FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Influência do Ciclo Menstrual na Fracção Exalada de Óxido Nítrico

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Saúde e Aparelho Respiratório

Orientador: Prof. Doutor Nuno Neuparth

Mestranda: Iolanda Caires

Lisboa
2011

RESUMO

A determinação da fracção exalada de óxido nítrico (FE_{NO}) é amplamente utilizada como um biomarcador da inflamação eosinofílica das vias aéreas. Alguns estudos sugerem que a produção de óxido nítrico (NO) é influenciada pelas variações cíclicas hormonais na mulher, porém os dados não são consensuais.

Deste modo, o objectivo do nosso estudo foi avaliar como varia a FE_{NO} ao longo do ciclo menstrual. Com esta finalidade, avaliamos um grupo de 20 voluntárias, em idade fértil, com ciclo menstrual regular, não fumadoras, que não utilizavam contraceptivos hormonais, nem suplementos alimentares e/ou medicamentosos e que não se encontravam grávidas, nem a amamentar. Todas referiram não ter conhecimento de qualquer patologia que afecte a FE_{NO}. A existência de atopia foi controlada através de testes cutâneos por *prick*, tendo-se excluído as participantes que apresentaram testes positivos.

Realizamos quatro visitas de estudo, com base na periodicidade do ciclo de cada participante, nas quais, efectuamos a determinação da FE_{NO}, a quantificação dos níveis plasmáticos de óxido nítrico e nitratos (NO/NO_3^-) e o doseamento hormonal de 17β-estradiol e progesterona. As avaliações realizaram-se no período da manhã, em jejum absoluto, tendo respeitado uma dieta pobre em nitratos no dia anterior e abstido da prática de exercício vigoroso uma hora antes da avaliação.

Com este trabalho, verificamos um aumento significativo da FE_{NO} na fase secretora (17.97 ppb ± 5.8) comparativamente com a fase menstrual e proliferativa (16.48 ppb ± 3.6 e 15.95 ppb ±2.8, respectivamente). Não observamos variações significativas dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- ao longo do ciclo. Constatamos uma correlação positiva entre a FE_{NO} e os níveis plasmáticos de NO/NO_3^- durante a ovulação e verificamos que, para a nossa amostra, os níveis hormonais de estradiol e progesterona não são preditores do valor da FE_{NO}, nem dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^-.

Os resultados deste trabalho mostram uma variação da FE_{NO} ao longo do ciclo, ainda assim, mantendo-se os seus valores dentro do intervalo de referência, reforçando a fiabilidade deste biomarcador.

Palavras chave: Fracção exalada de óxido nítrico, níveis plasmáticos de óxido nítrico e nitratos, ciclo menstrual, estradiol, progesterona

ABSTRACT

The determination of fractional exhaled nitric oxide (FE_{NO}) is widely used as a biomarker of eosinophilic airway inflammation. Some studies suggest that nitric oxide (NO) is influenced by cyclical hormonal changes in women, but those are not consensual.

The aim of our study was to assess how FE_{NO} varies throughout the menstrual cycle. With this purpose, we studied a group of 20 volunteers within childbearing age, with regular menstrual cycle, non-smokers, who were not taking any medications including hormonal contraception and food supplements and who were not pregnant or breast-feeding. All participants reported not being aware of any condition that could affect the FE_{NO}. The presence of atopy was controlled by a skin prick test, having been excluded participants with positive test.

We conducted four study visits, based on the periodicity of the cycle of each participant. In each visit, we made the determination of the FE_{NO}, the quantification of plasmatic levels of nitric oxide and nitrates (NO/NO_3^-) and the blood levels of hormone estradiol-17β and progesterone. The evaluations occurred at morning, after overnight fasting. The participants were request to follow a low-nitrate diet in the previous day and refrained from vigorous exercise, for at least one hour before the visit

We found a significant increase of FE_{NO} on secretory phase (17.97 ppb ± 5.8) compared with the menstrual and proliferative phase (16.48 ppb ± 3.6 and 15.95 ppb ± 2.8, respectively). No significant variations were found throughout the menstrual cycle in plasmatic levels of NO/NO_3^-. We found a positive correlation between FE_{NO} and plasmatic levels of NO/NO_3^- during ovulation. Finally, in our sample, the levels of oestradiol and progesterone are not predictors of FE_{NO} value nor of plasmatic levels of NO/NO_3^-.

This study shows a variation of FE_{NO} over the menstrual cycle, nevertheless, the values remain within the reference range, reinforcing the reliability of this biomarker.

Keywords: Fractional exhaled nitric oxide, plasmatic levels of nitric oxide and nitrates, menstrual cycle, oestradiol, progesterone

ABREVIATURAS USADAS

ARDS – Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda

ATS – American Thoracic Society

cNOS – Sintetase constitutiva do Óxido Nítrico

DP – Desvio padrão

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

E2 – Estradiol

ECLIA – Método de electroquimioluminescência

ecNOS – Sintetase constitutiva endotelial do Óxido Nítrico

EDRF – Factor de Relaxamento Derivado do Endotélio

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERS – European Respiratory Society

FE_{NO} – Fracção Exalada de Óxido Nítrico

$FE_{NO_{0.05}}$ – Fracção Exalada de Óxido Nítrico com um débito expiratório de 50±5 mL/s

FSH – Hormona foliculoestimulante

GnRH – Hormona libertadora de gonadotrofinas

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

I.C. – Intervalo de confiança

IMC – Índice de massa corporal

iNOS – Sintetase inductivel do Óxido Nítrico

LH – Hormona luteinizante

ln – Logaritmo natural

M – Média amostral

mL/s – Mililitro por segundo

$NaNO_3$ – Nitrato de sódio

ncNOS – Sintetase constitutiva neuronal do Óxido Nítrico

ng/ml – Nanograma por mililitro

NO – Óxido Nítrico

NO_2^- – Nitritos

NO_3^- – Nitratos

NOS – Sintetase do Óxido Nítrico

O_3 – Ozono

pg/ml – Picograma por mililitro

ppb – partes por bilião

Prog – Progesterona

rpm – Rotações por minuto

RV – Volume residual

SW – Shapiro-Wilk

TLC – Capacidade pulmonar total

VCL_3 – Tricloreto de vanádio

µl – Microlitro

µmol – Micromol

AGRADECIMENTOS

Não poderia iniciar este trabalho, sem antes agradecer:

- Ao Professor Doutor Nuno Neuparth, que desde o início da minha actividade profissional me imprimiu o gosto pela investigação científica, pelas sugestões e críticas, pelo rigor científico que me transmitiu e sobretudo pela disponibilidade, apoio e interesse constantes que demonstrou na orientação do presente trabalho;

- À Professora Doutora Maria Amália Botelho, pelo apoio e dicas no processo de elaboração do desenho de estudo;

- À Professora Doutora Maria Guarino, os ensinamentos e a colaboração na quantificação dos níveis plasmáticos de óxido nítrico e nitratos, bem como o apoio e a disponibilidade demonstrados;

- Às Técnicas de Análises Clínicas do Departamento Universitário de Bioquímica da Faculdade de Ciências Médicas Maria Firmina Lebre e Augusta Marques, pela dedicação e disponibilidade nas colheitas de sangue;

- A todas as participantes, por se terem voluntariado e colaborado neste estudo tão exigente do ponto de vista metodológico, que implicava a realização de várias visitas, tendo acedido ao cumprimento de uma dieta específica, de jejum e à colheita de sangue;

- Ao Laboratório Fernando Teixeira, em especial ao Professor Doutor José Cortez e ao Dr. João Pedro Alegria por me terem facilitado e disponibilizado os doseamentos hormonais a custo reduzido;

- À Professora Maria João Marques Gomes, enquanto coordenadora do mestrado, pela disponibilização de verba para o financiamento dos doseamentos hormonais, bem como pelo apoio e incentivo constantes;

- Ao Prof. Doutor António Gouveia de Oliveira, ao Dr. Pedro Martins e à Mestre Karla Correia, pelo apoio e sugestões no tratamento dos dados;

- Ao meu marido Edgar e às minhas filhas Eva e Matilde, pela compreensão, apoio, carinho e encorajamento constantes, que muito contribuíram para a elaboração desta tese;

- Aos restantes familiares e amigos, pelo carinho, apoio e incentivo sempre demonstrados;

- A todos os que directa ou indirectamente possibilitaram e apoiaram a execução deste trabalho.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO 11
CAPÍTULO I 12
1. ÓXIDO NÍTRICO 12
1.1. Fracção Exalada de Óxido Nítrico 13
1.2. Óxido Nítrico e Nitratos 15
2. CICLO MENSTRUAL 17
2.1. Alterações Hormonais 17
3. ÓXIDO NÍTRICO E CICLO MENSTRUAL 19
CAPÍTULO II – METODOLOGIA 23
1. OBJECTIVO GERAL DO ESTUDO 23
1.1. Objectivos Específicos 23
2. APRESENTAÇÃO DO ESTUDO 23
2.1. População 23
2.2. Amostra 23
2.2.1. Critérios de Inclusão 24
2.2.2. Critérios de Exclusão 24
2.3. Procedimentos 24
2.4. Desenho do Estudo 25
2.4.1. Instrumentos de Medida 27
2.4.1.1. Caderno de Registo de Dados 27
2.4.1.2. Determinação da Fracção Exalada de Óxido Nítrico 27
2.4.1.3. Doseamentos Hormonais 28
2.4.1.4. Quantificação dos Níveis Plasmáticos de Óxido Nítrico e Nitratos 29
2.5. Análise de Dados 29
CAPÍTULO III - RESULTADOS 31
1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA 31
2. APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS 34
2.1. Variação da Fracção Exalada de Óxido Nítrico e Níveis Plasmáticos de Óxido Nítrico e Nitratos ao Longo do Ciclo Menstrual 34
2.1.1. Relação entre a Fracção Exalada de Óxido Nítrico e Níveis Plasmáticos de Óxido Nítrico e Nitratos ao Longo do Ciclo Menstrual 36
2.2. Variação dos Níveis Hormonais de 17β-Estradiol e de Progesterona ao Longo do Ciclo Menstrual 36
2.3. Variações do Óxido Nítrico em Função dos Níveis de Estradiol e de Progesterona .. 39
CAPÍTULO VI – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 40
CAPÍTULO V - CONCLUSÕES 43
Referências Bibliográficas 44
ANEXOS 48
Anexo I - *Consentimento Informado* 49

Anexo II – *Preparação Prévia aos Exames* 53
Anexo III – *Caderno de Registo de Dados* 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Procedimentos e factores que afectam a FE_{NO} 14
Tabela 2 – Síntese dos resultados dos trabalhos referenciados na revisão bibliográfica 22
Tabela 3 – Características da amostra 31
Tabela 4 – Níveis médios da FE_{NO} e dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- ao longo do ciclo menstrual 34
Tabela 5 – Correlações de Pearson entre os níveis de FE_{NO} e os níveis plasmáticos de NO/NO_3^- nas quatro fases do ciclo menstrual 36
Tabela 6 – Níveis médios de 17β-estradiol e progesterona ao longo do ciclo menstrual 37
Tabela 7 – Teste t de Student para comparação das médias dos níveis de progesterona nas várias fases do ciclo menstrual 38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese de NO 12
Figura 2 – Isoformas da enzima sintetase do NO 13
Figura 3 – Ciclo ovárico e ciclo endometrial 17
Figura 4 – Alterações hormonais durante o ciclo menstrual 18
Figura 5 – Desenho de estudo 27
Figura 6 – Distribuição por idade 31
Figura 7 – Distribuição por idade de menarca 32
Figura 8 – Distribuição por regularidade do ciclo menstrual 32
Figura 9 – Pressão arterial 33
Figura 10 – IMC, peso e altura 33
Figura 11 – Variações da FE_{NO} *ao longo do ciclo menstrual* 35
Figura 12 – Variação dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- *e fases do ciclo menstrual* 35
Figura 13 – Níveis de 17β-estradiol ao longo do ciclo menstrual 37
Figura 14 – Níveis de progesterona ao longo do ciclo menstrual 38

INTRODUÇÃO

A determinação da fracção exalada de óxido nítrico (FE_{NO}) é amplamente utilizada como um biomarcador da inflamação eosinofílica das vias aéreas.

Diversos factores influenciam a determinação da FE_{NO}, inclusivamente as variações do ciclo menstrual.[1, 2] Segundo as últimas recomendações da *American Thoracic Society* (ATS) e da *European Respiratory Society* (ERS), em 2005,[2] a relação entre os níveis da FE_{NO} e as variações cíclicas hormonais na mulher não é consensual, recomendando o registo das características individuais do paciente no momento do exame. No entanto, a interpretação dos resultados não tem em conta tais influências.

Estudos epidemiológicos demonstram que a prevalência da asma antes da puberdade é mais frequente no sexo masculino, verificando-se o contrário durante a idade fértil na mulher.[3, 4]

Outros estudos referem que os níveis de estrogénio podem contribuir para o aumento da prevalência da asma no sexo feminino e que 30 a 40% das mulheres asmáticas sofrem agravamento da sintomatologia asmática na fase pré-menstrual – luteínica.[5]

Alguns estudos sugerem que os contraceptivos orais têm um ligeiro efeito benéfico nos casos de asma pré menstrual e de asma moderada, contudo, em casos de asma mais grave os contraceptivos orais podem potenciar a severidade da asma.[5-7]

Os estudos realizados sobre este tema em sujeitos saudáveis não observaram variações cíclicas significativas na FE_{NO}, nem nos níveis plasmáticos de nitratos durante o ciclo menstrual.[8, 9] Contudo, estes estudos utilizaram diferentes metodologias para a determinação da FE_{NO} e não controlaram a dieta pobre em nitratos como um importante factor que influencia o óxido nítrico (NO), sendo difícil a sua comparação.

Sendo o NO um marcador da inflamação brônquica, com elevada sensibilidade na detecção da perda de controlo sobre a doença asmática, pretendemos, a partir de um melhor conhecimento de como o ciclo menstrual influencia a determinação da FE_{NO} – numa população de mulheres saudáveis –, poder contribuir para uma melhor interpretação e classificação da inflamação brônquica.

CAPÍTULO I

1. ÓXIDO NÍTRICO

O estudo da produção endógena de NO teve o seu início em 1980, com a descoberta de uma poderosa substância vasodilatadora produzida pelo endotélio vascular, que foi denominada factor de relaxamento derivado do endotélio (EDRF).[10] Esta molécula foi, 7 anos mais tarde, identificada como NO.[11]

A presença de NO no ar exalado foi pela primeira vez descrita em 1991 por Gustafsson e colaboradores.[12] Posteriormente, vários estudos constataram a existência de níveis elevados de NO em doenças do foro respiratório, como a asma brônquica.[13-16]

Alguns autores confirmaram que os níveis elevados de NO exalado em asmáticos derivam predominantemente do tracto respiratório inferior, sendo estes comparáveis com os obtidos por broncofibroscopia.[17-19]

O NO é sintetizado a partir de um aminoácido essencial, a L-arginina, sob a acção de enzimas catalíticas, as NO sintetases (NOS), levando à formação de NO e L-citrulina (*Figura 1*). Existem duas classes isotípicas da sintetase do NO, as constitutivas (cNOS) e as inductíveis (iNOS). A cNOS é expressa nalgumas células nervosas – sintetase constitutiva neuronal (ncNOS ou NOS tipo I) – e endoteliais – sintetase constitutiva endotelial (ecNOS ou NOS tipo III) – e medeia diversas funções fisiológicas, como neurotransmissor, e na regulação do tónus vascular e do músculo liso brônquico. A iNOS (NOS tipo II) apresenta-se nos macrófagos, neutrófilos, endotélio e músculo liso vascular e expressa-se nos estados inflamatórios (*Figura 2*).[20-23]

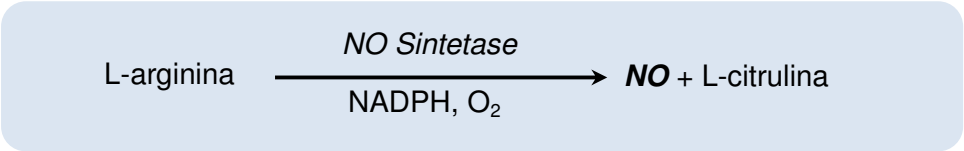


Figura 1 – Síntese de NO

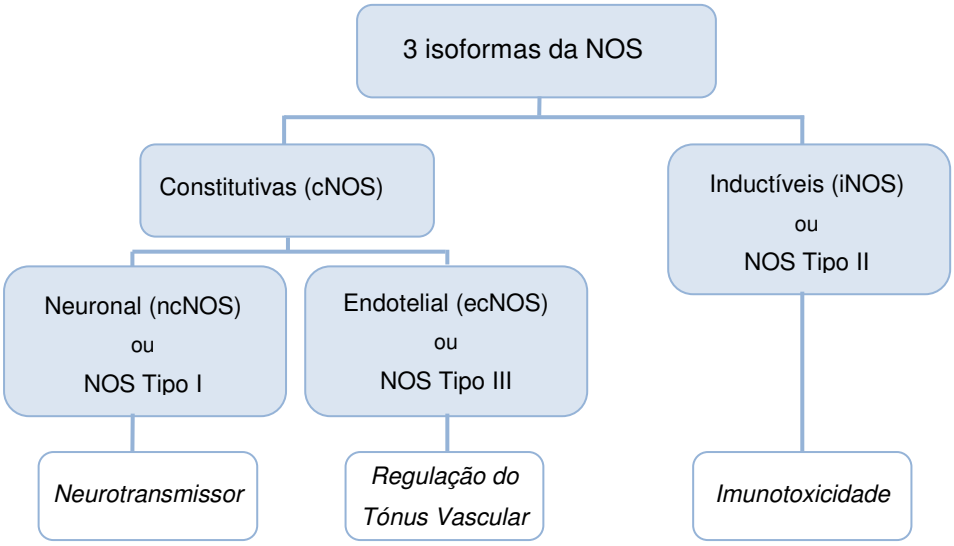


Figura 2 – Isoformas da enzima sintetase do NO

1.1. Fracção Exalada de Óxido Nítrico

A determinação da FE_{NO} tem demonstrado ser vantajosa, já que se trata de uma técnica validada, simples, não invasiva, muito bem tolerada, reprodutível, com resultados imediatos e exacta, podendo ser efectuada repetidamente e aplicada em crianças e em pacientes com obstrução severa, que não tolerem técnicas invasivas. Fornece informação que complementa os testes de função respiratória convencionais, nomeadamente em pacientes com queixas respiratórias não específicas, e permite adequar e monitorizar a resposta à terapêutica anti-inflamatória.[24]

No entanto, vários estudos demonstraram que determinados procedimentos e factores influenciam a FE_{NO} (*Tabela 1*).[1, 25-28] Neste sentido, a ATS/ERS,[2] em 2005, desenvolveram recomendações para a sua determinação. Contudo, no que respeita à influência das variações cíclicas hormonais na mulher, os dados não são consensuais.[2]

Tabela 1 – Procedimentos e factores que afectam a FE_{NO}

FE_{NO} aumentada	*FE_{NO} diminuída*
Factores Técnicos	
• Débito expiratório baixo	• Débito expiratório elevado
• Apneia	
Modulador de NO	
• L-arginina ingerida por sujeitos normais	• Inibidores NOS inalados ou *i.v.*
	• Corticóides inalados ou orais
Factores Fisiológicos	
• Variação do ciclo menstrual	• Variação do ciclo menstrual
• Apneia	• Tabaco
	• Ingestão elevada de álcool
Patologias	
• Asma	• Esclerose sistémica com hipertensão pulmonar
• Provocação com alergenos	• Fibrose quística
• Atopia	• Disquinésia ciliar primária
• Rinite alérgica	• Infecção por HIV
• Infecção do tracto respiratório superior	• ARDS
• Infecção viral do tracto respiratório inferior	
• Alveolites fibrosantes	
• Tuberculose pulmonar activa	
• Sarcoidose pulmonar	
• Rejeição de transplante pulmonar	

FE_{NO} normal ou aumentada	*FE_{NO} normal ou diminuída*
	• Exercício físico
• Bronquiectasias	• Doença pulmonar obstrutiva crónica estável
• Exacerbação de doença pulmonar obstrutiva crónica	

De acordo com Buchvald e colaboradores,[29] os níveis da FE_{NO} aumentam com a idade em sujeitos entre os 4 e os 17 anos, de 15 partes por bilião (ppb) nos mais jovens, para 25 ppb nos adolescentes, correspondendo a um aumento médio de 1 ppb por ano. Contudo, para a população adulta, os estudos que pretendem estabelecer valores de referência não evidenciam tal relação com a idade.[24, 30]

Outros factores que influenciam a FE_{NO} são os exames funcionais respiratórios, nomeadamente as manobras espirométricas,[31, 32] bem como os testes de provocação brônquica [31], entre outros. Estes procedimentos podem induzir broncoconstrição e condicionar, transitoriamente, uma diminuição dos valores da FE_{NO}.

Diversos estudos têm demonstrado uma diminuição significativa dos níveis da FE_{NO} após terapêutica anti-inflamatória em doentes asmáticos, sendo essa redução dose-dependente.

Deste modo, a determinação da FE_{NO} assume-se como um marcador extremamente sensível e rápido na monitorização dos efeitos do tratamento com corticódes,[27] constituindo uma ferramenta importante na detecção da não adesão à terapêutica.

A atopia é outro factor que influencia a FE_{NO}. Segundo Gratziou,[33] os níveis do NO exalado estão significativamente mais elevados em pacientes atópicos com asma e/ou rinite, comparativamente com pacientes não atópicos.

Segundo Vints,[34] uma dieta rica em nitratos, sobretudo vegetais como a alface, espinafres, brócolos, condiciona um aumento dos níveis da FE_{NO} de cerca de 60%, nas duas horas subsequentes à sua ingestão, retornando a valores basais, somente 20 horas depois.

A ingestão de álcool parece diminuir os níveis da FE_{NO},[26, 35] já que o etanol tem um efeito inibidor da iNOS. Dados contraditórios sobre a ingestão de bebidas, como água e cafeína,[36-38] antes da determinação da FE_{NO} levou a que as recomendações da ATS/ERS[2] aconselhassem a não ingerir bebidas uma hora antes da avaliação.

Relativamente ao tabagismo, diversos estudos referem uma redução significativa nos níveis da FE_{NO} em sujeitos normais, redução esta relativa ao número de cigarros fumados.[39-41] Os ex-fumadores e os fumadores passivos também apresentam uma redução dos níveis da FE_{NO}, contudo, observa-se uma normalização dos valores, nos fumadores-passivos, 30 minutos após a exposição ao fumo.[40, 41]

De acordo com a ATS/ERS,[2] a prática de exercício físico vigoroso é desaconselhada pelo menos uma hora antes da determinação da FE_{NO}, pois os dados sobre a sua influencia neste marcador não são consensuais.

1.2. Óxido Nítrico e Nitratos

Os nitratos (NO_3^-) são metabolitos do NO, utilizados como marcadores da actividade endotelial e, de acordo com alguns autores, a FE_{NO} está fortemente relacionada com os níveis plasmáticos de NO_3^-.[42]

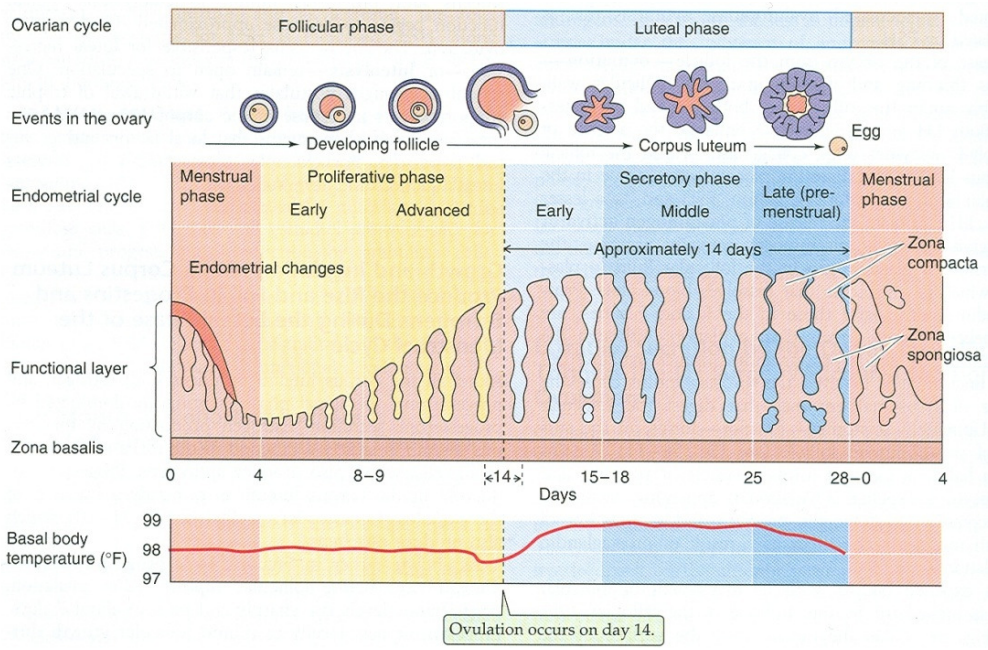
Os níveis de NO_3^- nos fluidos fisiológicos, nomeadamente plasma e urina, têm sido determinados como índice da produção de NO, uma vez que a determinação de NO nos fluidos fisiológicos é difícil, pois trata-se de uma molécula com um tempo de vida curto, decompondo-se rapidamente em nitritos (NO_2^-) e NO_3^- *in vivo*.[20]

Contudo, vários estudos referem que a determinação dos níveis de NO_2^-/NO_3^-, quer no plasma, quer na urina, podem ser influenciados pela dieta.[43-45] Segundo Wang e colaboradores,[43] a medição dos metabolitos do NO no plasma deve ser efectuada após uma dieta pobre em nitratos de pelo menos 4 dias, diminuindo deste modo a variação da produção de NO inter e intra sujeitos. Segundo Heller et al.,[44] os níveis de NO_2^-/NO_3^- diminuem aproximadamente 30% num período de jejum de 24 horas, em que os participantes ingeriram apenas água mineral com baixa concentração de nitratos.

Tsikas e colaboradores[45] referem que as determinações das concentrações de NO_2^- e NO_3^- devem ser realizadas sob uma dieta pobre em nitritos e nitratos. Neste trabalho, um grupo de voluntários efectuou, no dia anterior à colheita das amostras, uma dieta pobre em nitratos, com uma dose diária de 26 mg. Os níveis de NO_2^-/NO_3^-, no plasma e na urina foram neste grupo significativamente menores que os do grupo que não efectuou uma dieta controlada.

2. CICLO MENSTRUAL

O ciclo menstrual envolve mudanças cíclicas no útero e nos ovários e, deste modo, podemos considerar um ciclo ovárico e um ciclo endometrial ou uterino. O ciclo ovárico inclui a fase folicular e a fase luteínica, separadas pela ovulação. O ciclo endometrial inclui a fase menstrual, proliferativa e secretora (*Figura 3*).[46]



In Medical physiology. p.1160.[46]

Figura 3 – Ciclo ovárico e ciclo endometrial

2.1. Alterações Hormonais

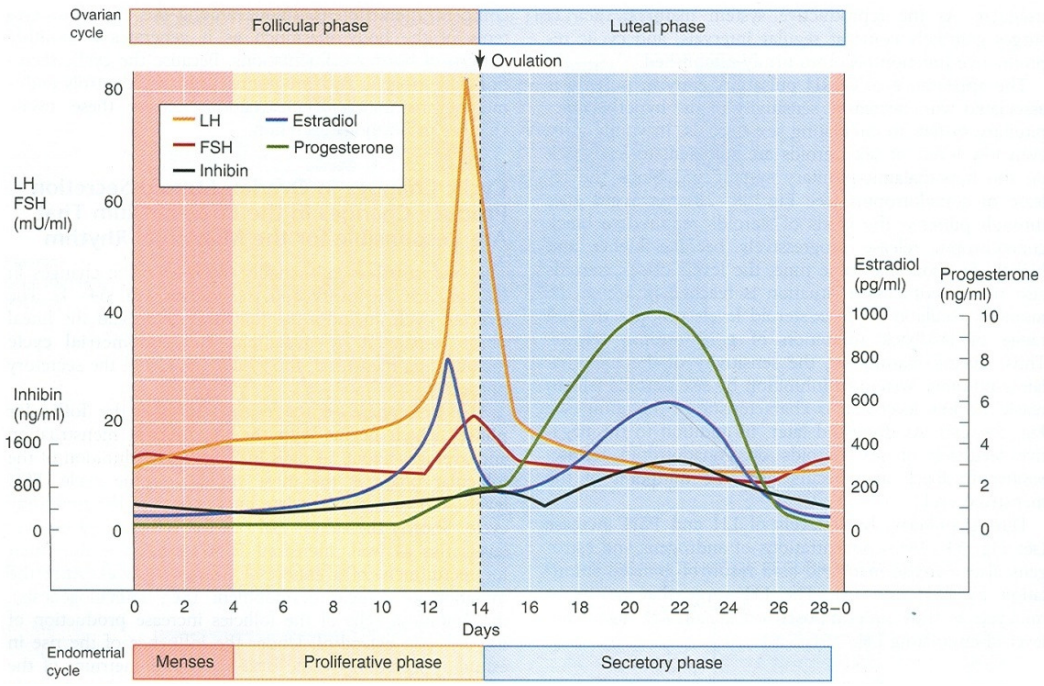
O ciclo menstrual é regulado pela interacção das hormonas pituitárias (luteinizante – LH – e foliculoestimulante – FSH) com as hormonas sexuais ováricas (estradiol e progesterona) (*Figura 4*).

O ciclo menstrual tem início com a fase folicular, primeira fase do ciclo ovárico. Esta fase tem uma duração média de 14 dias, no entanto, é a fase do ciclo com duração mais variável. No início desta fase, a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), produzida pelo hipotálamo, estimula a produção de hormona foliculoestimulante (FSH) e alguma hormona luteinizante (LH) pela hipófise. Os níveis de FSH e de LH aumentam ligeiramente, estimulando o desenvolvimento de alguns folículos.

O folículo em desenvolvimento produz quantidades crescentes de estradiol (estrogénio), estimulando o crescimento e maturação do endométrio, correspondendo à fase proliferativa do ciclo endometrial. Imediatamente antes da ovulação os níveis de estradiol aumentam significativamente, levando a um aumento dos níveis de LH, desencadeando a ovulação nas 24 horas subsequentes.

A concentração elevada de LH, por sua vez, estimula a passagem do folículo a corpo lúteo e, para além da produção de estradiol, observa-se a produção de progesterona, ocorrendo simultaneamente um aumento súbito da FSH, desencadeando a segunda fase do ciclo ovárico, a fase luteínica. Nesta fase, o aumento da progesterona leva ao espessamento do endométrio e estimula a secreção das glândulas do endométrio. A produção de estradiol e, principalmente, progesterona vai inibir a produção de GnRH pelo hipotálamo que, por sua vez, vai inibir a produção de FSH e LH.

A diminuição significativa da produção de LH, condiciona a degeneração do corpo lúteo e, por conseguinte, a inibição da produção de estrogénios e progesterona (fase pré menstrual). Desta forma, o endométrio deixa de ser estimulado, diminuindo o fornecimento de nutrientes às suas células por contracção dos seus vasos sanguíneos. Os baixos níveis de estradiol e de progesterona originam degeneração do endométrio, levando à menstruação, iniciando-se um novo ciclo menstrual.[46, 47]



In Medical physiology. p.1146.[46]

Figura 4 – Alterações hormonais durante o ciclo menstrual

3. ÓXIDO NÍTRICO E CICLO MENSTRUAL

De acordo com a ATS/ERS (2005),[2] é recomendável o registo das características individuais do paciente aquando da determinação da FE_{NO}, uma vez que esta é influenciada por diversos factores, entre os quais o ciclo menstrual. Alguns estudos têm sido realizados nesta área, sugerindo que as variações hormonais cíclicas fazem variar o NO.

Segundo O'Connor,[48] cerca de 40% de mulheres asmáticas sofrem um agravamento dos sintomas na fase pré menstrual, verificando-se uma deterioração da função respiratória entre o 7º e o 10º dia antes da menstruação, ocorrendo um pico da sintomatologia entre o 2º e o 3º dia antes do início da menstruação. Tal facto, segundo os autores, pode ser devido à queda súbita dos níveis de progesterona no plasma no final da fase luteínica.

O trabalho de Oguzulgen et al.[49] vem reforçar estes dados. Neste estudo, um grupo de mulheres com queixas de asma pré menstrual, com idades entre os 17 e os 40 anos, com ciclos menstruais regulares, que não utilizavam terapêutica hormonal incluindo anticonceptivos orais, nem anti-histamínicos, foram submetidas a avaliação funcional respiratória ao sétimo dia após a menstruação e entre o 23º e 29º dia do mesmo ciclo. Todas as determinações foram realizadas no mesmo período do dia e os sujeitos não ingeriram alimentos contendo cafeína nas 12 horas anteriores. No que se refere à FE_{NO}, verificaram níveis significativamente mais elevados antes da menstruação (fase luteínica) comparativamente com os obtidos após a menstruação (fase folicular).

Estes resultados são corroborados pela equipa de Mandhane,[50] onde verificaram uma associação entre o aumento dos níveis de estradiol com a diminuição da FE_{NO}, enquanto que o aumento dos níveis de progesterona associaram-se com o aumento dos níveis da FE_{NO}. Neste estudo foram avaliadas diariamente, durante um ciclo menstrual, 17 mulheres asmáticas, das quais 8 não utilizavam contraceptivos orais.

No entanto, Kharitonov e colegas,[51] utilizando um grupo de voluntárias saudáveis, mostraram que os níveis de pico de NO exalado eram significativamente mais elevados no meio do ciclo - compreendendo o último terço da fase folicular e o início da fase luteínica –, quando comparados com os produzidos durante a menstruação.

Também em sujeitos saudáveis, dados semelhantes são reportados pela equipa de Antczak,[52] que referem um aumento significativo da FE_{NO} a meio do ciclo (pré ovulação e ovulação), onde a concentração de estrogénio no sangue é mais elevada, comparativamente com os valores obtidos na fase luteínica (primeiro terço da fase secretora e período pré menstrual) e durante a menstruação.

Relativamente aos níveis plasmáticos de NO, alguns autores referem uma redução significativa no 21º dia do ciclo, correlacionando-se negativamente com a progesterona.[53] Outros referem um aumento dos níveis de NO_2^- e NO_3^- plasmáticos com o desenvolvimento folicular, mediado pelo estradiol.[54] Outros, ainda, reportam um aumento significativo da concentração plasmática de NO_3^- um dia após a detecção urinária de LH, correspondendo ao pico ovulatório.[55]

Estes dados são também verificados por Manau et al.,[56] que, num grupo de mulheres candidatas a fertilização *in vitro*, com ciclo ovulatório regular, reportou um aumento significativo do NO plasmático no final da fase folicular, num ciclo menstrual normal.

Um estudo sobre o impacto do stresse, género e ciclo menstrual no sistema imunológico, conduzido por Pehlivanoğlu,[57] verificou um aumento significativo dos níveis de NO plasmático e urinário na fase luteínica. Neste estudo, um grupo de mulheres com idades entre 25 e 35 anos, saudáveis, não fumadoras, não medicadas e que não utilizavam anticonceptivos orais, foram orientadas a tomar um pequeno-almoço leve e a abster-se de bebidas com cafeína nas 12 horas prévias ao exame. Foram efectuadas determinações do NO plasmático e urinário na fase folicular (5º-7º dia) e luteínica (21º-23º dia) do ciclo menstrual. As fases do ciclo foram aferidas com determinações plasmáticas dos níveis de estradiol e progesterona.

A equipa de Teran[58] vem reforçar estes dados, onde, num grupo de mulheres saudáveis, verificaram níveis plasmáticos de NO menores na fase pré-ovulatória em comparação com o meio da fase luteínica.

Morris e a sua equipa[8] estudaram um grupo de mulheres normotensas, com um ciclo menstrual regular, sem alterações ultrassonográficas compatíveis com ovários poliquísticos, com o objectivo de analisar a variação na produção de NO durante o ciclo menstrual. Foram excluídas fumadoras ou mulheres expostas ao fumo de tabaco, asmáticas e com história de febre ou de infecção respiratória recente. O grupo foi orientado a não ingerir bebidas alcoólicas e a evitar ambiente com tabaco durante o estudo. Foram determinados, em 30 dias consecutivos, a FE_{NO}, NO_2^- e NO_3^- na urina e esteróides sexuais femininos conjugados na urina. Para a determinação da FE_{NO}, apenas foi contabilizado um quarto do final da expiração, com o objectivo de avaliar o gás alveolar. Este estudo não observou variações cíclicas na FE_{NO} durante o ciclo menstrual, referindo parecer não haver relação entre a produção de hormonas sexuais femininas e a síntese de NO, utilizando técnicas não invasivas.

Outro trabalho desenvolvido por Jilma et al.,[9] centrou-se no estudo das diferenças sexuais na produção de NO, medindo a FE_{NO} e os níveis plasmáticos de NO_3^-. Aos participantes foi efectuado um exame físico pormenorizado. Foram excluídos os indivíduos com hábitos alcoólicos ou tabágicos, que tivessem doado sangue ou a quem tivesse sido prescrita alguma

medicação nos últimos 3 meses, que tivessem efectuado alguma medicação não prescrita ou experienciado alguma alteração clínica relevante nas últimas três semanas. Foram incentivados a manter os hábitos de exercício e de dieta e a não tomar medicação não prescrita durante todo o estudo. As voluntárias apresentavam ciclo menstrual regular e não utilizavam anticonceptivos orais, pelo menos nos três ciclos anteriores. Foram efectuadas três avaliações, a primeira realizou-se ao 7º dia do ciclo menstrual, a segunda um dia após o resultado positivo da medição da LH na urina ou, caso o teste não positivasse, até à terceira manhã após a data prevista de ovulação e a terceira avaliação, 9 dias depois. Contudo, neste estudo não foram observadas alterações significativas na FE_{NO}, nem nos níveis plasmáticos de NO_3^- durante o ciclo menstrual.

Existem evidências que sugerem que a produção de NO nas vias aéreas pode ser modulada pelos níveis de estradiol na mulher.[59] De acordo com Kirsch e colegas,[60] o estrogénio aumenta significativamente a actividade da eNOS, através de um processo que envolve a estimulação de receptores de estrogénio expressos em células epiteliais das vias aéreas humanas.

O estradiol é um activador rápido da ecNOS, levando ao aumento da produção de NO. Este, possui propriedades vasodilatadoras, fundamental para a hemostase cardiovascular.[58, 61, 62] Alguns estudos sugerem que a acção dos estrogénios na produção de NO pode contribuir para o baixo risco de eventos cardiovasculares em mulheres em idade fértil.[63-66] Por outro lado, a produção de NO aumenta a secreção glandular cervical, podendo ter implicações sobre a fertilização e a regulação da fertilidade.[67]

Tendo em conta os resultados contraditórios dos vários estudos (vide *Tabela 2*) e considerando que em alguns destes trabalhos, o controlo de importantes factores que afectam a determinação da FE_{NO} não foram devidamente controlados, julgamos importante encetar um estudo que procure avaliar com rigor a influência das variações hormonais cíclicas na mulher neste marcador de inflamação.

Tabela 2 – Síntese dos resultados dos trabalhos referenciados na revisão bibliográfica

Autores	***Amostra***	***Factores que afectam FE_{NO}***	***Fases do ciclo menstrual***			
			Menstrual	***Proliferativa***	***Ovulação***	***Secretora***
Oguzulgen et al.[49]	11 mulheres com queixas de asma pré menstrual	Abstenção de alimentos contendo cafeína nas 12 h prévias Ritmo circadiano Influência de manobras espirométricas e teste de provocação brônquica		↓ FE_{NO} (7ºdia)		↑ FE_{NO} (23-29º dia)
Mandhane et al.[50]	17 asmáticas (8 não utilizavam anticonceptivos orais)	-		↓ FE_{NO} com o ↑ E2		↑ FE_{NO} com o ↑ Prog
Kharitonov et al.[51]	19 mulheres saudáveis	Não fumadoras Não medicadas	↓ FE_{NO}		↑ FE_{NO}	
Antczak et al.[52]	15 mulheres saudáveis	Não fumadoras	↓ FE_{NO}	↑ FE_{NO}		↓ FE_{NO}
Giusti et al.[53]	37 mulheres saudáveis	-				↓ NO/NO_3^- plasmático com ↑ Prog (21º dia)
Rosselli et al.[54]	7 mulheres saudáveis	-		↑ NO/NO_3^- plasmático com o desenvolvimento folicular		↓ NO/NO_3^- plasmático com ↑ Prog
Ekerhovd et al.[55]	19 mulheres saudáveis	Dieta pobre em nitratos e abstenção de exercício físico vigoroso nas 48 h prévias Jejum no dia da colheita			↑ NO/NO_3^- plasmático	
Manau et al.[56]	10 candidatas a fertilização *in vitro* com ciclo ovulatório regular	Não fumadoras Não praticam exercício físico intenso		↑ NO/NO_3^- plasmático		
Pehlivanoğlu et al.[57]	10 mulheres saudáveis	Não fumadoras Não medicadas Abstenção de bebidas com cafeína nas 12 h prévias Pequeno-almoço leve no dia da colheita				↑ NO/NO_3^- plasmático e urinário
Teran et al.[58]	9 mulheres saudáveis	-		↓ NO/NO_3^- plasmático		↑ NO/NO_3^- plasmático
Morris et al.[8]	5 mulheres saudáveis	Abstenção de bebidas alcoólicas e evitar ambientes com tabaco durante todo o estudo	Sem variações da FE_{NO} e dos níveis urinários de NO_2^- e NO_3^-			
Jilma et al.[9]	21 mulheres saudáveis	Manter hábitos de dieta e de exercício	Sem variações da FE_{NO} e dos níveis plasmáticos de NO_3^-			

CAPÍTULO II – METODOLOGIA

1. OBJECTIVO GERAL DO ESTUDO

O objectivo geral do presente estudo foi compreender como varia a fracção exalada de óxido nítrico (FE_{NO}) ao longo do ciclo menstrual.

1.1. Objectivos Específicos

Com este estudo pretendeu-se:

- Descrever a variação da fracção exalada de óxido nítrico ao longo do ciclo menstrual;
- Descrever a relação entre níveis plasmáticos de óxido nítrico e nitratos e as fases do ciclo menstrual;
- Relacionar a fracção exalada de óxido nítrico com os níveis plasmáticos de óxido nítrico e nitratos ao longo das fases do ciclo menstrual;
- Determinar se a fracção exalada de óxido nítrico varia em função dos níveis hormonais de estradiol e progesterona.

2. APRESENTAÇÃO DO ESTUDO

2.1. População

Indivíduos do sexo feminino em idade fértil.

2.2. Amostra

Foram estudados 20 indivíduos do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 18 e os 45 anos inclusive. Todos os sujeitos estudados cumpriram os critérios de inclusão e de exclusão abaixo descritos.

A amostra foi recolhida de forma não probabilística, pelo método de amostragem por conveniência, entre alunos que frequentam o curso de Mestrado Integrado em Medicina da

Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa e, entre colegas e amigas que se voluntariaram para participar no presente estudo.

2.2.1. Critérios de Inclusão

- Sexo feminino;
- Ciclo menstrual regular;
- Idades entre 18 e 45 anos inclusive.

2.2.2. Critérios de Exclusão

- Gravidez;
- Amamentação;
- Utilização de métodos anticonceptivos hormonais (ex: contraceptivos orais combinados, contraceptivos orais progestativos, contraceptivos injectáveis, implantes subcutâneos, dispositivos intrauterinos com progestativo);
- Toma de suplementos alimentares e/ou medicamentosos;
- Existência de alguma patologia que afecte a FE_{NO} (ex: asma, atopia, rinite alérgica, infecção do tracto respiratório superior, infecção viral do tracto respiratório inferior, alveolites fibrosantes, tuberculose pulmonar activa, sarcoidose pulmonar, rejeição de transplante pulmonar, esclerose sistémica com hipertensão pulmonar, fibrose quística, disquinésia ciliar primária, infecção por HIV, ARDS, bronquiectasias, DPOC);
- Tabagismo activo;
- Alcoolismo.

2.3. Procedimentos

Para se atingirem os objectivos enunciados, desenhamos um protocolo de investigação humana, que foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

O protocolo constou de um estudo em painel, analítico e correlacional pretendendo descrever e analisar a associação entre as fases do ciclo menstrual e a FE_{NO}, numa amostra de indivíduos do sexo feminino, desde que preenchessem os critérios de inclusão e de exclusão definidos.

A participação no estudo foi inteiramente voluntária. Às participantes foi concedida toda a informação e esclarecimento sobre a natureza e objectivos da investigação, salientando a liberdade de participação ou abandono no estudo. Todos os exames foram realizados após

explicação prévia de todos os procedimentos e assinatura do consentimento informado (vide anexo I).

A identidade de cada participante foi mantida confidencial. O anonimato foi realizado mediante atribuição de um código, constituído pelas duas primeiras letras do primeiro nome, seguidas pelas duas primeiras letras do apelido e por um número sequencial. Todos os dados foram mantidos em sigilo, sendo apenas tratados através do referido código, sem qualquer menção ao nome da participante.

Os dados obtidos neste estudo foram registados no Caderno de Registo de Dados e, posteriormente, processados informaticamente. O arquivo de toda a documentação relativa ao participante foi da responsabilidade do investigador. Os documentos informáticos estão protegidos com um código.

O estudo decorreu no Departamento Universitário de Fisiopatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

2.4. Desenho do Estudo

As participantes foram avaliadas durante um ciclo menstrual, respeitando o seguinte plano (*Figura 5*):

- *Visita de selecção (VS)*
  - Registo dos dados demográficos;
  - Verificação dos critérios de inclusão/exclusão;
  - Assinatura do consentimento informado;
  - Realização de testes cutâneos para despiste de atopia (a atopia foi definida como uma resposta positiva – pápula de diâmetro superior a 3 mm – a um ou mais alérgenos);
  - Medição da pressão arterial;
  - Estabelecimento do plano de visitas;
  - Entrega de informação referente à preparação para os exames.

O plano das visitas de estudo foi estabelecido de acordo com a regularidade dos ciclos:

- *Visita 1 (V1)* – Fase menstrual (fase folicular) – entre 1º e 4º dia do ciclo;
- *Visita 2 (V2)* – Fase proliferativa (fase folicular) – entre o 8º e 10º dia do ciclo;

- *Visita 3 (V3)* – Ovulação – data calculada com base no número de dias do ciclo de cada participante de acordo com a fórmula:

  n.º de dias de ciclo – 14 = ovulação

  - Ciclo de 25 dias (ovulação - 11º dia do ciclo) – visita entre 10º e 12º dia do ciclo
  - Ciclo de 26 dias (ovulação - 12º dia do ciclo) – visita entre 11º e 13º dia do ciclo
  - Ciclo de 27 dias (ovulação - 13º dia do ciclo) – visita entre 12º e 14º dia do ciclo
  - Ciclo de 28 dias (ovulação - 14º dia do ciclo) – visita entre 13º e 15º dia do ciclo
  - Ciclo de 29 dias (ovulação - 15º dia do ciclo) – visita entre 14º e 16º dia do ciclo
  - Ciclo de 30 dias (ovulação - 16º dia do ciclo) – visita entre 15º e 17º dia do ciclo
  - Ciclo de 31 dias (ovulação - 17º dia do ciclo) – visita entre 16º e 18º dia do ciclo
  - Ciclo de 32 dias (ovulação - 18º dia do ciclo) – visita entre 17º e 19º dia do ciclo
- *Visita 4 (V4)* – Fase secretora (fase luteínica) – entre o 18º e o 25º dia do ciclo.

Nas quatro visitas de estudo, as participantes foram avaliadas no período da manhã e à mesma hora – ritmo circadiano – obedecendo ao seguinte plano:

- Confirmação da manutenção dos critérios de inclusão/exclusão;
- Verificação da preparação para o exame;
- Determinação da $FE_{NO_{0.05}}$;
- Colheita de sangue para o doseamento hormonal de 17β-estradiol (E2) e progesterona (Prog) e para a quantificação dos níveis plasmáticos de óxido nítrico e nitratos (NO/NO_3^-).

Com o intuito de minimizar todos os factores que afectam o NO, todas as visitas realizaram-se em jejum. Solicitamos, ainda, às participantes que não realizassem exercício físico uma hora antes da avaliação e que realizassem uma dieta pobre em nitratos nas 24 horas que antecediam a visita de estudo (vide anexo II). Em todas as visitas inquirimos as participantes sobre a toma medicamentosa e incentivamos a não tomar medicação não prescrita durante todo o estudo.

Após as visitas de estudo, todas as participantes informaram o investigador do primeiro dia do ciclo menstrual seguinte, o que permitiu efectuar o cálculo para confirmação da data da ovulação.

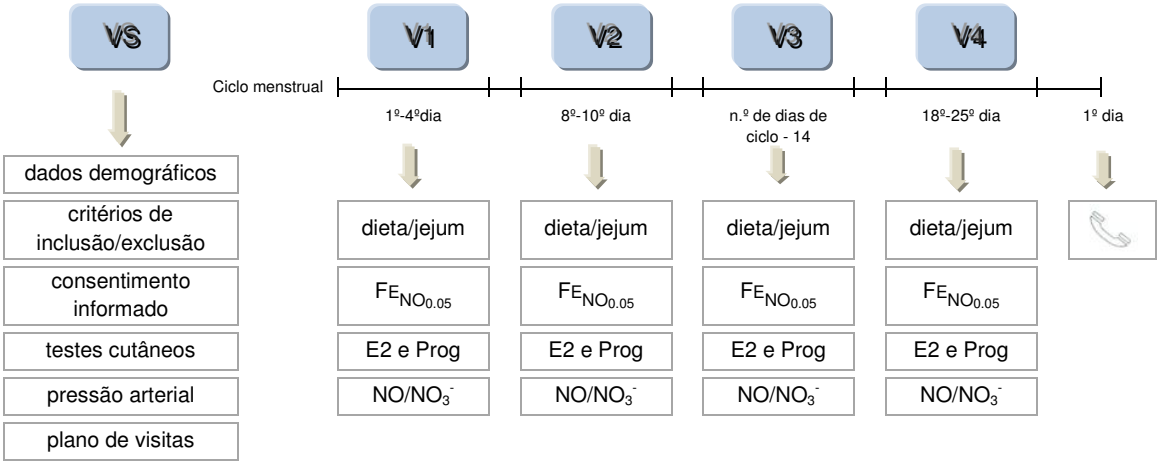


Figura 5 – Desenho de estudo

2.4.1. Instrumentos de Medida

Para a recolha de dados, e com o intuito de irmos ao encontro do objectivo geral e dos objectivos específicos utilizámos os seguintes instrumentos:

- Caderno de registo de dados;
- Determinação da $FE_{NO_{0.05}}$;
- Doseamentos hormonais de estradiol e de progesterona;
- Quantificação dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^-.

2.4.1.1. Caderno de Registo de Dados

O registo dos dados foi efectuado no caderno de registo de dados, elaborado para este estudo, constituído pela folha de registo dos dados demográficos, pela folha de verificação dos critérios de inclusão/exclusão, pelo plano de visitas, pelas folhas de verificação da preparação para o exame e de registo dos parâmetros medidos (vide anexo III).

2.4.1.2. Determinação da Fracção Exalada de Óxido Nítrico

A determinação da FE_{NO} foi realizada através de um analisador de elevada sensibilidade (Sievers 280 NOA™, Sievers Instruments, Inc., CO, USA), que permite a determinação de NO com base numa reacção de quimioluminescência em fase gasosa entre o NO e o ozono (O_3).

Esta determinação foi efectuada pelo método da expiração única e lenta, através de uma peça bocal directamente para o analisador e de acordo com as recomendações da *ATS/ERS (2005)* [(2)]. Assim, com o paciente em posição sentada (pelo menos 5 min. antes do exame e durante todo o procedimento), solicitou-se que efectuasse uma expiração até ao Volume Residual (RV), seguida de uma inspiração até à Capacidade Pulmonar Total (TLC) (inspiração rápida - 2 a 3 seg.) e de uma manobra expiratória lenta, através da peça bocal e sem mola nasal durante 6 a 30 seg. com um débito expiratório mantido de 50±5 mL/s ($FE_{NO_{0.05}}$), contra uma baixa resistência (permitindo uma pressão de 5 a 20 cmH_2O). A pressão criada pela expiração contra essa resistência permitiu a oclusão do palato mole e, deste modo, isolar as cavidades nasais do resto do tracto respiratório.

A medição foi repetida pelo menos 2 ou 3 vezes, respeitando um intervalo de 30 seg. entre os testes, para permitir uma adequada eliminação do NO entre as manobras.

Consideramos a $FE_{NO_{0.05}}$ correspondente à média de 3 medições com variabilidade ≤ 10% ou à média de 2 medições com variabilidade ≤ 5%.

Diariamente, antes da determinação da $FE_{NO,}$ procedemos ao registo do NO ambiente e à calibração do zero e de uma concentração padrão de NO.

2.4.1.3. Doseamentos Hormonais

A colheita de sangue venoso para doseamentos hormonais, com o objectivo de confirmar as fases do ciclo menstrual, foi efectuada no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa. Para tal, foram utilizados tubos com gel separador e acelerador.

Depois da colheita de sangue, no Departamento de Fisiopatologia, as amostras permaneceram à temperatura ambiente por 15 minutos, de forma a permitir a retracção do coágulo. De seguida, as amostras, foram centrifugadas durante 10 min a 3500 rpm. O sobrenadante retirado foi colocado em tubos eppendorf de 1.5 ml. Estas amostras foram congeladas a -40ºC e posteriormente enviadas, em gelo, para o Laboratório Fernando Teixeira, para proceder aos doseamentos de estradiol e progesterona. Os doseamentos foram efectuados pelo método de electroquimioluminescência (ECLIA).

2.4.1.4. Quantificação dos Níveis Plasmáticos de Óxido Nítrico e Nitratos

No momento de colheita de sangue para os doseamentos hormonais, foi também colhido sangue para a quantificação dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^-. Assim, foram colocados 3 ml de sangue venoso para um tubo de hemograma (tubo com EDTA), o qual se agitou manualmente.

Imediatamente após a colheita, no Departamento de Fisiopatologia, a amostra foi centrifugada durante 3 min a 9900 rpm, foram retirados 500 µl de plasma para um tubo de eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente, procedeu-se à desproteinização da amostra com etanol absoluto (adicionou-se à amostra 1 ml de etanol a 0ºC, agitou-se manualmente e deixou-se repousar em gelo a 0ºC durante 30 minutos; seguiu-se a centrifugação a 9900 rpm durante 5 minutos, remoção do sobrenadante e colocação em dois tubos de eppendorf de 1.5 ml). A amostra depois de desproteinizada foi congelada a -40ºC, para posterior análise.

A análise para quantificação dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- foi efectuada no Biotério da Faculdade de Ciências Médicas, utilizando um analisador de quimioluminescência (Sievers 280i NOA™, Sievers Instruments, Inc., CO, USA).

Após a realização de uma curva de calibração com várias concentrações de nitrato de sódio ($NaNO_3$), procedeu-se à injecção de 5 µl da amostra plasmática na câmara de reacção (*purge vessel*). Nesta câmara, a amostra reage com uma solução de tricloreto de vanádio (VCL_3), convertendo o nitrato em NO. Os níveis de NO das amostras foram calculados, pela integração dos valores pico de cada injecção, com base na curva de calibração efectuada [57, 68].

2.5. Análise de Dados

Para investigar a existência de diferenças entre as médias das variáveis FE_{NO}, níveis plasmáticos de NO/NO_3^-, níveis de estradiol e níveis de progesterona nas quatro medições efectuadas ao longo do ciclo menstrual, correspondendo às quatro fases (menstrual (V1), proliferativa (V2), ovulação (V3) e secretora (V4), utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para medições repetidas com a correcção de Greenhouse-Geisser seguida, no caso de um teste significativo, por comparações duas-a-duas das médias nas diferentes fases do ciclo com o teste *t* de Student para amostras emparelhadas. Consideraram-se estatisticamente significativas as diferenças entre médias com um nível de significância (*valor p*) inferior ou igual a 0.05. Os resultados são apresentados como média e intervalo de confiança (I.C.) de 95%.

Para testar o pressuposto da ANOVA de normalidade da distribuição das variáveis em estudo utilizamos o teste Shapiro-Wilk. Este pressuposto não se verificou para as variáveis progesterona e níveis plasmáticos de NO/NO_3^-, pelo que recorremos à transformação logarítmica destas – logaritmo natural (ln). A referida transformação possibilitou a normalização de ambas as variáveis, o que permitiu validar os pressupostos da análise ($SW(20)_{V1FE_{NO}}$=0.920; p=0.100; $SW(20)_{V1E2}$=0.968; p=0.716; $SW(20)_{lnV1Prog}$=0.936; p=0.201; $SW(20)_{lnV1NO/NO_3^-}$=0.974; p=0.845). Para as variáveis transformadas, os resultados são apresentados como anti-logaritmo natural (anti-ln).

Com o intuito de medir a intensidade e a direcção da associação entre as variáveis FE_{NO} e níveis plasmáticos de NO/NO_3^- recorremos ao coeficiente de correlação de Pearson.

Para determinar se a FE_{NO} varia em função dos níveis hormonais de estradiol e progesterona, utilizamos o modelo de regressão linear múltipla, pelo método de selecção de variáveis passo-a-passo anterógrada, com o objectivo de obter um modelo que permitisse predizer as variações da FE_{NO} (como variável dependente) em função dos níveis de estradiol e de progesterona como preditores (variáveis independentes). Efectuamos o mesmo procedimento para determinar se os níveis plasmáticos de NO/NO_3^- variam em função dos níveis hormonais de estradiol e progesterona.

Para o tratamento e análise dos dados utilizamos o programa informático SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chigaco, IL, USA), versão 18.0, para a representação gráfica utilizamos o programa GraphPad Prism, versão 4.

CAPÍTULO III - RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Como foi referido, o total da nossa amostra contou com 20 sujeitos do sexo feminino com idades compreendidas entre os 18 e os 45 anos inclusive, que preenchiam os critérios de inclusão e de exclusão definidos. A *Tabela 3* resume as características da amostra.

Tabela 3 – Características da amostra

	M	*DP*
Idade (anos)	27.95	8.31
Altura (cm)	161.65	4.55
Peso (Kg)	56.7	7.12
Índice de massa corporal (IMC) (Kg/m^2)	21.72	2.81
Pressão arterial sistólica (mmHg)	103.9	12.35
Pressão arterial diastólica (mmHg)	58.35	5.02
Idade de menarca (anos)	12.7	1.22
Regularidade do ciclo menstrual (dias)	28.75	1.45

Relativamente às idades dos indivíduos que compõem a amostra, verificamos que 55% (n=11) tinha idades compreendidas entre os 20 e os 29 anos, seguindo-se 30% (n=6) com idades entre os 30 e 39 anos, 10% (n=2) com idades entre os 40 e 45 anos e 5% (n=1) com idades entre os 18 e 19 anos (*Figura 6*).

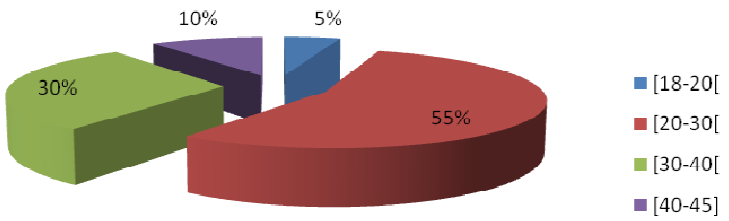


Figura 6 – Distribuição por idade

Quanto à idade de menarca das participantes da nossa amostra, verificamos que ocorreu maioritariamente entre os 12 e os 14 anos, ou seja, 35% (n=7) teve a primeira menstruação aos 13 anos, 25% (n=5) aos 12 anos, 20% (n=4) aos 14 anos, seguindo-se 10% (n=2) aos 11 anos e finalmente 5% (n=1) aos 10 anos e aos 15 anos (*Figura 7*).

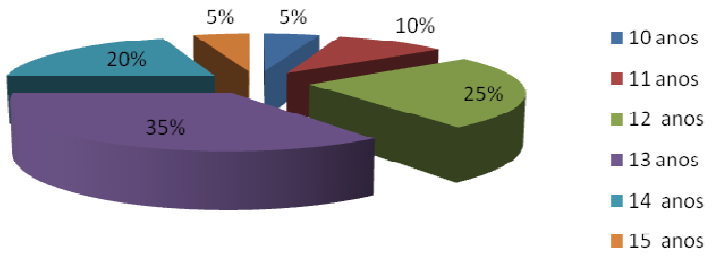


Figura 7 – Distribuição por idade de menarca

No que respeita à regularidade do ciclo menstrual, podemos verificar que 50% (n=10) das participantes da nossa amostra referiram ter ciclos regulares de 28 dias, 30% (n=6) ciclos de 30 dias, seguindo-se 10% (n=2) com ciclos de 29 dias e, por fim, 5% (n=1) referiram ter ciclos de 25 dias e de 32 dias (*Figura 8*).

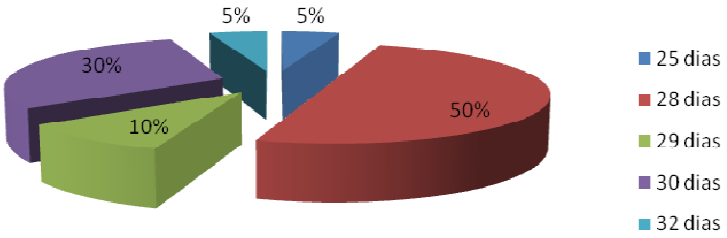


Figura 8 – Distribuição por regularidade do ciclo menstrual

Todas as participantes que constituíram a nossa amostra eram não fumadoras, no entanto, devido à dificuldade de inclusão de participantes que cumprissem os critérios de inclusão e de exclusão definidos, 25% (n=5) da nossa amostra eram ex-fumadoras, tendo cessado o tabagismo há pelo menos 12 meses.

Quanto às restantes características, com base na avaliação realizada na visita de selecção, verificamos que a nossa amostra apresentava testes cutâneos negativos para os alérgenos testados, pressão arterial normal (*Figura 9*), bem como peso normal, baseado na determinação do índice de massa corporal (IMC) (*Figura 10*).

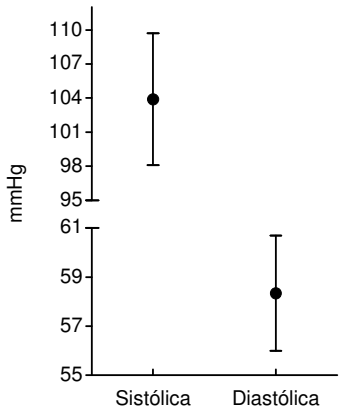


Figura 9 – Pressão arterial

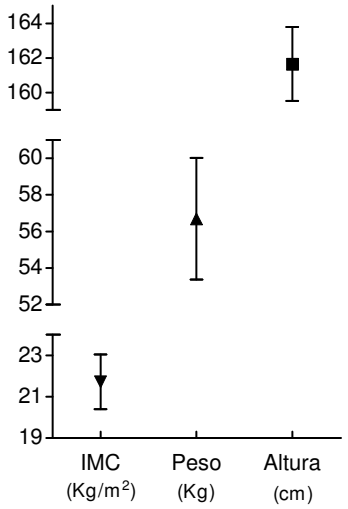


Figura 10 – IMC, peso e altura

A informação sobre o primeiro dia do ciclo menstrual seguinte permitiu efectuar o cálculo para confirmação da data da ovulação. Esta informação cruzada com os doseamentos hormonais, possibilitou-nos aferir com rigor as fases do ciclo menstrual medido.

Com base nestes dados, verificamos que foram medidas as fases planeadas (*i.e.* menstrual, proliferativa, ovulação e secretora) em 45% (n=9) das participantes, pois o ciclo medido teve duração idêntica à referida quando inquiridas sobre a sua regularidade.

Nas restantes 55% (n=11) das participantes, constatamos que o ciclo medido foi irregular, apresentando uma duração superior à referida. Destas participantes, observamos que na última visita de estudo 73% (n=8) encontravam-se na ovulação e 27% (n=3) encontrava-se ainda na fase proliferativa.

2. APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS

2.1. Variação da Fracção Exalada de Óxido Nítrico e Níveis Plasmáticos de Óxido Nítrico e Nitratos ao Longo do Ciclo Menstrual

Na *Tabela 4*, apresentam-se os valores médios e intervalos e confiança de 95% da FE_{NO} e dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- ao longo do ciclo menstrual, podendo observar-se valores médios ligeiramente superiores na fase secretora.

Tabela 4 – Níveis médios da FE_{NO} e dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- ao longo do ciclo menstrual

	Fase Menstrual (n=20)	Fase Proliferativa (n=20)	Ovulação (n=17)	Fase Secretora (n=9)
FE_{NO} (ppb)	16.48±3.6	15.95±2.8	14.62±2.9	17.97±5.8
anti-ln NO/NO_3^- (µmol)	17.53±1.2	16.26±1.2	17.95±1.2	18.66±1.4

Relativamente às variações da FE_{NO} ao longo do ciclo menstrual, observamos diferenças significativas entre as quatro fases do ciclo ($F(3,24)=3.42$; $p=0.05$). Ao analisar as diferenças das médias verificamos diferenças significativas entre os níveis de FE_{NO} nas fases menstrual e secretora ($t(8)=-2.348$; $p=0.047$) e nas fases proliferativa e secretora ($t(8)=-2.442$; $p=0.040$). No entanto, não se observaram diferenças significativas entre os níveis de FE_{NO} nas fases menstrual e proliferativa ($t(19)=0.595$; $p=0.559$), nas fases proliferativa e ovulação ($t(16)=1.411$; $p=0.177$) e na ovulação e fase secretora ($t(8)=-2,123$; $p=0.067$), bem como, entre as fases menstrual e ovulação ($t(16)=1.153$; $p=0.266$), como mostra a *Figura 11*.

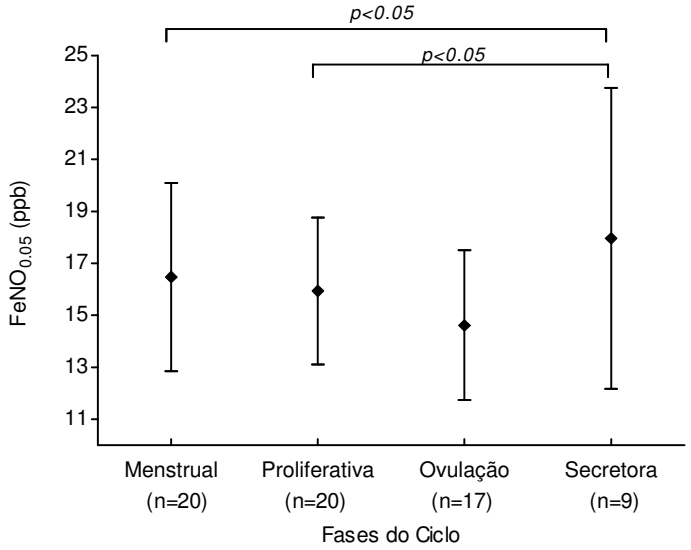


Figura 11 – Variações da FE_{NO} *ao longo do ciclo menstrual*

Ao analisar as variações dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- ao longo do ciclo menstrual, de acordo com o Teste *F*, não há evidência da existência de diferenças significativas do NO/NO_3^- plasmático nas quatro medições efectuadas ($F(3,24)=0.753$; $p>0.05$), como ilustra a *Figura 12*. Deste modo, não procedemos à análise de comparações múltiplas.

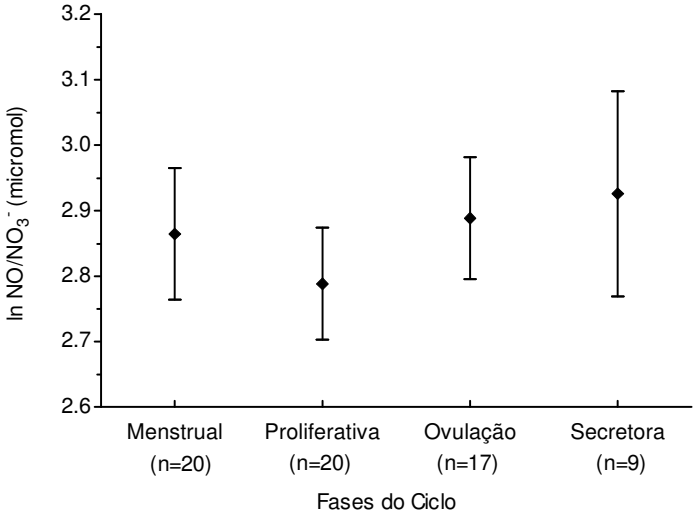


Figura 12 – Variação dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- *e fases do ciclo menstrual*

Nota: Representação em escala logarítmica (transformação dos dados (ln) de modo a validar as condições de aplicação dos testes).

2.1.1. Relação entre a Fracção Exalada de Óxido Nítrico e Níveis Plasmáticos de Óxido Nítrico e Nitratos ao Longo do Ciclo Menstrual

Ao analisar a relação entre os níveis de FE_{NO} e níveis plasmáticos de NO/NO_3^- obtidos nas quatro medições ao longo do ciclo, apenas encontramos uma única correlação significativa. Verificamos uma associação entre os valores de FE_{NO} e os níveis plasmáticos de NO/NO_3^- na ovulação, ou seja, os dados sugerem que quanto maiores os níveis de FE_{NO}, maiores os níveis plasmáticos de NO/NO_3^- na ovulação (r=0.518, n=17; p<0.05) (*Tabela 5*).

Tabela 5 – Correlações de Pearson entre os níveis de FE_{NO} e os níveis plasmáticos de NO/NO_3^- nas quatro fases do ciclo menstrual

		Níveis da FE_{NO} (ppb)			
		Menstrual (n=20)	Proliferativa (n=20)	Ovulação (n=17)	Secretora (n=9)
ln Níveis Plasmáticos de NO/NO_3^- (µmol)	Menstrual (n=20)	r=0.074	r=0.000	r=0.242	r=0.380
	Proliferativa (n=20)	r=0.042	r=-0.016	r=0.179	r=0.078
	Ovulação (n=17)	r=0.298	r=0.217	r=0.518*	r=-0.063
	Secretora (n=9)	r=0.544	r=0.145	r=0.325	r=0.411

*Nota: * p<0.05*

2.2. Variação dos Níveis Hormonais de 17β-Estradiol e de Progesterona ao Longo do Ciclo Menstrual

No que se refere aos doseamentos hormonais, mais especificamente aos níveis de 17β-estradiol e progesterona, os valores médios e intervalos de confiança de 95% obtidos estão representados na *Tabela 6*.

De acordo com o esperado, verifica-se um pico dos níveis de estradiol na ovulação, mantendo-se elevados na fase secretora. Para os níveis de progesterona observa-se um aumento na fase secretora.

Tabela 6 – Níveis médios de 17β-estradiol e progesterona ao longo do ciclo menstrual

	Fase Menstrual (n=20)	Fase Proliferativa (n=20)	Ovulação (n=17)	Fase Secretora (n=9)
Estradiol (pg/ml)	42.55±7.4	96.61±34.1	221.61±51.7	181.85±91.5
anti-ln Progesterona (ng/ml)	0.78±1.3	0.57±1.4	1.80±1.5	12.49±2.1

A análise estatística destes dados permitiu-nos observar diferenças significativas dos níveis de estradiol nas quatro fases ($F(3,24)=4.42$; $p<0.05$).

Da análise das diferenças das médias dos níveis de estradiol para as quatro fases do ciclo, verificamos diferenças significativas entre as fases menstrual e proliferativa ($t(19)=-3.577$; $p=0.002$), entre as fases menstrual e ovulação ($t(16)=-6.823$; $p<0.001$) e entre as fases menstrual e secretora ($t(8)=-3.293$; $p=0.011$). Observaram-se ainda diferenças significativas entre as fases proliferativa e ovulação ($t(16)=-3.749$; $p=0.002$). Contudo, não se verificaram diferenças significativas dos níveis de estradiol entre as fases proliferativa e secretora ($t(8)=-0.558$; $p=0.592$) e entre a ovulação e a fase secretora ($t(8)=0,317$; $p=0.760$) (*Figura 13*).

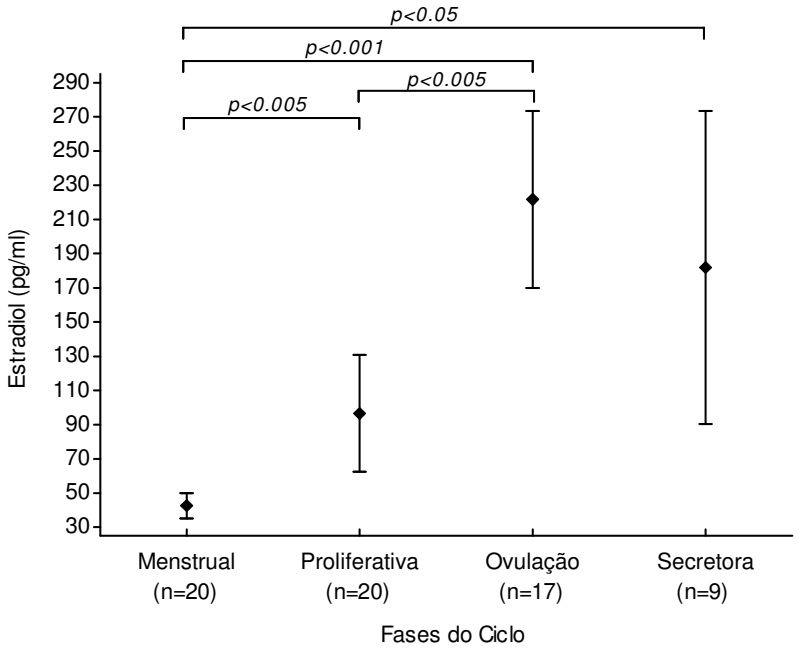


Figura 13 – Níveis de 17β-estradiol ao longo do ciclo menstrual

Quanto às variações hormonais de progesterona, verificamos a existência de diferenças significativas nas quatro fases avaliadas ao longo do ciclo ($F(3,24)=24.82$; $p<0.01$).

A comparação das médias dos níveis de progesterona nas quatro medições efectuadas permitiu-nos observar diferenças significativas entre as várias fases do ciclo, como podemos constatar na *Figura 14* e na *Tabela 7*.

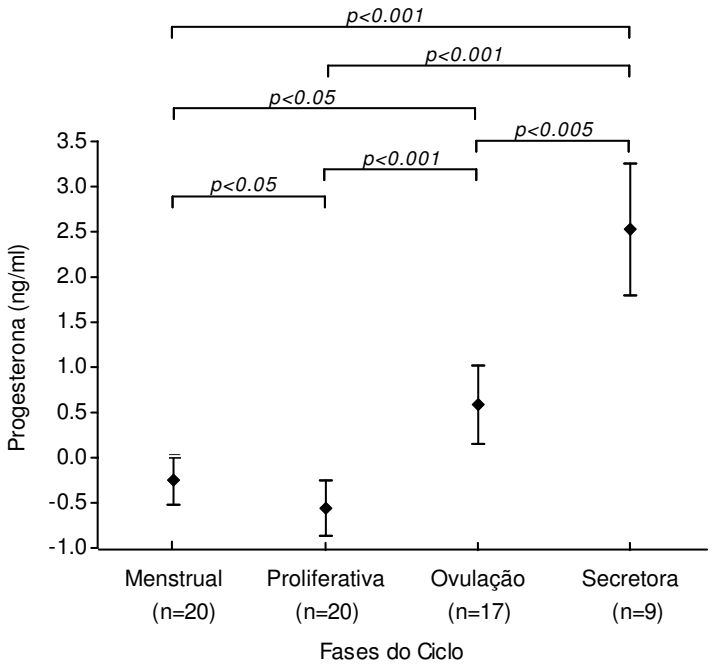


Figura 14 – Níveis de progesterona ao longo do ciclo menstrual

Nota: Representação em escala logarítmica (transformação dos dados (ln) de modo a validar as condições de aplicação dos testes).

Tabela 7 – Teste t de Student para comparação das médias dos níveis de progesterona nas várias fases do ciclo menstrual

	Proliferativa	Ovulação	Secretora
Menstrual	$t(19)=2.823$; $p=0.011$	$t(16)=-2.787$; $p=0.013$	$t(8)=-6.924$; $p<0.001$
Proliferativa)	_	$t(16)=-4.386$; $p<0.001$	$t(8)=-6.743$; $p<0.001$
Ovulação	_	_	$t(8)=-4.864$; $p=0.001$

2.3. Variações do Óxido Nítrico em Função dos Níveis de Estradiol e de Progesterona

Procurou-se prever o valor de FE_{NO} a partir dos níveis de Estradiol e Progesterona, no entanto na análise da regressão múltipla efectuada com o método passo-a-passo, os níveis hormonais de estradiol e progesterona não entraram no modelo de predição.

Observamos o mesmo ao procurar prever o valor dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- a partir dos níveis hormonais de estradiol e progesterona.

Estes resultados indicam que, para a nossa amostra, os níveis hormonais de estradiol e progesterona não são preditores do valor da FE_{NO}, nem dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^-.

CAPÍTULO VI – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste estudo verificamos uma variação da $FE_{NO_{0.05}}$ durante o ciclo menstrual, correspondendo a um aumento significativo da sua concentração na fase secretora, comparativamente com as fases menstrual e proliferativa, ou seja, assistimos, no ciclo ovárico, a um aumento da concentração da FE_{NO} na fase luteínica relativamente à fase folicular.

Estes dados, vêm de encontro aos obtidos pelas equipas de Oguzulgen[49] e de Mandhane,[50] contudo, as características dessas amostras são distintas, já que se realizaram em mulheres com asma.

Os estudos em voluntárias saudáveis,[51, 52] por seu turno, reportam um aumento dos níveis de NO exalado a meio do ciclo menstrual, o que não se verificou no presente estudo.

Contudo, torna-se difícil estabelecer comparações pois, para além das características da amostra, estes estudos apresentam diversos problemas metodológicos: as fases do ciclo não foram aferidas através de doseamentos hormonais e não controlaram diversos factores que afectam a FE_{NO}, como, por exemplo, a dieta. Em alguns casos, a determinação da FE_{NO} foi efectuada após a realização de exame espirométrico e de teste de provocação com metacolina, facto que condiciona uma redução transitória dos níveis da FE_{NO}, de acordo com as recomendações da ATS/ERS.[2, 31, 32]

Apesar da variação da FE_{NO} observada ao longo do ciclo, em todas as fases os valores medidos neste estudo encontram-se dentro dos intervalos de referência para o sexo feminino[30, 69, 70] e são idênticos aos apresentados por Jilma e colaboradores.[9]

Outros estudos, apesar de controlarem as variações hormonais na urina, não observaram variações cíclicas do FE_{NO}.[8, 9] No entanto, estes estudos apresentam como limitação a ausência de controlo da dieta pobre em nitratos.

No nosso estudo, não se observaram diferenças significativas dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- ao longo do ciclo menstrual. Estes resultados corroboram os apresentados por Jilma e colaboradores.[9] A equipa de Morris[8] obteve os mesmos resultados para a quantificação dos níveis de NO/NO_3^- na urina. No entanto, alguns autores referem um aumento significativo dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- na fase folicular, devido à activação da ecNOS, mediada pelo estradiol.[54-56, 61]

Pehlivanoğlu e colaboradores[57] reportaram um aumento significativo dos níveis plasmáticos e urinários de NO/NO_3^- na fase luteínica, resultados, também, verificados pela equipa de Teran.[58] O nosso trabalho, apesar de não apresentar significado estatístico, vem de encontro a estes resultados, pois constatamos um ligeiro aumento dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- na fase secretora.

Em oposição, alguns autores referem uma redução significativa dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- na fase luteínica, relacionando-se com o aumento dos níveis de progesterona.[53]

Contudo, alertamos que a maioria dos trabalhos referidos apresenta como limitação o controlo da dieta. No nosso trabalho, apesar deste controlo ter sido mais rigoroso, os dados poderiam apresentar ligeiras modificações se a medição dos metabolitos do NO no plasma fosse efectuada após uma dieta pobre em nitratos de pelo menos quatro dias, conforme o preconizado por Wang e colaboradores.[43]

Todavia, dado o objectivo geral do presente estudo, optamos pelo jejum no dia da avaliação e pelo controlo da dieta apenas nas 24 horas que a antecediam, já que os níveis de NO no ar exalado retornam a valores basais, cerca de 20 horas após uma refeição rica em nitratos[34] e os níveis de NO_2^-/NO_3^- diminuem significativamente após uma dieta pobre em nitratos no dia anterior à sua avaliação.[44, 45]

No nosso estudo procuramos analisar a relação entre os níveis de FE_{NO} e níveis plasmáticos de NO/NO_3^-, obtidos nas quatro medições ao longo do ciclo e observamos uma associação positiva apenas na ovulação, podendo estar relacionado com o aumento dos níveis de estrogénio e consequentemente com o aumento da actividade da eNOS.[60, 61]

Os doseamentos hormonais, de estradiol e progesterona, permitiram-nos aferir a fase do ciclo medido. Apesar de todas as participantes referirem ter ciclos regulares, observamos que em 55% das participantes o ciclo medido foi irregular. Tal facto poderá dever-se ao stresse condicionado pela época de exames académicos, altura em que grande parte das participantes foram avaliadas, isto porque o hipotálamo regula tanto as hormonas sexuais como a reacção ao stresse, podendo este último, em situações de grande tensão, determinar ciclos irregulares e anovulatórios.[46]

Neste estudo, na fase menstrual, observamos níveis baixos de ambas as hormonas que condicionam a degeneração do endométrio e, consequentemente, a menstruação. Na fase proliferativa, verificamos um ligeiro aumento dos níveis de estrogénio, devido ao desenvolvimento folicular, regulando o crescimento e maturação do endométrio. Na terceira medição, observa-se um pico dos níveis de estradiol e um ligeiro aumento da progesterona, levando à ovulação. A passagem do folículo a corpo lúteo condiciona, para além da produção

de estradiol, a produção de progesterona. O aumento dos níveis de progesterona leva ao espessamento do endométrio, correspondendo à fase secretora.[46, 47]

Na fase menstrual, os níveis baixos de estradiol e progesterona determinam que o endométrio deixe de ser estimulado, diminuindo o fornecimento de nutrientes devido à contracção dos seus vasos sanguíneos. Pensamos que tal ocorrência poderá dever-se à diminuição da actividade da eNOS, podendo justificar valores mais baixos de NO na fase menstrual comparativamente com a fase secretora.

Neste trabalho, procuramos prever variações do NO em função dos níveis hormonais e verificamos que, para a nossa amostra, os níveis de estradiol e de progesterona não predizem alterações do NO. Contudo, o facto de na fase secretora termos observado um aumento significativo da FE_{NO} e um ligeiro aumento dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^-, poderá sugerir alguma relação com os níveis hormonais de progesterona que, em paralelo, com o aumento dos níveis de estradiol possam determinar o aumento da actividade da eNOS e por conseguinte um aumento da expressão de NO.

CAPÍTULO V - CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho vêm reforçar a fiabilidade da determinação da FE_{NO}, pela sua reprodutibilidade em qualquer fase do ciclo menstrual, pois, apesar de se ter verificado uma interessante variação da FE_{NO} ao longo do ciclo menstrual em mulheres saudáveis, observando-se um aumento significativo na fase secretora comparativamente com as fases menstrual e proliferativa, os valores da FE_{NO} mantêm-se dentro do intervalo de referência, sugerindo a ausência de inflamação eosinofílica.

Com este trabalho, não observamos variações significativas dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- ao longo do ciclo menstrual, no entanto, verificamos um ligeiro aumento destes na fase secretora.

Constatamos uma correlação positiva entre a FE_{NO} e os níveis plasmáticos de NO/NO_3^- durante a ovulação.

Verificamos, ainda, que os níveis hormonais de estradiol e progesterona não são preditores do valor da FE_{NO}, nem dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^-, para a nossa amostra.

Uma das limitações do nosso estudo é o tamanho da amostra, pelo que se justifica a necessidade de continuar esta investigação com um número significativo de sujeitos, em que se avalie vários ciclos menstruais consecutivos e se estabeleça um plano de dieta pobre em nitratos de pelo menos quatro dias, factor importante para a determinação dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^-. Futuros estudos poderão realizar maior número de avaliações em cada ciclo e um doseamento mais exaustivo das variações hormonais, podendo dosear os níveis da FSH e LH, com o intuito de estabelecer relações mais estreitas entre as variações cíclicas hormonais e as variações da produção de NO, com vista a corroborar ou infirmar os dados aqui obtidos.

Referências Bibliográficas

1. Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. The European Respiratory Society Task Force. Eur Respir J. 1997;10(7):1683-93. Epub 1997/07/01.

2. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171(8):912-30.

3. Melgert BN, Ray A, Hylkema MN, Timens W, Postma DS. Are there reasons why adult asthma is more common in females? Curr Allergy Asthma Rep. 2007;7(2):143-50. Epub 2007/04/18.

4. Schatz M, Camargo CA, Jr. The relationship of sex to asthma prevalence, health care utilization, and medications in a large managed care organization. Ann Allergy Asthma Immunol. 2003;91(6):553-8.

5. Vrieze A, Postma DS, Kerstjens HA. Perimenstrual asthma: a syndrome without known cause or cure. J Allergy Clin Immunol. 2003;112(2):271-82.

6. Salam MT, Wenten M, Gilliland FD. Endogenous and exogenous sex steroid hormones and asthma and wheeze in young women. J Allergy Clin Immunol. 2006;117(5):1001-7.

7. Forbes L. Do exogenous oestrogens and progesterone influence asthma? Thorax. 1999;54(3):265-7. Epub 1999/05/18.

8. Morris NH, Sooranna SR, Steer PJ, Warren JB. The effect of the menstrual cycle on exhaled nitric oxide and urinary nitrate concentration. Eur J Clin Invest. 1996;26(6):481-4. Epub 1996/06/01.

9. Jilma B, Kastner J, Mensik C, Vondrovec B, Hildebrandt J, Krejcy K, et al. Sex differences in concentrations of exhaled nitric oxide and plasma nitrate. Life Sci. 1996;58(6):469-76.

10. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980;288(5789):373-6. Epub 1980/11/27.

11. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 1987;327(6122):524-6. Epub 1987/06/11.

12. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. Biochem Biophys Res Commun. 1991;181(2):852-7.

13. Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. Eur Respir J. 1993;6(9):1368-70. Epub 1993/10/01.

14. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. Lancet. 1994;343(8890):133-5.

15. Persson MG, Zetterstrom O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. Lancet. 1994;343(8890):146-7.

16. Gustafsson LE. Exhaled nitric oxide as a marker in asthma. Eur Respir J Suppl. 1998;26:49S-52S. Epub 1998/05/20.

17. Massaro AF, Mehta S, Lilly CM, Kobzik L, Reilly JJ, Drazen JM. Elevated nitric oxide concentrations in isolated lower airway gas of asthmatic subjects. Am J Respir Crit Care Med. 1996;153(5):1510-4. Epub 1996/05/01.

18. Kharitonov SA, Chung KF, Evans D, O'Connor BJ, Barnes PJ. Increased exhaled nitric oxide in asthma is mainly derived from the lower respiratory tract. Am J Respir Crit Care Med. 1996;153(6 Pt 1):1773-80. Epub 1996/06/01.

19. Byrnes CA, Dinarevic S, Busst C, Bush A, Shinebourne EA. Is nitric oxide in exhaled air produced at airway or alveolar level? Eur Respir J. 1997;10(5):1021-5. Epub 1997/05/01.

20. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991;43(2):109-42. Epub 1991/06/01.

21. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem. 1994;269(19):13725-8. Epub 1994/05/13.

22. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. Nature. 1990;345(6273):346-7. Epub 1990/05/24.

23. Barnes PJ. Nitric Oxide. In: Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC, editors. Asthma: basic mechanisms and clinical management. Third ed: Academic press; 1998. p. 369-78.

24. Taylor DR, Pijnenburg MW, Smith AD, De Jongste JC. Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation. Thorax. 2006;61(9):817-27.

25. Kharitonov SA, Yates D, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections. Eur Respir J. 1995;8(2):295-7. Epub 1995/02/01.

26. Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA, Thomas PS, Barnes PJ. The effect of alcohol ingestion on exhaled nitric oxide. Eur Respir J. 1996;9(6):1130-3. Epub 1996/06/01.

27. Kharitonov SA, Yates DH, Chung KF, Barnes PJ. Changes in the dose of inhaled steroid affect exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. Eur Respir J. 1996;9(2):196-201. Epub 1996/02/01.

28. Meijer RJ, Kerstjens HA, Postma DS, Koeter GH, van der Mark TW. Exhaled nitric oxide concentration is influenced by alcohol containing disinfectants. Eur Respir J. 1996;9(5):1111. Epub 1996/05/01.

29. Buchvald F, Baraldi E, Carraro S, Gaston B, De Jongste J, Pijnenburg MW, et al. Measurements of exhaled nitric oxide in healthy subjects age 4 to 17 years. J Allergy Clin Immunol. 2005;115(6):1130-6.

30. Olivieri M, Talamini G, Corradi M, Perbellini L, Mutti A, Tantucci C, et al. Reference values for exhaled nitric oxide (reveno) study. Respir Res. 2006;7:94.

31. Deykin A, Halpern O, Massaro AF, Drazen JM, Israel E. Expired nitric oxide after bronchoprovocation and repeated spirometry in patients with asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1998;157(3 Pt 1):769-75. Epub 1998/03/28.

32. Gabriele C, Pijnenburg MW, Monti F, Hop W, Bakker ME, de Jongste JC. The effect of spirometry and exercise on exhaled nitric oxide in asthmatic children. Pediatr Allergy Immunol. 2005;16(3):243-7.

33. Gratziou C, Lignos M, Dassiou M, Roussos C. Influence of atopy on exhaled nitric oxide in patients with stable asthma and rhinitis. Eur Respir J. 1999;14(4):897-901. Epub 1999/11/26.

34. Vints AM, Oostveen E, Eeckhaut G, Smolders M, De Backer WA. Time-dependent effect of nitrate-rich meals on exhaled nitric oxide in healthy subjects. Chest. 2005;128(4):2465-70.

35. Jones AW, Fransson M, Maldonado-Holmertz E. Does consumption of ethanol distort measurements of exhaled nitric oxide? Respir Med. 2005;99(2):196-9. Epub 2005/02/18.

36. Byrnes CA, Dinarevic S, Busst CA, Shinebourne EA, Bush A. Effect of measurement conditions on measured levels of peak exhaled nitric oxide. Thorax. 1997;52(8):697-701. Epub 1997/08/01.

37. Bruce C, Yates DH, Thomas PS. Caffeine decreases exhaled nitric oxide. Thorax. 2002;57(4):361-3. Epub 2002/03/30.

38. Taylor ES, Smith AD, Cowan JO, Herbison GP, Taylor DR. Effect of caffeine ingestion on exhaled nitric oxide measurements in patients with asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2004;169(9):1019-21.

39. Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, Keatings V, Barnes PJ. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. Am J Respir Crit Care Med. 1995;152(2):609-12. Epub 1995/08/01.

40. Maniscalco M, Di Mauro V, Farinaro E, Carratu L, Sofia M. Transient decrease of exhaled nitric oxide after acute exposure to passive smoke in healthy subjects. Arch Environ Health. 2002;57(5):437-40. Epub 2003/03/19.

41. Malinovschi A, Janson C, Holmkvist T, Norback D, Merilainen P, Hogman M. Effect of smoking on exhaled nitric oxide and flow-independent nitric oxide exchange parameters. Eur Respir J. 2006;28(2):339-45.

42. Mata PL, Neuparth N, Carmo MM, Caires I, Maedo P, Rendas AB. How does nitrates in blood relate with exhaled nitric oxide in asthma? Eur Resp J. 1998;12 (suppl 28):127s.

43. Wang J, Brown MA, Tam SH, Chan MC, Whitworth JA. Effects of diet on measurement of nitric oxide metabolites. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1997;24(6):418-20. Epub 1997/06/01.

44. Heller J, Kristeleit H, Brensing KA, Woitas RP, Spengler U, Sauerbruch T. Nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis of the liver: influence of kidney function and fasting state. Scand J Gastroenterol. 1999;34(3):297-302. Epub 1999/05/08.

45. Tsikas D, Böger RH, Bode-Boger SM, Gutzki FM, Frolich JC. Quantification of nitrite and nitrate in human urine and plasma as pentafluorobenzyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry using their 15N-labelled analogs. J Chromatogr B Biomed Appl. 1994;661(2):185-91. Epub 1994/11/18.

46. Jones EE, DeCherney AH. The female reproductive system. In: Boron WF, Boulpaep EL, editors. Medical physiology. First ed: Elsevier saunders; 2004. p. 1141-65.

47. Slaunwhite WRJ. Reproduction – Regulation of menstrual cycles. Fundamentals of endocrinology: Marcel Dekker, inc.; 1988. p. 223-54.

48. O'Connor BJ. Premenstrual asthma: still poorly understood. Thorax. 1997;52(7):591-2. Epub 1997/07/01.

49. Oguzulgen IK, Turktas H, Erbas D. Airway inflammation in premenstrual asthma. J Asthma. 2002;39(6):517-22. Epub 2002/10/12.

50. Mandhane PJ, Hanna SE, Inman MD, Duncan JM, Greene JM, Hong-Yu W, et al. Changes in Exhaled Nitric Oxide Related to Estrogen and Progesterone During the Menstrual Cycle. CHEST. 2009;136(5):1301-7.

51. Kharitonov SA, Logan-Sinclair RB, Busset CM, Shinebourne EA. Peak expiratory nitric oxide differences in men and women: relation to the menstrual cycle. Br Heart J. 1994;72(3):243-5. Epub 1994/09/01.

52. Antczak A, Ciebiada M, Kharitonov SA, Gorski P, Barnes PJ. Inflammatory Markers: Exhaled Nitric Oxide and Carbon Monoxide During the Ovarian Cycle. Inflammation. 2011. Epub 2011/05/19.

53. Giusti M, Fazzuoli L, Cavallero D, Valenti S. Circulating nitric oxide changes throughout the menstrual cycle in healthy women and women affected by pathological hyperprolactinemia on dopamine agonist therapy. Gynecol Endocrinol. 2002;16(5):407-12. Epub 2003/02/18.

54. Rosselli M, Imthurm B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release. Biochem Biophys Res Commun. 1994;202(3):1543-52.

55. Ekerhovd E, Enskog A, Caidahl K, Klintland N, Nilsson L, Brannstrom M, et al. Plasma concentrations of nitrate during the menstrual cycle, ovarian stimulation and ovarian hyperstimulation syndrome. Hum Reprod. 2001;16(7):1334-9. Epub 2001/06/27.

56. Manau D, Balasch J, Jiménez W, Fábregues F, Casamitjana R, Creus M, et al. Adrenomedullin and nitric oxide in menstrual and in vitro fertilization cycles. Relationship to estradiol. Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica. 1999;78(7):626-31.

57. Pehlivanoğlu B, Balkanci ZD, Rıdvanağaoğlu AY, Durmazlar N, Öztürk G, Erbas D, et al. Impact of stress, gender and menstrual cycle on immune system: possible role of nitric oxide. Arch Physiol Biochem. 2001;109(4):383-7. Epub 2002/04/06.

58. Teran E, Escudero C, Vivero S. Physiological changes in platelet aggregation and nitric oxide levels during menstrual cycle in healthy women. Nitric Oxide. 2002;7(3):217.

59. Barnes PJ. Nitric oxide and airway disease. Ann Med. 1995;27(3):389-93. Epub 1995/06/01.

60. Kirsch EA, Yuhanna IS, Chen Z, German Z, Sherman TS, Shaul PW. Estrogen acutely stimulates endothelial nitric oxide synthase in H441 human airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 1999;20(4):658-66. Epub 1999/04/01.

61. Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, et al. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. Circ Res. 2000;87(8):677-82. Epub 2000/10/13.

62. Battaglia C, Nappi RE, Mancini F, Cianciosi A, Persico N, Busacchi P, et al. Menstrual Cycle-Related Morphometric and Vascular Modifications of the Clitoris. Journal of Sexual Medicine. 2008;5(12):2853-61.

63. Forte P, Kneale BJ, Milne E, Chowienczyk PJ, Johnston A, Benjamin N, et al. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. Hypertension. 1998;32(4):730-4. Epub 1998/10/17.

64. Cevik D, Unay O, Durmusoglu F, Yurdun T, Bilsel AS. Plasma markers of NO synthase activity in women after ovarian hyperstimulation: influence of estradiol on ADMA. Vasc Med. 2006;11(1):7-12. Epub 2006/05/04.

65. Williams MR, Westerman RA, Kingwell BA, Paige J, Blombery PA, Sudhir K, et al. Variations in endothelial function and arterial compliance during the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(11):5389-95. Epub 2001/11/10.

66. Sioutas A, Ehrén I, Gemzell-Danielsson K. Measurement of nitric oxide in the vagina. Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica. 2008;87(10):1055-9.

67. Mörlin B, Hammarström M. Nitric oxide increases endocervical secretion at the ovulatory phase in the female. Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica. 2005;84(9):883-6.

68. Braman RS, Hendrix SA. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. Anal Chem. 1989;61(24):2715-8. Epub 1989/12/15.

69. Olin AC, Bake B, Toren K. Fraction of exhaled nitric oxide at 50 mL/s: reference values for adult lifelong never-smokers. Chest. 2007;131(6):1852-6.

70. Olivieri M, Corradi M, Malerba M. Gender and exhaled nitric oxide. Chest. 2007;132(4):1410; author reply

ANEXOS

Anexo I - *Consentimento Informado*

Informação para o participante

No âmbito do Mestrado em Saúde e Aparelho Respiratório, estamos a desenvolver um estudo intitulado "*Influência do ciclo menstrual na fracção exalado do óxido nítrico*", que decorrerá no Departamento de Fisiopatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, para o qual solicitamos a sua colaboração.

Estudos epidemiológicos demonstram que a prevalência da asma antes da puberdade é mais frequente no sexo masculino, verificando-se o contrário durante a idade fértil na mulher.

Outros estudos referem que os níveis de estrogénio podem contribuir para o aumento da prevalência da asma no sexo feminino e que 30 a 40% das mulheres asmáticas sofrem agravamento da sintomatologia asmática na fase pré-menstrual – luteínica.

Alguns estudos sugerem que os contraceptivos orais têm um ligeiro efeito benéfico nos casos de asma pré-menstrual e de asma moderada, contudo em casos de asma mais grave, os contraceptivos orais podem potenciar a severidade da asma.

Segundo as últimas recomendações da ATS/ERS (2005), a relação entre os níveis da fracção exalada de óxido nítrico e as variações cíclicas hormonais na mulher não é consensual.

Sendo o óxido nítrico um marcador da inflamação brônquica, com elevada sensibilidade na detecção da perda de controlo sobre a doença asmática, pretendemos estudar como varia o óxido nítrico exalado ao longo das fases do ciclo menstrual numa população de mulheres saudáveis em idade fértil.

Com o intuito de atingirmos os nossos objectivos ser-lhe-á pedido que efectue quatro visitas de colheita de dados, respeitando um plano de visitas com base na periodicidade do seu ciclo, de modo a abranger todas as fases do ciclo menstrual.

Na visita de selecção, serão confirmados os critérios de participação e estabelecido o plano de visitas de estudo. Nesta visita, com o intuito de excluirmos a existência de atopia ser-lhe-á solicitada a colaboração no seguinte exame:

Testes cutâneos por *prick* (picada)

Trata-se de testes convencionais realizados no âmbito de uma consulta de alergologia. São testes simples, seguros, rápidos e precisos, podendo realizar-se desde o primeiro mês de vida, se indicados. Realizam-se na face anterior do antebraço, iniciam-se com a higiene local com algodão e álcool, seguindo-se a aplicação das gotas dos extractos alergénicos estandardizados. Após a aplicação do extracto este será introduzido na camada superficial da pele, mediante a picada com uma pequena lanceta de plástico descartável. Vinte minutos após a picada, será efectuada a interpretação dos testes. Se positivo, poderá surgir uma pápula vermelha no local da picada, que poderá provocar

algum desconforto, nomeadamente comichão, sensibilidade e inchaço. A pápula desaparece ao fim de aproximadamente 30 minutos, habitualmente sem qualquer lesão residual.

Durante estes testes é altamente improvável a ocorrência de reacções alérgicas graves, no entanto, muito raramente, poderá surgir sintomas como dificuldade respiratória, sensação de desmaio, queda da tensão arterial, perda de consciência. O tratamento destas reacções alérgicas pode incluir administração de medicamentos por via oral, intramuscular, endovenosa ou inalatória. Os testes cutâneos serão realizados sob vigilância de um médico imunoalergologista.

Nas quatro visitas de estudo ser-lhe-á solicitada a colaboração nos seguintes exames:

Determinação da Fracção Exalada de Óxido Nítrico

Trata-se de um exame indolor, não invasivo e de fácil execução, destinado a avaliar o grau de inflamação brônquica.

Durante este exame ser-lhe-á solicitado que através de uma peça bocal inspire ao máximo e expire lenta e prolongadamente, durante 6 a 10 segundos. Este procedimento é repetido até obtermos 2 ou 3 medições válidas.

A duração do exame é de cerca de 5 minutos.

Todo o material utilizado está devidamente esterilizado e a peça bocal é constituída por um filtro anti-bacteriano e viral descartável.

Como é um exame facilmente influenciável por diversos factores, solicitamos que respeite a preparação para o exame.

Colheita de Sangue

A colheita de sangue permitir-nos-á efectuar o doseamento hormonal e, deste modo, avaliar com precisão a fase do ciclo menstrual, bem como efectuar a quantificação dos níveis plasmáticos de óxido nítrico e nitratos para compreender como varia o óxido nítrico ao longo das fases do ciclo menstrual.

Este procedimento poderá causar dor de baixa intensidade e curta duração, podendo ocorrer sintomas gerais como palidez, sudorese, sensação de desmaio, perda da consciência. A formação de hematoma é a complicação mais comum da punção venosa. Embora muito raramente, poderá ocorrer punção acidental de uma artéria, lesão nervosa, múltiplas tentativas de punção para localização da veia, infecção no local da injecção da agulha.

As amostras de sangue serão destruídas imediatamente após serem analisadas.

Ao longo do estudo deverá respeitar um plano de preparação para os exames. Assim, *um dia antes* de cada visita de estudo deve fazer uma dieta pobre em nitratos (evitando produtos de salsicharia, *foie gras*, produtos à base de carne de conserva, toucinho fumado (bacon), queijos,

conservas e alguns legumes como espinafres, alface, brócolos, couve-flor, couve-chinesa, nabiças). Não deverá praticar qualquer esforço físico intenso pelo menos *uma hora antes* de cada visita. *No dia da visita* deverá estar em jejum absoluto.

Todos os procedimentos relacionados com este estudo não implicam quaisquer despesas para o participante.

A identidade de cada participante será mantida confidencial, o seu nome será apenas do conhecimento da investigadora responsável do estudo. A identificação no estudo será feita mediante atribuição de um código a cada participante, constituído pelas duas primeiras letras do primeiro nome, seguidas pelas duas primeiras letras do apelido e por um número sequencial. Todos os dados serão mantidos em sigilo, sendo apenas tratados através do referido código, sem qualquer menção ao nome do participante.

Os dados obtidos neste estudo serão registados e processados informaticamente, estando os documentos protegidos por um código apenas do conhecimento da investigadora responsável.

Os resultados deste estudo destinam-se à dissertação de mestrado, podendo ser publicados, em qualquer dos casos será sempre salvaguardada a confidencialidade da identidade dos participantes.

A sua participação neste estudo é completamente voluntária. Pode recusar participar no estudo ou retirar o seu consentimento em qualquer altura, sem qualquer desvantagem ou consequência. A sua participação poderá terminar no caso de engravidar, iniciar a utilização de anticonceptivos hormonais, de suplementos alimentares e/ou medicamentosos.

Pode colocar questões em qualquer altura do estudo. Caso necessite de algum esclarecimento ou informações adicionais, por favor contacte:

Investigadora responsável/mestranda: _____

Telefone(s): _____

Agradecemos desde já a sua colaboração

Consentimento Informado

Declaração para o investigador

Declaro que concordo voluntariamente participar no estudo "*Influência do ciclo menstrual na fracção exalado do óxido nítrico*". Foram-me explicados o objectivo e a natureza do estudo.

Foi-me entregue, li e compreendi a informação para o participante do consentimento informado. Fui esclarecido sobre todos os aspectos que considero importantes e todas as minhas perguntas relacionadas com o estudo foram respondidas.

Estou de acordo que as informações resultantes deste estudo sejam registadas e processadas por computador, sendo os documentos protegidos por um código do conhecimento exclusivo da investigadora responsável.

Concordo que os resultados deste estudo possam ser publicados, sendo a minha identidade mantida confidencial em todas as publicações.

Fui informado que tenho o direito de recusar participar no estudo e que a minha recusa em fazê-lo não terá consequências.

Compreendo que disponho de total liberdade para retirar o meu consentimento, em qualquer altura, sem precisar de dar qualquer justificação e sem que daí resultem quaisquer inconvenientes.

Confirmo que prestarei toda a colaboração possível e que informarei de imediato, a investigadora responsável, caso engravide, inicie a utilização de anticonceptivos hormonais, de suplementos alimentares e/ou medicamentosos, durante o presente estudo.

Data: ___/___/_____ Assinatura do participante

_____

Confirmo ter explicado, ao participante acima, a natureza e objectivo do estudo em que vai participar e ter respondido a todas as questões que me foram colocadas sobre o mesmo. Confirmo igualmente ter explicado os procedimentos e possíveis riscos do mesmo estudo.

Data: ___/___/_____ Assinatura da investigadora responsável / mestranda

_____

Anexo II – *Preparação Prévia aos Exames*

Para a determinação da fracção exalada de óxido nítrico e para a quantificação dos níveis plasmáticos de óxido nítrico e nitratos deve:

No dia do exame

- Jejum absoluto

Uma hora antes do exame

- Não fazer exercício vigoroso

Um dia antes do exame deve fazer uma dieta pobre em nitratos, evitando os seguintes alimentos:

- Foie gras
- Produtos de salsicharia
- Produtos à base de carne de conserva
- Toucinho fumado (bacon)
- Queijos
- Conservas
- Legumes com alto teor de nitratos:
    - Espinafres
    - Alface
    - Brócolos
    - Couve-flor
    - Couve-chinesa
    - Nabiças

Anexo III – *Caderno de Registo de Dados*

Visita de Selecção

Participante |__|__| |__|__| N.º |__|__| Data da visita de selecção: ___/___/____

2 primeiras letras do 1º nome 2 primeiras letras do apelido

Informação ao participante e consentimento informado		
- O participante foi informado oralmente e por escrito sobre a natureza e objectivos do estudo e assinou o consentimento para participação no estudo	❒ sim	❒ não ⇒ exclusão
Critérios de Inclusão		
- Sexo feminino	❒ sim	❒ não ⇒ exclusão
- Ciclo menstrual regular	❒ sim	❒ não ⇒ exclusão
- Idades entre 18 e 45 anos inclusive	❒ sim	❒ não ⇒ exclusão
Critérios de Exclusão		
- Gravidez	❒ não	❒ sim ⇒ exclusão
- Amamentação	❒ não	❒ sim ⇒ exclusão
- Utilização de métodos anticonceptivos hormonais (ex: contraceptivos orais combinados, contraceptivos orais progestativos, contraceptivos injectáveis, implantes subcutâneos, dispositivos intrauterinos com progestativo)	❒ não	❒ sim ⇒ exclusão
- Toma de suplementos alimentares e/ou medicamentosos (ex: suplemento vitamínico, alimentar, bio-estimulante, terapêutica de substituição hormonal, anti-histamínicos)	❒ não	❒ sim ⇒ exclusão
- Existência de alguma patologia que afecte a FE_{NO} (ex: asma, atopia, rinite alérgica, infecção do tracto respiratório superior, infecção viral do tracto respiratório inferior, alveolites fibrosantes, tuberculose pulmonar activa, sarcoidose pulmonar, rejeição de transplante pulmonar, esclerose sistémica com hipertensão pulmonar, fibrose quística, disquinésia ciliar primária, infecção por HIV, ARDS, bronquiectasias, DPOC)	❒ não	❒ sim ⇒ exclusão
- Tabagismo activo	❒ não	❒ sim ⇒ exclusão
- Alcoolismo	❒ não	❒ sim ⇒ exclusão

Dados Demográficos

Data de nascimento: ___/___/____

Altura: _____ cm

Peso: _____ kg

Pressão arterial - Sistólica: _____mmHg Diastólica: _____mmHg

Tabagismo: ❒ nunca

❒ actual ⇒ exclusão

❒ anterior – uMA (n.º de anos que fumou *n.º cigarros por dia/20):_____

Ciclo Menstrual

Idade da primeira menstruação _____ anos

Ciclos regulares _____ dias

Data da última menstruação ___/___/____

Plano de Visitas

- *Visita 1* – Fase menstrual (fase folicular) – entre 1º e 4º dia do ciclo;
- *Visita 2* – Fase proliferativa (fase folicular) – entre o 8º e 10º dia do ciclo;
- *Visita 3* – Ovulação – data calculada com base no número de dias do ciclo de cada participante de acordo com a fórmula (n.º de dias de ciclo-14=ovulação)

  Ciclo de 25 dias (ovulação - 11º dia do ciclo) – visita entre 10º e 12º dia do ciclo
  Ciclo de 26 dias (ovulação - 12º dia do ciclo) – visita entre 11º e 13º dia do ciclo
  Ciclo de 27 dias (ovulação - 13º dia do ciclo) – visita entre 12º e 14º dia do ciclo
  Ciclo de 28 dias (ovulação - 14º dia do ciclo) – visita entre 13º e 15º dia do ciclo
  Ciclo de 29 dias (ovulação - 15º dia do ciclo) – visita entre 14º e 16º dia do ciclo
  Ciclo de 30 dias (ovulação - 16º dia do ciclo) – visita entre 15º e 17º dia do ciclo
  Ciclo de 31 dias (ovulação - 17º dia do ciclo) – visita entre 16º e 18º dia do ciclo
  Ciclo de 32 dias (ovulação - 18º dia do ciclo) – visita entre 17º e 19º dia do ciclo
- *Visita 4* – Fase secretora (fase luteínica) – entre o 18º e o 25º dia do ciclo.

Visita 1 (V1) Data: ___/___/____ Hora: _____

Visita 2 (V2) Data: ___/___/____ Hora: _____

Visita 3 (V3) Data: ___/___/____ Hora: _____

Visita 4 (V4) Data: ___/___/____ Hora: _____

Testes Cutâneos

Despiste de atopia		Gramíneas	Parietária
Controlo +	Controlo -	Alternaria	Barata
Cão	Gato	Oliveira	Carvalho
Der. P	Der. f	Cipreste	Bétula

Visita 1 *– Fase Menstrual*

Participante |__|__| |__|__| N.º |__|__| Data V1: ___/___/____ Hora V1:_____

2 primeiras letras do 1º nome 2 primeiras letras do apelido

Verificação da preparação para o exame

No dia do exame

Jejum absoluto	❒ sim	❒ não

Uma hora antes do exame

Não fazer exercício vigoroso	❒ sim	❒ não

Um dia antes do exame deve evitar a ingestão de:

Foie gras	❒ sim	❒ não
Produtos de salsicharia	❒ sim	❒ não
Produtos à base de carne de conserva	❒ sim	❒ não
Toucinho fumado (bacon)	❒ sim	❒ não
Queijos	❒ sim	❒ não
Conservas	❒ sim	❒ não
Espinafres	❒ sim	❒ não
Alface	❒ sim	❒ não
Brócolos	❒ sim	❒ não
Couve-flor	❒ sim	❒ não
Couve-chinesa	❒ sim	❒ não
Nabiças	❒ sim	❒ não

Concentrações de $FE_{NO_{0.05}}$

_____ ppb

Doseamento Hormonal Data de análise: ___/___/____

E2: _____ pg/ml

Prog: _____ ng/ml

Quantificação dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- Data de análise: ___/___/____

_____ µM

Visita 2 *- Fase Proliferativa*

Participante |__|__| |__|__| N.º |__|__| Data V2: ___/___/____ Hora V2:_____

2 primeiras letras do 1º nome 2 primeiras letras do apelido

Verificação da preparação para o exame

No dia do exame

Jejum absoluto	❒ sim	❒ não

Uma hora antes do exame

Não fazer exercício vigoroso	❒ sim	❒ não

Um dia antes do exame deve evitar a ingestão de:

Foie gras	❒ sim	❒ não
Produtos de salsicharia	❒ sim	❒ não
Produtos à base de carne de conserva	❒ sim	❒ não
Toucinho fumado (bacon)	❒ sim	❒ não
Queijos	❒ sim	❒ não
Conservas	❒ sim	❒ não
Espinafres	❒ sim	❒ não
Alface	❒ sim	❒ não
Brócolos	❒ sim	❒ não
Couve-flor	❒ sim	❒ não
Couve-chinesa	❒ sim	❒ não
Nabiças	❒ sim	❒ não

Concentrações de $FE_{NO_{0.05}}$

_____ ppb

Doseamento Hormonal Data de análise: ___/___/____

E2: _____ pg/ml

Prog: _____ ng/ml

Quantificação dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- Data de análise: ___/___/____

_____ µM

Visita 3 *– Ovulação*

Participante |__|__| |__|__| N.º |__|__| Data V3: ___/___/____ Hora V3:_____

2 primeiras letras do 1º nome 2 primeiras letras do apelido

Verificação da preparação para o exame

No dia do exame

Jejum absoluto	❒ sim	❒ não

Uma hora antes do exame

Não fazer exercício vigoroso	❒ sim	❒ não

Um dia antes do exame deve evitar a ingestão de:

Foie gras	❒ sim	❒ não
Produtos de salsicharia	❒ sim	❒ não
Produtos à base de carne de conserva	❒ sim	❒ não
Toucinho fumado (bacon)	❒ sim	❒ não
Queijos	❒ sim	❒ não
Conservas	❒ sim	❒ não
Espinafres	❒ sim	❒ não
Alface	❒ sim	❒ não
Brócolos	❒ sim	❒ não
Couve-flor	❒ sim	❒ não
Couve-chinesa	❒ sim	❒ não
Nabiças	❒ sim	❒ não

Concentrações de $FE_{NO_{0.05}}$

_____ ppb

Doseamento Hormonal Data de análise: ___/___/____

E2: _____ pg/ml

Prog: _____ ng/ml

Quantificação dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- Data de análise: ___/___/____

_____ µM

Visita 4 *- Fase Secretora*

Participante |__|__| |__|__| N.º |__|__| Data V4: ___/___/____ Hora V4:_____

2 primeiras letras do 1º nome 2 primeiras letras do apelido

Verificação da preparação para o exame

No dia do exame

Jejum absoluto	❒ sim	❒ não

Uma hora antes do exame

Não fazer exercício vigoroso	❒ sim	❒ não

Um dia antes do exame deve evitar a ingestão de:

Foie gras	❒ sim	❒ não
Produtos de salsicharia	❒ sim	❒ não
Produtos à base de carne de conserva	❒ sim	❒ não
Toucinho fumado (bacon)	❒ sim	❒ não
Queijos	❒ sim	❒ não
Conservas	❒ sim	❒ não
Espinafres	❒ sim	❒ não
Alface	❒ sim	❒ não
Brócolos	❒ sim	❒ não
Couve-flor	❒ sim	❒ não
Couve-chinesa	❒ sim	❒ não
Nabiças	❒ sim	❒ não

Concentrações de $FE_{NO_{0.05}}$

_____ ppb

Doseamento Hormonal Data de análise: ___/___/____

E2: _____ pg/ml

Prog: _____ ng/ml

Quantificação dos níveis plasmáticos de NO/NO_3^- Data de análise: ___/___/____

_____ µM