambiente inflamatório e químico das vias aéreas ainda é muito recente e apresenta questões não totalmente respondidas. Assim, aprimoramentos e modificações nas técnicas existentes precisam ser realizados para permitir a obtenção de métodos com maior sensibilidade e maior reprodutibilidade para detecção de determinado biomarcador.<sup>43,44,45</sup>

Segundo as recomendações da Sociedade Torácica Americana e da Sociedade Respiratória Européia,<sup>41</sup> a coleta do ar exalado é um método completamente não invasivo e as amostras do trato respiratório podem ser obtidas a partir de coletas feitas repetidas vezes com intervalos curtos de tempo entre as mesmas. Os coletores podem ser portáteis e usados em grande variedade de locais incluindo unidade de terapia intensiva, consultórios médicos e até em casa. A coleta do condensado do ar exalado não afeta as vias aéreas como ocorre em outros procedimentos mais invasivos usados na obtenção de amostras respiratórias e pode ser coletada com mínimo risco e inconveniência para os pacientes.<sup>46</sup> Estas atribuições fazem com que a coleta do ar exalado seja ferramenta útil tanto para investigações epidemiológicas quanto para auxiliar no entendimento do curso de tempo de processos patológicos importantes.

Devido à vasta diversidade do ar exalado propriamente dito, este método ainda não atingiu todo o potencial de sua aplicabilidade clínica. Como o número de investigadores estudando cada biomarcador ainda é relativamente pequeno, o processo para determinação da metodologia padrão para cada biomarcador específico é lento. No entanto, uma vez validada a metodologia específica para cada biomarcador, o uso do ar exalado pode contribuir muito para a prática clínica por fornecer informações extremamente úteis sobre aspectos críticos de determinada doença.

### 1.2.1 Análise de ar exalado em indivíduos saudáveis

O ar exalado de indivíduos saudáveis contém diferentes componentes que podem ser determinados por espectrometria de massas. O maior estudo realizado em indivíduos saudáveis avaliou o ar exalado de 30 voluntários sadios semanalmente por 6 meses. Os metabólitos mais freqüentemente encontrados nesta população foram amônia, acetona, metanol, etanol, propanol, acetaldeído e isopreno.<sup>47</sup> As concentrações de amônia podem aumentar com a idade, porém as concentrações de acetona não variam significativamente com a idade.<sup>48</sup>

No entanto, nem todos os metabólitos presentes no ar exalado se originam realmente do ar alveolar.<sup>49</sup> Estudo realizado por Wang et al<sup>50</sup> avaliou a concentração de diferentes substâncias no ar exalado de indivíduos saudáveis através de coleta via oral, via nasal e também o ar presente na cavidade oral diariamente durante 30 dias. As concentrações de acetona, metanol e isopreno no ar exalado quando coletado via oral ou via nasal não diferiram e, portanto, tais substâncias refletem a interface alveolar e são verdadeiramente sistêmicas. As concentrações de amônia, etanol e cianeto de hidrogênio foram muito menores quando a coleta foi nasal do que oral, além de apresentarem-se em

altas concentrações na cavidade oral e, portanto, não refletem liberação alveolar. Por fim, propanol, acetaldeído e formaldeído aparentemente têm origem tanto sistêmica quanto oral.

Vale ressaltar que as concentrações de diferentes componentes no ar exalado também podem sofrer influência da dieta, principalmente quando o componente avaliado é a acetona, que aumenta diante de dieta cetogênica ou pobre em carboidrato.<sup>51</sup>

### 1.2.2 Análise de ar exalado em doenças do trato respiratório

A análise de marcadores exalados permite a monitoração não invasiva de inflamação e estresse oxidativo em doenças do trato respiratório tais como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose cística, bronquiectasia e doença pulmonar intersticial. Diversos componentes voláteis já foram identificados no ar exalado (NO, monóxido de carbono e hidrocarbonos) e componentes não voláteis no condensado do ar exalado (proteínas, mediadores) de pacientes com doença do trato respiratório.<sup>52</sup>

A análise do ar exalado é especialmente importante em pacientes com asma e doença pulmonar obstrutiva crônica por permitir monitoração de futuras alterações de função pulmonar.<sup>53</sup> Em pacientes com fibrose cística, sugere-se que a presença de óxido nítrico está associada à maior gravidade da doença, assim como a presença de interferon gama, nitrito e 8-isoprostano no condensado do ar exalado destes pacientes.<sup>54</sup> Em pacientes submetidos ao transplante de pulmão, o ar exalado pode ter importante papel para monitoração de rejeição aguda. Em estudo com 44 transplantados, a presença de compostos sulfúricos no ar exalado esteve relacionada à rejeição aguda. A presença de acetona ou hidrocarbonos não conferiu maior risco de rejeição.<sup>55</sup>

### 1.2.3 Análise de ar exalado em doenças metabólicas

Os achados de alterações no ar exalado de pacientes com doenças metabólicas, particularmente *Diabetes mellitus*, são antigos. Em 1998, Nelson et al<sup>56</sup> mostraram correlação positiva entre o estado metabólico de crianças com diabetes e a concentração de acetona exalada. A concentração de acetona no ar exalado varia de 300 a 900 partes por bilhão (ppb) em indivíduos saudáveis, sendo maiores que 1 800 ppb em pacientes diabéticos. A detecção destas baixas concentrações requer sensores sensíveis e seletivos para acetona e para tanto se busca o desenvolvimento de dispositivos portáteis que permitam a detecção de acetona de forma rápida e eficaz.<sup>57</sup>

### 1.2.4 Análise de ar exalado em doenças cardiovasculares

Apesar do grande número de estudos que envolvem o uso do ar exalado como método diagnóstico em doenças respiratórias e metabólicas, poucos são os estudos que avaliaram o ar exalado em doenças cardíacas. Há relatos da presença acetona no ar exalado de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca imediatamente após o término do uso de circulação extracorpórea.<sup>58</sup> Embora os pacientes deste estudo apresentassem doenças cardiovasculares, o estresse do procedimento, assim como a circulação extracorpórea e o jejum prolongado poderiam ser os responsáveis pela alteração do metabolismo sistêmico e conseqüente aumento na produção de corpos cetônicos.

### 1.2.5 Análise de ar exalado na insuficiência cardíaca

Diferentemente das doenças respiratórias, o estudo do ar exalado na IC ainda não foi tão amplamente explorado. Dentre os componentes presentes no ar exalado destes pacientes destaca-se a determinação de NO. As concentrações de NO estão elevadas em pacientes com IC quando comparados a indivíduos saudáveis, e ainda mais elevados em episódios de descompensação da doença.<sup>59</sup> A presença de NO exalado parece refletir tanto a produção nas vias aéreas quanto em células endoteliais vasculares e apresenta correlação inversa com a resistência vascular pulmonar e sistêmica provavelmente devido aos seus efeitos vasodilatadores.<sup>60</sup> Assim, o NO exalado pode ser utilizado como uma medida facilmente obtida e quantificada da resposta à terapia na IC avançada.

Até o presente momento, a análise do condensado do ar exalado de pacientes com IC foi avaliada apenas por Kupari et al<sup>61</sup> que demonstraram que a concentração de acetona no ar exalado está elevada em pacientes com IC quando comparados a indivíduos saudáveis. Neste estudo, os autores sugerem que pacientes com IC apresentam predisposição à cetose e que a mesma está relacionada à congestão, vez que as concentrações de acetona foram mais elevadas entre os pacientes que apresentavam estase jugular. No entanto, o número de pacientes envolvidos no estudo foi pequeno, sendo que apenas 11 pacientes com sinais clínicos de congestão foram avaliados. Além disso, toda a coleta foi realizada após 12 horas de jejum e este fato pode ter interferido nos valores encontrados de acetona exalada.

Apesar de raros os estudos do ar exalado em pacientes com IC, seus resultados são interessantes por refletirem mecanismos fisiopatológicos da doença. Assim, a realização de estudos maiores e controlados que permitam confirmar achados prévios e ampliar o conhecimento sobre a perspectiva de

uso deste método não invasivo para diagnóstico e prognóstico desta síndrome clínica de alta morbimortalidade é mandatória.

Diante destas evidências da literatura<sup>61</sup> e a partir da observação clínica de que pacientes com IC exalam odor peculiar em vigência de descompensação da doença, ainda em estudo piloto, nós identificamos a presença de acetona no ar exalado de pacientes com IC, confirmando achados de Kupari et al.<sup>61</sup> Assim, considerando as limitações dos biomarcadores em IC disponíveis, a praticidade da coleta do ar exalado e a disseminação de novas tecnologias como a espectrometria de massas que permite a identificação de biomarcadores dos mecanismos fisiopatológicos da IC, nós desenvolvemos estudo visando avaliar a relevância clínica da acetona exalada para o diagnóstico de IC e de IC descompensada e suas implicações como biomarcador de gravidade de IC.

*Objetivos*

## **2 OBJETIVOS**

### 2.1 Primário

Analisar o ar exalado de pacientes com IC e avaliar o papel da acetona exalada como biomarcador do diagnóstico de IC compensada e descompensada.

### 2.2 Secundários

- Avaliar a correlação da acetona exalada com BNP plasmático;
- Avaliar a relação da acetona exalada com as diferentes classes funcionais da IC segundo a *New York Heart Association* (NYHA);
- Avaliar a capacidade da acetona exalada em diferenciar IC de acordo com o perfil hemodinâmico de apresentação na Unidade de Emergência;

*Casuística e  
Métodos*

### 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Pacientes com IC acompanhados no ambulatório de Insuficiência Cardíaca e Transplante do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC.FMUSP) foram avaliados no período de maio de 2009 a setembro de 2010 para inclusão no estudo. A inclusão e/ou exclusão dos pacientes respeitou os critérios abaixo descritos. Os pacientes incluídos foram comparados com indivíduos saudáveis pareados por idade. O estudo recebeu a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC.FMUSP sob número 1045/07.

#### Critérios de Inclusão:

- Pacientes com idade superior a 18 anos de ambos os sexos;
- Pacientes com cardiomiopatia dilatada e disfunção sistólica (diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo - DDVE  $\geq$  55 mm e fração de ejeção do ventrículo esquerdo - FEVE  $\leq$  40 %).
- Pacientes com sintomas de IC de acordo com critérios de Framingham:<sup>62</sup> presença simultânea de dois critérios maiores ou um critério maior e dois menores.

#### Critérios maiores:

- Dispneia paroxística noturna
- Estase jugular
- Estertores pulmonares
- Cardiomegalia (índice cardiotorácico  $>$  0,5)
- Edema agudo de pulmão
- Terceira bulha cardíaca
- Refluxo hepato-jugular
- Perda de peso  $\geq$  4,5 kg em 5 dias em resposta ao tratamento

Critérios menores:

- Edema bilateral de membros inferiores
- Tosse noturna
- Dispneia de esforço
- Hepatomegalia
- Derrame pleural
- Redução da capacidade funcional em um terço da máxima
- Taquicardia (frequência cardíaca - FC > 100 batimentos por minuto - bpm)

Critérios de exclusão:

- Pacientes portadores de *Diabetes mellitus*
- Pacientes portadores de doença hepática crônica
- Pacientes portadores de neoplasias ou doença do tecido conectivo
- Pacientes portadores de doença renal crônica conhecida previamente ao quadro de descompensação (creatinina  $\geq$  2,5 mg/dL e uréia  $\geq$  100 mg/dL e/ou clearance de creatinina  $\leq$  50 mL/kg/min)
- Gestantes
- Pacientes em uso crônico de corticóides
- Ausência de uso de betabloqueador

Pacientes portadores de doenças crônicas como as acima citadas, assim como pacientes em uso crônico de corticóide foram excluídos do estudo porque tais doenças e drogas podem interferir diretamente com o metabolismo de lipídios e, portanto, poderiam exercer forte influência sobre a produção de acetona. Os betabloqueadores também podem interferir neste metabolismo e,

por ser medicamento essencial para o tratamento da IC, optamos por incluir apenas pacientes já em uso de betabloqueador.

### **3.1 Desenho e população do estudo**

O estudo foi desenhado para ser realizado em três diferentes etapas conforme ilustrado na figura 3.

Primeiramente, analisamos a acetona exalada de pacientes com insuficiência cardíaca (grupo IC) e comparamos com indivíduos saudáveis (grupo CONTROLE). O grupo **IC** era composto por pacientes com o diagnóstico clínico de IC segundo critérios de Framingham<sup>62</sup> associado à presença de disfunção sistólica (FEVE  $\leq$  40 %). O grupo **CONTROLE** era composto por indivíduos sem doença cardíaca conhecida com função sistólica normal e sem qualquer doença aguda ou crônica, pareados por idade em relação ao grupo IC.

Em uma segunda etapa, os pacientes do grupo IC foram agrupados de acordo com seu perfil clínico em dois grupos: IC compensada (grupo ICCOMP) e IC descompensada (grupo ICDESCOMP). O grupo **ICCOMP** foi formado a partir de pacientes consecutivos encaminhados do ambulatório de IC para realização do teste cardiopulmonar e, portanto, com sintomas estáveis sem necessidade de internação por pelo menos três meses. O grupo **ICDESCOMP** foi formado por pacientes do ambulatório de IC admitidos consecutivamente na Unidade de Emergência Clínica do Instituto do Coração do HC.FMUSP.

Como objetivo secundário de nosso estudo, foi avaliada a capacidade da acetona presente no ar exalado de pacientes com IC descompensada em auxiliar no diagnóstico diferencial entre os perfis hemodinâmicos mais freqüentes na admissão hospitalar conforme descrito por Nohria et al.<sup>63</sup> Para isto os pacientes do grupo ICDESCOMP foram subdivididos em dois grupos: grupo **ICCONG** composto por pacientes com sinais de congestão, mas sem

sinais de hipoperfusão (perfil quente e congesto) e grupo **ICBXDB**, composto por pacientes com sinais de hipoperfusão associados a sinais de congestão (perfil frio e congesto). Para a inclusão nestes dois últimos grupos foi utilizada a presença de dois ou mais dos critérios abaixo descritos.

Sintomas/sinais de congestão (dois ou mais):

- dispnéia aos esforços;
- ortopnéia;
- dispnéia paroxística noturna;
- dispnéia de repouso;
- estertores pulmonares;
- sibilância;
- edema de membros inferiores;
- estase jugular;
- terceira bulha cardíaca
- sinais radiológicos de congestão como inversão de trama; opacidade basal; derrame pleural.

Sintomas/sinais de hipoperfusão (dois ou mais):

- hipotensão (pressão arterial sistólica - PAS  $\leq$  80 mm Hg);
- taquicardia;
- pulso filiforme;
- extremidades frias;
- tempo de enchimento capilar lentificado (TEC > 3 segundos);
- náuseas ou vômitos;
- inapetência;
- oligúria;

Os pacientes foram avaliados imediatamente após sua chegada ao hospital: pacientes com IC descompensada logo após sua admissão na sala de emergência e pacientes com IC compensada ou indivíduos do grupo controle foram avaliados no Laboratório de Insuficiência Cardíaca do InCor. Uma vez assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, todos os pacientes incluídos receberam dieta padronizada pelo estudo, que consistia em um copo de chá e três biscoitos, e foram submetidos à coleta de sangue para determinação de BNP, eletrólitos, função renal, perfil hepático, hemograma, lactato venoso, catecolaminas plasmáticas e urina tipo 1. Após a coleta de amostras sanguíneas, os pacientes foram submetidos à coleta de ar exalado, aproximadamente 60 minutos após a ingestão da dieta acima referida, a fim de evitar que os efeitos do jejum prolongado pudessem interferir em nossas análises.

Com relação ao delineamento, este foi um estudo transversal no que tange a avaliação da acetona exalada nos diferentes grupos acima descritos.

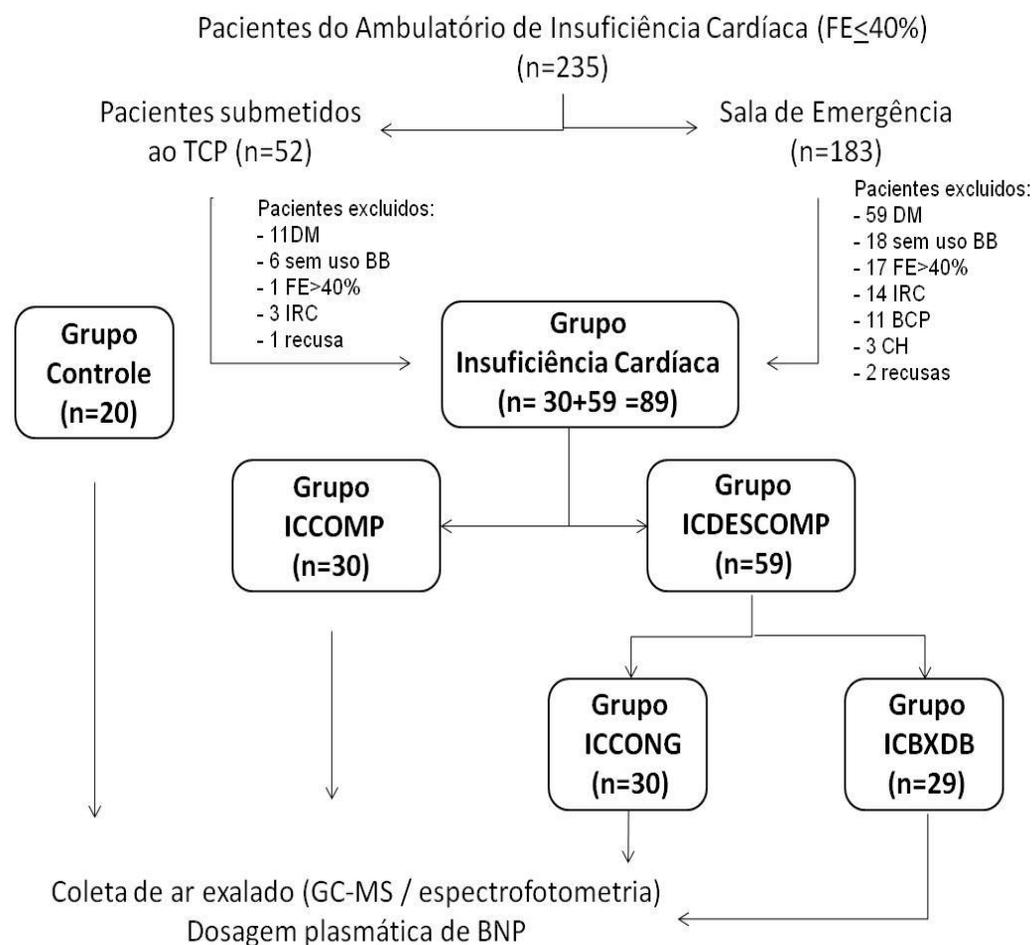


Figura 3 - Desenho do estudo

IC – insuficiência cardíaca; ICCOMP – insuficiência cardíaca compensada; ICDESCOMP – insuficiência cardíaca descompensada; ICCONG - insuficiência cardíaca com congestão; ICBXDB - insuficiência cardíaca com baixo débito; FE – fração ejeção; TCP – teste cardiopulmonar; IRC – insuficiência renal crônica; BB – betabloqueador; BCP – broncopneumonia; CH – cirrose hepática; GC-MS – cromatografia gasosa – espectrometria de massas; BNP – peptídeo natriurético atrial do tipo B.

### 3.2 Coleta do ar exalado

Para a coleta do ar exalado, foi desenvolvido inicialmente um dispositivo junto com o Laboratório de Bioengenharia do InCor com base na descrição de

aparelhos usados em outros trabalhos na literatura.<sup>61,64</sup> Tal dispositivo, ilustrado e descrito no anexo A, foi utilizado durante o estudo piloto. No entanto, observou-se dificuldade para os pacientes com IC descompensada respirarem continuamente por um dispositivo fechado por tempo prolongado. Além disso, a quantidade de amostra recolhida era diminuta (dificultando a análise posterior), vez que na região refrigerada do *impinger* ocorre condensação da pequena quantidade de vapor de água contida no ar exalado e de gases solúveis em água. Após vários aperfeiçoamentos do aparelho de amostragem realizados no Instituto de Química chegou-se a uma versão simples e eficiente do coletor.

O dispositivo de coleta, em sua versão final, utilizado durante todo o período de coleta de amostras de ar exalado, encontra-se ilustrado na figura 4 e é composto por um tubo de entrada (A) que conduz o ar exalado; um recipiente de vidro tipo *impinger* (B) contendo um difusor (C) submerso em água destilada (D), que aumenta o contato gás/água; um recipiente feito de plástico com um isolante térmico, preenchido com um banho de gelo/água (E) e uma bolsa plástica vazia e totalmente fechada (F) afora o tubo de entrada pelo qual é conectada ao ducto de saída do *impinger*, permitindo a coleta de um volume fixo de 7,6 litros de ar exalado. Para aumentar a eficiência de retenção da acetona, água destilada é acrescentada ao *impinger* antes do início da coleta (volume constante de 5 mL se mostrou apropriado) e o ar exalado é borbulhado no líquido com difusor poroso. Tira-se proveito, assim, da alta solubilidade da acetona na água e da elevada superfície de contato entre as bolhas e o líquido (comparado às paredes do *impinger*), minimizando, também, as perdas por volatilização na transferência posterior da amostra. Estudos realizados com gerador de gás de concentração padronizada de acetona alimentando dois coletores ligados em série mostraram que a eficiência da retenção de acetona na fase líquida é de 78 % para o coletor da figura 4.<sup>65</sup>

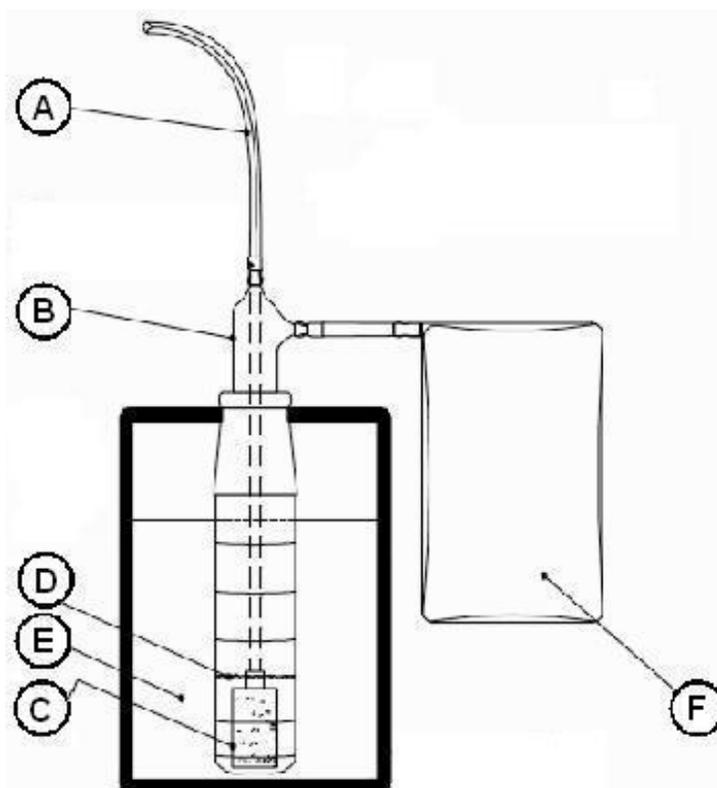


Figura 4 - Dispositivo de coleta do ar exalado. A – tubo de entrada do ar exalado; B – frasco de vidro (*impinger*); C – difusor; D – água destilada; E – banho de água e gelo; F – bolsa plástica vazia e totalmente fechada com volume fixo de 7,6 litros

Após a coleta, o líquido de amostragem é prontamente transferido para pequeno recipiente de vidro com tampa rosqueada. Para preservação da amostra até o momento da análise (por vezes, duas semanas), o congelamento a 80 °C negativos mostrou-se apropriado em termos da conservação do teor de acetona. A recuperação do teor de acetona após as etapas de congelamento, conservação a 80 °C negativos por períodos variáveis de 2 a 43 dias seguida de descongelamento foi de  $76 \pm 11$  %.<sup>65</sup> A análise das amostras teve seguimento por duas técnicas muito distintas e complementares. Para identificação das espécies químicas mais relevantes adicionadas ao ar exalado pelos pacientes com IC, recorreu-se à técnica de cromatografia gasosa

acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), dada sua potencialidade para separação, identificação e determinação semi-quantitativa de múltiplos constituintes nas amostras, com alta sensibilidade e seletividade.<sup>66,67</sup> Para a quantificação mais exata da concentração de acetona na solução aquosa coletada, recorreu-se à espectrofotometria de absorção. O método utilizado consiste em reagir acetona com salicilaldeído e medir a absorção de luz do produto colorido formado.<sup>68</sup>

### **3.3 Determinação por cromatografia gasosa e espectrometria de massas: análise química qualitativa**

Para a análise química das amostras coletadas, foi utilizada a GC-MS como técnica padrão para avaliação da composição do ar exalado. A figura 5 representa um diagrama esquemático do sistema GC-MS. Em diferentes estudos, este método mostrou-se eficaz na identificação de acetona exalada em pacientes diabéticos<sup>69</sup> ou ainda na determinação de acetona, amônia e propanol do material exalado por voluntários sadios.

#### **3.3.1 Cromatografia a Gás**

A cromatografia a gás<sup>66</sup> é um método físico de separação, no qual a amostra é eluída por uma corrente de gás inerte (fase móvel) através de uma coluna empacotada ou capilar (fase estacionária). A separação dos componentes da amostra se dá, de forma genérica, em função de sua maior ou menor afinidade pela fase estacionária ou móvel. Devido a sua simplicidade e efetividade para separar os componentes de misturas, a cromatografia a gás é

uma das técnicas mais importantes em análise química. É amplamente usada para análises de espécies químicas e para determinar constantes termoquímicas tais como calores de solução e vaporização, pressão de vapor e coeficientes de atividade. A cromatografia a gás é também usada para monitorar os processos industriais de forma automática: analisam-se as correntes de gás periodicamente e, com base nos resultados, realizam-se correções no processo de forma manual ou automática para compensar variações não desejadas. Muitas análises de rotina são realizadas rapidamente no campo medicinal e outros. Por exemplo, por meio do uso de apenas 0,1 cm<sup>3</sup> de sangue, é possível determinar as porcentagens de oxigênio dissolvido, nitrogênio, dióxido de carbono e monóxido de carbono. A cromatografia a gás é útil também na análise de contaminantes do ar, álcool no sangue e óleos essenciais.

A técnica consiste primeiramente na introdução da amostra - com prévia vaporização, se necessária - numa corrente de gás inerte, normalmente hélio, nitrogênio ou argônio, que atuarão como gás de arraste. O fluxo de gás passa pela coluna empacotada através da qual cada componente da amostra se desloca numa velocidade diferente, devido à interação de cada componente com a fase estacionária não volátil. As substâncias que têm a maior interação com a fase estacionária são retidas por mais tempo no sistema e, portanto, separadas daquelas de menor interação. À medida que as substâncias eluem da coluna, estas podem ser quantificadas por um detector e/ou tomadas para outra análise (figura 5).

Existem dois tipos de cromatografia a gás: cromatografia Gás - Sólido e cromatografia Gás - Líquido. A cromatografia Gás - Sólido se baseia na fase estacionária sólida, na qual a retenção das substâncias analisáveis é a consequência das diferenças na adsorção física. Na cromatografia Gás - Líquido a fase estacionária consiste em um filme de um líquido não volátil aplicado à parede interna de uma coluna capilar (ou sobre grãos de material inerte de enchimento da coluna). As diferenças na partição dos analitos entre a

fase gasosa (móvel) e a fase líquida (estacionária, podendo ser apolar, pouco polar ou fortemente polar). Estas diferenças no equilíbrio de partição permitem que os componentes da mistura se separem e apresentem tempos de retenção distintos do ponto de injeção na coluna até o detector.

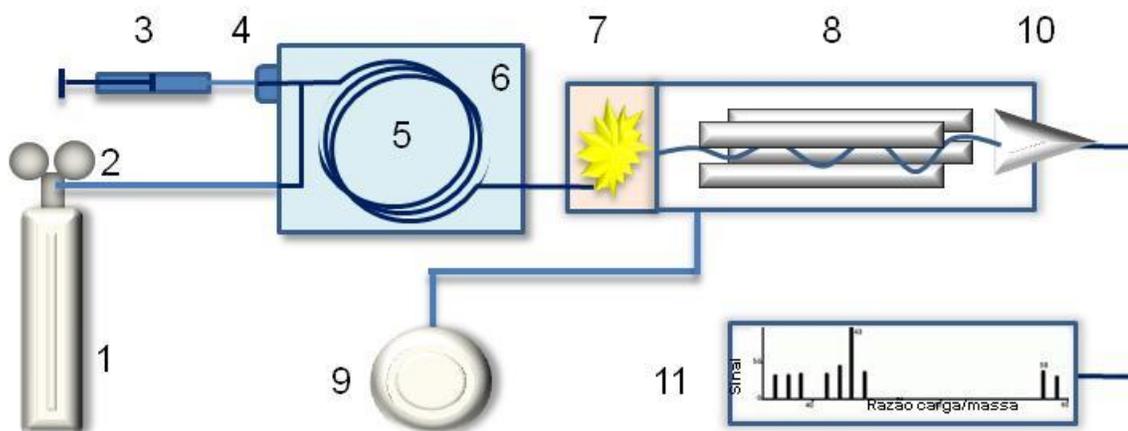


Figura 5 - Diagrama esquemático do sistema GC-MS. 1- Cilindro com gás de arraste; 2 – Ajuste de pressão e vazão; 3 – Seringa com amostra; 4 – Injetor; 5 – Coluna cromatográfica; 6 – Forno de coluna; 7 – Sistema de ionização; 8 – Analizador de massa quadrupolar; 9 – Bomba de vácuo; 10 – Detector de íons; 11 – Espectro de massas (para cada composto separado pela coluna, por exemplo acetona)

### 3.3.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas<sup>66,67</sup> é uma técnica analítica capaz de separar e detectar íons de acordo com sua relação massa-carga mediante desvio de sua trajetória numa câmara sob vácuo por aplicação de campos elétricos, em combinação ou não com campos magnéticos. As moléculas da amostra precisam ser ionizadas antes da introdução no espectrômetro, sendo que neste processo costuma ocorrer, também, fragmentação de moléculas.

Com base na relação massa-carga dos íons detectados, é possível, em geral, identificar as moléculas de origem, desde que não se trate de misturas complexas, caso em que a separação cromatográfica prévia se torna necessária. Existem diversos tipos de espectrômetros de massas, cada qual com suas características, resolução, custo e aplicações. Dentre os espectrômetros mais comuns cabe citar os espectrômetros quadrupolares baseados na aplicação de radiofrequência, sendo freqüentemente preferidos para detectores em cromatografia, por serem mais compactos e de custo menor (figura 5).

A espectrometria de massas pode proporcionar informação sobre a composição atômica e molecular de materiais inorgânicos e orgânicos, sendo útil também para a elucidação da estrutura de moléculas novas.<sup>66,67</sup>

O espectrômetro de massa convencional apresenta quatro partes básicas:

- um sistema de manipulação para introduzir a amostra desconhecida no equipamento, cujo interior é mantido sob vácuo;
- uma fonte de íons, que cria fragmentos gasosos da amostra;
- um analisador que separa os íons que são produzidos na fonte de acordo com as diferentes relações de massa-carga;
- um detector, no qual os íons separados são recolhidos e quantificados.

### 3.3.3. Determinação por GC-MS

A análise das amostras estudadas foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da USP, em cromatógrafo GC 17A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) com coluna de polietileno glicol, 30m x 0,25 mm (Carbowax GC-745R), acoplado a espectrômetro de massas QP5050A (Shimadzu Corporation,

Kyoto, Japan), utilizando ionização por impacto de elétrons. A figura 6 ilustra o GC-MS acima referido.



Figura 6 - Cromatógrafo a gás (GC 17A) acoplado à espectrômetro de massas (QP5050A)

Para a análise, a amostra é descongelada em temperatura ambiente e são injetados 5  $\mu$ L da solução aquosa no cromatógrafo a gás, nas seguintes configurações: injetor a 220 °C, fluxo de 4,9 mL/min, temperatura inicial da coluna 60 °C durante 3 minutos, rampa de aquecimento a 40 °C/min até atingir temperatura de 220 °C, na qual permanece em um patamar durante 10 minutos. O monitoramento dos íons formados era realizado por *Selected Ion Monitoring*, monitorando-se os fragmentos de relação massa/carga ( $m/z$ ) 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 58 e 59. Para estabelecimento do método de monitoramento

acima, foram realizados previamente injeções do *headspace* da fração líquida coletada no modo *Scan Mode*, sob as mesmas condições. Os dados obtidos pelo método cromatográfico foram analisados em um primeiro momento utilizando-se o *software* CLASS-GC5000 (Shimadzu, fornecido originalmente com o aparelho; representação típica gerada por este *software* é apresentada na figura 7) e posteriormente os dados foram decodificados e tratados numericamente em planilha tipo Microsoft Excel. A resposta do método foi avaliada por curva de calibração, com padrões recém-preparados de acetona em água deionizada, nas concentrações 0,0 (branco), 0,6; 1,3; 3,3; 6,5 e 32,7 mg/L.<sup>65</sup>

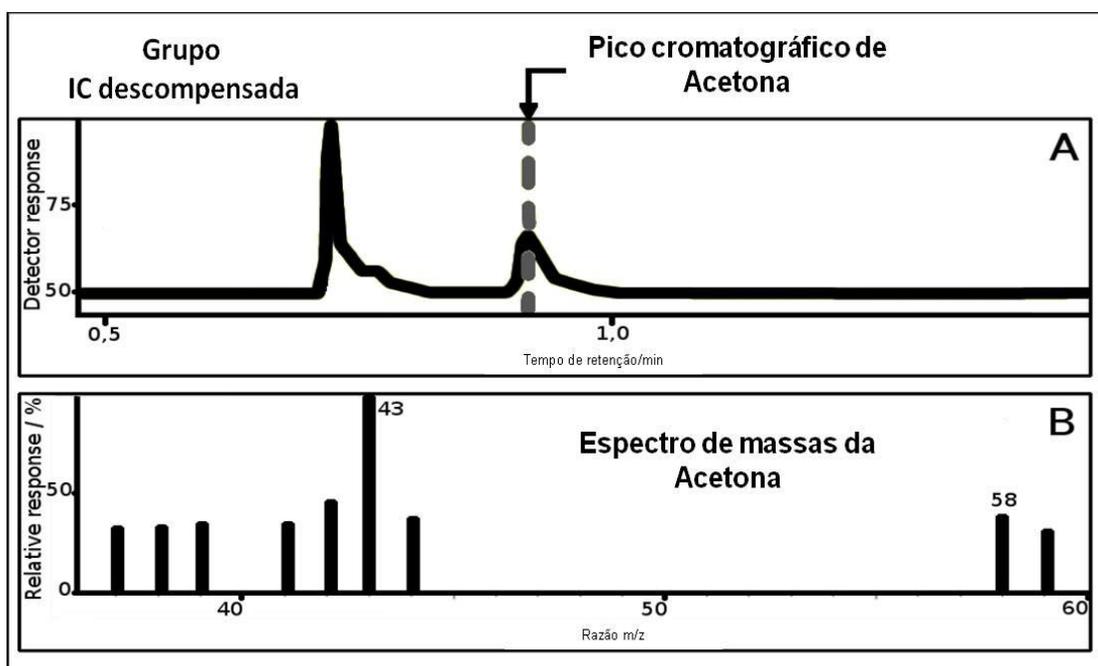


Figura 7 - Representação típica do cromatograma da amostra de ar exalado de um dos pacientes com insuficiência cardíaca descompensada, visualizado pelo software CLASS-GC5000. Painel A: Separação de componentes da amostra de acordo com a afinidade pela fase estacionária. Painel B: espectro de massa característico da acetona

Para melhorar a sensibilidade e a capacidade de quantificação de acetona por esta técnica, o método foi adaptado para a injeção direta da fração aquosa no GC-MS e monitoramento iônico por *Selected Ion Monitoring* dos íons  $m/z$  43 e 58, referentes à acetona. Os valores da integração dos picos correspondentes a acetona, em  $m/z$  43 e  $m/z$  58 mostraram-se proporcionais à concentração de acetona em padrões analisados, sendo que a quantificação se mostra de 4,2 vezes mais sensível quando realizada pelo íon  $m/z$  43.

### 3.4 Determinação espectrofotométrica: análise quantitativa

A acetona sofre condensação aldólica com solução aquosa de salicilaldeído em meio básico, gerando produto conforme figura 8.

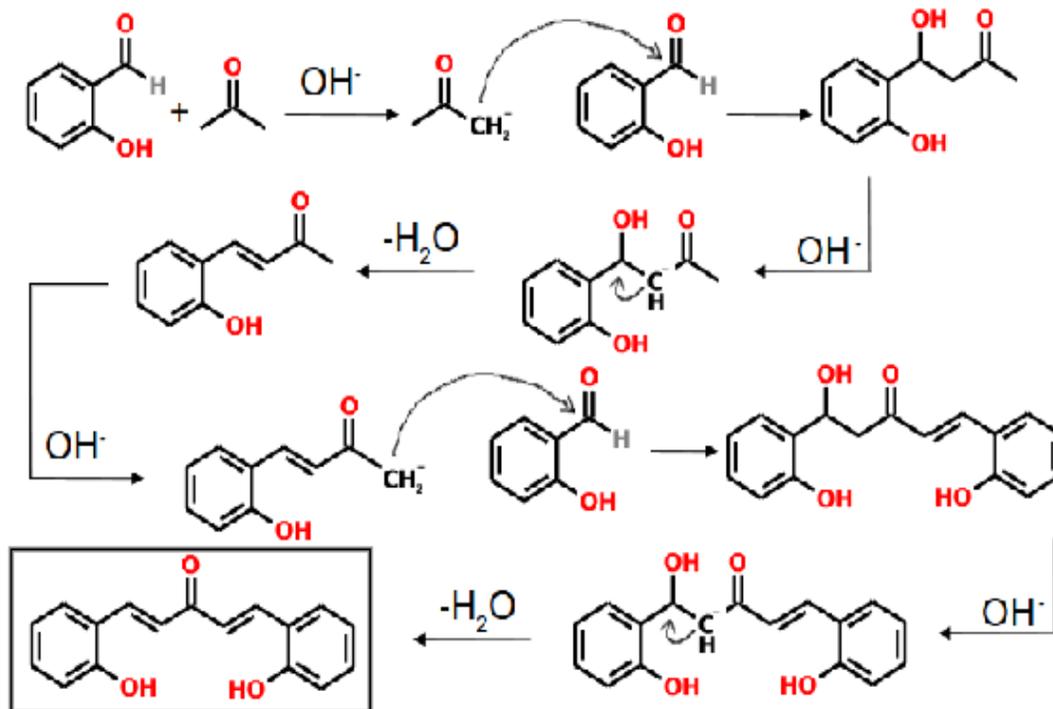


Figura 8 - Representação da reação de salicilaldeído com acetona em meio básico<sup>70</sup>

Esta reação é lenta, mas o produto apresenta coloração distinta do reagente, ensejando determinação colorimétrica ou fotométrica, sendo possível definir condições em que a absorbância devido ao produto guarde relação linear com a concentração de acetona (figura 9). Conforme estudo da literatura, não há interferência significativa de outros compostos usualmente presentes no ar exalado.<sup>70</sup>

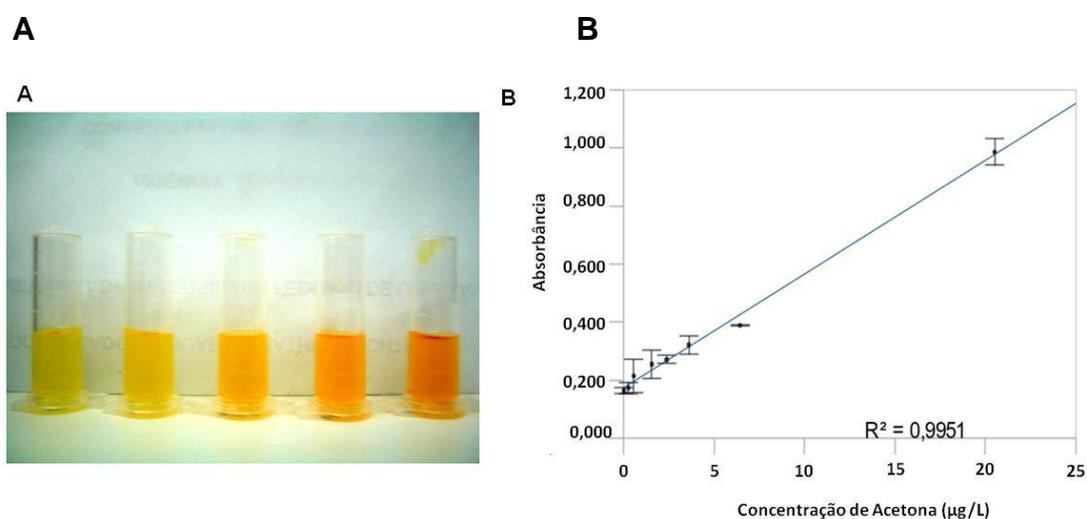


Figura 9 – Painel A: Coloração da solução após reação da acetona com o salicilaldeído. Concentrações de acetona: 0,0 (branco); 0,7; 1,7; 2,8 e 3,4mg/L. Painel B: Curva de calibração obtida por espectrofotometria a 474 nm, após 10h de reação.

Para a preparação do reagente, adiciona-se inicialmente 2 mL de hidróxido de sódio 10,6 mol/L em um balão de 50 mL cheio à metade com água deionizada. A este balão misturam-se 600 µL de salicilaldeído, seguidos de 20 mL da solução de hidróxido de sódio, completando-se com água deionizada.<sup>68</sup>

Na etapa de determinação, misturam-se 500 µL de reagente colorimétrico com 500 µL de amostra e aguarda-se um período de tempo pré-definido para que a reação se processe. Para estabelecer o melhor

comprimento de onda de trabalho, em termos de linearidade da resposta e precisão das medidas, amostras com concentrações conhecidas foram medidas em espectrofotômetro em uma faixa de 450 a 600 nm (a cada 2 nm). Comprimentos de onda inferiores a 450 nm não foram considerados por ser alta demais a absorbância ( $> 2,5$ ), mesmo na ausência de acetona (ou seja, no branco). Para tanto, utilizou-se espectrofotômetro do tipo *diode array* HP8452A. O comprimento de onda escolhido foi 474 nm.

Para medições rotineiras empregou-se espectrofotômetro 600 Plus da Femto, que apresenta resolução de 0,001 unidades de absorbância e ajuste manual de comprimento de onda, mantido fixo em 474 nm. A curva analítica (curva de calibração), representada na figura 9, foi construída com soluções de concentrações conhecidas obtidas por sucessivas diluições de acetona pura (Sigma-Aldrich, 99,5 %), na faixa de 0,3 a 30,0 mg/L. O reagente colorimétrico, bem como os padrões de acetona, foram sempre preparados imediatamente antes da realização das determinações.<sup>65</sup>

A reação da amostra com salicilaldeído se completa em 10 horas a 25 °C permitindo a quantificação de acetona sendo a absorbância estável pelo menos por 24 horas após o início da reação. Medidas mais rápidas para concentrações maiores de acetona ainda podem ser realizadas medindo-se a absorbância em tempo menor do que 10 horas.

O limite de detecção estimado para o referido método diagnóstico foi de 0,3 mg de acetona por litro de água ou 1,5 µg de acetona coletados em 5 mL de água contidos no *impinger* em que se faz a amostragem (figura 4). O correspondente limite de quantificação é de 1,0 mg/L.<sup>65</sup>

### 3.5 Tamanho amostral e análise estatística

Não existem estudos prévios comparando acetona exalada entre pacientes com IC compensada e descompensada ou com diferentes perfis hemodinâmicos (com congestão ou em baixo débito). Apenas um estudo<sup>61</sup> na literatura nos mostra dados de acetona exalada em pacientes com IC, porém foi utilizada amostra pequena e os valores foram expressos em mediana, não sendo possível o cálculo do tamanho amostral com base neste único estudo. Além disso, o estudo foi publicado em 1995 na era pré-betabloqueador o que dificulta a extrapolação dos resultados para atualidade. Assim, para o cálculo do tamanho amostral utilizamos dados de nosso estudo piloto e estimamos que 30 pacientes em cada grupo seria suficiente para atingir um poder de 80% com um erro de 5 % para atingir o objetivo primário.

Os pacientes do grupo IC foram comparados aos pacientes do grupo controle quanto às variáveis clínicas, laboratoriais e ecocardiográficas. Os pacientes dos grupos IC compensada e IC descompensada, assim como pacientes dos grupos IC com congestão e IC com hipoperfusão (em baixo débito), foram comparados quanto às variáveis clínicas, laboratoriais, ecocardiográficas e também quanto à etiologia da cardiomiopatia e ao tratamento medicamentoso recebido.

Os dados categóricos foram representados através de frequência absoluta (n) e frequência relativa (%) e para avaliar a associação entre as variáveis categóricas foi utilizado o teste de Qui-Quadrado de Pearson ou do teste exato de Fisher (quando pelo menos uma das frequências esperadas foi menor do que 5).

Os dados contínuos de cada variável foram inicialmente comparados com a curva normal através do teste de distância Kolmogorov-Smirnov e classificados em paramétricos e não paramétricos. Os dados paramétricos foram representados através de média e desvio padrão da amostra e os grupos

independentes comparados entre si através do teste t de *Student* para medidas não repetidas. Os dados não paramétricos foram representados através de mediana e variação interquartil, quartil inferior (percentil 25) e quartil superior (percentil 75) e os grupos independentes comparados entre si através do teste de Mann-Whitney. Para avaliar a correlação entre variáveis contínuas foi utilizada a correlação de Spearman. Para analisar diferenças das variáveis contínuas de acordo com a classificação da NYHA, nós utilizamos o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

Curvas ROC (*receiver-operator-characteristic*) foram construídas para acessar a sensibilidade e a especificidade do método diagnóstico. A área sob a curva (AUC) indica a acurácia diagnóstica do teste, sendo que  $AUC \geq 0,8$  significa boa acurácia.

Para acessar a influência das variáveis na concentração de acetona exalada nós realizamos análise univariada e valor de  $p < 0,10$  foi requerido para que as variáveis fossem incluídas na análise multivariada através da regressão linear múltipla.

Para avaliar a capacidade da acetona exalada e do BNP em predizer o diagnóstico de IC e IC descompensada, nós utilizamos o método de regressão logística.

Foi considerado para o estudo, risco alfa menor ou igual a 5 % de cometer erro tipo I e risco beta menor ou igual a 5 % de cometer erro tipo 2. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico SPSS (*Software Statistical Package for the Social Science*) for Windows versão 13.0.

*Resultados*

## 4 RESULTADOS

Entre maio de 2009 e setembro de 2010, foram avaliados para inclusão no estudo 235 pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Insuficiência Cardíaca do InCor, 183 pacientes admitidos na Unidade de Emergência e 52 pacientes estáveis encaminhados para a realização do teste cardiopulmonar. Dentre estes pacientes, 89 completaram os critérios para inclusão no estudo e compuseram o grupo IC. Trinta pacientes apresentavam-se com IC compensada (grupo ICCOMP) e 59 com IC descompensada (grupo ICDESCOMP), sendo 30 do grupo ICCONG e 29 do grupo ICBXDB. Foram selecionados para participar como controles, 20 pacientes pareados pela idade (figura 3).

Os motivos para exclusão do estudo foram: presença de *Diabetes mellitus* (n = 70); IC descompensada com FEVE > 40 % (n = 18); ausência de uso de betabloqueador (n = 24); insuficiência renal crônica - creatinina prévia maior que 2,5 mg/dL (n = 17); hepatopatia crônica (n = 3); recusa do paciente (n = 3) e infecção pulmonar (n = 11) (figura 3).

Nossos resultados confirmaram a presença de acetona ou propanona no ar exalado de pacientes com IC conforme dados do estudo piloto e dados apresentados por Kupari et al.<sup>61</sup> A figura 10 ilustra as fórmulas, estrutural e molecular da acetona.

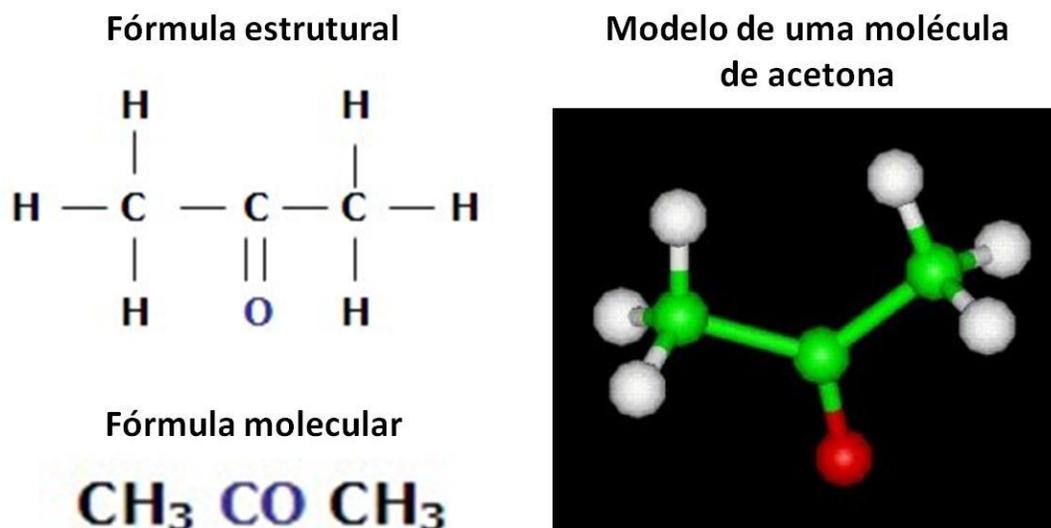


Figura 10 - Representação da acetona (propanona): modelo, fórmula estrutural e fórmula molecular

#### 4.1 Análise do grupo CONTROLE versus grupo IC

##### 4.1.1 Características gerais da população

As características gerais da população com IC e do grupo controle, assim como a comparação entre os grupos, encontram-se listadas na tabela 1.

No grupo controle, houve predomínio de voluntários do sexo feminino (55 %), raça branca (75 %), com mediana (intervalo interquartil) de idade 45,5 anos (43,3 – 55,5 anos) e de peso de 70 kg (63,8 – 77,7 kg). Não apresentavam doença cardíaca ou comorbidades, a mediana da FEVE foi de 65,5 % (65,0 – 69,8 %) e do DDVE foi 48,0 mm (44,2 – 50,0 mm). As variáveis clínicas e laboratoriais foram compatíveis com a normalidade.

No grupo IC, houve predomínio do sexo masculino (61,8 %) embora sem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Houve

predomínio da raça branca (57,3 %); a mediana de idade foi de 52 anos (44,5–61,0 anos) e de peso 65 kg (59,5–76,0 kg). A mediana da FEVE foi de 24 % (19,5–30,0 %) e do DDVE 67 mm (62,0–73,5 mm). Observamos odor peculiar em 50,6 % dos pacientes do grupo IC e em nenhum dos pacientes do grupo controle. Quanto às comorbidades, observou-se que 38,2 % do pacientes tinham hipertensão; 27 % dislipidemia; 18 % relatavam antecedente de infarto agudo do miocárdio (IAM) e 13,5 % acidente vascular cerebral (AVC) ou acidente isquêmico transitório (AIT). A etiologia predominante entre pacientes com IC foi cardiomiopatia chagásica (37,1 %), seguida de cardiomiopatia idiopática (22,5 %), hipertensiva (18 %), isquêmica (13,5 %) e outras (9 %). Quanto às variáveis clínicas a mediana da PAS foi 96 mm Hg (80 – 110 mm Hg), da pressão arterial diastólica (PAD) 70 mm Hg (60-70 mm Hg) e da FC foi 68 bpm (60–76 bpm). Quanto ao tratamento medicamentoso, 94 % dos pacientes usavam inibidores da enzima de conversão de angiotensina II (IECA) ou bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRA), 100 % betabloqueadores, 81 % diuréticos de alça, 69 % espironolactona, 37 % hidralazina e nitrato, 37 % digoxina e 19 % diuréticos tiazídicos.

Tabela 1 - Características gerais dos controles e pacientes com IC

Características	Controle (n=20)	IC (n=89)	p
Sexo Masculino n(%)	9 (45,0)	55 (61,8)	0,168
Raça Branca n(%)	15 (75,0)	51 (57,3)	0,143
Idade (anos)	45,5 (43,3 - 55,5)	52 (44,5 - 61,0)	0,133
Peso (kg)	70,0 (63,8 - 77,7)	65,0 (59,5 - 76,0)	0,216
Antecedentes n(%)			
HAS	0(0)	34 (38,2)	0,001
DLP	4(20)	24 (27,0)	0,519
IAM	0(0)	16 (18,0)	0,040
AVC/AIT	0(0)	12 (13,5)	0,220
Anemia	0(0)	4 (4,5)	0,334
Tabagismo	4(20)	2 (2,2)	0,002
Ritmo Sinusal n(%)	20 (100)	55 (61,8)	0,038
Odor peculiar n(%)	0(0)	45(50,6)	<0,001
Exame físico			
PAS (mmHg)	110 (110 - 128)	96 (80 - 110)	<0,001
PAD (mmHg)	70 (70 - 80)	70 (60 - 70)	0,018
FC (bpm)	75 (70 - 80)	68 (60 - 77)	0,005
FR (irm)	16 (14 - 16)	22 (18 - 28)	<0,001
Saturação O <sub>2</sub> (%)	94,5 (94,0 - 95,8)	95 (94 - 96)	0,682
Ecodopplercardiograma			
FEVE (%)	65,5 (65,0 - 69,8)	24,0 (19,5 - 30,0)	<0,001
DDVE (mm)	48,0 (44,2 - 50,0)	67 (62 - 73,5)	<0,001
Disfunção Diastólica n(%)	4(20)	42 (47,2)	0,026
Disfunção de VD n(%)	0(0)	55 (61,8)	<0,001
Laboratório			
Hemoglobina (g/dl)	14,3 (13,2 - 15,2)	13,1 (12,1 - 14,3)	0,004
Uréia (mg/dl)	31,5 (24,0 - 39,0)	51,0 (37,0 - 74,0)	<0,001
Creatinina (mg/dl)	0,80 (0,70 - 1,05)	1,22 (0,97 - 1,58)	<0,001
Sódio sérico (mEq/L)	139 (138 - 140)	138 (136 - 140)	0,104
Potássio (mg/dl)	4,2 (4,0 - 4,4)	4,4 (4,0 - 4,8)	0,211
Glicemia (mg%)	92,0 (82,8 - 97,8)	92,0 (85,0 - 99,0)	0,802
TGO (U/l)	21,5 (19,0 - 25,8)	30,0 (21,5 - 44,5)	0,005
TGP (U/l)	39,0 (32,5 - 45,3)	41,0 (33,0 - 54,0)	0,349
Fosfatase alcalina (U/l)	85,0 (62,0 - 98,5)	110,0 (86,0 - 167,0)	<0,001
Gama GT (U/l)	31,5 (26,2 - 54,2)	129,0 (62,0 - 230,5)	<0,001
Bilirrubinas (mg/dl)	0,48 (0,40 - 0,58)	0,94 (0,58 - 1,60)	<0,001
Lactato (mg/dL)	15 (10 - 18)	17 (13 - 25)	0,023
Catecolaminas (pg/ml)	220,5 (179,3 - 321,3)	703,0 (446 - 1237)	<0,001

Variáveis contínuas foram expressas em mediana (variação interquartil; percentil 25 - percentil 75).

IC - insuficiência cardíaca; IMC - índice de massa corporal; HAS - hipertensão arterial sistêmica; DLP - dislipidemia; IAM - infarto agudo do miocárdio; AVC - acidente vascular cerebral; AIT - acidente isquêmico transitório; PAS - pressão arterial sistólica; PAD - pressão arterial diastólica; FC - frequência cardíaca; FR - frequência respiratória; FEVE - fração de ejeção de ventrículo esquerdo; DDVE - diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; VD - ventrículo direito; TGO - transaminase glutâmico oxalacética; TGP transaminase glutâmico pirúvica; Gama GT - gama glutamyl transferase.

## 4.1.2 Determinação acetona exalada por GC-MS

As figuras, 11 e 12, exemplificam os resultados da análise por GC-MS de um indivíduo do grupo CONTROLE e outro do grupo IC, respectivamente. No painel A, encontra-se o pico cromatográfico (intensidade) da substância detectada. No painel B, encontramos o peso molecular do componente sinalizado no painel A (acetona).

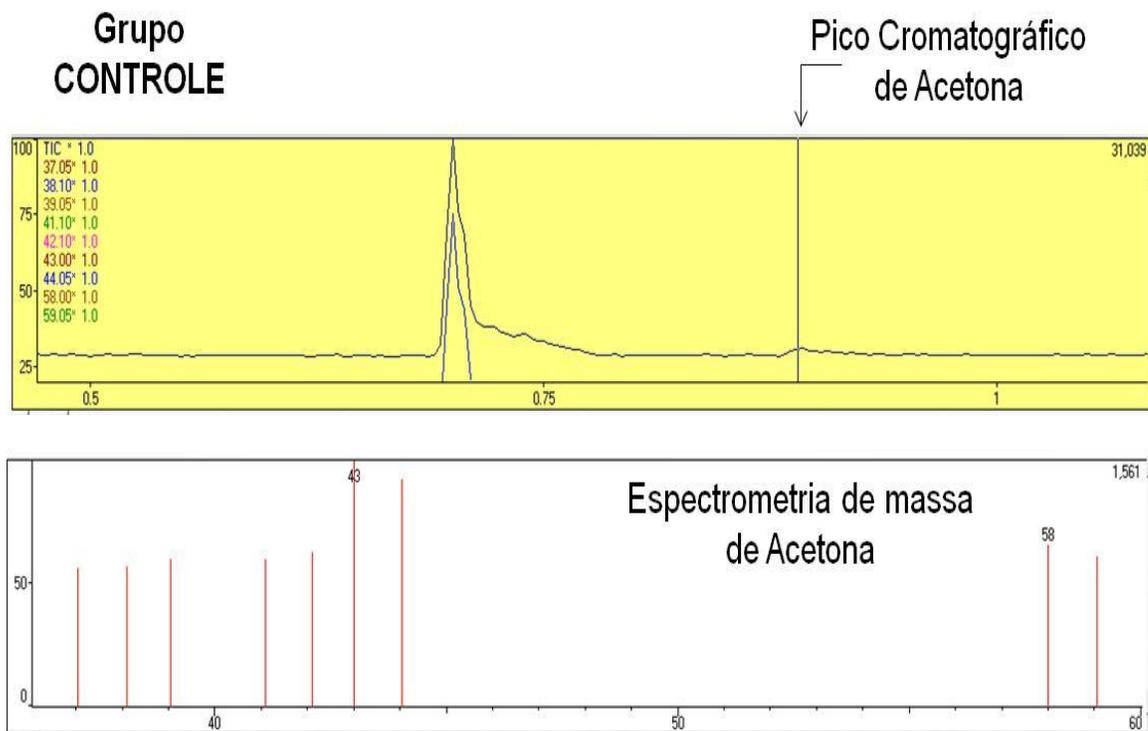


Figura 11 - Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de um indivíduo do grupo controle. O painel superior indica a separação dos componentes da amostra e o painel inferior o espectro de massas da acetona que produziu o pico cromatográfico observado no painel superior

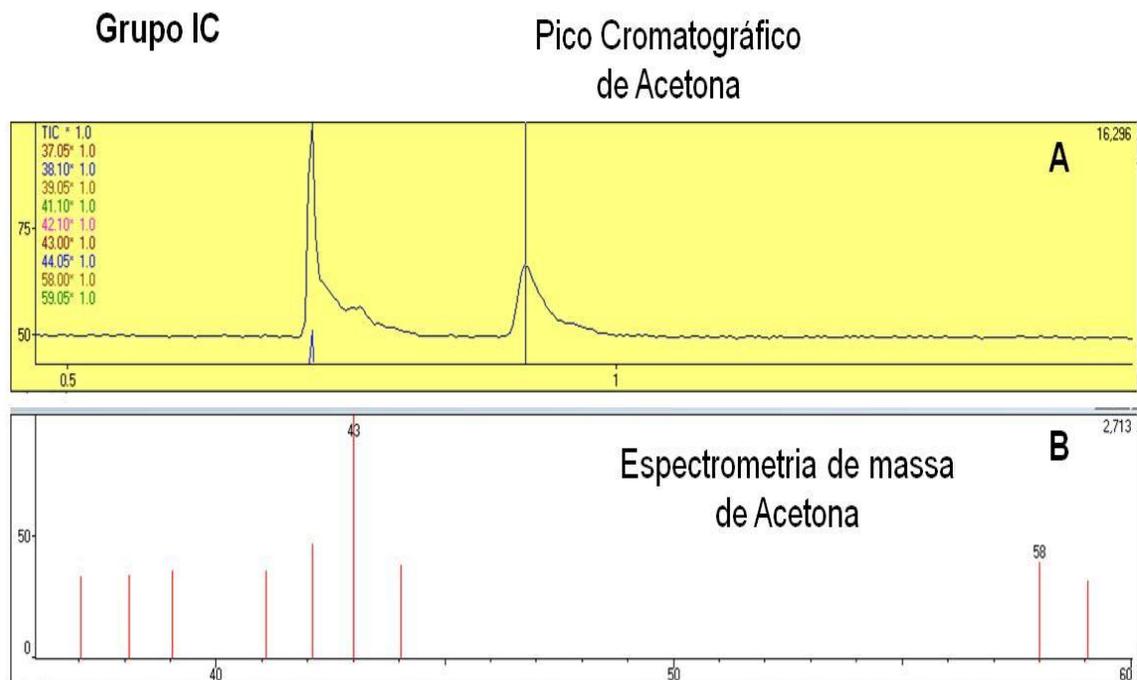


Figura 12 - Cromatografia gasosa-espectrometria de massas (GC-MS) de um paciente do grupo IC. O painel superior indica a separação dos componentes da amostra e o painel inferior o espectro de massas da acetona que produziu o pico cromatográfico observado no painel superior

#### 4.1.3 Determinação acetona exalada por Espectrofotometria

O produto da reação da amostra de ar exalado com salicilaldeído foi submetido à leitura espectrofotométrica e os valores de absorvância encontrados para cada amostra foram comparados com os das concentrações de acetona da solução padrão, utilizando-se a curva de calibração analítica de acetona, ilustrada na figura 9.

Através do teste de Kolmogorov-Smirnov, observamos que os valores de acetona exalada, assim como os de BNP, apresentam distribuição assimétrica

e, portanto, suas concentrações foram representadas através de mediana e intervalo interquartil.

A concentração mediana de acetona exalada no grupo IC foi 3,70 µg/L (1,69 -10,45 µg/L) e no grupo controle 0,39 µg/L (0,30-0,79 µg/L), apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) conforme representado no gráfico 1. A concentração mediana de BNP sérico no grupo IC foi 997,0 pg/mL (329,0–2059,0 µg/L) e no grupo controle de 9,5 pg/mL (4,5-13,5 pg/mL), apresentando também diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) conforme representado no gráfico 2.

Gráfico 1 - Concentração de Acetona exalada nos grupos controle e insuficiência cardíaca

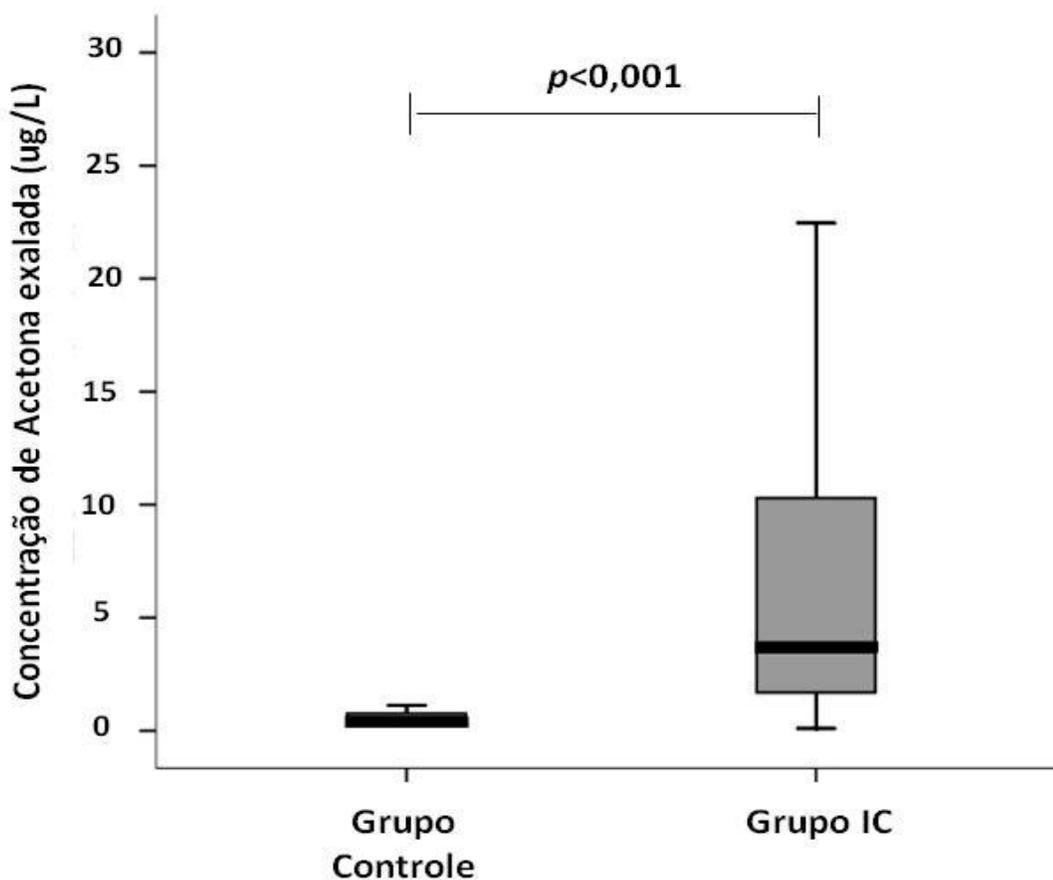
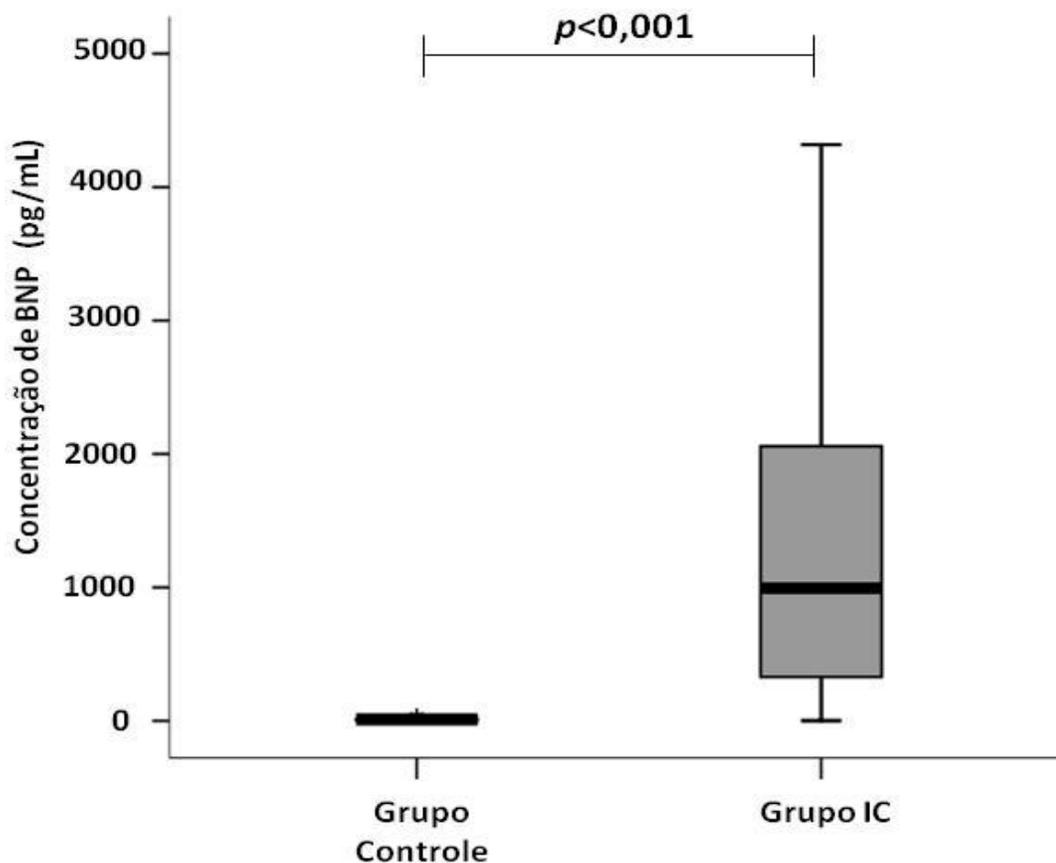


Gráfico 2 - Concentração de BNP plasmático nos grupos controle e insuficiência cardíaca



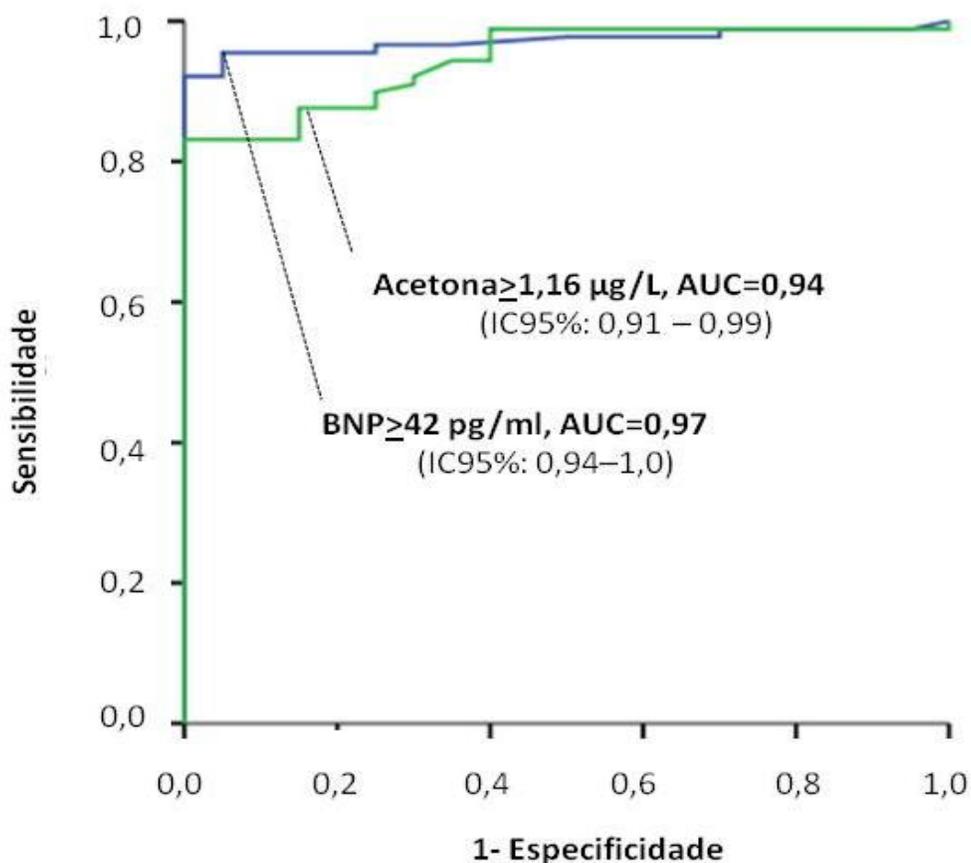
IC – insuficiência cardíaca; BNP – peptídeo natriurético do tipo B

A capacidade da concentração de acetona exalada diferenciar pacientes com IC de indivíduos saudáveis, sem disfunção ventricular sistólica, foi avaliada através da análise da curva ROC (gráfico 3). A quantificação da acetona exalada apresentou boa acurácia diagnóstica para diferenciação entre pacientes com IC e indivíduos controles (área sob a curva = 0,94, com intervalo de confiança 95 % IC95 % = 0,91–0,99). O melhor ponto de corte de acetona exalada, encontrado através da curva ROC, para o diagnóstico de IC foi de 1,16

$\mu\text{g/L}$ . Este valor de corte conferiu sensibilidade de 83 %, especificidade de 100 % e acurácia de 86 % para o diagnóstico de IC (tabela 4).

Avaliamos também a capacidade diagnóstica da dosagem de BNP para definir IC nesta população e observamos boa acurácia diagnóstica (área sob a curva = 0,97, IC95% = 0,94–1,00) (gráfico 3). O melhor ponto de corte de BNP encontrado em nossa população para diferenciar IC foi de 42  $\text{pg/mL}$ , conferindo sensibilidade de 92 %, especificidade de 100 % e acurácia de 94 % para o diagnóstico de IC.

Gráfico 3 - Curvas ROC de Acetona exalada e BNP plasmático para o diagnóstico de IC



BNP - Peptídeo natriurético do tipo B; IC95 % - intervalo de confiança 95%; AUC - área sob a curva

Observamos ainda que valores de acetona exalada maiores que 1,16 µg/L foram capazes de predizer o diagnóstico de IC em 86,2 % dos casos e que valores de BNP maiores que 42 pg/mL identificaram 93,6 % dos casos. Quando considerados simultaneamente no modelo de regressão logística foi possível predizer o diagnóstico de IC em 95,4 % dos casos.

## **4.2 Análise do grupo ICCOMP versus ICDESCOMP**

### 4.2.1 Características gerais da população

Para avaliar se a dosagem de acetona no ar exalado poderia ser um marcador de descompensação da IC foram avaliados, separadamente, os pacientes com IC.

As características gerais desta população (IC compensada e IC descompensada) encontram-se listadas e comparadas na tabela 2, assim como as características ecocardiográficas, laboratoriais e as medicações utilizadas por cada grupo encontram-se na tabela 3.

No grupo IC compensada, o sexo masculino (63,3 %) e a raça branca (60 %) foram mais freqüentes, a mediana (intervalo interquartil) da idade foi de 48,5 anos (42,0–56,5 anos) e do peso foi de 70 kg (62,5–80,4 kg). A etiologia predominante foi a cardiomiopatia idiopática (40 %), seguida da hipertensiva (30 %) e das cardiomiopatias chagásica (13,3 %), isquêmica (13,3 %) e outras (3,3 %). Quanto às comorbidades, observou-se que 36,7 % dos pacientes tinham hipertensão; 26,7 % dislipidemia; 13,3 % relatavam antecedente de IAM e 10% de AVC. A mediana da PAS foi 100 mm Hg (90–110 mm Hg), de PAD 70 mm Hg (60-70 mm Hg), de FC 68 bpm (60–70 bpm) e de freqüência respiratória (FR) 16 irm (14–18 irm). A mediana da FEVE foi de 25,5 % (20,0–31,3 %) e do DDVE 65,5 mm (60,8-74,3 mm). Observamos odor peculiar em 76,3 % dos pacientes do grupo IC descompensada e em nenhum dos pacientes com IC

compensada ( $p < 0,001$ ). Quanto às variáveis laboratoriais, vale destacar valores medianos de hemoglobina 13,4 g/dL (12,6–14,7 g/dL), uréia 38,5 mg/dL (30,8–51,3 mg/dL), creatinina 1,02 mg/dL (0,92–1,15 mg/dL), transaminase glutâmico oxalacética (TGO) 23,5 mg/dL (20,5–31,8 mg/dL), enzimas canaliculares como fosfatase alcalina 84,5 U/L (70,8–98,5 U/L) e gama glutamil transferase (GGT) 51,0 U/L (37,0–91,0 U/L), bilirrubinas 0,55 mg/dL (0,41–0,90 mg/dL) e catecolaminas plasmáticas 462,5 pg/mL (362,3–533,8 pg/mL). Por fim, em relação ao tratamento da IC os pacientes do grupo ICCOMP estavam bem medicados: 100 % em uso de betabloqueador; 96,7 % em uso de IECA ou BRA e 76,7 % em uso de espironolactona.

No grupo IC descompensada também houve predomínio de pacientes do sexo masculino (61 %) e da raça branca (55,9 %). A mediana da idade foi de 52 anos (46–63 anos) e do peso 65,0 kg (55,0–70,5 kg). Diferentemente do grupo compensado ( $p = 0,001$ ), a etiologia predominante entre os pacientes do grupo ICDESCOMP foi a chagásica (49,2 %), seguida das cardiomiopatias idiopática (13,5 %), isquêmica (13,5 %), hipertensiva (11,9 %) e outras (11,9 %). Quanto às variáveis clínicas, a mediana da PAS foi de 90 mm Hg (80–100 mm Hg), da PAD 60 mm Hg (50–75 mm Hg) da FC 68 bpm (60–80 bpm) e da FR 26 irm (22–28 irm). Observa-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à PAS ( $p = 0,002$ ) e à FR ( $p < 0,001$ ). A mediana do DDVE foi 67 mm (62–74 mm), semelhante ao grupo ICCOMP ( $p = 0,869$ ). No entanto, a FEVE foi discretamente menor 23 % (17–29 %),  $p = 0,040$ . Quanto às variáveis laboratoriais, observamos diferença entre os grupos em relação aos níveis de uréia 63 mg/dL (43–82 mg/dL), creatinina 1,34 mg/dL (1,04–1,75 mg/dL), fosfatase alcalina 140 U/L (103–183 U/L), GGT 173 U/L (117–296 U/L), bilirrubinas 1,29 mg/dL (0,81–1,96 mmol/L) e catecolaminas 984 pg/mL (582–1750 pg/mL) e hemoglobina 12,9 g/dl (12,0–13,8 /dL). Em relação ao tratamento farmacológico, os pacientes do grupo ICDESCOMP também estavam bem medicados: 100 % em uso de betabloqueador; 93,2 % em uso de IECA ou BRA e 64,4 % em uso de espironolactona.

Tabela 2 - Características gerais dos pacientes com IC compensada e IC descompensada

<b>Características</b>	<b>ICCOMP (n=30)</b>	<b>IC DESCOMP (n=59)</b>	<b>p</b>
Sexo Masculino n(%)	19 (63,3)	36 (61,0)	0,832
Raça Branca n(%)	18 (60,0)	33 (55,9)	0,714
Idade (anos)	48,5 (42,0 – 56,5)	52,0 (46,0 – 63,0)	0,104
Peso (g)	70,0 (62,5 – 80,4)	65,0 (55,0 – 70,5)	0,097
IMC	24,8 (22,5 – 27,8)	20,8 (23,3 – 25,9)	0,084
Etiologia n(%)			0,001
Isquêmico	4 (13,3)	8 (13,5)	
Chagásico	4 (13,3)	29 (49,2)	
Hipertensivo	9 (30,0)	7 (11,9)	
Idiopático	12 (40,0)	8 (13,5)	
Outras	1 (3,4)	7 (11,9)	
Classe Funcional n(%)			<0,001
1/2	20 (66,7)	0 (0)	
3	10 (33,3)	29 (49,2)	
4	0 (0)	30 (50,8)	
Perfil Hemodinâmico			<0,001
A	30 (100)	0 (0,0)	
B	0 (0,0)	30 (50,8)	
C	0 (0,0)	29 (49,2)	
Antecedentes n(%)			
HAS	11 (36,7)	23 (39,0)	0,832
DLP	8 (26,7)	16 (27,1)	0,964
IAM	4 (13,3)	12 (20,3)	0,416
AVC	3 (10,0)	9 (15,3)	0,493
Anemia	0 (0,0)	4 (6,8)	0,144
Tabagismo	1 (3,3)	1 (1,7)	0,662
Odor peculiar n(%)	0 (0,0)	45 (76,3)	<0,001
Exame físico			
PAS (mm Hg)	100 (90 – 110)	90 (80 – 100)	0,002
PAD (mm Hg)	70 (60 – 70)	60 (50 – 75)	0,275
FC (bpm)	68 (60 – 70)	68 (60 – 80)	0,111
FR (irm)	16 (14 – 18)	26 (22 – 28)	<0,001
Saturação O <sub>2</sub> (%)	95 (94 – 96)	95 (94 – 96)	0,229

Variáveis contínuas foram expressas em mediana (percentil 25 – percentil 75).

ICCOMP – insuficiência cardíaca compensada; ICDESCOMP – insuficiência cardíaca descompensada; IMC – índice de massa corporal; HAS – hipertensão arterial sistêmica; DM – diabetes mellitus; DLP – dislipidemia; IAM – infarto agudo do miocárdio; AVC – acidente vascular cerebral; DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica; IRC – insuficiência renal crônica; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; FC – frequência cardíaca; FR – frequência respiratória.

Tabela 3 - Características ecocardiográficas, laboratoriais e medicações em uso dos pacientes com IC compensada e IC descompensada

Características	ICCOMP (n=30)	IC DESCOMP (n=59)	p
Ritmo Sinusal n(%)	21 (70,0)	34 (57,6)	0,576
Ecocardiograma			
FEVE (%)	25,5 (20,0 – 31,3)	23,0 (17,0 – 29,0)	0,040
DDVE (mm)	65,5 (60,8 – 74,3)	67,0 (62,0 – 74,0)	0,869
Disfunção Diastólica n(%)	22 (73,3)	20 (33,9)	<0,001
Disfunção de VD n(%)	14 (46,7)	41 (69,5)	0,036
Laboratório			
Hemoglobina (g/dL)	13,4 (12,6 – 14,7)	12,9 (12,0 – 13,8)	0,038
Hematócrito (%)	41,0 (38,8 – 44,0)	39,0 (37,0 – 43,0)	0,108
Uréia (mg/dL)	38,5 (30,0 – 51,0)	63,0 (43,0 – 82,0)	<0,001
Creatinina (mg/dL)	1,02 (0,92 – 1,15)	1,34 (1,04 – 1,75)	0,001
Sódio sérico (mEq/L)	138,0 (136,8 – 139,3)	138,0 (136,0 – 140,0)	0,976
Potássio (mg/dL)	4,3 (3,9 – 4,7)	4,5 (4,0 – 4,8)	0,617
Glicemia (mg%)	94,5 (86,5 – 97,3)	89,0 (84,0 – 99,0)	0,373
TGO (U/L)	23,5 (20,5 – 31,8)	32,0 (24,0 – 57,0)	0,001
TGP (U/L)	41,0 (34,8 – 50,5)	41,0 (33,0 – 60,0)	0,955
Fosfatase alcalina (U/L)	84,5 (70,8 – 98,5)	140,0 (103,0 – 183,0)	<0,001
GGT (U/L)	51,0 (37,0 – 91,0)	173,0 (117,0 – 296,0)	<0,001
Bilirrubinas (mg/dL)	0,55 (0,41 – 0,90)	1,29 (0,81 – 1,96)	<0,001
Lactato (mmol/l)	14,0 (10,0 -21,0)	19,0 (15,0 – 27,0)	0,002
Catecolaminas (pg/mL)	462,5 (362,3 – 533,8)	984,0 (582,0 – 1750,0)	<0,001
Drogas n(%)			
IECA	22(73,3)	49(83,1)	0,281
BRA	7(23,3)	6(10,2)	0,096
IECA/BRA	29(96,7)	55(93,2)	0,504
Beta-bloqueador	30(100)	59(100)	1
Espironolactona	23(76,7)	38(64,4)	0,239
Diurético de Alça	20(66,7)	52(88,1)	0,015
Diurético tiazídico	5(16,7)	12(20,3)	0,677
Hidralazina/Nitrato	12(40)	21(36,2)	0,728
Digoxina	14(46,7)	19(32,2)	0,182
Amiodarona	3(10,0)	9(15,3)	0,493
Aspirina	5(16,7)	24(40,7)	0,022
Estatina	6(20,0)	13(22,0)	0,825

Variáveis contínuas foram expressas em mediana (percentil 25 – percentil 75).

ICCOMP – insuficiência cardíaca compensada; ICDESCOMP – insuficiência cardíaca descompensada; FEVE – fração de ejeção de ventrículo esquerdo; DDVE – diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; VD – ventrículo direito. TGO – transaminase glutâmico oxalacética; TGP – transaminase glutâmico pirúvica; GGT – gama glutamil transferase; IECA – inibidores da enzima de conversão de angiotensina; BRA – bloqueadores dos receptores de angiotensina II

## 4.2.2 Determinação Acetona exalada por GC-MS

As figuras, 13 e 14, ilustram os resultados da análise por GC-MS de um paciente do grupo ICCOMP e outro do grupo ICDESCOMP respectivamente, e confirmam a presença de acetona nas amostras de ar exalado de pacientes de ambos os grupos. Observa-se que a intensidade do pico de acetona no grupo ICCOMP foi menor do que o pico observado no cromatograma de um paciente do grupo ICDESCOMP.

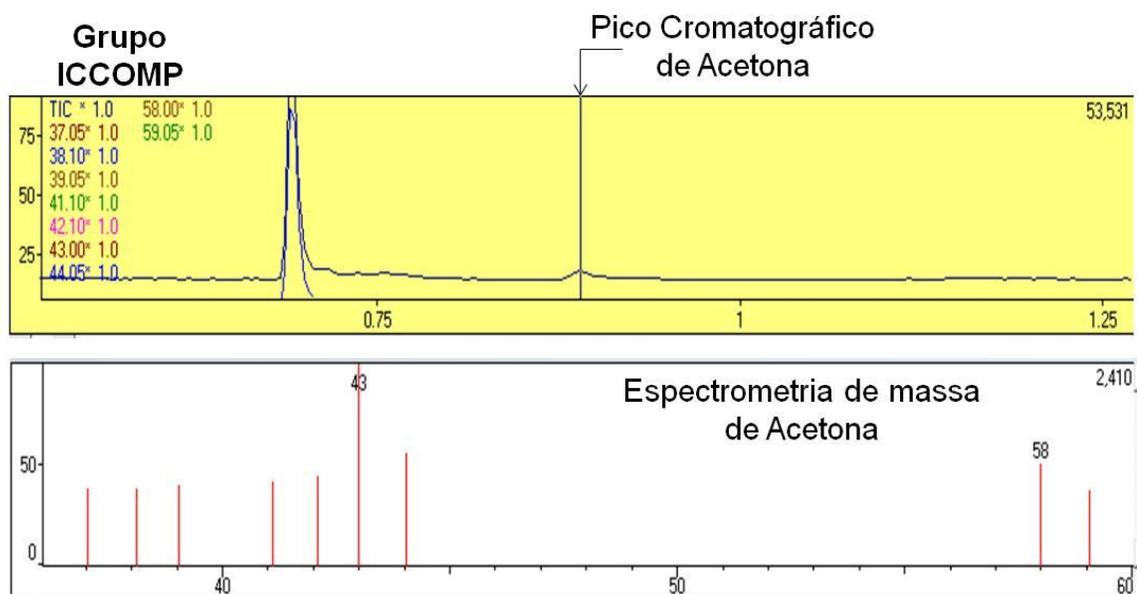


Figura 13 - Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de um paciente do grupo IC compensada. O painel superior indica a separação dos componentes da amostra e o painel inferior o espectro de massas da acetona que produziu o pico cromatográfico observado no painel superior

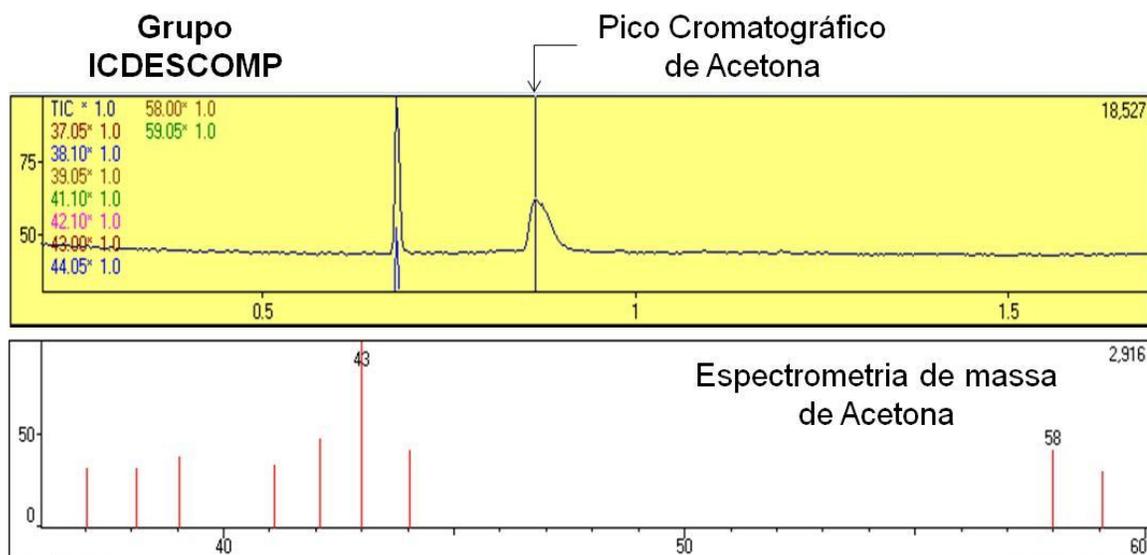
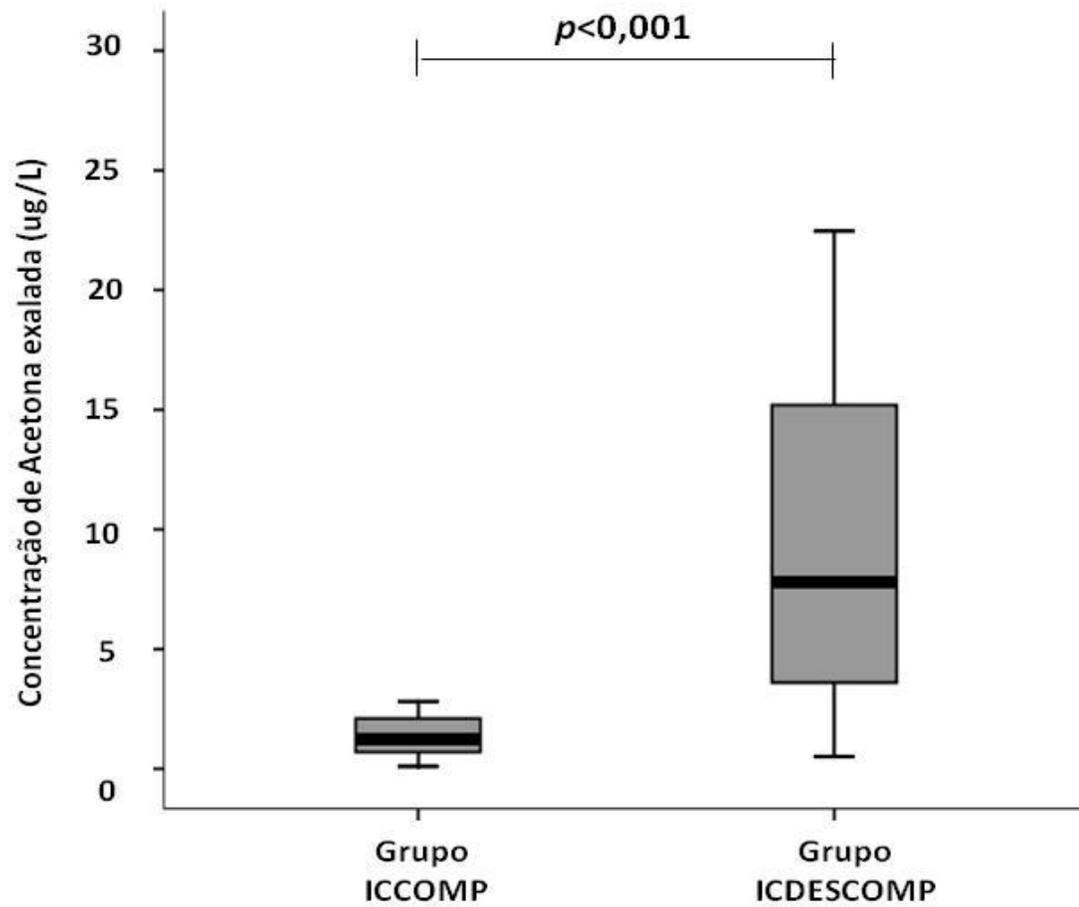


Figura 14 - Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de um paciente do grupo IC descompensada. O painel superior indica a separação dos componentes da amostra e o painel inferior o espectro de massas da acetona que produziu o pico cromatográfico observado no painel superior

#### 4.2.3 Determinação acetona exalada por Espectrofotometria

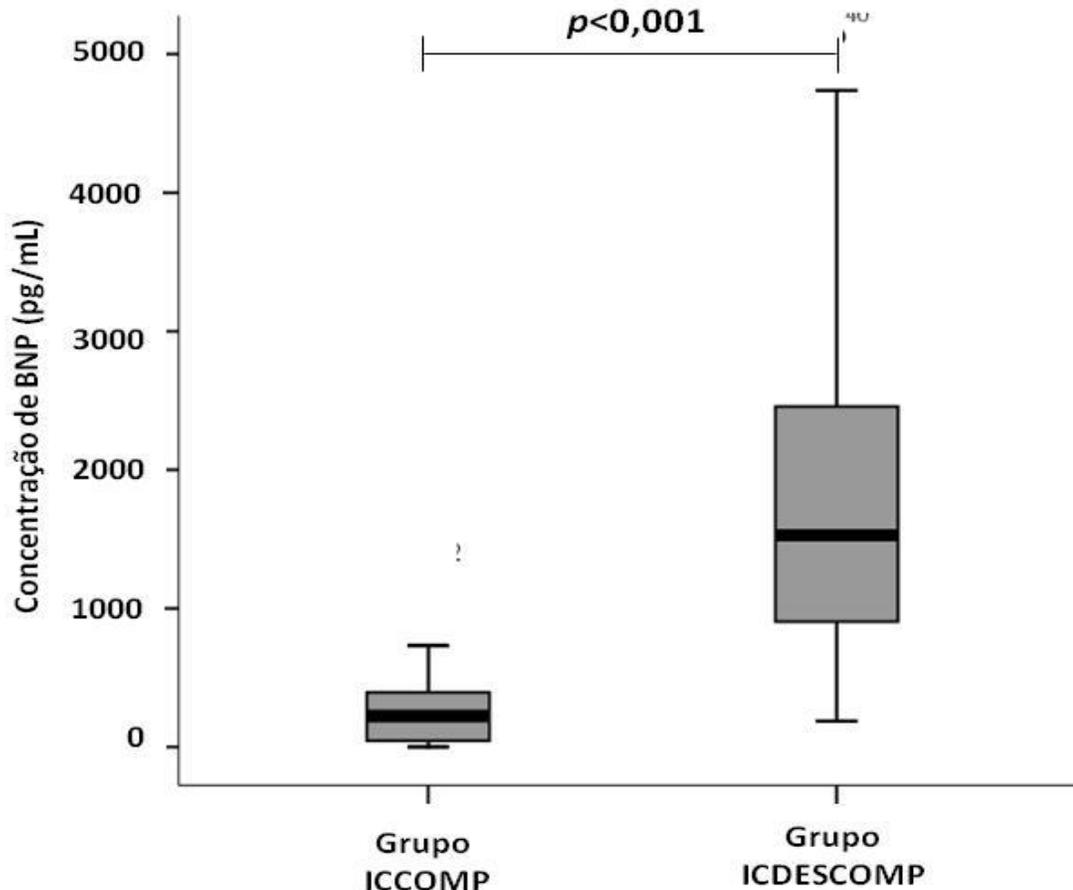
Através da análise espectrofotométrica, observamos que a concentração mediana de acetona encontrada no ar exalado de pacientes com IC descompensada foi 7,80  $\mu\text{g/L}$  (3,60-15,20  $\mu\text{g/L}$ ) e em pacientes com IC compensada foi 1,22  $\mu\text{g/L}$  (0,68-2,19  $\mu\text{g/L}$ ), apresentando diferença estatisticamente significante ( $p < 0,001$ ) conforme apresentado no gráfico 4. A concentração mediana de BNP plasmático para pacientes com IC descompensada foi 1 527  $\text{pg/mL}$  (905-2475  $\text{pg/mL}$ ) e para IC compensada 224  $\text{pg/mL}$  (45-394  $\text{pg/mL}$ ), também demonstrando diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ), conforme apresentado no gráfico 5.

Gráfico 4 - Concentração de acetona exalada nos grupos IC compensada e IC descompensada



ICCOMP - Insuficiência cardíaca compensada; ICDESCOMP - Insuficiência cardíaca descompensada

Gráfico 5 - Concentração de BNP nos grupos IC compensada e IC descompensada

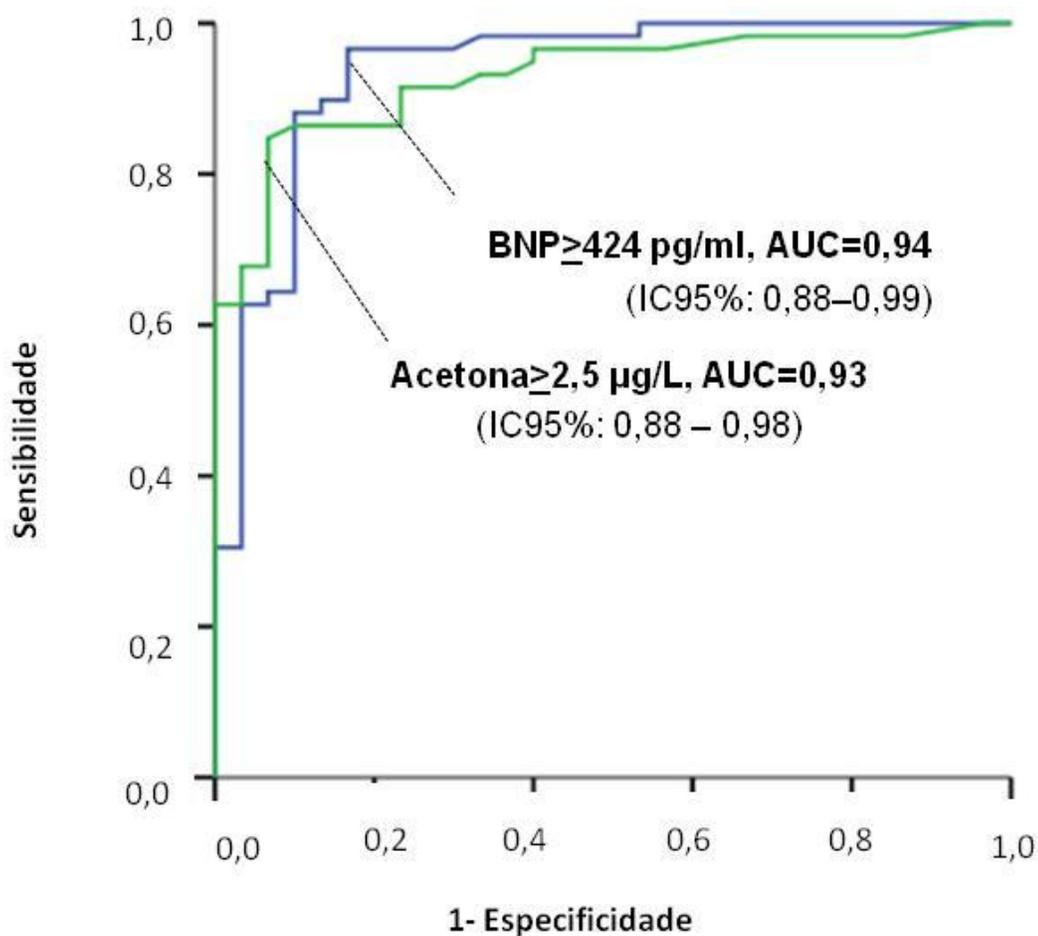


BNP - Peptídeo natriurético do tipo B; ICCOMP - Insuficiência cardíaca compensada; ICDESCOMP - Insuficiência cardíaca descompensada

A capacidade da concentração de acetona diferenciar pacientes com IC descompensada, mais grave, foi avaliada também através da análise da curva ROC (gráfico 6). O método espectrofotométrico utilizado para determinação da concentração de acetona mostrou ter boa acurácia diagnóstica para diferenciação entre indivíduos com IC descompensada e IC compensada (área sob a curva = 0,93, IC95 % 0,88–0,98,  $p < 0,001$ ). O melhor ponto de corte encontrado para esta diferenciação foi de 2,50  $\mu\text{g/L}$ . Valores acima de 2,50  $\mu\text{g/L}$  conferiram especificidade de 80 %, sensibilidade de 86 % e acurácia de 84 %

para o diagnóstico de IC descompensada (tabela 4). Quanto ao BNP, observou-se também boa acurácia para diferenciar pacientes descompensados (área sob a curva = 0,94, IC95% 0,88–0,99,  $p < 0,001$ ). A concentração de BNP de 424 pg/mL foi o melhor ponto de corte encontrado para o diagnóstico de IC descompensada. Este valor conferiu especificidade de 100 % e sensibilidade de 92 % para o diagnóstico de IC descompensada.

Gráfico 6 - Curvas ROC de Acetona exalada e BNP plasmático para o diagnóstico de IC descompensada



BNP: Peptídeo natriurético do tipo B; IC95 % - intervalo de confiança 95%; AUC: área sob a curva

Tabela 4 - Acurácia da acetona para o diagnóstico de IC

Acetona exalada	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
<b>Diagnóstico de IC</b> (Acetona 1,16 µg/L)	83 %	100 %	86 %
<b>Diagnóstico de IC descomp</b> (Acetona 2,50 µg/L)	86 %	80 %	84 %

IC: insuficiência cardíaca

Observamos ainda que valores de acetona exalada maiores que 2,50 µg/L permitiram identificar pacientes em IC descompensada em 84,3 % dos casos e que valores de BNP maiores que 424 pg/mL identificaram 92,1 % dos casos. Quando considerados simultaneamente no modelo de regressão logística continuam identificando 92,1 % dos casos.

#### 4.3 Análise do grupo ICCONG versus ICBXDB

Uma vez demonstrada diferença significativa da concentração da acetona exalada entre pacientes com IC descompensada e IC compensada, nosso estudo teve como objetivo secundário avaliar se a presença de acetona no ar exalado de pacientes com IC descompensada seria capaz de auxiliar no diagnóstico diferencial entre os perfis hemodinâmicos mais frequentes na admissão hospitalar conforme descrito por Nohria et al<sup>63</sup>: perfil quente e congesto (grupo ICCONG), ou seja, pacientes com sinais de congestão, mas sem sinais de hipoperfusão e perfil frio e congesto (grupo ICBXDB), ou seja, pacientes com sinais de hipoperfusão associados aos sinais de congestão.

#### 4.3.1 Características gerais da população

As características gerais desta população (IC com congestão e IC com hipoperfusão) encontram-se listadas e comparadas na tabela 5, assim como as características ecocardiográficas, laboratoriais e as medicações utilizadas por cada grupo encontram-se na tabela 6.

No grupo ICCONG, o sexo masculino (67,7 %) e a raça branca (60,0 %) foram mais freqüentes, a mediana da idade foi de 58,5 anos (47,5-66,3 anos), do peso foi de 65,5 kg (63,0-75,0 kg) e do IMC foi 24,5 (22,3 – 26,7). A etiologia predominante foi a cardiomiopatia chagásica (43,3 %), seguida da isquêmica (20,0 %), hipertensiva (13,3 %), idiopática (6,7 %) e outras (16,7 %). Quanto às comorbidades, observa-se que 43,3% dos pacientes tinham hipertensão; 33,3 % dislipidemia; 20,0 % relatavam antecedente de IAM e 20,0 % AVC ou AIT. A mediana da PAS foi 100 mm Hg (90–132 mm Hg), da PAD 70 mm Hg (60-90 mm Hg), da FC 75 bpm (60–85 bpm) e da FR 26 irm (22–28 irm). Os sintomas que identificam congestão pulmonar e congestão sistêmica estiveram presentes na maioria dos pacientes (83 e 96 % dos pacientes, respectivamente). Sinais ou sintomas sugestivos de hipoperfusão tais como tontura ou TEC identificado foram pouco observados nesta população. A mediana da FEVE foi de 24,5 % (18,5-30,5 %) e do DDVE 65 mm (61,0-70,3 mm) e 66,7 % dos pacientes apresentavam disfunção de ventrículo direito (VD). Quanto às variáveis laboratoriais, vale destacar valores medianos de hemoglobina 13,1 g/dL (12,3-14,6 g/dL), uréia 49,0 mg/dL (39,7-72,0 g/dL), creatinina 1,17 mg/dL (0,99-1,38 mg/dL), glicemia de jejum 90,5 mg% (85-101 mg%) e catecolaminas plasmáticas 732 pg/mL (443-1124 pg/mL) que demonstram que os pacientes não apresentavam anemia importante, insuficiência renal crônica ou *Diabetes mellitus*, mas mantinham estado hiperadrenérgico. Também não apresentavam alteração significativa de transaminases ou enzimas canaliculares apesar dos

sinais clínicos de congestão hepática como hepatomegalia, presente em 96 % dos pacientes. Por fim, em relação ao tratamento da IC, os pacientes estavam bem medicados: 100 % em uso de betabloqueador; 96 % em uso de IECA ou BRA e 67 % em uso de espironolactona.

No grupo ICBXDB também houve predomínio de pacientes do sexo masculino (55,2 %) e da raça branca (51,7 %). A mediana da idade foi de 50 anos (40-57 anos), do peso 60 kg (52-70 kg) e do IMC foi 22,3 (20,4 – 24,6). A etiologia predominante foi a chagásica (55,2 %), seguida das cardiomiopatias idiopática (20,7 %), hipertensiva (10,3 %), isquêmica (6,9 %), e outras (6,9 %). Sintomas de hipoperfusão como TEC lentificado e tontura estiveram presentes em 96,6 e 75,9 % dos pacientes respectivamente e sintomas de congestão também foram freqüentes (ortopnéia presente em 96,6% dos pacientes e dispnéia paroxística noturna em 93,1 % dos pacientes deste grupo). Quanto às variáveis clínicas, a mediana da PAS foi de 80 mm Hg (70–90 mm Hg), de PAD 60 mm Hg (40-66 mm Hg), da FC 64 bpm (60–80 bpm) e da FR 26 irm (22–28 irm). Observa-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à PAS e a PAD ( $p < 0,001$ ). A mediana da FEVE foi 20 % (17-26 %), tendendo a ser menor do que no grupo ICCONG, porém sem diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,056$ ) e a mediana do DDVE foi 71 mm (65,0-75,5 mm), discretamente maior ( $p = 0,019$ ) do que no grupo ICCONG. Observamos odor peculiar em 89,7 % dos pacientes do grupo ICBXDB e em 63,3 % dos pacientes do grupo ICCONG ( $p = 0,018$ ). Quanto às variáveis laboratoriais, observamos que o grupo com hipoperfusão apresentava valores medianos mais elevados de uréia (71 x 49 mg/dL,  $p = 0,003$ ), creatinina (1,59 x 1,17 mg/dL,  $p = 0,001$ ), catecolaminas plasmáticas (1 467 x 732 pg/mL,  $p = 0,004$ ) e lactato venoso (25 x 17 mg/dL,  $p = 0,001$ ), sem alteração significativa em relação às outros parâmetros laboratoriais. Em relação ao tratamento farmacológico, os pacientes também estavam bem medicados: 100 % em uso de betabloqueador; 89,7 % em uso de IECA ou BRA e 62,1 % em uso de espironolactona.

Tabela 5 - Características gerais dos pacientes dos grupos ICCONG e ICBXDB

<b>Características</b>	<b>ICCONG (n=30)</b>	<b>ICBXDB (n=29)</b>	<b>p</b>
Sexo Masculino n(%)	20 (67,7)	16 (55,2)	0,365
Raça Branca n(%)	18 (60,0)	15 (51,7)	0,522
Idade (anos)	58,5 (47,5 – 66,3)	50,0 (40,0 – 57,0)	0,032
Peso (g)	65,5 (63,0 – 75,0)	60,0 (52,0 – 70,0)	0,022
Etiologia n(%)			0,261
Isquêmico	6 (20,0)	2 (6,9)	
Chagásico	13 (43,3)	16 (55,2)	
Hipertensivo	4 (13,3)	3 (10,3)	
Idiopático	2 (6,7)	6 (20,7)	
Outras	5 (16,7)	2 (6,9)	
Antecedentes n(%)			
HAS	13 (43,3)	10 (34,5)	0,486
DLP	10 (33,3)	6 (20,7)	0,275
IAM	6 (20,0)	6 (20,7)	0,948
AVC/ AIT	6 (20,0)	3 (10,3)	0,302
Anemia	1 (3,3)	3 (10,3)	0,284
Tabagismo	0 (0,0)	1 (3,4)	0,305
Odor peculiar n(%)	19 (63,3)	26 (89,7)	0,018
Sintomas n(%)			
Ortopnéia	28 (93,3)	28 (96,6)	0,574
DPN	26 (86,7)	27 (93,1)	0,413
Tontura	13 (43,3)	22 (75,9)	0,011
Síncope	2 (6,7)	7 (24,1)	0,062
Exame físico			
PAS (mmHg)	100 (90 – 132)	80 (70 – 90)	<0,001
PAD (mmHg)	70 (60 – 90)	60 (40 – 66)	<0,001
FC (bpm)	75 (60 – 85)	64 (60 – 73)	0,121
FR (irm)	26 (22 – 28)	26 (22 – 28)	0,884
Saturação O <sub>2</sub> (%)	95 (94 – 96)	94 (94 – 96)	0,555
EC pulmonar n(%)	28 (93,3)	24 (82,8)	0,209
RHJ n(%)	25 (83,3)	26 (89,7)	0,478
TJ n(%)	29 (96,7)	28 (96,6)	0,981
Ascite n(%)	15 (50,0)	21 (72,4)	0,078
Hepatomegalia n(%)	29 (96,7)	29(100,0)	0,321
Edema periférico n(%)	27 (90,0)	23 (79,3)	0,254
TEC > 3 seg n(%)	8 (26,7)	28 (96,6)	<0,001

Variáveis contínuas foram expressas em mediana (variação interquartil; percentil 25 – percentil 75). ICCONG – insuficiência cardíaca com sinais de congestão; ICBXDB – insuficiência cardíaca com baixo débito/hipoperfusão; IMC – índice de massa corporal; HAS – hipertensão arterial sistêmica; DLP – dislipidemia; IAM – infarto agudo do miocárdio; AVC – acidente vascular cerebral; AIT – acidente isquêmico transitório; DPN – dispnéia paroxística noturna; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; FC – frequência cardíaca; FR – frequência respiratória; EC – estertor crepitante pulmonar; RHJ – refluxo hepato-jugular; TJ – turgência jugular; TEC – tempo de enchimento capilar.

Tabela 6 - Características ecocardiográficas, laboratoriais e medicações em uso dos pacientes dos grupos ICCONG e ICBXDB

<b>Características</b>	<b>ICCONG (n=30)</b>	<b>ICBXDB (n=29)</b>	<b>p</b>
Ritmo Sinusal n(%)	21 (70,0)	13 (44,8)	0,060
<b>Ecodopplercardiograma</b>			
FEVE (%)	24,5 (18,5 – 30,5)	20,0 (17,0 – 26,0)	0,056
DDVE (mm)	65,0 (61,0 – 70,3)	71,0 (65,0 – 75,5)	0,019
Disfunção Diastólica n(%)	10 (33,3)	10 (34,5)	0,926
Disfunção de VD n(%)	20 (66,7)	21 (72,4)	0,632
<b>Laboratório</b>			
Hemoglobina (g/dL)	13,1 (12,3 – 14,6)	12,7 (11,7 – 13,7)	0,131
Uréia (mg/dL)	49,0 (39,7 – 72,0)	71,0 (62,0 – 99,0)	0,003
Creatinina (mg/dL)	1,17 (0,99 – 1,38)	1,59 (1,21 – 2,25)	0,001
Sódio sérico (mEq/L)	139 (138 – 140)	137 (134 – 139)	0,011
Potássio (mg/dL)	4,2 (3,9 – 4,6)	4,6 (4,2 – 4,9)	0,035
Glicemia (mg%)	90,5 (85,0 – 101,5)	88,0 (82,0 – 98,0)	0,295
TGO (U/L)	32,0 (25,8 – 50,5)	22,0 (30,0 – 78,0)	0,808
TGP (U/L)	42,0 (34,5 – 57,0)	38,0 (31,0 – 79,0)	0,529
Fosfatase alcalina (U/L)	147,5 (105,8 – 183,0)	127,0 (100,0 – 195,5)	0,682
Gama GT (U/L)	171,5 (114,8 – 313,3)	177,0 (112,5 – 308,5)	0,958
Bilirrubinas (mg/dL)	1,17 (0,75 – 1,72)	1,49 (0,95 – 2,07)	0,129
Lactato (mg/dL)	17,0 (13,0 -20,0)	25,0 (18,0 – 32,0)	0,001
Catecolaminas (pg/mL)	732 (443 – 1124)	1467 (878 – 2241)	0,004
<b>Drogas n (%)</b>			
IECA	26 (86,7)	23 (76,7)	0,451
BRA	3 (10,0)	3 (10,3)	0,965
IECA/BRA	29 (96,7)	26 (89,7)	0,284
Betabloqueador	30 (100,0)	29 (100,0)	1,0
Espironolactona	20 (66,7)	18 (62,1)	0,712
Diurético de Alça	24 (80,0)	28 (96,6)	0,049
Diurético tiazídico	6 (20,0)	6 (20,7)	0,948
Hidralazina/Nitrato	10 (33,3)	11 (37,9)	0,543
Digoxina	9 (30,0)	10 (34,5)	0,713
Amiodarona	4 (13,3)	5 (17,2)	0,637
Aspirina	14 (46,6)	10 (34,5)	0,341
Estatina	9 (30,0)	4 (13,7)	0,133

Variáveis contínuas foram expressas em mediana (percentil 25 – percentil 75). ICCONG – insuficiência cardíaca com sinais de congestão; ICBXDB – insuficiência cardíaca com baixo débito/hipoperfusão; FEVE – fração de ejeção de ventrículo esquerdo; DDVE – diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; VD – ventrículo direito; TGO – transaminase glutâmico oxalacética; TGP – transaminase glutâmico pirúvica; Gama GT – gama glutamyl transferase; IECA – inibidores da enzima de conversão de angiotensina; BRA – bloqueadores dos receptores de angiotensina II

## 4.3.2 Determinação acetona exalada por GC-MS

As figuras, 15 e 16, ilustram os resultados da análise por GC-MS de um paciente do grupo ICCONG e outro do grupo ICBXDB respectivamente, e confirmam a presença de acetona nas amostras de ar exalado de pacientes de ambos os grupos. Observa-se que a intensidade do pico de acetona nos dois grupos foi semelhante.

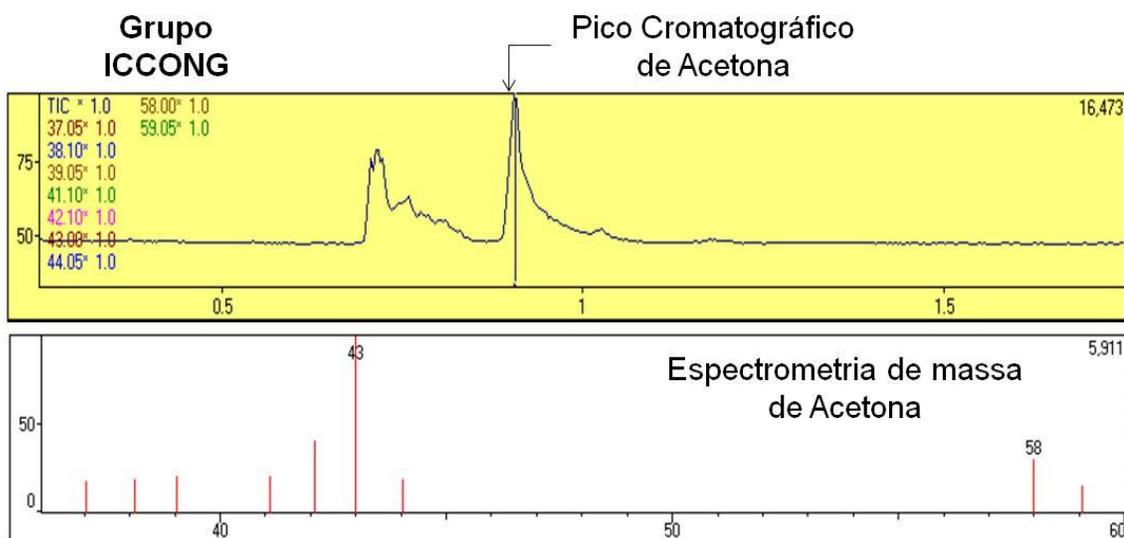


Figura 15 - Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de um paciente do grupo IC descompensada com congestão (ICCONG). O painel superior indica a separação dos componentes da amostra e o painel inferior o espectro de massas da acetona que produziu o pico cromatográfico observado no painel superior

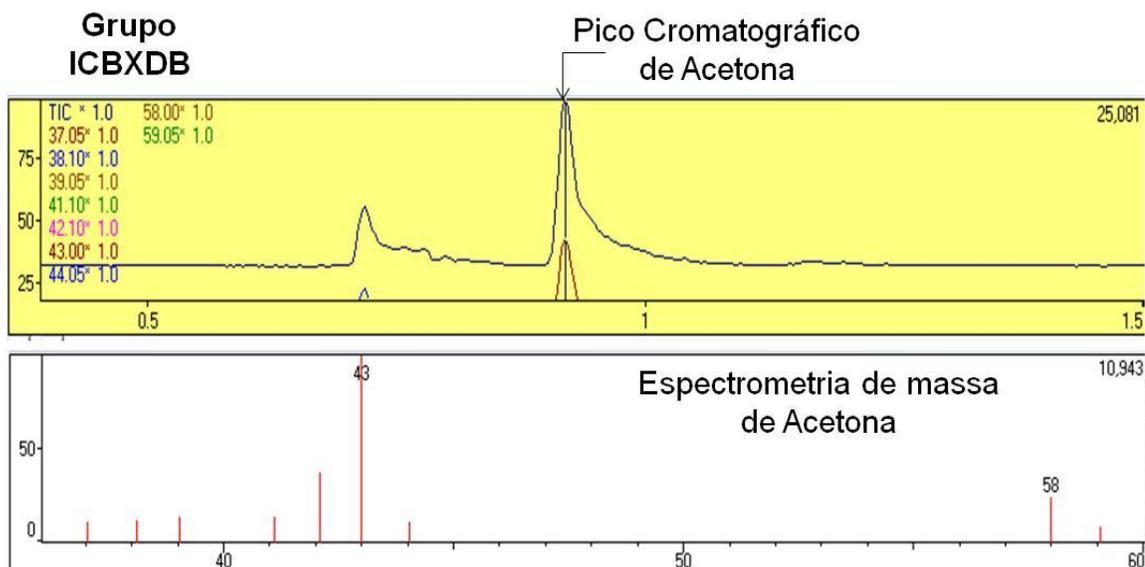
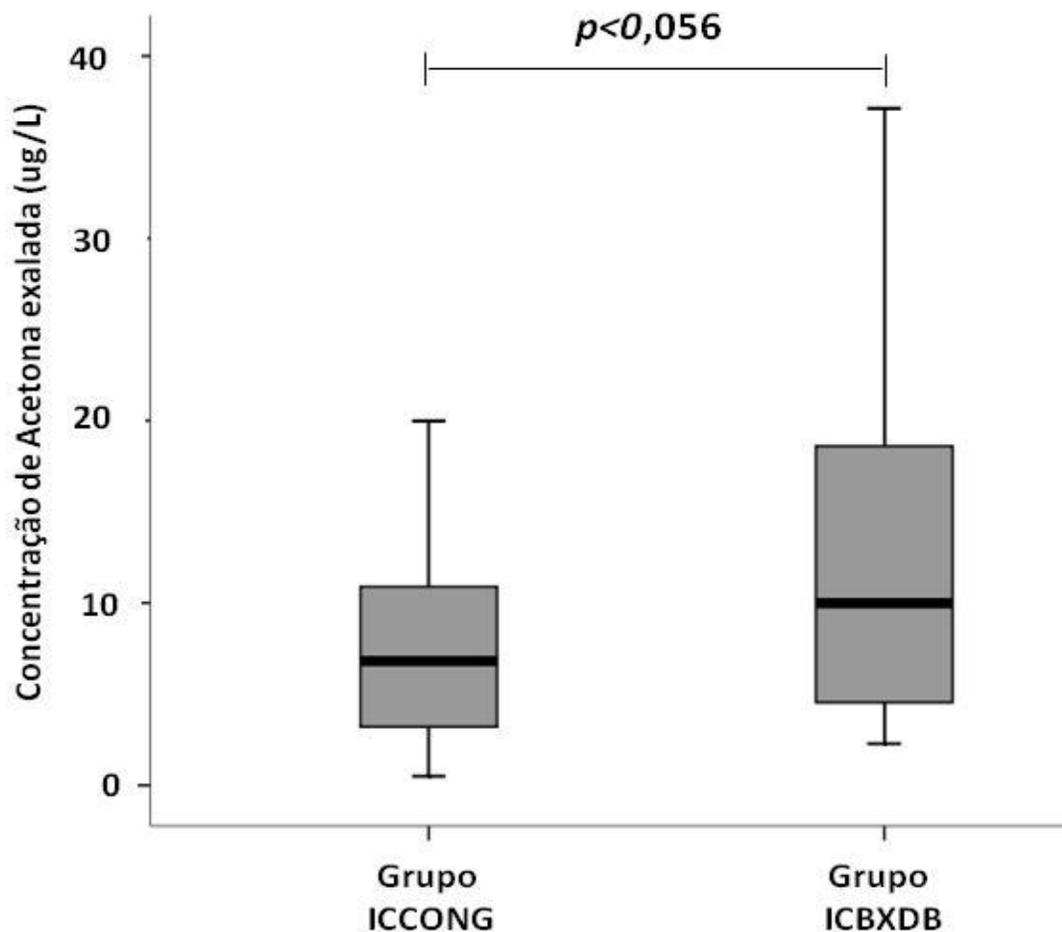


Figura 16 - Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de um paciente do grupo IC descompensada com hipoperfusão / baixo débito (ICBXDB). O painel superior indica a separação dos componentes da amostra e o painel inferior o espectro de massas da acetona que produziu o pico cromatográfico observado no painel superior

#### 4.3.3 Determinação por Espectrofotometria

A análise espectrofotométrica revelou que a concentração mediana de acetona exalada para pacientes com sinais clínicos de hipoperfusão (grupo ICBXDB) foi 10,0 µg/L (4,5-18,6 µg/L) e para pacientes apenas com sinais clínicos de congestão (grupo ICCONG) foi 6,8 µg/L (3,2-10,9 µg/L) conforme ilustrado no gráfico 7. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p = 0,056$ ).

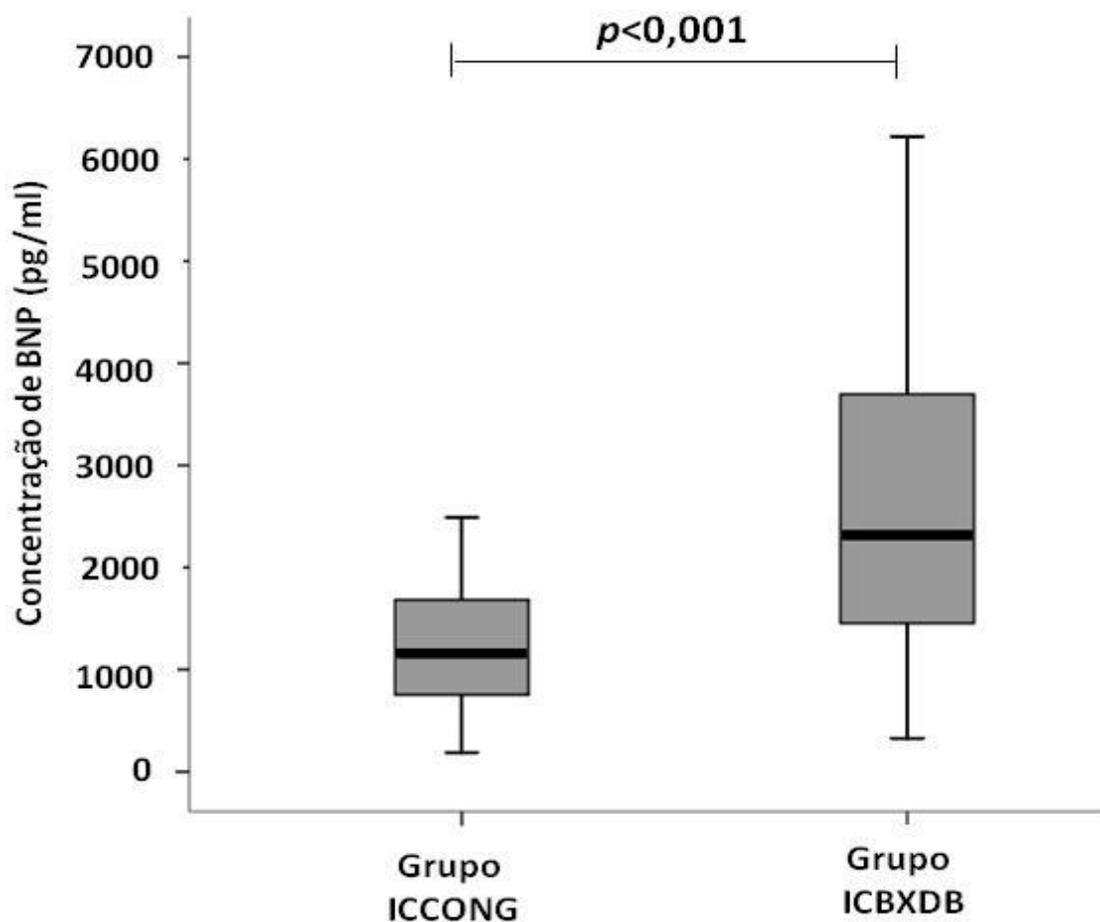
Gráfico 7 - Concentração de Acetona exalada nos grupos IC com congestão e IC com hipoperfusão



ICCONG - insuficiência cardíaca com congestão; ICBXDB - insuficiência cardíaca com hipoperfusão (baixo débito)

A concentração mediana de BNP foi de 2316 pg/mL (1453 – 3697 pg/mL) para os pacientes com hipoperfusão e 1161 pg/mL (754 – 1684 pg/mL) para pacientes apenas com congestão (gráfico 8). Observou-se que esta diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

Gráfico 8 - Concentração de BNP plasmático nos grupos IC com congestão e IC com hipoperfusão



ICCONG - insuficiência cardíaca com congestão; ICBXDB - insuficiência cardíaca com hipoperfusão (baixo débito)

#### 4.4 Variáveis clínicas e laboratoriais associadas à acetona exalada

##### 4.4.1 Análise univariada

Na avaliação dos pacientes com IC, as variáveis contínuas estudadas na análise univariada estão reunidas na tabela 7. Foi observada correlação significativamente positiva entre acetona exalada e FR ( $p < 0,001$ ), uréia ( $p <$

0,001), creatinina ( $p < 0,001$ ), sódio ( $p = 0,017$ ), catecolaminas séricas ( $p < 0,001$ ), TGO ( $p < 0,001$ ), fosfatase alcalina ( $p < 0,001$ ), GGT ( $p < 0,001$ ), bilirrubinas totais ( $p < 0,001$ ) e lactato venoso ( $p = 0,008$ ) e correlação significativamente negativa com PAS ( $p < 0,001$ ), PAD ( $p = 0,007$ ), hemoglobina ( $p = 0,005$ ) e hematócrito ( $p = 0,019$ ).

Apesar da observação de alteração nos níveis de creatinina em pacientes com IC descompensada, em nossa amostra, a variável creatinina não pode ser considerada preditora isolada da acetona exalada, vez que possui linearidade praticamente nula ( $r^2$  ajustado =  $0,09 \pm 8,3$ ).

Tabela 7 - Análise univariada das variáveis contínuas em relação à acetona exalada

Variáveis Contínuas	Coefficiente de Correlação (r)	p
BNP	0,773	<0,001
FR	0,678	<0,001
GGT	0,657	<0,001
Bilirrubinas totais	0,628	<0,001
Uréia sérica	0,585	<0,001
Catecolaminas plasmáticas	0,564	<0,001
Creatinina sérica	0,528	<0,001
Fosfatase alcalina	0,501	<0,001
TGO	0,447	<0,001
Lactato	0,253	0,008
Sódio sérico	0,228	0,017
TGP	0,104	0,283
PAS	(0,454)	<0,001
Hemoglobina	(0,270)	0,005
PAD	(0,259)	0,007
Potássio sérico	(0,180)	0,060
IMC	(0,167)	0,082
Hematócrito	(0,225)	0,019
Peso	(0,130)	0,177

BNP – peptídeo natriurético do tipo B; FR – frequência respiratória; GGT – gama glutamyl transferase; TGO – transaminase glutâmico oxalacética; TGP – transaminase glutâmico pirúvica; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corporal

As variáveis categóricas estudadas na análise univariada estão reunidas nas tabelas 8 e 9. Foi observada correlação positiva entre acetona exalada e classe funcional ( $p < 0,001$ ), ritmo sinusal ( $p = 0,001$ ), disfunção do VD ( $p < 0,001$ ), presença de odor peculiar ( $p < 0,001$ ), anemia ( $p = 0,027$ ), além de variáveis clínicas como dispnéia de esforço ( $p < 0,001$ ), ortopnéia ( $p < 0,001$ ), dispnéia paroxística noturna ( $p < 0,001$ ), síncope ( $p = 0,002$ ), edema de membros inferiores ( $p < 0,001$ ), turgência jugular ( $p < 0,001$ ), refluxo hepatojugular ( $p < 0,001$ ) e ascite ( $p < 0,001$ ).

Tabela 8 - Análise univariada das variáveis categóricas em relação à acetona exalada

Variáveis Categóricas	Coefficiente de Correlação (r)	p
Hepatomegalia	0,785	<0,001
RHJ	0,741	<0,001
Classe Funcional	0,737	<0,001
TJ	0,725	<0,001
Dispnéia de esforço	0,703	<0,001
Odor peculiar	0,683	<0,001
Edema periférico	0,653	<0,001
DPN	0,624	<0,001
Ascite	0,602	<0,001
Disfunção de VD	0,585	<0,001
TEC lenticado	0,575	<0,001
Ritmo Sinusal	0,315	0,001
Síncope	0,292	0,002
Anemia	0,213	0,027
Raça Branca	0,176	0,065
HAS	0,082	0,394
IAM	0,074	0,446
Disfunção Diastólica	(0,290)	0,767
Sexo Masculino	(0,146)	0,131
DLP	(0,002)	0,961

RHJ – refluxo hepato-jugular; TJ – turgência jugular; DPN – dispnéia paroxística noturna; VD – ventrículo direito; TEC – tempo de enchimento capilar; HAS – hipertensão arterial sistêmica; IAM – infarto agudo do miocárdio; DLP – dislipidemia.

Na tabela 9 estão listadas todas as medicações utilizadas pelos pacientes do estudo e sua correlação com a acetona exalada. Observa-se correlação positiva e significativa entre acetona exalada e betabloqueadores, IECA, diuréticos de alça, espironolactona e aspirina.

Tabela 9 - Análise univariada das medicações utilizadas em relação à acetona exalada

Medicações	Coefficiente de Correlação (r)	p
Betabloqueador	0,596	<0,001
Diurético de Alça	0,554	<0,001
IECA	0,426	<0,001
Espironolactona	0,366	<0,001
Aspirina	0,331	<0,001
Nitrato	0,186	0,052
Amiodarona	0,182	0,058
Digoxina	0,165	0,086
Hidralazina	0,146	0,130
Diurético tiazídico	0,096	0,322
Estatina	(0,028)	0,771
BRA	(0,003)	0,974

IECA – inibidores da enzima de conversão de angiotensina; BRA – bloqueadores dos receptores de angiotensina II

#### 4.4.2 Análise multivariada – Regressão Linear Múltipla

Para a análise multivariada, incluímos no modelo de regressão linear múltipla todas as variáveis, contínuas e categóricas que apresentaram  $p < 0,10$ . Foi observado que níveis elevados de bilirrubina total ( $\beta = 0,63 \pm 0,53$ ;  $p <$

0,0001), FR elevada ( $\beta = 0,27 \pm 0,09$ ;  $p < 0,001$ ) e creatinina elevada ( $\beta = 0,19 \pm 1,1$ ;  $p = 0,015$ ) estiveram associados à elevação de acetona exalada. Quanto às variáveis categóricas, observamos que a presença de refluxo hepato-jugular ( $\beta = 0,57 \pm 1,24$ ;  $p < 0,001$ ), síncope ( $\beta = 0,24 \pm 1,99$ ;  $p = 0,003$ ), TEC lentificado ( $\beta = 0,24 \pm 1,04$ ;  $p = 0,006$ ) e a presença de disfunção de VD ( $\beta = 0,18 \pm 0,52$ ;  $p = 0,026$ ) também estiveram associados à presença de acetona exalada (tabela 10). Nenhuma das medicações utilizadas esteve independentemente associada com a produção de acetona exalada.

A regressão linear múltipla para acetona apresentou baixa linearidade tanto para variáveis contínuas ( $r^2$  ajustado = 0,48) quanto para variáveis categóricas ( $r^2$  ajustado = 0,43).

Tabela 10 - Regressão Linear Múltipla para acetona exalada

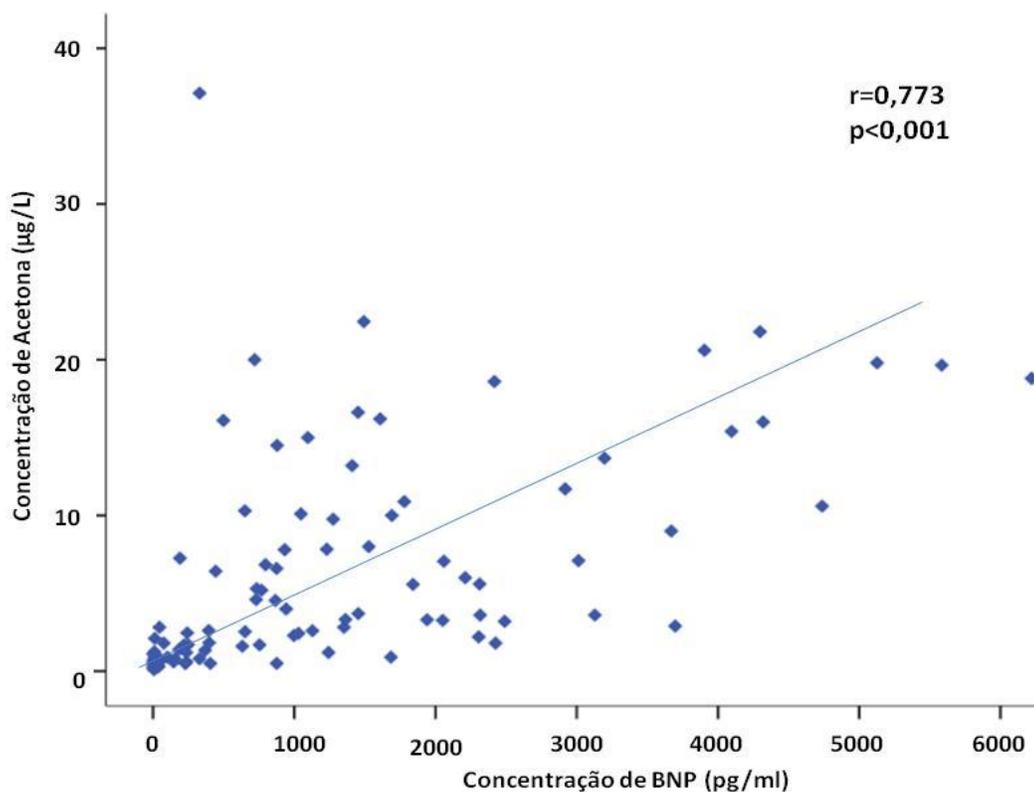
Variáveis	Coefficiente $\beta$	Erro padrão	p
<b>Contínuas</b>			
Bilirrubina total	0,63	0,53	<0,0001
Frequência respiratória	0,27	0,09	0,001
Creatinina	0,19	1,10	0,015
<b>Categóricas</b>			
RHJ	0,57	1,24	<0,001
Síncope	0,24	1,99	0,003
TEC lentificado	0,24	1,04	0,006
Disfunção de VD	0,18	0,52	0,026

RHJ – refluxo hepato-jugular; TEC – tempo de enchimento capilar; VD – ventrículo direito

#### 4.4.3 Correlação entre acetona exalada e BNP

Para avaliação da correlação entre acetona exalada e as variáveis de interesse, como o BNP, foi aplicado o Coeficiente de Correlação de Spearman, uma vez que as variáveis em questão apresentam distribuição assimétrica. Observou-se correlação positiva entre a concentração mediana de acetona no ar exalado e níveis de BNP plasmático ( $r = 0,772$ ,  $p < 0,001$ ) (gráfico 9). Embora tenha sido observada tal correlação, BNP não pode ser considerado como preditor isolado de acetona exalada, vez que apresenta baixa linearidade ( $r^2$  ajustado = 0,574).

Gráfico 9 - Correlação entre Acetona exalada e BNP plasmático

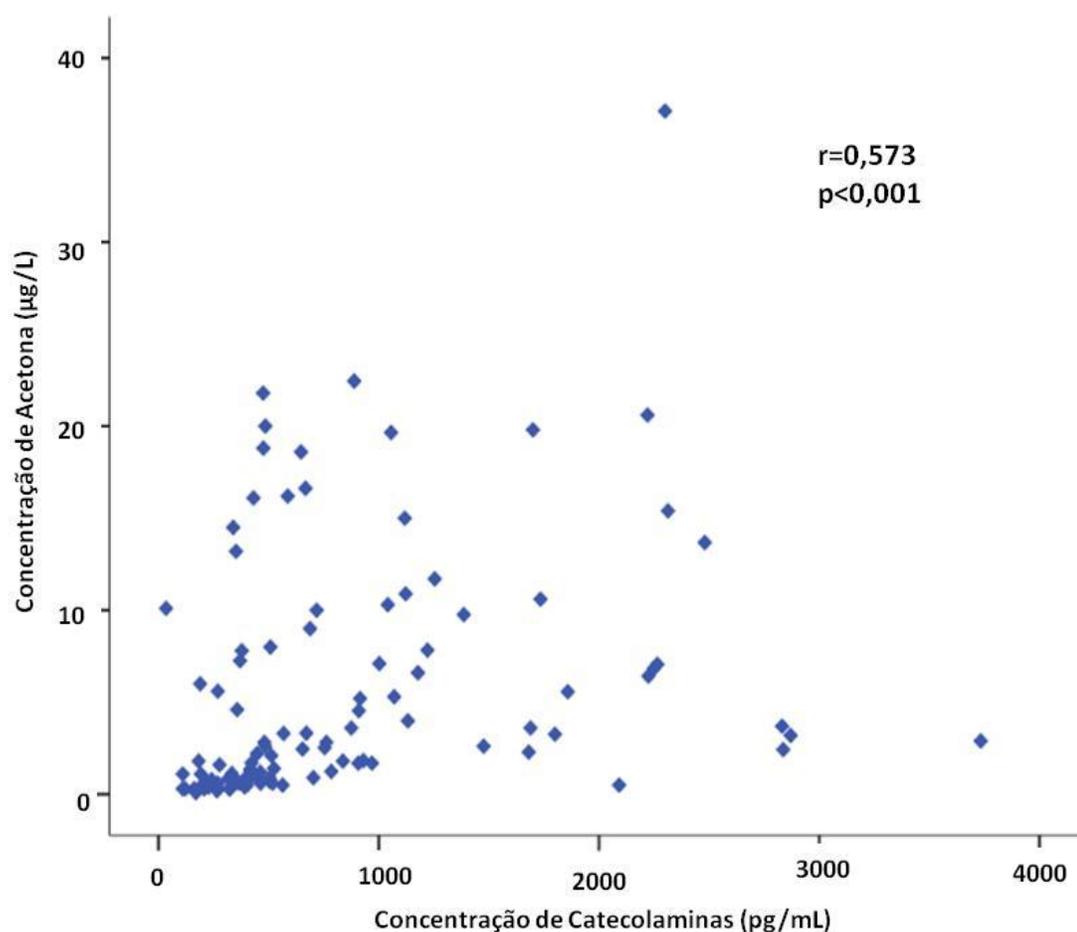


BNP - peptídeo natriurético do tipo B

#### 4.4.4 Correlação entre acetona exalada e catecolamina sérica

Para avaliação da correlação entre acetona exalada e catecolaminas plasmáticas também foi aplicado o Coeficiente de Correlação de Serman. Observou-se correlação positiva entre a concentração mediana de acetona no ar exalado e níveis de catecolaminas plasmáticas ( $r = 0,573$ ,  $p < 0,001$ ) (gráfico 10).

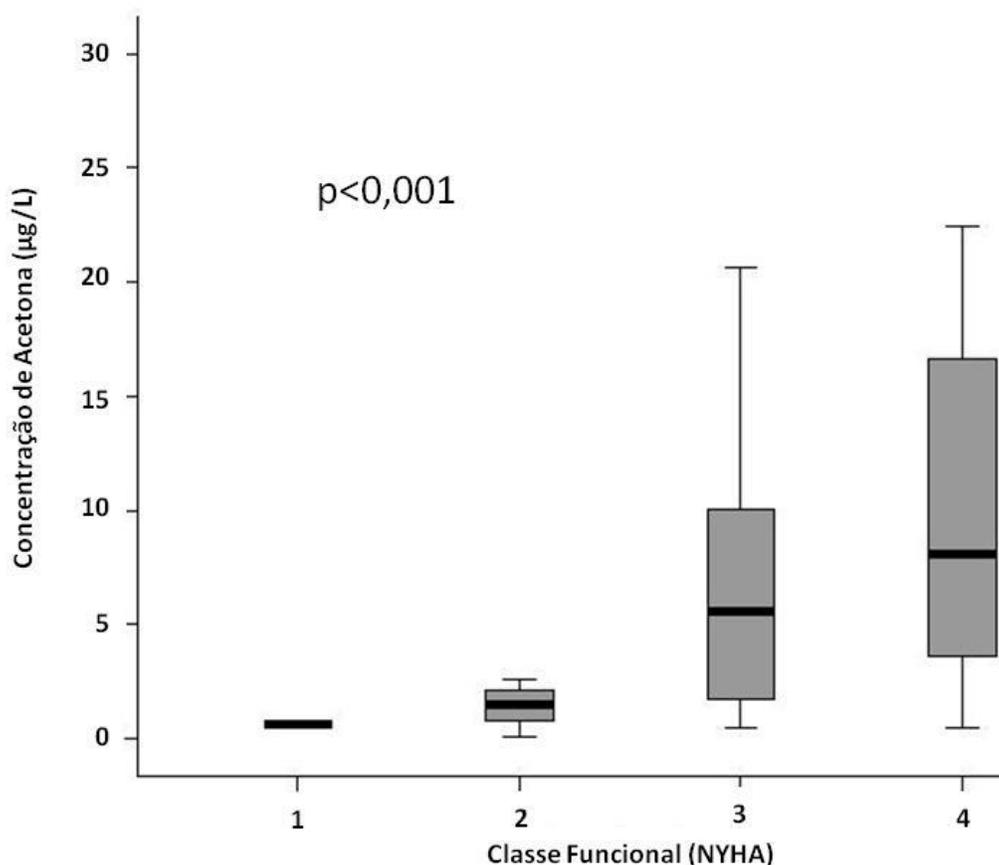
Gráfico 10 - Correlação entre acetona exalada e catecolaminas séricas



#### 4.4.5 Relação entre acetona exalada e classe funcional (NYHA)

Considerando o interesse em definirmos a relação de acetona exalada com gravidade de doença, avaliamos as concentrações de acetona nas diferentes classes funcionais segundo a classificação da NYHA. A concentração mediana (intervalo interquartil) de acetona exalada foi de 0,60 µg/L (0,50–0,70 µg/L) em pacientes NYHA 1 (n = 2); 1,50 µg/L (0,80–2,20 µg/L) em pacientes NYHA 2 (n = 18); 5,60 µg/L (1,70–10,10 µg/L) em pacientes NYHA 3 (n = 39) e 8,1 µg/L (3,60–17,10 µg/L) em pacientes NYHA 4 (n = 30). Observamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ). Esta diferença pode ser observada quando comparada a classe funcional 4 com as classes funcionais 1 e 2 ( $p < 0,05$ ).

Gráfico 11 - Correlação entre Acetona exalada e diferentes classes funcionais



#### 4.5 Evolução dos pacientes com IC

Observamos que 10 dentre 89 pacientes (11,2 %) morreram em 60 dias após a inclusão no estudo. No grupo IC compensada, dois óbitos (6,6 %) ocorreram: um por morte súbita e outro durante transplante cardíaco. No grupo IC descompensada, oito óbitos (13,5 %) ocorreram, sendo um óbito no grupo ICCONG (3,3 %) por sepse de causa urinária e sete óbitos no grupo ICBXDB (24,1 %) com sinais de hipoperfusão na admissão na unidade de emergência. Dentre os pacientes admitidos com hipoperfusão, seis pacientes faleceram por choque cardiogênico ainda na mesma internação e um paciente recebeu alta após 25 dias de internação e faleceu em casa de causa desconhecida (tabela11).

Tabela 11 – Evolução dos pacientes com IC

<b>Pacientes</b>	<b>Grupo</b>	<b>Acetona exalada (µg/L)</b>	<b>Causa de óbito</b>
Paciente 1	ICBXDB	37,10	Choque cardiogênico
Paciente 2	ICBXDB	9,00	Choque cardiogênico
Paciente 3	ICCOMP	4,60	Morte súbita
Paciente 4	ICCOMP	1,70	Intra-operatório (transplante)
Paciente 5	ICBXDB	18,80	Choque cardiogênico
Paciente 6	ICBXDB	16,00	Choque cardiogênico
Paciente 7	ICBXDB	18,60	Desconhecida
Paciente 8	ICBXDB	3,70	Choque cardiogênico
Paciente 9	ICCONG	14,50	Infecção (sepse urinária)
Paciente 10	ICBXDB	6,80	Choque cardiogênico

ICBXDB – Insuficiência cardíaca com hipoperfusão (baixo débito); ICCOMP - Insuficiência cardíaca compensada; ICCONG - Insuficiência cardíaca com congestão.

Avaliamos ainda os valores de acetona exalada destes pacientes que evoluíram a óbito no período de 60 dias após inclusão no estudo. A tabela 11 ilustra tais valores e a causa de óbito destes pacientes.

Observamos que, dentre os dez pacientes que evoluíram a óbito no período de 60 dias, nove apresentavam valores de acetona exalada maiores do que o percentil 50 de acetona exalada (3,70 µg/L) e apenas um paciente, cujo óbito ocorreu no intra-operatório durante o transplante cardíaco, apresentava valor menor do que o percentil 50 da acetona exalada.

*Discussão*

## **5 DISCUSSÃO**

Partindo da observação clínica de que pacientes com IC exalam odor peculiar quando internados por descompensação da doença, nós desenvolvemos um dispositivo portátil capaz de coletar o ar exalado à beira leito para posterior análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massas e espectrofotometria. Nossos resultados confirmaram que a acetona está aumentada no ar exalado de pacientes com IC como previamente demonstrado por Kupari et al.<sup>61</sup>

No entanto, nosso estudo revelou, pela primeira vez, que a acetona exalada é também um bom biomarcador do diagnóstico de IC e IC descompensada, cuja acurácia é similar à do BNP e que está relacionada à gravidade da IC, uma vez que concentrações elevadas de acetona exalada estão associadas à pior classe funcional. Observamos ainda correlação positiva entre acetona exalada e BNP. Estes achados sugerem fortemente que a acetona exalada pode ter importante papel no manejo clínico de pacientes com IC.

### **5.1 Grupo controle versus grupo IC**

Quanto às características basais dos pacientes não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à idade, peso, raça e sexo, sendo que a maioria dos pacientes era do sexo masculino e da raça branca. Estes dados são concordantes com dados da literatura, exceto em relação à idade, uma vez que a população do grupo controle estudada por Kupari et al<sup>61</sup> era mais jovem do que a população de pacientes com IC e em nosso estudo utilizamos como critério para seleção do grupo controle o

pareamento por idade. Vale ressaltar que a média da idade dos pacientes com IC, em nosso estudo, foi menor do que a média de idade dos pacientes estudados por Kupari et al.<sup>61</sup> Esta diferença pode ser explicada pelo considerável número de pacientes chagásicos presentes, uma vez que a doença de Chagas acomete pacientes mais jovens.

Ainda em relação às características basais da população, destaca-se que as diferenças observadas entre os grupos controle e IC relacionam-se a parâmetros que definem IC (FEVE baixa e DDVE aumentado); a alterações laboratoriais freqüentemente observadas na IC e a alterações clínicas comuns na IC (PAS e PAD baixas e FC e FR elevadas). Nota-se que a população estudada era composta por pacientes com doença mais grave - mediana da FEVE de 24 % e PAS de 96 mm Hg – quando comparada à população estudada por Kupari et al,<sup>61</sup> cuja média de FEVE foi 38 % e de PAS 114 mm Hg. Observamos ainda que o odor peculiar só foi identificado entre os pacientes com IC, o que pode estar relacionado ao fato de que o odor só é perceptível quando as concentrações de acetona são elevadas. Nosso estudo diferiu da literatura em relação à etiologia da cardiomiopatia, sendo a chagásica a predominante em nossa população e a valvar no estudo de Kupari et al.<sup>61</sup>

Quanto ao tratamento, os pacientes com IC estavam bem medicados e recebiam terapia considerada ótima para IC (94 % usavam IECA ou BRA; 100 % betabloqueador e 70 % espironolactona) em doses otimizadas. Em relação às medicações utilizadas, os pacientes recebiam tratamento de acordo com as atuais recomendações das Sociedades Brasileira,<sup>71</sup> Americana,<sup>72</sup> e Européia<sup>73</sup> de Cardiologia, diferentemente dos pacientes estudados por Kupari et al,<sup>61</sup> cujo tratamento incluía basicamente o uso de diuréticos (87 %) e digoxina (74 %), sendo o uso de IECA (51 %) e espironolactona (22 %) pouco freqüente e de betabloqueador ausente. Esta diferença já era esperada, uma vez que o único estudo<sup>61</sup> que avaliou acetona exalada em pacientes com IC foi realizado na década de 90, quando o conhecimento sobre os benefícios dos betabloqueadores<sup>74</sup> no tratamento da IC ainda não estava totalmente difundido.

Utilizamos para a identificação da acetona no ar exalado dos pacientes, o método de cromatografia gasosa associada à técnica de espectrometria de massas. Desta forma, estamos em concordância com dados da literatura que sugerem que a busca por novos biomarcadores deve envolver tecnologias novas capazes de identificar metabólitos com alta precisão mesmo em fluidos complexos.<sup>5</sup>

Para quantificar acetona exalada com maior eficiência, nós utilizamos a técnica de espectrofotometria. Observamos que os indivíduos do grupo controle apresentavam baixas concentrações de acetona exalada (mediana de 0,39 µg/L, variação interquartil de 0,30–0,79 µg/L). Estes dados se assemelham aos valores de acetona exalada observados em indivíduos saudáveis na literatura. Smith et al<sup>47</sup> estudaram o ar exalado de 30 indivíduos normais semanalmente por seis meses e encontraram concentração mediana de acetona de 477 partes por bilhão (ppb), que corresponde a 1,13 µg/L e Kupari et al<sup>61</sup> encontraram valor mediano de acetona de 19 nmol/L, que corresponde a 1,10 µg/L. Em nosso estudo, a concentração de acetona exalada entre os pacientes com IC foi significativamente maior (mediana de 3,7 µg/L) do que no grupo controle ( $p < 0,001$ ). Esta diferença também foi evidenciada por Kupari et al<sup>61</sup> que observaram entre os 31 pacientes com IC estudados, valor mediano de acetona exalada de 81 nmol/L (4,70 µg/L), valor semelhante à concentração de acetona exalada de nossa população. Observa-se que os valores encontrados em pacientes com IC por Kupari et al<sup>61</sup> foram aproximadamente 4 vezes mais elevados do que em indivíduos saudáveis e em nosso estudo os valores foram quase 10 vezes maiores. Esta diferença pode ser explicada em parte pelo menor número de pacientes estudados pelos autores, mas também pode ter sofrido a influência das 12 horas de jejum que antecederam a coleta do ar exalado mesmo no grupo de indivíduos saudáveis no estudo de Kupari et al<sup>61</sup>. Como sabemos, o jejum prolongado pode induzir a produção de corpos cetônicos<sup>75</sup> e tal fato pode ter contribuído para valores discretamente maiores de acetona exalada entre indivíduos saudáveis observados por Kupari et al.<sup>61</sup>

Quanto à dosagem de BNP, observamos que o grupo controle apresentou concentração mediana de 9,50 pg/mL, valor compatível com dados de literatura. McDonagh et al<sup>76</sup> avaliaram a capacidade do BNP diagnosticar disfunção sistólica de ventrículo esquerdo (VE) em pacientes sintomáticos ou assintomáticos e observaram concentração mediana de BNP de 7,70 pg/ml entre indivíduos com função de VE normal. Krupicka et al<sup>77</sup> em avaliação do efeito do exercício sobre o BNP em indivíduos saudáveis mostraram valores de BNP pré-exercício semelhantes (19 pg/mL). Daniels et al<sup>78</sup> estudaram a distribuição e as características dos peptídeos natriuréticos em atletas pré-competição e mostraram concentração mediana de BNP de 8 pg/mL. De acordo com as recomendações atuais considera-se que entre indivíduos jovens e saudáveis, 90 % apresentam BNP < 25 pg/mL.<sup>6</sup> Em nosso estudo, a concentração de BNP entre os pacientes com IC foi significativamente maior do que o observado no grupo controle ( $p < 0,001$ ). A comparação com dados da literatura é um pouco difícil, uma vez que o desenho dos estudos disponíveis é um pouco diferente do nosso. No entanto, níveis elevados de BNP foram demonstrados tanto em pacientes com IC crônica quanto IC aguda. McDonagh et al<sup>76</sup> mostraram que os níveis de BNP estão elevados em pacientes com disfunção sistólica de VE importante (FE < 30 %) sintomáticos ou não. Yamamoto et al<sup>79</sup> mostraram que o BNP é capaz de prever disfunção sistólica (FE < 45%) com boa acurácia diagnóstica (área sob a curva de 0,79). Wright et al<sup>80</sup> avaliaram 305 pacientes ambulatoriais estáveis com suspeita de IC e observaram níveis significativamente elevados de BNP entre os 77 pacientes que tiveram o diagnóstico clínico de IC confirmado e Maisel et al<sup>8</sup> mostraram que os níveis de BNP estão aumentados em pacientes que são admitidos na sala de emergência por dispnéia aguda secundária à IC quando comparados a pacientes com dispnéia secundária a outras causas.

Através da construção da curva ROC, nós demonstramos pela primeira vez, que a acetona exalada é capaz de diagnosticar IC com boa acurácia (área sob a curva de 0,94 com IC95% entre 0,91 a 0,99) sendo o melhor ponto de

---

corte 1,16 µg/L. Dados da literatura apenas pontuam que a acetona exalada está aumentada em pacientes com IC, porém não mostram dados de sensibilidade ou especificidade do método para o diagnóstico de IC.<sup>61</sup> Tal acurácia foi muito semelhante à acurácia observada quando utilizado o BNP como método diagnóstico de IC (área sob a curva de 0,97 com IC95% entre 0,94 a 1,00), sendo o melhor ponto de corte de BNP encontrado 42 pg/mL. O principal estudo que avaliou a acurácia do BNP para diagnóstico de IC foi realizado por Maisel et al<sup>8</sup> e definiu o valor de 100 pg/mL como melhor ponto de corte para o diagnóstico de IC. No entanto, a população estudada diferia da nossa, pois incluía pacientes com quadro de dispnéia aguda de etiologia desconhecida que foram admitidos na sala de emergência. Fuat et al,<sup>81</sup> ao avaliarem 297 pacientes com suspeita de IC, observaram que 40 pg/mL foi o ponto de corte do BNP com maior valor preditivo negativo e melhor acurácia para o diagnóstico de IC. Seus dados aproximam-se dos nossos muito provavelmente pela maior semelhança entre as populações estudadas, uma vez que os autores avaliaram pacientes com sinais sugestivos de IC, porém não apenas pacientes com sinais clínicos de descompensação da doença.

## **5.2 Grupo IC compensada versus IC descompensada**

Quanto às características basais, não foi observada diferença significativa entre os grupos ICCOMP e ICDESCOMP em relação ao sexo e à raça, sendo que houve predomínio do sexo masculino (63 % versus 61 %) e da raça branca (60 % versus 55 %) nos dois grupos. Também não se observou diferença quanto à idade, peso, IMC e comorbidades. No entanto, a etiologia predominante no grupo ICCOMP foi a cardiomiopatia idiopática (40 %) e no grupo ICDESCOMP foi a chagásica (49 %). Tal diferença pode ser explicada pela maior dificuldade em otimização do tratamento clínico e pela maior

freqüência de descompensações em pacientes com doença de Chagas.<sup>1</sup> As diferenças evidenciadas ( $p < 0,001$ ) para perfil hemodinâmico (100 % perfil A no grupo ICCOMP e 100 % perfil B ou C no grupo ICDESCOMP) e classe funcional (66 % NYHA 1/2 na ICCOMP e 100 % NYHA 3/4 na ICDESCOMP) relacionam-se diretamente à forma de apresentação da doença e refletem a maior gravidade do grupo descompensado, uma vez que dados da literatura<sup>63</sup> mostram que os perfis hemodinâmicos B, quente e congesto e C, frio e congesto, estão relacionados a maior risco de morte ou transplante de urgência e inclusive acrescentam informação prognóstica quando limitados a pacientes em classes funcionais da NYHA 3 ou 4.

Quanto às características clínicas, destacam-se as diferenças entre os grupos em relação aos níveis de PAS ( $p = 0,002$ ) e de FR ( $p < 0,001$ ), cujas alterações são inerentes à descompensação da IC. Apesar desta diferença, nota-se que os valores de PAS foram baixos tanto no grupo ICDESCOMP (mediana da PAS 90 mm Hg) quanto no grupo ICCOMP (mediana da PAS 100 mm Hg) quando comparados a dados da literatura, tal fato novamente reflete a maior gravidade de nossos pacientes. Dados do registro ADHERE,<sup>82</sup> que avaliou preditores de mortalidade em 33046 pacientes internados por IC agudamente descompensada, indicam como preditor independente de mortalidade níveis de PAS inferiores a 115 mm Hg. Apesar da exclusão de pacientes com insuficiência renal crônica, notamos níveis mais elevados de uréia (63 mg/dL versus 38 mg/dL,  $p < 0,001$ ) e creatinina (1,34 versus 1,02,  $p = 0,001$ ) no grupo descompensado. O mesmo raciocínio utilizado para a PAS pode ser aplicado ao avaliarmos as diferenças em relação à função renal, uma vez que estas duas variáveis também foram preditoras independentes de mortalidade no registro conduzido por Fonarow et al<sup>82</sup> e, portanto, refletem maior gravidade do pacientes. Os grupos também diferiram em relação aos níveis de enzimas hepáticas, bilirrubinas, lactato e catecolaminas. Tais diferenças também podem ser explicadas pela própria descompensação da doença que inclui congestão hepática, hipoperfusão e estado

hiperadrenérgico.<sup>63,83</sup> Observamos ainda que o odor peculiar só foi identificado entre os pacientes com IC descompensada, o que reflete as maiores concentrações de acetona encontradas entre pacientes descompensados. Quanto ao tratamento medicamentoso, observa-se que os pacientes dos dois grupos estavam recebendo terapia otimizada para IC, havendo diferença significativa apenas em relação ao uso de diuréticos de alça que foi mais freqüente entre os pacientes com IC descompensada.

Nosso estudo mostrou diferença ( $p < 0,001$ ) entre os níveis de acetona exalada encontrados em pacientes com IC crônica estáveis (mediana de 1,22 ug/L) e pacientes que apresentam IC agudamente descompensada (mediana de 7,8 ug/L). Embora Kupari et al<sup>61</sup> não tenham avaliado seus pacientes de acordo com o grau de descompensação da doença, observaram que os pacientes com estase jugular apresentavam níveis até 10 vezes mais elevados de acetona exalada do que indivíduos normais. Estes dados corroboram nossos resultados.

Quanto aos valores de BNP, também foram significativamente ( $p < 0,001$ ) maiores entre os pacientes agudamente descompensados (mediana de 1527 pg/mL) quando comparados aos pacientes com IC crônica estáveis (mediana de 224 pg/mL). Estes achados são compatíveis com dados de literatura. Maisel et al<sup>8</sup> avaliaram 1586 pacientes com dispnéia aguda, sendo 47 % com IC congestiva (744 pacientes). Entre estes pacientes, o valor médio encontrado para o BNP foi de  $675 \pm 450$  pg/mL, sendo ainda mais elevado entre pacientes em classe funcional 4 da NYHA ( $817 \pm 435$  pg/mL) em comparação com pacientes em classe funcional 1 ( $244 \pm 286$  pg/mL), cujos valores aproximam-se dos encontrados em nosso estudo para pacientes estáveis com IC compensada (66 % em classe funcional 1 ou 2).

Nós demonstramos, também pela primeira vez, que a acetona exalada é um biomarcador da descompensação da IC e que níveis elevados de acetona (maiores que 2,50  $\mu\text{g/L}$ ) são capazes de diagnosticar IC descompensada com boa acurácia (área sob a curva de 0,93 com IC95% entre 0,88 a 0,98),

semelhante à acurácia diagnóstica do BNP (valores maiores que 424 pg/mL) nesta mesma população (área sob a curva de 0,94 com IC95% entre 0,88 a 0,99). Dados da literatura<sup>16,84</sup> sugerem que embora o ponto de corte de 100 pg/mL de BNP seja excelente para afastar IC devido ao seu alto valor preditivo negativo, seu valor preditivo positivo é menos robusto e não auxilia o clínico a excluir outras causas de elevação do BNP incluindo embolia pulmonar, cor pulmonale ou até mesmo a presença de disfunção VE sem exacerbação da IC a menos que ultrapasse o valor de 400 pg/mL. Assim, a necessidade de um segundo ponto de corte para confirmação diagnóstica de IC descompensada como causa de dispnéia principalmente em pacientes que já apresentam disfunção sistólica do VE corroboram nossos resultados.

### **5.3 Grupo IC com congestão versus IC com hipoperfusão**

Dados da literatura sugerem que a classificação proposta por Nohria et al,<sup>63</sup> que consiste em subdividir os pacientes com IC descompensada de acordo com sinais e sintomas clínicos de congestão ou hipoperfusão, é útil na avaliação de prognóstico de pacientes com IC. Os autores demonstraram que o perfil mais freqüente é o perfil B (quente e congesto), seguido do perfil C (frio e congesto) e que ambos são preditores independentes de morte ou transplante de urgência em pacientes com IC descompensada, mesmo quando avaliados apenas pacientes com classes funcionais 3 ou 4.

Em nosso estudo, também avaliamos pacientes com estes dois perfis hemodinâmicos e quanto às características basais, observamos que houve predomínio do sexo masculino tanto no grupo ICCONG (67 %) quanto ICBXDB (55 %), assim como da raça branca (60 % e 52 %, respectivamente). No entanto, os grupos diferiram em relação à idade ( $p = 0,032$ ), peso ( $p = 0,022$ ) e IMC ( $p = 0,022$ ), sendo que os pacientes do grupo com hipoperfusão eram mais

jovens e tinham menor peso . A etiologia predominante foi a chagásica nos dois grupos e também não houve diferença em relação às comorbidades. Os dados de nossa população são concordantes com o perfil de pacientes avaliados por Nohria et al,<sup>63</sup> exceto pela etiologia da cardiomiopatia, uma vez que aproximadamente 50% dos pacientes estudados pelos autores apresentavam cardiomiopatia isquêmica.

Quanto às características clínicas, observamos que houve diferença significativa entre os grupos apenas em relação aos sintomas e sinais que definem hipoperfusão como PAS e PAD mais baixos e TEC lentificado ( $p < 0,001$ ). Estes dados são concordantes com o perfil hemodinâmico de cada grupo: ICCONG – perfil quente e congesto e ICBXDB – perfil frio e congesto. No entanto, diferem em relação aos valores observados na população estudada por Nohria et al,<sup>63</sup> que apresentavam PAS mais elevada do que em nossa população (perfil B: 114 versus 100 mm Hg e perfil C: 103 versus 80 mm Hg). Tal fato sugere maior gravidade dos pacientes de nosso estudo. A FEVE mediana foi de 24 % no grupo ICCONG e 20 % no grupo ICBXDB sem diferença estatística ( $p = 0,056$ ), dados semelhantes aos encontrados por Nohria et al.<sup>63</sup> Quanto à presença do odor peculiar, observamos que no grupo ICBXDB o odor foi identificado em 89,6 % dos pacientes e no grupo ICCONG em 63,3 % ( $p = 0,018$ ), o que pode estar relacionado à tendência a maiores concentrações de acetona entre pacientes com hipoperfusão. Quanto às variáveis laboratoriais, observamos que o grupo com hipoperfusão apresentava valores mais elevados de uréia, creatinina, catecolaminas plasmáticas e lactato venoso e menores níveis de sódio sérico, sem alteração significativa em relação à outros parâmetros laboratoriais. Estas diferenças estão de acordo com dados da literatura que mostram alteração da função renal com maior frequência em pacientes com perfil frio e congesto.<sup>63</sup> Por fim, em relação ao tratamento da IC, os pacientes dos dois grupos estavam recebendo terapia otimizada para IC. Vale ressaltar que neste aspecto, nosso estudo diferia do estudo conduzido por

Nohria et al,<sup>63</sup> pois neste estudo apenas 26 % dos pacientes estavam em uso de betabloqueador e a FC média dos pacientes era de 90 bpm.

A concentração de acetona exalada mostrou-se elevada tanto no grupo ICCONG quanto no grupo ICBXDB, sendo discretamente maior nos pacientes com sinais de hipoperfusão (10,0 versus 6,8 µg/L), porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p = 0,056$ ). Tal fato sugere que as altas concentrações de acetona estão relacionadas à congestão sistêmica, uma vez que esta característica foi comum aos dois grupos. Estes resultados corroboram a observação de Kupari et al<sup>61</sup> de que pacientes com sinais de congestão venosa sistêmica apresentavam maiores concentrações de acetona exalada. No entanto, a tendência a maiores valores entre os pacientes do grupo ICBXDB sugere que acetona exalada também pode estar relacionada à hipoperfusão e gera a perspectiva de novos estudos com maior número de pacientes, desenhados especificamente para avaliar os diferentes perfis hemodinâmicos de apresentação do pacientes com IC descompensada.

#### **5.4 Correlações e variáveis interferentes para acetona exalada**

Observamos correlação fortemente positiva ( $r = 0,772$ ,  $p < 0,001$ ) entre acetona exalada e BNP plasmático. Tal resultado fortalece a hipótese de que a acetona exalada é realmente um biomarcador do diagnóstico de IC, uma vez que diversos estudos mostram o valor do BNP para o diagnóstico de IC crônica<sup>76,79</sup> e IC aguda.<sup>8</sup> No entanto, os níveis de BNP sofrem influência de diferentes variáveis e este fato deve ser levado em consideração no momento da análise de seus resultados.<sup>11,12,13,14,15</sup>

Correlação positiva ( $r = 0,573$ ,  $p < 0,001$ ) também foi observada entre acetona exalada e catecolaminas séricas. Tal fato reflete, em parte, o provável

mecanismo pelo qual ocorre aumento de acetona exalada em pacientes com IC descompensada. Dados da literatura sugerem que na IC avançada ocorre aumento de catecolaminas. Altos níveis de norepinefrina estimulam lipólise, aumentam as concentrações de ácidos graxos livres e, conseqüentemente, aumentam a produção de corpos cetônicos.<sup>83,85,86</sup> Estas alterações serão discutidos em detalhes a seguir.

Quanto à presença de odor peculiar, observamos correlação positiva com os níveis de acetona exalada ( $r = 0,683$ ,  $p < 0,001$ ). Tal fato sugere que a substância encontrada no ar exalado (acetona) de pacientes com IC pode ser responsável pelo odor peculiar exalado por estes pacientes. No entanto, a análise deste achado deve ser interpretada com cautela, uma vez que a avaliação do odor é subjetiva e foi definida por um único observador.

Na avaliação da relação da acetona exalada com gravidade de IC, observamos concentrações progressivamente maiores de acordo com aumento da classe funcional segundo a NYHA. Não há na literatura estudos que avaliem a acetona exalada de acordo com a classe funcional da IC. No entanto, nossos resultados se assemelham ao que foi observado por Maisel et al<sup>8</sup> quando avaliaram a relação das concentrações de BNP com a classe funcional de pacientes com IC.

Considerando que nosso estudo descreve um novo biomarcador de IC, a avaliação de possíveis fatores interferentes na acetona exalada se fez necessária. Na análise univariada, observamos que as variáveis relacionadas à IC direita apresentaram correlação fortemente positiva com acetona exalada ( $p < 0,001$ ): hepatomegalia ( $r = 0,785$ ), turgência jugular ( $r = 0,725$ ), refluxo hepato-jugular ( $r = 0,741$ ), ascite ( $r = 0,602$ ), GGT ( $r = 0,657$ ), edema de membros inferiores ( $r = 0,653$ ), bilirrubinas ( $r = 0,628$ ), disfunção de VD ( $r = 0,585$ ), assim como o uso de betabloqueadores ( $r = 0,596$ ), IECA ( $r = 0,554$ ), diuréticos de alça ( $r = 0,426$ ), espirolactona ( $r = 0,366$ ) e aspirina ( $r = 0,331$ ). A alta incidência de cardiomiopatia chagásica entre os pacientes com IC descompensada (49 %) justifica a alta freqüência de IC direita entre os

pacientes descompensados. Assim, parece-nos que a acetona eleva-se no ar exalado de pacientes com doença mais grave com IC direita predominante, características comuns aos chagásicos. Pela análise multivariada, observamos que permaneceram ainda associados à maior concentração de acetona exalada níveis elevados de bilirrubina e creatinina; alta frequência respiratória; TEC lentificado; síncope e a presença de refluxo hepato-jugular e disfunção de VD. Nenhuma das medicações utilizadas esteve independentemente associada com a produção de acetona exalada. Estes resultados reforçam a possível associação da produção exacerbada de acetona com IC direita e com maior gravidade da doença, uma vez que se associam à variáveis em geral presentes em pacientes com doença mais avançada. No entanto, devido à baixa linearidade observada através da regressão linear múltipla tanto para variáveis contínuas ( $r^2$  ajustado = 0,48) quanto para variáveis categóricas ( $r^2$  ajustado = 0,43), tais variáveis não podem ser consideradas preditoras da acetona, mas apenas variáveis de influência.

### **5.5 Explicações fisiopatológicas para o aumento da acetona exalada na IC**

Alterações do metabolismo sistêmico e do metabolismo da célula miocárdica têm sido vastamente estudadas nos últimos anos.<sup>83,87</sup> Estudos clínicos têm demonstrado que a acetona exalada é indicativa de cetose sistêmica.<sup>88</sup> No entanto, os possíveis mecanismos que levam ao aumento de acetona exalada em pacientes com IC ainda não foram totalmente esclarecidos.

Sabemos que pacientes com IC apresentam aumento de catecolaminas plasmáticas<sup>89,90,91</sup> e que os níveis elevados de catecolaminas estão associados

à maior risco de morte conforme demonstrado por Cohn et al<sup>1</sup> (1984 apud Opie et al, 2009, p.1637-1646).<sup>89</sup>

Altos níveis de norepinefrina estimulam lipólise e aumentam as concentrações de ácidos graxos livres (AGL) provavelmente devido ao maior estímulo  $\beta$ -adrenérgico.<sup>83</sup> Durante situações de estresse como fome extrema e IC avançada, grande demanda é requerida ao fígado para gerar a energia necessária ao restante dos órgãos, incluindo o miocárdio. O fígado precisa manter o Ciclo de Krebs para produção intra-hepática de trifosfato de adenosina (ATP) e a gliconeogênese para produção de glicose para os tecidos extra-hepáticos. Considerando que estes dois processos requerem os mesmos intermediários, tanto a produção de ATP quanto a produção de glicose pela gliconeogênese ficam mais lentos.<sup>92</sup> Como resultado, acetil-coenzima A (acetil-CoA) acumula na mitocôndria, o que leva a uma série de reações de condensação que produzem corpos cetônicos na forma de três moléculas: acetoacetato;  $\beta$ -hidroxibutirato e acetona (figura 17). Dentre estas três moléculas somente acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato são metabolicamente ativos, mas a volatilidade da acetona permite a detecção de cetose através do ar exalado. Na IC avançada, além das alterações acima descritas, as altas concentrações de AGL circulantes contribuem para o aumento de corpos cetônicos.<sup>86</sup> Embora o fígado possua as enzimas necessárias para a produção de corpos cetônicos, ele não produz as enzimas necessárias para a metabolização destes compostos. Como resultado, corpos cetônicos acumulam na corrente sanguínea e passam a ser responsáveis por gerar a energia necessária aos tecidos como cérebro, coração, músculo e rins durante situações de escassez de glicose.

---

<sup>1</sup> Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. N Engl J Med. 1984 Sep;311(13):819-23.

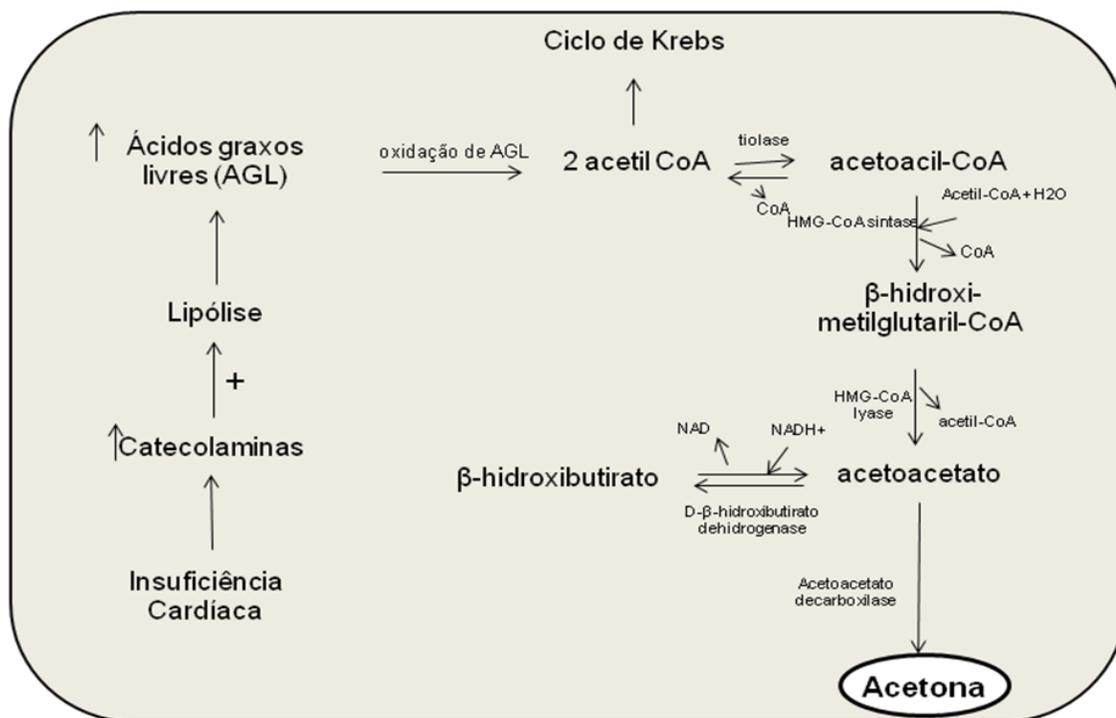


Figura 17 - Alterações metabólicas sistêmicas na IC avançada

Além das alterações metabólicas sistêmicas que ocorrem na IC, algumas alterações específicas do metabolismo da célula miocárdica que ocorrem nas diferentes fases da doença podem explicar a presença de acetona exalada em pacientes com IC e, principalmente, sua relação com a maior gravidade da doença.

Glicose e AGL são os principais substratos usados pela célula miocárdica normal para produzir energia através de glicólise e  $\beta$ -oxidação (figura 18). Em condições aeróbicas, a célula miocárdica oxida preferencialmente AGL. Diante de estresse metabólico, a glicose passa a ser a principal fonte de energia para a célula miocárdica e o aumento de sua captação tem efeito protetor sobre a função do cardiomiócito.<sup>93</sup> Assim, alteração na regulação da captação de glicose pelo miocárdico pode contribuir para doença cardíaca. Na IC, a contribuição de cada um destes substratos pode mudar dependendo do estágio da doença. Na fase inicial da IC, a utilização de

AGL praticamente não se altera e a utilização de glicose aumenta (efeito protetor). Com a evolução da doença, a utilização de AGL decresce substancialmente, o miocárdio desenvolve resistência à insulina e a maioria dos estudos mostra também declínio na utilização de glicose pela célula miocárdica.<sup>87</sup> Portanto, na IC avançada, ocorre redução da captação tanto de AGL quanto de glicose. Além disso, os altos níveis de AGL circulantes (por maior produção e menor utilização) podem gerar aumento nas concentrações de corpos cetônicos. Tal fato foi demonstrado também clinicamente por Lommi et al<sup>90,91</sup> que observaram níveis elevados de catecolaminas, AGL e corpos cetônicos (acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato) em pacientes com IC quando comparados a pacientes com doença cardíaca, porém sem IC.

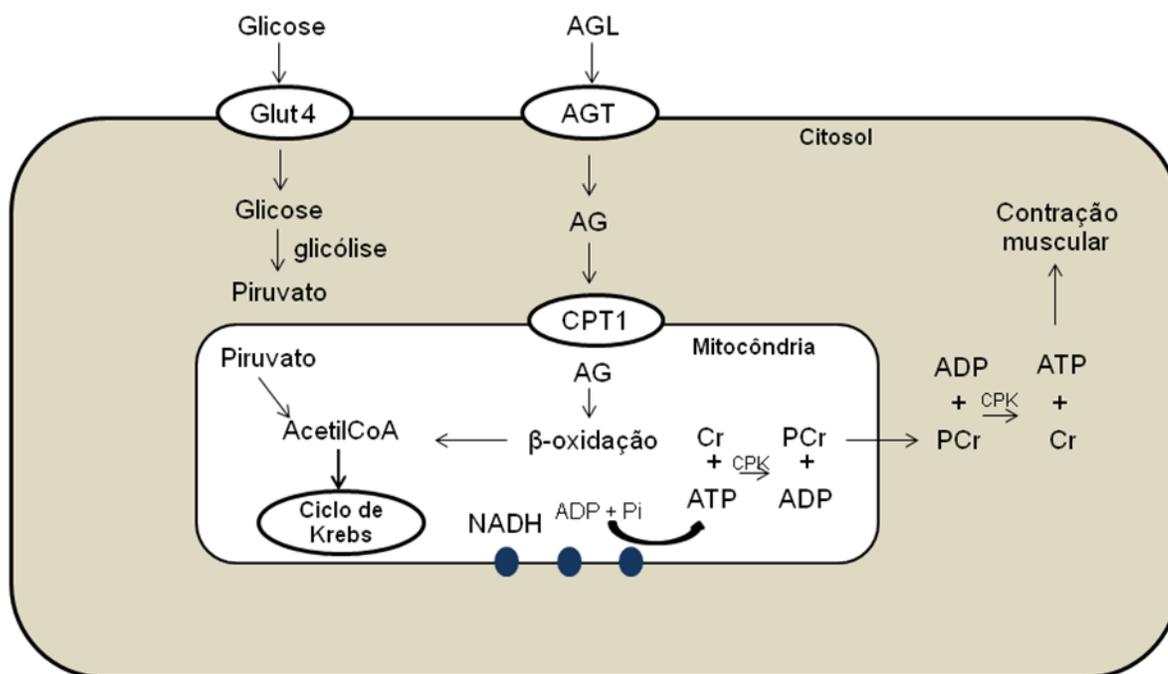


Figura 18 - Metabolismo da célula miocárdica normal

Glut 4: transportador de glicose; AGL: ácidos graxos livres; AGT: transportador de ácido graxo; CPT1: carnitina palmitoil transferase 1; ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; Cr: creatina; PCr: fosfocreatina

Alguns autores ainda sugerem que os corpos cetônicos podem não somente elevar-se na IC avançada, mas talvez também contribuir para a

disfunção miocárdica. Estudos *in vitro* mostram que corpos cetônicos regulam a captação de glicose cardíaca e podem desta forma contribuir para a mudança no metabolismo miocárdico na IC avançada.<sup>94</sup> Neste contexto, a presença de acetona em alta concentração no ar exalado de pacientes com IC pode ser considerado não apenas um marcador de gravidade da doença, mas também pode contribuir para o dano miocárdico.

### 5.6 Acetona exalada e gravidade de IC

A observação clínica de que o odor peculiar era mais evidente em pacientes internados por IC descompensada e, muitas vezes, em uso de drogas vasoativas, nos levou a pensar que a acetona exalada poderia ter relação com maior gravidade da doença e até mesmo com pior prognóstico. Inicialmente mostramos que há diferença na concentração de acetona exalada de acordo com a classe funcional da NYHA, sendo que pacientes em classe funcional 4 apresentam os maiores valores de acetona exalada.

Observamos que a maioria dos pacientes que foram a óbito em 60 dias apresentava acetona exalada elevada (valores acima do percentil 50 para acetona exalada) sugerindo que a presença de acetona no ar exalado de pacientes com insuficiência cardíaca possa estar relacionado a pior prognóstico. Acreditamos que a explicação para os altos níveis de acetona exalada encontrados em pacientes que evoluíram a óbito está no mecanismo que leva ao aumento da produção de acetona em pacientes com IC avançada acima descrito. As mudanças que ocorrem no metabolismo sistêmico geram maior produção de corpos cetônicos.<sup>83,86</sup> Entre estes, está a acetona, cuja produção reflete as alterações sistêmicas da IC e a volatilidade permite sua detecção de forma não invasiva através do ar exalado.

Os resultados observados são intrigantes e levantam a hipótese de possível papel da acetona exalada como preditora de eventos em pacientes com IC. No entanto, tais achados são apenas exploratórios uma vez que o estudo não foi desenhado para avaliação prognóstica. Estudos prospectivos envolvendo maior número de pacientes são necessários para confirmar possível papel da acetona exalada como biomarcador de prognóstico de IC.

### **5.7 Limitações do estudo**

A principal limitação de nosso estudo é o pequeno número de pacientes envolvidos. No entanto, os resultados observados são relevantes e o fato de revelar a acetona exalada como potencial biomarcador da gravidade da IC pode inspirar a realização de estudos maiores que confirmem nossos achados. A exclusão de pacientes diabéticos e pacientes com doença renal crônica, necessária para evitar potencial viés no estabelecimento de um novo método diagnóstico, é uma limitação importante, uma vez que estas são comorbidades freqüentemente associadas à IC. Estudos futuros envolvendo pacientes com estas comorbidades possibilitarão expandir a aplicação do método para pacientes com IC que apresentem outras doenças crônicas.

### **5.8 Considerações finais e implicações clínicas**

O presente estudo foi idealizado a partir da observação clínica de que pacientes internados por IC descompensada, graves e muitas vezes em uso de drogas vasoativas, exalam odor peculiar. Diante desta observação, nós desenvolvemos com tecnologia nacional um dispositivo capaz de coletar o ar

exalado destes pacientes à beira leito. Os achados do estudo revelaram que a acetona exalada é um novo biomarcador de IC que é capaz de identificar os pacientes com maior gravidade da doença. Considerando a alta morbimortalidade da IC, o desenvolvimento de um novo método não invasivo, acessível e reprodutível, capaz de identificar pacientes de maior risco de maneira rápida e eficaz, pode ter grande aplicabilidade clínica tanto para o diagnóstico quanto para o seguimento de pacientes com IC.

*Conclusões*

## **6 CONCLUSÕES**

- Nosso estudo revelou a acetona exalada como novo biomarcador do diagnóstico de IC crônica e do diagnóstico de IC descompensada;
- A dosagem de acetona exalada, método de diagnóstico não invasivo, apresentou acurácia semelhante ao BNP para o diagnóstico de IC e IC descompensada;
- Houve correlação fortemente positiva entre acetona exalada e níveis séricos de BNP em pacientes com IC;
- A concentração de acetona no ar exalado de pacientes com IC aumentou progressivamente de acordo com a classe funcional da NYHA;
- A acetona exalada não foi capaz de diferenciar pacientes com IC descompensada de acordo com o perfil hemodinâmico de apresentação na Unidade de Emergência.

*Anexos*

## 7 ANEXOS

### Anexo A - Dispositivo inicial de coleta do ar exalado

Para a coleta do ar exalado, foi desenvolvido inicialmente um dispositivo junto com o Laboratório de Bioengenharia do InCor com base na descrição de aparelhos usados em outros trabalhos na literatura.<sup>61,64</sup>

Tratava-se de um conduto de Poliacetal (Delrin, Dupont) em forma de T que continha uma válvula unidirecional composta por membrana fina acoplada. Esta membrana era capaz de abrir quando da inspiração do paciente e de fechar mediante a expiração do mesmo para que todo o ar exalado pudesse ser direcionado para a “base” do conduto em T e ser coletado em frasco de vidro (*impinger*), imerso em água e gelo em recipiente térmico. Durante a respiração não forçada por aproximadamente dez (10) minutos, a passagem dos gases exalados pela região refrigerada do *impinger* provocava a condensação de vapor juntamente com gases solúveis, como a acetona. Findada a coleta, o material condensado era envasado hermeticamente e congelado para preservação até o momento da realização da análise química. Abaixo segue uma figura ilustrativa do primeiro aparelho acima descrito.

Este dispositivo foi utilizado durante o projeto piloto (fase exploratória). No entanto, observou-se certa dificuldade para os pacientes com IC descompensada respirarem continuamente pelo dispositivo fechado por tempo prolongado (10 minutos), além de diferenças nos volumes coletados entre os pacientes. Para melhor reprodutibilidade do procedimento de amostragem, substituiu-se o controle do período de tempo de coleta pela delimitação do volume total de ar exalado pelo paciente.

O aperfeiçoamento do aparelho de amostragem deu-se principalmente no Instituto de Química da USP. Com um gerador de gás de concentração padronizada de acetona, constatou-se a pequena eficiência do coletor original, de uso não otimizado para acetona. A principal explicação para

a pequena absorção da acetona é o reduzido volume de água que condensa no recipiente coletor original (nulo no início), vez que a partição líquido/gás, expressa pela constante da lei de Henry de  $28,3 \text{ mol L}^{-1} \text{ atm}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  (ou  $106 \text{ mol L}^{-1} \text{ atm}^{-1}$  a  $2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), não é das mais elevadas e o contato do gás com as gotículas nas paredes é insuficiente. A adição de água ao recipiente coletor (frasco tipo *impinger*) antes do início da coleta permite que a acetona seja solubilizada e retida com eficiência muito maior. Após vários aperfeiçoamentos, chegou-se a uma versão simples e eficiente do coletor, em que são colocados, de início, 5,0 ml de água destilada no *impinger* imerso em banho de gelo (para a constante de Henry mais elevada).

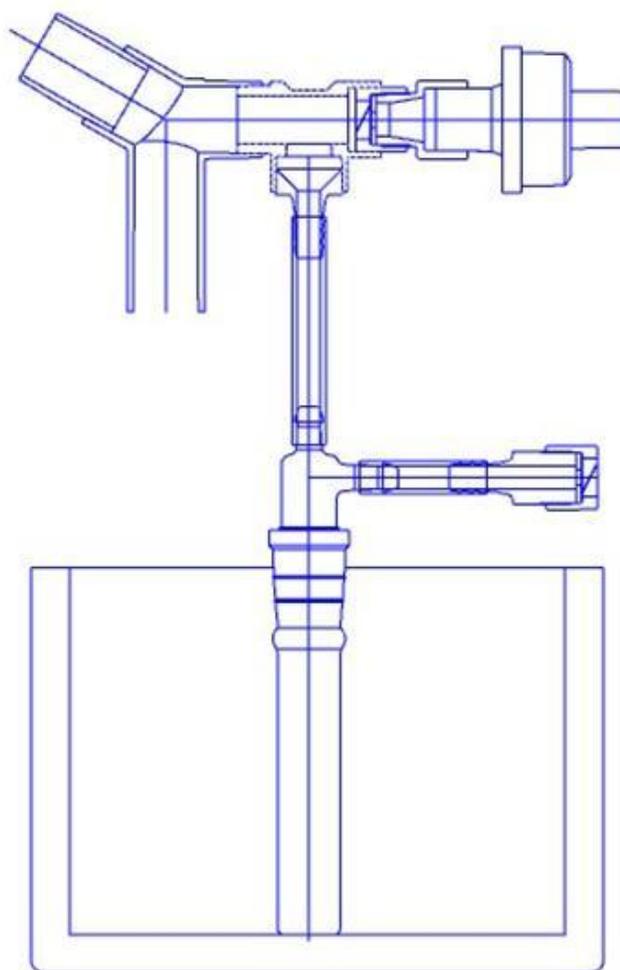


Figura 19 - Dispositivo inicial de coleta do ar exalado



---

### **III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:**

#### **1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:**

Estamos iniciando um estudo com pacientes que apresentam insuficiência cardíaca (“coração inchado”), a mesma doença que o senhor tem no coração. Neste estudo, será analisado o que existe no ar eliminado com a respiração de pacientes com insuficiência cardíaca e o senhor está sendo convidado a participar deste estudo. O objetivo de analisar o ar exalado por pacientes como o senhor é descobrir quais são as substâncias eliminadas e o que elas podem refletir da doença cardíaca em estudo. Entendendo melhor o que se passa no organismo de pacientes como o senhor, poderemos pesquisar novas formas de tratamento para melhorar a qualidade de vida de pacientes com insuficiência cardíaca. Para isso, precisaremos coletar o material que o senhor elimina com a respiração através de um aparelho acoplado em sua boca. Em seguida, precisaremos coletar uma amostra de sangue e de urina que serão comparados aos gases eliminados com a respiração.

#### **2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos:**

Nesta pesquisa, estudaremos um total de 110 pacientes que igualmente ao senhor (a) são portadores de Miocardiopatia Dilatada e Insuficiência Cardíaca. Se o senhor (a) concordar em participar desse estudo será necessário coletar os gases eliminados pela respiração do senhor. Para isso, o senhor precisará respirar por dez minutos através de um aparelho acoplado a sua boca com nariz fechado. Durante a realização do teste o senhor (a) permanecerá sentado em frente a uma mesa onde será apoiado o aparelho por onde o senhor (a) respirará por cerca de 10 minutos, em companhia de um médico que irá se comunicar com o senhor (a). Este aparelho contém um bucal para o senhor ajustar à boca e tubos que permitirão a passagem do ar eliminado por sua respiração até que atinjam um recipiente de vidro, que estará mergulhado em frasco com gelo e água. Respirando normalmente pela boca por dez minutos, o ar exalado pelo senhor se transformará em líquido por estar em contato com uma superfície fria (gelo e água) e se misturará à água presente no recipiente de vidro. Este líquido será, então, coletado e analisado junto com o material colhido de outros pacientes que participarem do trabalho. A análise deste líquido permitirá a identificação das substâncias eliminadas pelo senhor e por pacientes portadores de insuficiência cardíaca em diferentes fases da doença e a comparação com as substâncias eliminadas por pessoas que não têm insuficiência cardíaca. Será necessário também colher uma amostra de urina e puncionar uma veia do seu braço para coletarmos amostra de sangue para dosagem de substâncias produzidas em seu corpo que possam estar relacionadas aos gases eliminados na respiração. Os exames colhidos nesta fase são os mesmos colhidos rotineiramente em seu acompanhamento ambulatorial ou ainda em sua admissão ao pronto socorro diante de descompensação da doença cardíaca. As coletas de sangue e urina serão realizadas logo após coleta do condensado do ar exalado, uma única amostra por paciente. Se o senhor fizer parte do grupo que chegou ao pronto socorro, após as coletas acima referidas será iniciado seu tratamento clínico a critério da equipe que estiver responsável pelo senhor na unidade de emergência. Se o senhor permanecer internado, após doze a vinte quatro horas de tratamento, o senhor precisará respirar novamente por dez minutos através do aparelho para coleta de novas amostras. Somente no caso de internação, serão necessárias duas coletas do ar exalado.

**3-Desconfortos e riscos esperados:**

Como já descrito anteriormente, o senhor (a) deverá respirar pela boca por dez minutos com o nariz fechado, isto pode ser um pouco incômodo no início até que o senhor (a) se acostume. Este desconforto deve-se ao fato que normalmente estamos acostumados a respirar inspirando pelo nariz e expirando pela boca e durante a coleta toda a respiração deverá ser feita pela boca sem deixar escapar ar durante a expiração, pois o ar eliminado com a respiração deverá ser todo direcionado para dentro do aparelho. No entanto, o processo torna-se mais fácil ao longo da coleta por adaptar-se a respirar pela boca. Para minimizar este desconforto, o senhor deverá manter-se calmo respirando pausadamente, lembrando-se de que sempre estará acompanhado por um médico que lhe dará todas as orientações necessárias para que a coleta seja feita de forma tranqüila e com segurança. Não há necessidade de forçar a respiração. Apesar deste pequeno desconforto o procedimento não lhe causará nenhum prejuízo e nem piora dos sintomas clínicos. Não há riscos maiores para o senhor. O senhor (a) também será puncionado para coleta de amostra de sangue e coletará amostra de urina. No entanto, estas coletas são as mesmas necessárias de rotina no seu acompanhamento cardiológico ou então exames que normalmente são colhidos na entrada na sala de emergência quando diante de descompensações clínicas.

**4- Benefícios que poderão ser obtidos:**

Os gases eliminados pela respiração de qualquer pessoa podem refletir alterações em nosso organismo. Já sabemos que os gases eliminados por pacientes com insuficiência cardíaca são diferentes dos indivíduos sem doença cardíaca, mas não sabemos exatamente o que são estes gases. Assim a análise dos mesmos nos permitirá melhor estudo do que acontece com o metabolismo de pacientes como o senhor (a) com insuficiência cardíaca e desta forma poderá nos ajudar no futuro a decidir o tratamento mais adequado para cada fase da insuficiência cardíaca.

**5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:**

Caso decida em não participar desse estudo não haverá nenhum problema para o seu tratamento e o senhor (a) continuará o seu acompanhamento clínico com seu médico assistente. Existem outros exames laboratoriais que permitem a avaliação clínica e o acompanhamento da doença que o senhor possui no coração.

---

**IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:**

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas:
  2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência:
  3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade:
  4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa:
  5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa:
-

---

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

Dra. Fabiana Goulart Marcondes Braga; InCor HC-FMUSP – Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 CEP 05403-300 São Paulo-SP 11- 30695419.

Dr. Sandrigo Mangini; InCor HC-FMUSP – Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 CEP 05403-300 São Paulo-SP 11- 30695419.

Prof. Dr. Fernando Bacal; InCor HC-FMUSP – Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 CEP 05403-300 São Paulo-SP 11- 30695419.

---

**VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**

O senhor (a) receberá cópia deste documento para guardar como prova da sua participação e para sua segurança.

---

**VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
assinatura do pesquisador  
(carimbo ou nome Legível)

**INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO  
(Resolução Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 outubro 1996)**

1. Este termo conterà o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser preenchido em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário do paciente.
5. A via do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa -CAPPesq deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.

Todos os pacientes foram informados de que a respiração contínua por dez minutos não era mais necessária e de que precisavam apenas soprar pelo bucal espontaneamente, podendo descansar quantas vezes fosse necessário durante a coleta.

## *Referências*

---

---

## 8 REFERÊNCIAS

1. Bocchi EA, Guimarães G, Tarasoutshi F, Spina G, Mangini S, Bacal F. Cardiomyopathy, adult valve disease and heart failure in South America. *Heart*. 2009;95(3):181-9.
2. Bocchi EA, Cruz F, Guimarães G, Pinho Moreira LF, Issa VS, Ayub Ferreira SM, Chizzola PR, Souza GE, Brandão S, Bacal F. Long-term prospective, randomized, controlled study using repetitive education at six-month intervals and monitoring for adherence in heart failure outpatients: the REMADHE trial. *Circ Heart Fail*. 2008;1(2):115-24.
3. DATASUS [base de dados na internet]. Brasil: Ministério da Saúde. [acesso em 24 set 2011]. Disponível em: [www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br).
4. Singh V, Martinezclark P, Pascual M, Shaw ES, O'Neill WW. Cardiac biomarkers - the old and the new: a review. *Coron Artery Dis*. 2010;21(4):244-56.
5. Gerszten RE, Wang TJ. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature*. 2008;451(7181):949-52.
6. Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:2357-68.
7. Taub PR, Gabbai-Saldate P, Maisel A. Biomarkers of Heart Failure. *Congest Heart Fail*. 2010;16(4 Suppl 1):S19-24.
8. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Clopton P, Steg PG,

- Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA. Breathing Not Properly Multinational Study Investigators. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med.* 2002;347(3):161-7.
9. Mueller C, Scholer A, Laule-Kilian K, Martina B, Schindler C, Buser P, Pfisterer M, Perruchoud AP. Use of B-type natriuretic peptide in the evaluation and management of acute dyspnea. *N Engl J Med.* 2004;350(7):647-54.
10. Januzzi JL Jr, Camargo CA, Anwaruddin S, Baggish AL, Chen AA, Krauser DG, Tung R, Cameron R, Nagurney JT, Chae CU, Lloyd-Jones DM, Brown DF, Foran-Melanson S, Sluss PM, Lee-Lewandrowski E, Lewandrowski KB. The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study. *Am J Cardiol.* 2005;95(8):948-54.
11. Hogenhuis J, Voors AA, Jaarsma T, Hoes AW, Hillege HL, Kragten JA, van Veldhuisen DJ. Anaemia and renal dysfunction are independently associated with BNP and NT-proBNP levels in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2007;9(8):787-94.
12. Tsutamoto T, Wada A, Sakai H, Ishikawa C, Tanaka T, Hayashi M, Fujii M, Yamamoto T, Dohke T, Ohnishi M, Takashima H, Kinoshita M, Horie M. Relationship between renal function and plasma brain natriuretic peptide in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(3):582-6.
13. McCullough PA, Duc P, Omland T, McCord J, Nowak RM, Hollander JE, Herrmann HC, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Storrow AB,

- Abraham WT, Lamba S, Wu AH, Perez A, Clopton P, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Maisel AS. B-type natriuretic peptide and renal function in the diagnosis of heart failure: an analysis from the Breathing Not Properly Multinational Study. *Am J Kidney Dis.* 2003;41(3):571–9.
14. Daniels LB, Clopton P, Bhalla V, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA, Maisel AS. How obesity affects the cut-points for B-type natriuretic peptide in the diagnosis of acute heart failure. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study. *Am Heart J.* 2006;151(5):999-1005.
15. Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Bailey KR, Burnett JC Jr. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40(5):976-82.
16. Brenden CK, Hollander JE, Guss D, McCullough PA, Nowak R, Green G, Saltzberg M, Ellison SR, Bhalla MA, Bhalla V, Clopton P, Jesse R, Maisel AS. Gray zone BNP levels in heart failure patients in the emergency department: results from the Rapid Emergency Department Heart Failure Outpatient Trial (REDHOT) multicenter study. *Am Heart J.* 2006;151(5):1006-11.
17. van Kimmenade RR, Pinto YM, Bayes-Genis A, Lainchbury JG, Richards AM, Januzzi JL Jr. Usefulness of intermediate amino-terminal pro-brain natriuretic peptide concentrations for diagnosis and prognosis of acute heart failure. *Am J Cardiol.* 2006;98(3):386-90.

18. Maisel A, Mueller C, Nowak R, Peacock WF, Landsberg JW, Ponikowski P, Mockel M, Hogan C, Wu AH, Richards M, Clopton P, Filippatos GS, Di Somma S, Anand I, Ng L, Daniels LB, Neath SX, Christenson R, Potocki M, McCord J, Terracciano G, Kremastinos D, Hartmann O, von Haehling S, Bergmann A, Morgenthaler NG, Anker SD. Mid-region pro-hormone markers for diagnosis and prognosis in acute dyspnea: results from the BACH (Biomarkers in Acute Heart Failure) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(19):2062-76.
19. Mazzini GS, Schaf DV, Vinadé ER, Horowitz E, Bruch RS, Brunm LM, Gonçalves CA, Bacal F, Souza DO, Portela LV, Bordignon S. Increased S100B serum levels in dilated cardiomyopathy patients. *J Card Fail.* 2007;13(10):850-4.
20. Gottlieb SS, Kukin ML, Ahern D, Packer M. Prognostic importance of atrial natriuretic peptide in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1989;14(3):812.
21. Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, Latini R, Masson S, Maggioni AP, Glazer RD, Tognoni G, Cohn JN; Val-HeFT Investigators. Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation.* 2003;107:1278–83.
22. Berger R, Huelsman M, Strecker K, Bojic A, Moser P, Stanek B, Pacher R. B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 2002;105:2392–7.
23. Maisel A, Hollander JE, Guss D, McCullough P, Nowak R, Green G, Saltzberg M, Ellison SR, Bhalla MA, Bhalla V, Clopton P, Jesse R. Rapid

- Emergency Department Heart Failure Outpatient Trial investigators. Primary results of the Rapid Emergency Department Heart Failure Outpatient Trial (REDHOT). A multicenter study of B-type natriuretic peptide levels, emergency department decision making, and outcomes in patients presenting with shortness of breath. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(6):1328–33.
24. Yu CM, Sanderson JE. Plasma brain natriuretic peptide--an independent predictor of cardiovascular mortality in acute heart failure. *Eur J Heart Fail.* 1999;1(1):59-65.
25. Lam LL, Cameron PA, Schneider HG, Abramson MJ, Müller C, Krum H. Meta-analysis: effect of B-type natriuretic peptide testing on clinical outcomes in patients with acute dyspnea in the emergency setting. *Ann Intern Med.* 2010;153(11):728-35.
26. Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM. Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet.* 2000;355(9210):1126–30.
27. Pfisterer M, Buser P, Rickli H, Gutmann M, Erne P, Rickenbacher P, Vuillomenet A, Jeker U, Dubach P, Beer H, Yoon SI, Suter T, Osterhues HH, Schieber MM, Hilti P, Schindler R, Brunner-La Rocca HP; TIME-CHF Investigators. BNP-Guided vs Symptom-Guided Heart Failure Therapy: The Trial of Intensified vs Standard Medical Therapy in Elderly Patients With Congestive Heart Failure (TIME-CHF) randomized trial. *JAMA.* 2009;301(4):383-92.

- 
28. Felker GM, Hasselblad V, Hernandez AF, O'Connor CM. Biomarker-guided therapy in chronic heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J*. 2009;158(3):422–30.
  29. Porapakkham P, Porapakkham P, Zimmet H, Billah B, Krum H. B-type natriuretic peptide-guided heart failure therapy: a meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2010;170(6):507–14.
  30. Troughton RW, Frampton CH, Nicholls G. Biomarker-Guided Treatment of Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(25):2101-4.
  31. von Haehling S, Filippatos GS, Papassotiriou J, Cicoira M, Jankowska EA, Doehner W, Rozentryt P, Vassanelli C, Struck J, Banasiak W, Ponikowski P, Kremastinos D, Bergmann A, Morgenthaler NG, Anker SD. Mid-regional pro-adrenomedullin as a novel predictor of mortality in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2010;12(5):484–91.
  32. Aghel A, Shrestha K, Mullens W, Borowski A, Tang WH. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in predicting worsening renal function in acute decompensated heart failure. *J Card Fail*. 2010;16(1):49-54.
  33. Maisel AS, Mueller C, Fitzgerald R, Brikhan R, Hiestand BC, Iqbal N, Clopton P, van Veldhuisen DJ. Prognostic utility of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with acute heart failure: the NGAL Evaluation Along with B-type Natriuretic Peptide in acutely decompensated heart failure (GALLANT) trial. *Eur J Heart Fail*. 2011;13(8):846-51.

34. Potocki M, Breidthardt T, Mueller A, Reichlin T, Socrates T, Arenja N, Reiter M, Morgenthaler NG, Bergmann A, Noveanu M, Buser PT, Mueller C. Copeptin and risk stratification in patients with acute dyspnea. *Crit Care*. 2010;14(6):R213.
35. Neuhold S, Huelsmann M, Strunk G, Stoiser B, Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A, Moertl D, Berger R, Pacher R. Comparison of copeptin, B-Type Natriuretic Peptide, and amino-terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide in patients with chronic heart failure: prediction of death at different stages of the disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(4):266-72.
36. Peacock WF 4th, De Marco T, Fonarow GC, Diercks D, Wynne J, Apple FS, Wu AH. ADHERE Investigators. Cardiac troponin and outcome in acute heart failure. *N Engl J Med*. 2008; 358(20):2117–26.
37. Rehman SU, Mueller T, Januzzi JL Jr. Characteristics of the novel interleukin family biomarker ST2 in patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(18):1458–65.
38. Anderson NL, Anderson NG, Pearson TW, Borchers CH, Paulovich AG, Patterson SD, Gillette M, Aebersold R, Carr SA. A human proteome detection and quantitation project. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8(5):883-6.
39. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, Sinelnikov I, Krishnamurthy R, Eisner R, Gautam B, Young N, Xia J, Knox C, Dong E, Huang P, Hollander Z, Pedersen TL, Smith SR, Bamforth F, Greiner R, McManus B, Newman JW, Goodfriend T, Wishart DS. The human serum metabolome. *PLoS One*. 2011;6(2):e16957.

- 
40. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, Hau DD, Psychogios N, Dong E, Bouatra S, Mandal R, Sinelnikov I, Xia J, Jia L, Cruz JA, Lim E, Sobsey CA, Shrivastava S, Huang P, Liu P, Fang L, Peng J, Fradette R, Cheng D, Tzur D, Clements M, Lewis A, De Souza A, Zuniga A, Dawe M, Xiong Y, Clive D, Greiner R, Nazyrova A, Shaykhtudinov R, Li L, Vogel HJ, Forsythe I. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D603-10.
  41. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, Becher G, van Beurden WJ, Corradi M, Dekhuijzen R, Dweik RA, Dwyer T, Effros R, Erzurum S, Gaston B, Gessner C, Greening A, Ho LP, Hohlfeld J, Jöbbsis Q, Laskowski D, Loukides S, Marlin D, Montuschi P, Olin AC, Redington AE, Reinhold P, van Rensen EL, Rubinstein I, Silkoff P, Toren K, Vass G, Vogelberg C, Wirtz H; ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J.* 2005;26(3):523-48.
  42. Turner C, Spanel P, Smith D. A longitudinal study of ammonia, acetone and propanol in the exhaled breath of 30 subjects using selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS. *Physiol Meas.* 2006;27(4):321-37.
  43. Rosias P, Robroeks C, Niemarkt H, Kester AD, Vernooij JH, Suykerbuyk J, Teunissen J, Heynens J, Hendriks HJ, Jöbbsis Q, Dompeling E. Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate. *Eur Respir J.* 2006;28(5):1036-41.
  44. Rosias P, Robroeks C, Kester A, den Hartog GJ, Wodzig WK, Rijkers GT, Zimmermann LJ, van Schayck CP, Jöbbsis Q, Dompeling E. Biomarker

- reproducibility in exhaled breath condensate collected with different condensers. *Eur Respir J.* 2008;31(5):934– 42.
45. Rosias PP, Robroeks CM, van de Kant KD, Rijkers GT, Zimmermann LJ, van Schayck CP, Heynens JW, Jöbsis Q, Dompeling E. Feasibility of a new method to collect exhaled breath condensate in pre-school children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21(1 Pt 2):e235-44.
  46. Baraldi E, Ghio L, Piovan V, Carraro S, Zacchello F, Zanconato S. Safety and success of exhaled breath condensate collection in asthma. *Arch Dis Child.* 2003;88(4):358-60.
  47. Smith D, Turner C, Spanel P. Volatile metabolites in the exhaled breath of healthy volunteers: their levels and distributions. *J Breath Res.* 2007;1(1): R1–R12.
  48. Spaněl P, Dryahina K, Smith D. Acetone, ammonia and hydrogen cyanide in exhaled breath of several volunteers aged 4-83 years. *J Breath Res.* 2007;1(1):L1-L4.
  49. Cáp P, Dryahina K, Pehal F, Spanel P. Selected ion flow tube mass spectrometry of exhaled breath condensate headspace. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008;22(18):2844-50.
  50. Wang T, Pysanenko A, Dryahina K, Spaněl P, Smith D. Analysis of breath, exhaled via the mouth and nose, and the air in the oral cavity. *J Breath Res.* 2008;2(3):1-13.

- 
51. Spanel P, Dryahina K, Rejšková A, Chippendale TW, Smith D. Breath acetone concentration; biological variability and the influence of diet. *Physiol Meas*. 2011;32(8):N23-31.
  52. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001;1(3):217-24.
  53. Hoffmeyer F, Raulf-Heimsoth M, Brüning T. Exhaled breath condensate and airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009;9(1):16-22.
  54. Robroeks CMHHT, Rosias PPR, van Vliet D, Jobsis Q, Yntema J-BL, Brackel HJL, Damoiseaux JGMC, den Hartog GM, Wodzig WKWH, Dompeling E. Biomarkers in exhaled breath condensate indicate presence and severity of cystic fibrosis in children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008;19(7): 652–9.
  55. Studer SM, Orens JB, Rosas I, Krishnan JA, Cope KA, Yang S, Conte JV, Becker PB, Risby TH. Patterns and significance of exhaled-breath biomarkers in lung transplant recipients with acute allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20(11):1158–66.
  56. Nelson N, Lagesson V, Nosratabadi AR, Ludvigsson J, Tagesson C. Exhaled isoprene and acetone in newborn infants and in children with diabetes mellitus. *Pediatr Res*. 1998;44(3):363-7.
  57. Righettoni M, Tricoli A, Pratsinis SE. Si:WO<sub>3</sub> Sensors for highly selective detection of acetone for easy diagnosis of diabetes by breath analysis. *Anal Chem*. 2010;82(9):3581-7.

58. Pabst F, Miekisch W, Fuchs P, Kischkel S, Schubert JK. Monitoring of oxidative and metabolic stress during cardiac surgery by means of breath biomarkers: an observational study. *J Cardiothorac Surg.* 2007;2:37.
59. Hare JM, Nguyen GC, Massaro AF, Drazen JM, Stevenson LW, Colucci WS, Fang JC, Johnson W, Givertz MM, Lucas C. Exhaled nitric oxide: a marker of pulmonary hemodynamics in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40(6):1114-9.
60. Sumino H, Sato K, Sakamaki T, Masuda H, Nakamura T, Kanda T, Nagai R. Decreased basal production of nitric oxide in patients with heart disease. *Chest.* 1998;113(2):317-22.
61. Kupari M, Lommi J, Ventila M, Karjalainen U. Breath acetone in congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1995;76(14):1076-8.
62. McKee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med* 1971;285(26):1441-6.
63. Nohria A, Tsang SW, Fang JC, Lewis EF, Jarcho JA, Mudge GH, Stevenson LW. Clinical assessment identifies hemodynamic profiles that predict outcomes in patients admitted with heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(10):1797-804.
64. Anderson JC, Lamm WJE, Hlastala MP. Measuring airway exchange of endogenous acetone using a single-exhalation breathing maneuver. *J Apply Phys.* 2006;100(3):880-9.

- 
65. Batista GL. *Análise de acetona em ar exalado: metodologia para estudo em pacientes hospitalizados* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Química; 2011.
  66. Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry: principles and applications*. Third edition. New York: Wiley, 2007.
  67. Dass C. *Principles and Practise of Biological Mass Spectrometry*. New York: Wiley, 2001.
  68. Berntsson S. Spectrophotometric Determination of Acetone by Salicylaldehyde Method. *Anal Chem*. 1956;28(8):1337.
  69. Deng C, Zhang J, Yu X, Zhang W, Zhang X. Determination of acetone in human breath by gas chromatography-mass spectrometry and solid-phase microextraction with on fiber derivatization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;810(2):269-75.
  70. Teshima N, Li J, Toda K, Dasgupta PK. Determination of acetone in breath. *Anal Chim Acta*. 2005;535:189-199.
  71. Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Ayub-Ferreira SM, Rohde LE, Oliveira WA, Almeida DR, Moreira M da C, Bestetti RB, Bordignon S, Azevedo C, Tinoco EM, Rocha RM, Issa VS, Ferraz A, Cruz FD, Guimarães GV, Montera Vdos S, Albuquerque DC, Bacal F, Souza GE, Rossi Neto JM, Clausell NO, Martins SM, Siciliano A, Souza Neto JD, Moreira LF, Teixeira RA, Moura LZ, Beck-da-Silva L, Rassi S, Azeka E, Horowitz E, Ramires F, Simões MV, Castro RB, Salemi VM, Villacorta Junior H, Vila JH, Simões R, Albanesi F, Montera MW; Sociedade Brasileira de

- 
- Cardiologia. III Brazilian Guidelines on Chronic Heart Failure. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(1 Suppl 1):3-70.
72. Jessup M, Abraham WT, Casey DE, Feldman AM, Francis GS, Ganiat TG, Konstam MA, Mancini DM, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW. 2009 Focused Update: ACCF/AHA Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation.* 2009;119(14):1977-2016.
73. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K. ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). Task Force for Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2008;29(19):2388-442.
74. MERIT-HF study group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet.* 1999;353(9169):2001-7.
75. Higashino-Matsui Y, Shirato K, Suzuki Y, Kawashima Y, Someya Y, Sato S, Shiraishi A, Jinde M, Matsumoto A, Ideno H, Tachiyashiki K, Imaizumi

- K. Age-related effects of fasting on ketone body production during lipolysis in rats. *Environ Health Prev Med.* 2011 Aug 18. [Epub ahead of print]. Available from: [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
76. McDonagh TA, Robb SD, Murdoch DR, Morton JJ, Ford I, Morrison CE, Tunstall-Pedoe H, McMurray JJ, Dargie HJ. Biochemical detection of left-ventricular systolic dysfunction. *Lancet.* 1998;351(9095):9-13.
77. Krupicka J, Janota T, Kasalová Z, Hradec J. Effect of short-term maximal exercise on BNP plasma levels in healthy individuals. *Physiol Res.* 2010;59(4):625-8.
78. Daniels LB, Allison MA, Clopton P, Redwine L, Siecke N, Taylor K, Fitzgerald R, Bracker M, Maisel AS. Use of natriuretic peptides in pre-participation screening of college athletes. *Int J Cardiol.* 2008;124(3):411-4.
79. Yamamoto K, Burnett JC Jr, Bermudez EA, Jougasaki M, Bailey KR, Redfield MM. Clinical criteria and biochemical markers for the detection of systolic dysfunction. *J Card Fail.* 2000;6(3):194-200.
80. Wright SP, Doughty RN, Pearl A, Gamble GD, Whalley GA, Walsh HJ, Gordon G, Bagg W, Oxenham H, Yandle T, Richards M, Sharpe N. Plasma amino-terminal pro-brain natriuretic peptide and accuracy of heart failure diagnosis in primary care: A randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(10):1793-800.
81. Fuat A, Murphy JJ, Hungin AP, Curry J, Mehrzad AA, Hetherington A, Johnston JI, Smellie WS, Duffy V, Cawley P. The diagnostic accuracy and utility of a B-type natriuretic peptide test in a community population of

- patients with suspected heart failure. *Br J Gen Pract.* 2006;56(526):327-33.
82. Fonarow GC, Adams KF Jr, Abraham WT, Yancy CW, Boscardin WJ; ADHERE Scientific Advisory Committee, Study Group, and Investigators. Risk stratification for in-hospital mortality in acutely decompensated heart failure: classification and regression tree analysis. *JAMA.* 2005;293(5):572-80.
83. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* 2005;85(3):1093-1129.
84. Maisel A, McCord J, Nowak R, Hollander JE, Wu AH, Duc P, Omland T, Storrow AB, Krishnaswamy P, Abraham WT, Clopton P, Steg G, Aumont MC, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kamin R, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA; Breathing Not Properly Multinational Study Investigators. Bedside B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure with reduced or preserved ejection fraction. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(11):2010-7.
85. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90(1):207-58.
86. Lommi J, Kupari M, Koskinen P, Näveri H, Leinonen H, Pulkki K, Härkönen M. Blood ketone bodies in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28(3):665-72.

87. Neubauer S. The failing heart – an engine out of fuel. *N Engl J Med*. 2007;356(11):1140-51.
88. Musa-Veloso K, Likhoddi SS, Rarama E, Benoi S, Liu YM, Chartrand D, Curtis R, Carmant L, Lortie A, Comeau FJ, Cunnane SC. Breath acetone predicts plasma ketone bodies in children with epilepsy on a ketogenic diet. *Nutrition*. 2006;22(1):1-8.
89. Opie LH, Knuuti J. The adrenergic-fatty acid load in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(18):1637-46.
90. Lommi J, Koskinen P, Naveri H, Harkonen M, Kupari M. Heart failure ketosis. *J Intern Med*. 1997;242(3):231-8.
91. Lommi J, Kupari M, Yki-Jarvinen H. Free fatty acid kinetics and oxidation in congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 1998;81(1):45-50.
92. Lopes-Cardozo M, Mulder I, van Vugt F, Hermans PG, van den Bergh G, Klazinga W, de Vries-Akkerman E. Aspects of ketogenesis: control and mechanism of ketone-body formation in isolated rat-liver mitochondria. *Mol Cell Biochem*. 1975;9(3):155–73.
93. Revenco D, Morgan JP. Metabolic modulation and cellular therapy of cardiac dysfunction and failure. *J Cell Mol Med*. 2009;13(5):811-25.
94. Pelletier A, Coderre L. Ketone bodies alter dinitrophenol-induced glucose uptake through AMPK inhibition and oxidative stress generation in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(5):E1325-32.

*Apêndice*

## APÊNDICE

### APÊNDICE A - Fichas dos pacientes incluídos no estudo

#### FICHA – TESE

**NOME:** \_\_\_\_\_  
**FABI/GUTZ no.** \_\_\_\_\_ **GRUPO do ESTUDO:** \_\_\_\_\_ **DATA:** \_\_\_\_\_  
**REG:** \_\_\_\_\_ **ID:** \_\_\_\_\_ **TEL.** \_\_\_\_\_  
**END:** \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ **CEP** \_\_\_\_\_ **DNasc.** \_\_\_\_\_  
**IDADE:** \_\_\_\_\_ **SEXO:** \_\_\_\_\_ **RAÇA:** \_\_\_\_\_

#### Diagnósticos:

Etiologia	0-Isquêmica	1-Chagásica	2-Hipertensiva	3-Idiopática	4-Valvar	5-Outros
CF	0 - -----	1 - I	2 - II	3 - III	4 - IV	
Ritmo	0 - Sinusal	1- FA	2- Flutter	3- Ritmo MP	4 - Outros	
Cirurgias	0- Nenhuma	1- MPAV	2- MPABiv	3- CDI	4-TValvar	5-RVM
GRUPOS		I- Grupo 01 IC compensada	II- Grupo 02 IC descompensada (congestão)	III- Grupo 03 IC descompensada (hipoperfusão)	IV-Grupo 04 Controle	
Hemodin.	0 - A	1 - B	2 - C	3 - L		

#### Antecedentes Pessoais:

HAS	DM	DLP	IAM	AVC/AIT	DPOC	Anemia	IRC	Hepatop	Tireoid.	Tabag.	Etil.
0-não	0-não	0-não	0-não	0-não	0-não	0-não	0-não	0-não	0-não	0-não	0-não
1-sim	1-sim	1-sim	1-sim	1-sim	1-leve	1-sim	1-sim	1-sim	1-hipo	1-sim	1-sim
					2- mod				2-hiper	2-ex	2-ex
					3-sever					Anos _____	Anos _____

Outros: \_\_\_\_\_

Infecção: \_\_\_\_\_ Antibiótico: \_\_\_\_\_

#### Medicações em uso na admissão:

CLASSE		DROGAS					Dose Total (mg/dia)
IECA	0 - não	1-Captopril	2-Enalapril	3-Ramipril	4-Lisinopril	5- Outros	
B-Bloquead.	0 - não	1 - Carvedilol	2- Metoprolol (succinato)	3-Metoprolol (tartarato)	4-Bisoprolol	5- Outros	

BRA	0 - não	1- Losartana	2- Irbesartana	3- Candesartan	4-Valsartan	5- Outros	
Bloq. Aldosterona	0 - não	1- Espironol.	2- Eplerenone				
Diurético Alça	0 - não	1- Furosemida	2- Bumetanida				
Diurético Tiazídico	0 - não	1 - Hidroclot.					
Digital	0 - não	1 - Digoxina			Digoxina		
Vasodilat. Hidralazina	0 - não	1 - plena	2 - parcial		Hidralazina		
Monocordil	0 - não	1 - plena	2 - parcial		Monocordil		
Bloqueador de Cálcio	0 - não	1 - plena	2 - parcial		Amlodipina		
Antiarritmico	0 - não	1 - plena	2 - parcial		Amiodarona		
Antiagreg.	0 - não	1 - AAS	2 - Clopidogrel		3- Ticlopidina		
Anticoag.	0 - não	1 - RNI terapêutico	2 - RNI não terapêutico		Varfarina		RNI: _____
Hipoglic.	0 - não	1 - sim	2 - associacao		Metform./ Glibencl./ Insul.		
Estatina	0 - não	1 - plena	2 - parcial		Sinvast/ Pravast/ Atorvast/ Ezetimibe		
Medicação Tireoidop.	0 - não	1 - plena	2 - parcial		Levotiroxina/ PTU/ Metimazol		
OUTROS	0 - não	1 - plena	2 - parcial				

Sintomas na admissão (data: \_\_\_\_\_):

Sintomas					Outros
Dispnéia Esforço	0-ausente	1-leve	2-moderada	3-severa	
Ortopnéia	0-não	1-sim			
DPN	0-não	1-sim			
Cansaço	0-não	1-sim			
Tontura	0-não	1-sim			
Síncope	0-não	1-sim			
Intolerância TGI	0-não	1-náuseas	2-plenitude		
Dor torácica	0-não	1-típica	2-atípica		

Exame Físico da admissão:

PA mmHg	FC bpm	FR irm	Dextro	Sat %
Desidratação	0 - não	1 - ++/ 4+	2- +++/ 4+	3- ++++/ 4+
Pulso	0-ausente	1-amplo	2-filiforme	
T ench. Capilar	0 - < 3seg	1 - 3 a 5 seg	2 - > 5seg	
B3	0 - não	1 - sim		
Ecrepitante	0 - não	1 - sim		
RHJ	0 - não	1 - sim		
TJ	0 - não	1 - sim		
ASCITE	0 - não	1 - sim		
Hepatomegalia	0 - não	1- sim ( ___ cm)		
Edema de MMII	0 - não	1 - leve	2 - moderado	3 - severo

Hemodinâmica	0 - A	1 - B	2 - C	3 - L
Odor característico	0 - Não	1 - Sim		

**Exames da admissão:**

Uréia		Hb/Ht		TGO/TGP		Gasos venosa: pH/ Bic/BE	
Creat		Leuco /PLT		FALC/GGT		Lactato	
Na		BNP		RNI/AP		CKMB/Tropo	
K		Catecol ser		BT/BD/BI		Glicemia	
Urina1:	pH	d=	gli	ceton	prot	leuc	hem

**Exames prévios (data: \_\_\_\_\_):**

Gli		Ur		Crea	
-----	--	----	--	------	--

**ECG na admissão:**

Ritmo	0-sinusal	1-FA	2-Flutter	3- MP	BRE	0-ausente	1-presente
FC					BRD	0-ausente	1-presente
Descrição	0- s/ alterST	1- AI ant	2- AI inf	3- AI lat	SVE	0-ausente	1-presente
	4- AI anter-later	5- AI ant-septal	6- AI inf-later	7- AI ant e inferior	SAE	0-ausente	1-presente

**RX TÓRAX na admissão:**

Cardiomegalia	0-ausente	1-presente	
Congestão Pulmonar	0-ausente	1-presente	2-derrame pleural s/ cong
Condensação Pulmonar	0-ausente	1-presente	

**ECO ( \_\_\_/200 ): 0-AUSENTE/NÃO AFERIDO; 1-LEVE; 2-MOD.; 3-GRAVE**

DDVE	DSVE	FEVE	PSVD	DISFÇ VD	DISFÇ DIAST	IMITRAL	AE	AO	ANEURISMA	SIV	P P
<b>0 – nada</b>	<b>1 – acinesia ant. / infer / lateral</b>			<b>2 – hipocinesia ant. / infer / lateral</b>		<b>3- Prot Aórtica Grad pico: _____</b>		<b>4 – Prot Mitral Grad pico: _____</b>			

**GATED ( \_\_\_/\_\_\_ ): FEVE \_\_\_\_\_ FEVD \_\_\_\_\_**

**ERGOESPIRO ( \_\_\_/200 ): VO2 \_\_\_\_\_ SLOPE \_\_\_\_\_**

**MIBI ( \_\_\_/\_\_\_ ): \_\_\_\_\_**

Método	1- físico	2- DIPIRIDAMOL	3 - DOBUTA	4 - ADENOS	
Resultado	0-negativo	1-hipo transitória	2-hipo persistente		
Hipo transitória	0-ausente	1-anterior	2-inferior	3-lateral	4 - outro
Hipo persistente	0-ausente	1-anterior	2-inferior	3-lateral	4 - outro

**CATE** (\_\_\_/\_\_\_):

Resultado	0-não fez	1- normal	2-uniarterial	3-multiarterial
Tratam/o realizado	0-clínico		1-angioplastia	2-cirurgia
TCE	Dgnalis		CX	CD
DA	Dg1/Dg2		Mg1/Mg2	VP/DP

**RESULTADOS DOS GASES EXALADOS NA ADMISSAO (todos os grupos)**

**Grupo** \_\_\_\_\_:

Gases Exalados:	Nome (subtipo)			Absorbância	Quantidade (em ppbv)	Volume Ar exalado	Volume Amostra
Acetona	CG - MS	0-ausente	1-presente				
Outros:		0-ausente	1-presente				
		0-ausente	1-presente				

**APÊNDICE B – Petição de depósito de patente nos Estados Unidos**



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE  
 United States Patent and Trademark Office  
 Address: COMMISSIONER FOR PATENTS  
 P.O. Box 1450  
 Alexandria, Virginia 22313-1450  
 www.uspto.gov

APPLICATION NUMBER	FILING or 371(c) DATE	GRP ART UNIT	FIL FEE RECD	ATTY. DOCKET NO	TOT CLAIMS	IND CLAIMS
12/838,204	07/16/2010	1641	1324	033794/392771	32	8

**CONFIRMATION NO. 5794**

826  
 ALSTON & BIRD LLP  
 BANK OF AMERICA PLAZA  
 101 SOUTH TRYON STREET, SUITE 4000  
 CHARLOTTE, NC 28280-4000

**FILING RECEIPT**



Date Mailed: 07/27/2010

Receipt is acknowledged of this non-provisional patent application. The application will be taken up for examination in due course. Applicant will be notified as to the results of the examination. Any correspondence concerning the application must include the following identification information: the U.S. APPLICATION NUMBER, FILING DATE, NAME OF APPLICANT, and TITLE OF INVENTION. Fees transmitted by check or draft are subject to collection. Please verify the accuracy of the data presented on this receipt. **If an error is noted on this Filing Receipt, please submit a written request for a Filing Receipt Correction. Please provide a copy of this Filing Receipt with the changes noted thereon. If you received a "Notice to File Missing Parts" for this application, please submit any corrections to this Filing Receipt with your reply to the Notice. When the USPTO processes the reply to the Notice, the USPTO will generate another Filing Receipt incorporating the requested corrections**

**Applicant(s)**

Fernando Bacal, Residence Not Provided;  
 Fabiana Goulart Marcondes Braga, Residence Not Provided;  
 Ivano Gebhardt Rolf Gutz, Residence Not Provided;  
 Guilherme Lopes Batista, Residence Not Provided;

**Power of Attorney:** None

**Domestic Priority data as claimed by applicant**

**Foreign Applications**

**If Required, Foreign Filing License Granted:** 07/26/2010

The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is **US 12/838,204**

**Projected Publication Date:** To Be Determined - pending completion of Missing Parts

**Non-Publication Request:** No

**Early Publication Request:** No

**\*\* SMALL ENTITY \*\***

**Title**

NON-INVASIVE METHOD FOR DIAGNOSING THE SEVERITY OF HEART FAILURE, USE OF A BIOMARKER FOR DIAGNOSING DECOMPENSATED HEART FAILURE, COLLECTOR DEVICE FOR THE HEART FAILURE BIOMARKER FROM EXHALED BREATH AND A DIAGNOSIS KIT

**Preliminary Class**

435

**PROTECTING YOUR INVENTION OUTSIDE THE UNITED STATES**

Since the rights granted by a U.S. patent extend only throughout the territory of the United States and have no effect in a foreign country, an inventor who wishes patent protection in another country must apply for a patent in a specific country or in regional patent offices. Applicants may wish to consider the filing of an international application under the Patent Cooperation Treaty (PCT). An international (PCT) application generally has the same effect as a regular national patent application in each PCT-member country. The PCT process **simplifies** the filing of patent applications on the same invention in member countries, but **does not result** in a grant of "an international patent" and does not eliminate the need of applicants to file additional documents and fees in countries where patent protection is desired.

Almost every country has its own patent law, and a person desiring a patent in a particular country must make an application for patent in that country in accordance with its particular laws. Since the laws of many countries differ in various respects from the patent law of the United States, applicants are advised to seek guidance from specific foreign countries to ensure that patent rights are not lost prematurely.

Applicants also are advised that in the case of inventions made in the United States, the Director of the USPTO must issue a license before applicants can apply for a patent in a foreign country. The filing of a U.S. patent application serves as a request for a foreign filing license. The application's filing receipt contains further information and guidance as to the status of applicant's license for foreign filing.

Applicants may wish to consult the USPTO booklet, "General Information Concerning Patents" (specifically, the section entitled "Treaties and Foreign Patents") for more information on timeframes and deadlines for filing foreign patent applications. The guide is available either by contacting the USPTO Contact Center at 800-786-9199, or it can be viewed on the USPTO website at <http://www.uspto.gov/web/offices/pac/doc/general/index.html>.

For information on preventing theft of your intellectual property (patents, trademarks and copyrights), you may wish to consult the U.S. Government website, <http://www.stopfakes.gov>. Part of a Department of Commerce initiative, this website includes self-help "toolkits" giving innovators guidance on how to protect intellectual property in specific countries such as China, Korea and Mexico. For questions regarding patent enforcement issues, applicants may call the U.S. Government hotline at 1-866-999-HALT (1-866-999-4158).

**LICENSE FOR FOREIGN FILING UNDER  
Title 35, United States Code, Section 184  
Title 37, Code of Federal Regulations, 5.11 & 5.15**

**GRANTED**

The applicant has been granted a license under 35 U.S.C. 184, if the phrase "IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" followed by a date appears on this form. Such licenses are issued in all applications where the conditions for issuance of a license have been met, regardless of whether or not a license may be required as set forth in 37 CFR 5.15. The scope and limitations of this license are set forth in 37 CFR 5.15(a) unless an earlier license has been issued under 37 CFR 5.15(b). The license is subject to revocation upon written notification. The date indicated is the effective date of the license, unless an earlier license of similar scope has been granted under 37 CFR 5.13 or 5.14.

This license is to be retained by the licensee and may be used at any time on or after the effective date thereof unless it is revoked. This license is automatically transferred to any related applications(s) filed under 37 CFR 1.53(d). This license is not retroactive.

The grant of a license does not in any way lessen the responsibility of a licensee for the security of the subject matter as imposed by any Government contract or the provisions of existing laws relating to espionage and the national security or the export of technical data. Licensees should apprise themselves of current regulations especially with respect to certain countries, of other agencies, particularly the Office of Defense Trade Controls, Department of State (with respect to Arms, Munitions and Implements of War (22 CFR 121-128)); the Bureau of Industry and Security, Department of Commerce (15 CFR parts 730-774); the Office of Foreign Assets Control, Department of Treasury (31 CFR Parts 500+) and the Department of Energy.

**NOT GRANTED**

No license under 35 U.S.C. 184 has been granted at this time, if the phrase "IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" DOES NOT appear on this form. Applicant may still petition for a license under 37 CFR 5.12, if a license is desired before the expiration of 6 months from the filing date of the application. If 6 months has lapsed from the filing date of this application and the licensee has not received any indication of a secrecy order under 35 U.S.C. 181, the licensee may foreign file the application pursuant to 37 CFR 5.15(b).

## APÊNDICE C – Cessão de direitos dos inventores para a USP

### ASSIGNMENT AND/OR DECLARATION OF INVENTOR

By this instrument,

**BACAL, Fernando**, Brazilian citizen of Av. Divino Salvador, 395 - apto. 201 – Moema - 04078-011 - São Paulo - SP, Brazil,

**BRAGA, Fabiana Goulart Marcondes**, Brazilian citizen of Rua Santa Clara, 314, apto 202, bloco A - 12243-630 - São José dos Campos – SP, Brazil,

**GUTZ, Ivano Gebhardt Rolf**, Brazilian citizen of Av. Lineu Prestes, 748, bloco 12, sala 1270 - Cidade Universitária - 05508-000 - São Paulo – SP, Brazil,

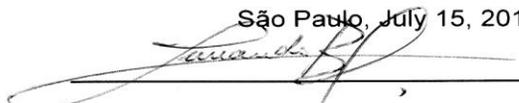
**BATISTA, Guilherme Lopes**, Brazilian citizen of Av. Lineu Prestes, 748, bloco 12, sala 1270 - Cidade Universitária - 05508-000 - São Paulo – SP, Brazil,

being inventors of an invention entitled

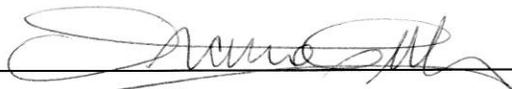
**NON-INVASIVE METHOD FOR DIAGNOSING THE SEVERITY OF HEART FAILURE, USE OF A BIOMARKER FOR DIAGNOSING DECOMPENSATED HEART FAILURE, COLLECTOR DEVICE FOR THE HEART FAILURE BIOMARKER FROM EXHALED BREATH AND A DIAGNOSIS KIT**

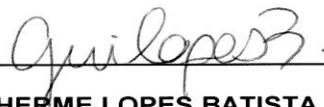
for which an application was filed in the Brazilian National Institute of Industrial Property under No. US 12/838,204 of July 16, 2010, hereby assigns and transfers to **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP**, with offices at Rua da Praça do Relógio, 109 - Cidade Universitária "Armando Salles de Oliveira", Butantã - 05508-900 - São Paulo - SP, Brazil all rights in connection with said invention, giving full consent in order that said assignee may file a corresponding international application with the appropriate international authorities, claiming the priority under the International Convention.

São Paulo, July 15, 2011

  
\_\_\_\_\_  
**FERNANDO BACAL**

  
\_\_\_\_\_  
**FABIANA GOULART MARCONDES BRAGA**

  
\_\_\_\_\_  
**IVANO GEBHARDT ROLF GUTZ**

  
\_\_\_\_\_  
**GUILHERME LOPES BATISTA**

## APÊNDICE D – Cessão de direitos dos inventores para a FAPESP

### ASSIGNMENT AND/OR DECLARATION OF INVENTOR

By this instrument,

**BACAL, Fernando**, Brazilian citizen of Av. Divino Salvador, 395 - apto. 201 – Moema - 04078-011 - São Paulo - SP, Brazil,

**BRAGA, Fabiana Goulart Marcondes**, Brazilian citizen of Rua Santa Clara, 314, apto 202, bloco A - 12243-630 - São José dos Campos – SP, Brazil,

**GUTZ, Ivano Gebhardt Rolf**, Brazilian citizen of Av. Lineu Prestes, 748, bloco 12, sala 1270 - Cidade Universitária - 05508-000 - São Paulo – SP, Brazil,

**BATISTA, Guilherme Lopes**, Brazilian citizen of Av. Lineu Prestes, 748, bloco 12, sala 1270 - Cidade Universitária - 05508-000 - São Paulo – SP, Brazil,

being inventors of an invention entitled

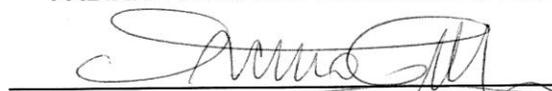
**NON-INVASIVE METHOD FOR DIAGNOSING THE SEVERITY OF HEART FAILURE, USE OF A BIOMARKER FOR DIAGNOSING DECOMPENSATED HEART FAILURE, COLLECTOR DEVICE FOR THE HEART FAILURE BIOMARKER FROM EXHALED BREATH AND A DIAGNOSIS KIT**

for which an application was filed in the Brazilian National Institute of Industrial Property under No. US 12/838,204 of July 16, 2010, hereby assigns and transfers to **FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP**, with offices at Rua Pio XI, 1.500 - Alto da Lapa - 05468-901 - São Paulo - SP, Brazil, all rights in connection with said invention, giving full consent in order that said assignee may file a corresponding international application with the appropriate international authorities, claiming the priority under the International Convention.

São Paulo, July 15, 2011

  
\_\_\_\_\_  
**FERNANDO BACAL**

  
\_\_\_\_\_  
**FABIANA GOULART MARCONDES BRAGA**

  
\_\_\_\_\_  
**IVANO GEBHARDT ROLF GUTZ**

  
\_\_\_\_\_  
**GUILHERME LOPES BATISTA**

## APÊNDICE E – Petição de depósito de patente no PCT (Patent Cooperation Treaty)

# PCT

## REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only	
PCT/BR 2011 / 000227 International Application No.	
15 JUL 2011 150711 International Filing Date	
<b>INPI/BRAZIL-PCT INTERNATIONAL APPLICATION</b>	
Name of receiving Office and "PCT International Application"	
Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum) P177698-PCT	

<b>Box No. I TITLE OF INVENTION</b>	
NON-INVASIVE METHOD FOR DIAGNOSING THE SEVERITY OF HEART FAILURE, USE OF A BIOMAKER FOR DIAGNOSING DECOMPENSATED HEART FAILURE, COLLECTOR DEVICE FOR THE HEART FAILURE BIOMAKER FROM EXHALED BREATH AND A DIAGNOSIS KIT	
<b>Box No. II APPLICANT</b> <input type="checkbox"/> This person is also inventor	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP Rua da Praça do Relógio, 109 Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" 05508-050 - Butantã - São Paulo - SP Brazil	Telephone No. Facsimile No. Applicant's registration No. with the Office
<b>E-mail authorization:</b> Marking one of the check-boxes below authorizes the receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority to use the e-mail address indicated in this Box to send, notifications issued in respect of this international application to that e-mail address if those offices are willing to do so. <input type="checkbox"/> as advance copies followed by paper notifications; or <input type="checkbox"/> exclusively in electronic form (no paper notifications will be sent). E-mail address:	
State (that is, country) of nationality: BR	State (that is, country) of residence: BR
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
<b>Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
<b>Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE</b>	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: <input checked="" type="checkbox"/> agent <input type="checkbox"/> common representative	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA Caixa Postal 2124 Rua Marquês de Olinda, 70 - Botafogo 22251-040 - Rio de Janeiro - RJ Brazil	Telephone No. (55 21) 2237 8700 Facsimile No. (55 21) 2237 8922 Agent's registration No. with the Office
<b>E-mail authorization:</b> Marking one of the check-boxes below authorizes the receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority to use the e-mail address indicated in this Box to send, notifications issued in respect of this international application to that e-mail address if those offices are willing to do so. <input checked="" type="checkbox"/> as advance copies followed by paper notifications; or <input type="checkbox"/> exclusively in electronic form (no paper notifications will be sent). E-mail address: mail@dannemann.com.br	
<input type="checkbox"/> <b>Address for correspondence:</b> Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	

Sheet No. ...2...

901/08 2011 / 000227

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>	
<p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p> <p>FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DE SÃO PAULO - FAPESP Rua Pio XI, 1500 - Alto da Lapa 05468-901 - São Paulo - SP Brazil</p>	<p>This person is:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p>
State <i>(that is, country)</i> of nationality: BR	State <i>(that is, country)</i> of residence: BR
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p> <p>BACAL, Fernando Av. Divino Salvador, 395 - apto. 201 - Moema 04078-011 - São Paulo - SP Brazil</p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p>
State <i>(that is, country)</i> of nationality: BR	State <i>(that is, country)</i> of residence: BR
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p> <p>BRAGA, Fabiana Goulart Marcondes Rua Santa Clara, 314, apto 202, bloco A 12243-630 - São José dos Campos - SP Brazil</p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p>
State <i>(that is, country)</i> of nationality: BR	State <i>(that is, country)</i> of residence: BR
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p> <p>GUTZ, Ivano Gebhardt Rolf Av. Lineu Prestes, 748, bloco 12, sala 1270 - Cidade Universitária 05508-000 - São Paulo - SP</p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p>
State <i>(that is, country)</i> of nationality: BR	State <i>(that is, country)</i> of residence: BR
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.</p>	

Sheet No. ...3... PCT/BR 2011 / 000227

**Supplemental Box** *If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. *If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No. ..." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:*
- (i) *if more than one person is to be indicated as applicant and/or inventor and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;*
  - (ii) *if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;*
  - (iii) *if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;*
  - (iv) *if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;*
  - (v) *if, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.*
2. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition: in such case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition" or "utility certificate of addition," the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other parent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(i) and 49bis.1(a) or (b)).*
3. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(ii) and 49bis.1(d)).*
4. *If the applicant wishes to request the receiving Office or the International Bureau to obtain a priority document from a digital library but that document is only held in a digital library in connection with another application which also relied upon that priority document to support a priority claim (and unless that digital library is to be accessed through the Digital Access Service for Priority Documents), in such cases write "Continuation of Box No. VI", indicate for each earlier application concerned the same type of information as required in Box No. VI and indicate the number under which the application is stored (and, if known, the digital library concerned) (Section 716(a)(ii)).*
- Name: BATISTA, Guilherme Lopes  
 Address: Av. Lineu Prestes, 748, bloco 12, sala 1270  
 Cidade Universitária  
 05508-000 - São Paulo SP - Brasil  
 Nationality: BR  
 Domiciled: BR  
 This person is This person is applicant for the purposes of the United States of America only

PCT/RO 2011 / 000222

Sheet No. ... 4 ...

<b>Box No. V DESIGNATIONS</b>				
The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a) the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.				
However,				
<input type="checkbox"/> DE Germany is not designated for any kind of national protection				
<input type="checkbox"/> JP Japan is not designated for any kind of national protection				
<input type="checkbox"/> KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection				
<i>(The check-boxes above may only be used to exclude (irrevocably) the designations concerned if, at the time of filing or subsequently under Rule 26bis.1, the international application contains in Box No. VI a priority claim to an earlier national application filed in the particular State concerned, in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of this earlier national application.)</i>				
<b>Box No. VI PRIORITY CLAIM</b>				
The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:				
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 16 July 2010 (16.07.2010)	12/838,204	US		
item (2)				
item (3)				
<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.				
<input type="checkbox"/> The International Bureau is requested to obtain from a digital library, a certified copy of the earlier application(s) (if the earlier application(s) is available to it from a digital library) identified above as:*				
<input type="checkbox"/> all items <input type="checkbox"/> item (1) <input type="checkbox"/> item (2) <input type="checkbox"/> item (3) <input type="checkbox"/> other, see Supplemental Box				
<input type="checkbox"/> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (if the earlier application(s) was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) or to obtain a certified copy of the earlier application(s) from a digital library and transmit a copy of it to the International Bureau (if the earlier application(s) is available to the receiving Office from a digital library), identified above as:*				
<input type="checkbox"/> all items <input checked="" type="checkbox"/> item (1) <input type="checkbox"/> item (2) <input type="checkbox"/> item (3) <input type="checkbox"/> other, see Supplemental Box				
* Where the certified copy of the earlier application(s) is not stored in a digital library under the number of the earlier application indicated above but under the application number of another application which also claims priority from it, indicate that number in the supplemental sheet (item 4).				
Restore the right of priority: the receiving Office is requested to restore the right of priority for the earlier application(s) identified above or in the Supplemental Box as item(s) (_____). (See also the Notes to Box No. VI; further information must be provided to support a request to restore the right of priority.)				
Incorporation by reference: where an element of the international application referred to in Article 11(1)(ii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.				
<b>Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY</b>				
Choice of International Searching Authority (ISA) (if more than one International Searching Authority is competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):				
ISA/ EP .....				

## APÊNDICE F – Decisão editorial do CHEST

Imprimir

Page 1 of 1

**Assunto:** CHEST – Decision on Manuscript ID CHEST-11-2892.R2  
**De:** EditorialOffice@chestnet.org (EditorialOffice@chestnet.org)  
**Para:** fgmarcondes@yahoo.com.br; gutz@iq.usp.br; guilhermelb@usp.br; pepino@usp.br; silvia.ayub@incor.usp.br; victor.issa@incor.usp.br; sanmangini@ig.com.br; edimar.bocchi@incor.usp.br; fbacal@uol.com.br;  
**Data:** Terça-feira, 17 de Janeiro de 2012 17:23

DL-22

17-Jan-2012

CC: Marcondes-Braga, Fabiana; Gutz, Ivano; Batista, Guilherme; Saldiva, Paulo; Ayub-Ferreira, Silvia; Issa, Victor; Mangini, Sandrigo; Bocchi, Edimar; Bacal, Fernando

Dear Dr. Fabiana Marcondes-Braga:

It is a pleasure to accept your revised manuscript entitled "EXHALED ACETONE AS A NEW BIOMARKER OF HEART FAILURE SEVERITY" for publication in CHEST.

The editorial staff at CHEST will contact Dr. Fabiana Marcondes-Braga, the corresponding author for this manuscript, if needed as the paper moves through production. Any queries to CHEST regarding this manuscript should come from the corresponding author.

Dr. Marcondes-Braga will receive proofs to review before your article is published.

NEW POLICY: After you have approved the proofs, any subsequent requests for changes will incur a processing fee.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of CHEST, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,  
Richard S. Irwin, MD, Master FCCP  
Editor in Chief, CHEST

Note: Because all authors as well as CHEST staff are being copied on decision letters, please be advised, if you hit "Reply All" to this e-mail, EditorialOffice@chestnet.org will receive a copy of your reply and any confidential comments may be shared with the CHEST editorial staff.