

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO EM LEUCÓCITOS DE PACIENTES COM
DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA NO ESTADO
DO ESPÍRITO SANTO**

CARLA CRISTIANA DE CASTRO BULIAN

VILA VELHA, ES
NOVEMBRO/ 2014

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO EM LEUCÓCITOS DE PACIENTES COM
DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA NO ESTADO
DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências Farmacêuticas,
para obtenção do grau de Mestra em
Ciências Farmacêuticas.

CARLA CRISTIANA DE CASTRO BULIAN

VILA VELHA, ES
NOVEMBRO/ 2014

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

B933e Bulian, Carla Cristiana de Castro.
Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio em leucócitos de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica no Estado do Espírito Santo / Carla Cristiana de Castro Bulian. – 2014.
51 f. : il.

Orientadora: Bianca Prandi Campagnaro.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Vila Velha, 2014.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Estresse oxidativo.
3. Doença pulmonar (especialidade). I. Campagnaro, Bianca Prandi. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

CARLA CRISTIANA DE CASTRO BULIAN

**DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO EM LEUCÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA
PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA NO ESTADO DO
ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 20 de novembro de 2014,

Banca Examinadora:



Dra. Silvana dos Santos Meyrelles – (UFES)



Dr. Thiago de Melo Costa Pereira – (UVV)



**Dra. Bianca Prandi Campagnaro – (UVV)
Orientadora**

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Aparelho respiratório	8
Figura 2: Complexo citocromo-oxidase.	15
Figura 3: Efeitos sistêmicos e comorbidades da DPOC.	16
Figura 4: Câncer de pulmão e DPOC	18
Figura 5: Curva volume/fluxo e volume/tempo pulmonar	20
Figura 6: Níveis de $O_2\bullet$ em pacientes Controle, DPOC II, III, IV	31
Figura 7: Níveis de NO em pacientes Controle, DPOC II, III, IV	32
Figura 8: Níveis de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) em pacientes Controle, DPOC II, III, IV	33
Figura 9: Níveis de $OH\cdot$ e peroxinitrito em pacientes Controle, DPOC II, III e IV	34
Tabela 1. Características gerais da população total de pacientes estudados	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACh: agonistas acetilcolina
- a.u.: unidades arbitrárias
- CAT: teste de avaliação na DPOC
- CAT: catalase
- CI: corticoide inalatório
- CO: corticoide oral
- CPT: capacidade pulmonar total
- CRE: Centro Regional de Especialidades
- CVF: Capacidade Vital Forçada
- DAF-2T: triazol-fluoresceína
- DCF: diclorofluoresceína
- DHE: dihidroetídeo
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica
- DRC: doenças respiratórias crônicas
- EBC: condensado exalado pulmonar
- EGFR: fator de crescimento epidérmico
- GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
- GPx: glutathiona peroxidase
- GSH: glutathiona
- H₂O₂: peróxido de hidrogênio

- HDAC: histona deacetilase
- HPF: hidroxifenilfluoresceína
- IMC: índice de massa corporal
- iNOS: enzima óxido nítrico sintase induzida
- IL1-b: interleucina 1-b
- IL6: interleucina 6
- IL8: interleucina 8
- ISAAS: International Study of Asthma and Allergies in Childhood
- LABA: beta 2 agonista de longa duração
- LAMA: antagonistas muscarínicos de longa ação
- LB: linfócito B
- LT: linfócito T
- LTCD4: linfócito T CD4
- LTCD8: linfócito T CD8
- M3: receptores muscarínicos
- MDA: malondialdeído
- MFI: mediana da intensidade de fluorescência
- ml: mililitros
- MMP: metaloproteínas de matriz
- µg: microgramas
- NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato de hidrogênio-oxidase
- NE: elastase dos neutrófilos

- NF-1B: fator nuclear 1B
- NO: óxido nítrico
- NO₂: dióxido de nitrogênio
- O₂^{•-}: ânion superóxido
- OH: radical hidroxila
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- PCR: proteína C reativa
- ROS: espécies reativas de oxigênio
- RNS: espécies reativas de nitrogênio
- SA: amiloide sérica A
- SABA: β₂ agonista de curta duração
- SOD: superóxido dismutase
- SUS: sistema único de saúde
- TEAC: capacidade antioxidante TROLOX equivalente
- TGF-β: fator transformador de crescimento β
- TNF: fator de necrose tumoral
- TNF α: fator de necrose tumoral alfa
- TROLOX: análogo a vitamina E
- VEF1: volume expiratório forçado no primeiro segundo
- VEGF: fator de crescimento vascular endotelial
- VR: volume residual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	FISIOLOGIA DO APRELHO RESPIRATÓRIO.....	8
1.2	EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS CRÔNICAS.....	8
1.3	DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA.....	10
1.3.1	Definição	10
1.3.2	Fatores de risco	11
1.3.3	Fisiopatologia	11
1.3.3.1	Alterações celulares.....	11
1.3.3.2	Estresse oxidativo.....	13
1.3.3.3	Alterações sistêmicas.....	15
1.3.4	Diagnóstico	18
1.3.5	Tratamento	20
2	JUSTIFICATIVA	21
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL.....	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	METODOLOGIA	22
4.1	POPULAÇÃO ESTUDADA.....	22
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	23
4.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	23
4.4	AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO.....	24

4.5 DETERMINAÇÃO DE VEF1 E DA CVF POR ESPIROMETRIA.....	24
4.6 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO POR CITOMETRIA DE FLUXO	24
4.6.1 Determinação dos níveis citoplasmáticos de ânion superóxido....	25
4.6.2 Determinação dos níveis citoplasmáticos de peróxido de hidrogênio	
4.6.3 Determinação dos níveis citoplasmáticos de óxido nítrico.....	26
4.6.4 Determinação dos níveis citoplasmáticos de ânion peroxinitrito e radical hidroxila.....	26
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5 RESULTADOS.....	27
5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	27
5.1.1 Dados demográficos e relacionados ao tabagismo.....	28
5.1.2 Dados espirométricos.....	28
5.2 PRODUÇÃO CITOPLASMÁTICA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	30
5.2.1 Ânion superóxido.....	30
5.2.2 Óxido nítrico.....	31
5.2.3 Peróxido de hidrogênio.....	32
5.2.4 Radical hidroxila e peroxinitrito.....	33
6 DISCUSSÃO.....	33
7 CONCLUSÃO.....	44
8 REFERÊNCIAS.....	44
9 ANEXOS	

RESUMO

CASTRO BULIAN, Carla Cristiana de, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, novembro de 2014. **Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio em Leucócitos de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica no Estado do Espírito Santo.** Orientadora: Bianca Prandi Campagnaro.

As espécies reativas de oxigênio são produzidas por uma fonte endógena (mitocôndrias), de forma contínua e fisiológica. Sua produção pode ser aumentada, a partir de estímulos exógenos, desequilibrando os mecanismos de defesa antioxidante do organismo, levando a um estresse oxidativo que estimula a liberação de mediadores inflamatórios lesando as células. Na doença pulmonar obstrutiva crônica, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio em excesso, levando a uma resposta inflamatória anormal devido à inalação de partículas ou gases tóxicos, principalmente o tabaco, que culmina na obstrução progressiva das vias aéreas, resultando na limitação ao fluxo aéreo, necessitando do uso de medicações inalatórias para tratamento. Nestes pacientes, tem sido feito estudos para medir as espécies reativas de oxigênio principalmente através da marcação de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio exalados, e a identificação de enzimas antioxidantes no plasma, escarro, e lavado broncoalveolar. Por isso, este trabalho tem como objetivo, a avaliação da produção das espécies reativas de oxigênio pelos leucócitos dos pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica, que fazem uso de medicações inalatórias, principalmente corticoide inalatório, através da citometria de fluxo. Foram selecionados e contatados por telefone 45 pacientes ex tabagistas, com idade variando de 45 a 80 anos, após realizarem espirometria foram divididos em 11 pacientes do grupo Controle, sem uso de medicações inalatórias. 8 pacientes do grupo DPOC II, em uso de Formoterol. 12 pacientes do grupo DPOC III, em uso de Formoterol e Brometo de Tiotrópio e 14 pacientes do grupo DPOC IV, em uso de Salmeterol + Fluticasona e Brometo de Tiotrópio. Após assinarem um termo de consentimento livre e esclarecido, foram coletadas 5 ml de sangue e levados para o Laboratório de Fisiologia Translacional da Universidade Federal do Espírito Santo. Para análise do estresse oxidativo,). Para análise do estresse oxidativo 10^6 células foram diluídas em solução salina de fosfato tamponada e incubadas com $160\mu\text{M}$ de DHE e 20mM de DCFH-DA,

por 30 minutos, 2 μ M DAF-2DA, por 180 minutos, 5 μ M HPF, por 15 minutos , todos a 37°C no escuro e, depois lavadas e ressuspendidas em 0,5ml de PBS-iFBS. Em cada experimento foi avaliado 10000 células. Os dados estão expressos como média \pm EPM e a análise estatística usada foi ANOVA de uma via, seguida pelo *post hoc* de Tuckey. A análise mostrou que nos pacientes dos grupos DPOCII, DPOCIII e DPOCIV, houve uma maior produção de ânions superóxido quando comparados ao grupo Controle (Controle: 3218 \pm 1,88; DPOC II: 5156 \pm 242; DPOC III: 6470 \pm 241; DPOC IV: 5223 \pm 151, a.u). A produção de óxido nítrico foi menor no grupo DPOC IV (1889 \pm 70, a.u), em comparação com todos os outros grupos. A produção de peróxido de hidrogênio foi menor no grupo DPOC IV (4825 \pm 233, a.u), em comparação com o grupo DPOC III (6524 \pm 691,a.u), porém foi maior que o grupo Controle (3034 \pm 98, a.u). A produção de radical hidroxila e peroxinitrito do grupo DPOC IV (1384 \pm 57, a.u) apresentaram menor produção em comparação com os do grupo DPOC III (2289 \pm 43, a.u), sendo que esta diminuição se mostrou quase igual a do grupo DPOC II (1315 \pm 43, a.u), porém maior que a do grupo Controle (771 \pm 20, a.u). Nossos resultados sugerem que portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica apresentam um aumento das espécies reativas de oxigênio quando comparados com o grupo controle e que pacientes do grupo DPOC IV apresentam uma diminuição desta produção em comparação com o grupo DPOC III, que pode ser explicada pelo uso de corticoide inalatório e que o uso da citometria de fluxo para avaliação de espécies reativas de oxigênio em pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica pode auxiliar o monitoramento da doença.

Palavras-chave: DPOC, estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio, citometria de fluxo.

ABSTRACT

CASTRO BULIAN, Carla Cristiana de, M.Sc, University of Vila Velha – ES, november de 2014. Determination of reactive oxygen species levels in leukocytes of Chronic Obstructive Pulmonary Disease patients from Espirito Santo. Advisor: Bianca Prandi Campagnaro.

Reactive oxygen species (ROS) are produced continuously and physiologically. However, this production can be increased from exogenous stimuli leading to oxidative stress which increases the release of inflammatory mediators injuring the cells. In chronic obstructive pulmonary disease (COPD), the inhale of toxic gases, mainly tobacco, increases the production of ROS leading to an exacerbated inflammatory response which culminates in progressive airflow limitation, requiring the use of inhaled drugs for airway clearance. Although many studies have shown increased ROS production in patients with COPD, little is known about the effects of COPD and its available treatments on systemic ROS production. Therefore, the aim of this study was to evaluate the production of ROS in leukocytes of patients with COPD, in treatment with inhaled medications, especially corticosteroids, by flow cytometry. So, 45 former smokers, aged 45-80 years, were contacted by telephone and, after performing spirometry, divided into 4 groups: patients without inhaled medications treatment (Control, N=11), patients using Formoterol (COPD II, N = 8), patients using Formoterol and Tiotropium Bromide (COPD III, N = 12) and patients using Salmeterol + Tiotropium Bromide and Fluticasone (COPD IV, N=14). After signing the free and informed consent form (Appendix) 5mL of peripheral blood were collected. Oxidative stress was determined by superoxide anion, nitric oxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical and nitric peroxide production using the probes DHE, DAF, DCFH-DA and HPF, respectively. 10^6 cells were diluted with 1mL PBS and incubated with 160 μ M DHE and 20mM DCFHDA for 30 min, 2 μ M DAF-2DA, for 180 minutes and 5 μ M HPF, for 15 minutes, all at 37°C in the dark. Then the cells were washed and resuspended in 0.5ml of PBS-iFBS. In each measurement, 10000 events were analyzed. Data were acquired and analyzed using the BD FACSDiva and FCS Express softwares. Data are means \pm SEM. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Tuckey *post hoc*. Flow cytometric analysis showed that patients of DPOC II, DPOC III and DPOC IV

groups, showed a greater production of superoxide anion compared to the control group (Control: 1.88 ± 3218 , COPD II: 5156 ± 242 ; COPD III: 6470 ± 241 ; COPD IV: 5223 ± 151 , a.u.). Among the experimental groups, the COPD III showed higher production of superoxide anion. However, among the COPD II and IV groups the superoxide anion production was different. The production of nitric oxide in the COPD IV group (1889 ± 70 au) was lower compared to the other groups (Control: 3740 ± 221 ; COPD II: 2948 ± 150 ; COPD III: 2734 ± 90 , au). The production of hydrogen peroxide in groups COPD II (4607 ± 271 , au) and COPD IV (4825 ± 233 au) was lower compared to the COPD III group (6524 ± 691 , au), but was higher than in Control group (3034 ± 98 au). The production of hydroxyl radical and peroxynitrite anion in COPD IV group (1384 ± 57 au) was lower compared to the COPD III group (2289 ± 43 au), this reduction was similar to the COPD II group (1315 ± 43 au), but higher than the Control group (771 ± 20 au). Our results demonstrate that patients with COPD present an increase of ROS and patients of COPD IV group showed a decreased production compared to the COPD III group, probably due to the use of inhaled corticosteroids. Furthermore, the use of flow cytometry to evaluate the systemic ROS production in COPD patients can be used to monitor the progression of the disease, as well as the therapeutic effect of the different drugs available for treatment.

Keywords: Chronic obstructive pulmonar disease. Reactive oxygen species. Inhaled corticosteroids. Flow cytometry.

1. INTRODUÇÃO

1.1. FISILOGIA DO APARELHO RESPIRATÓRIO

O aparelho respiratório é composto por vias aéreas superiores (cavidades nasais, faringe, laringe) e vias aéreas inferiores (traquéia, brônquios, bronquíolos e alvéolos). Os brônquios, bronquíolos e alvéolos formam os pulmões. Esse se localiza na caixa torácica, envolto pela pleura parietal e visceral.

Cada um dos componentes do sistema respiratório tem suas funções. A cavidade nasal filtra, aquece e umedece o ar inalado, que passa pela faringe, laringe, traquéia, brônquios, bronquíolos e alvéolos. Nos alvéolos que possuem paredes finas e nelas, uma grande quantidade de vasos sanguíneos, permite as trocas gasosas conhecida como hematose, fazendo com que o oxigênio inspirado na atmosfera vá para o interior dos capilares e o gás carbônico do interior dos alvéolos seja expirado do organismo. Qualquer alteração na fisiologia do aparelho respiratório pode resultar em doenças agudas ou crônicas que terão um impacto negativo no organismo.

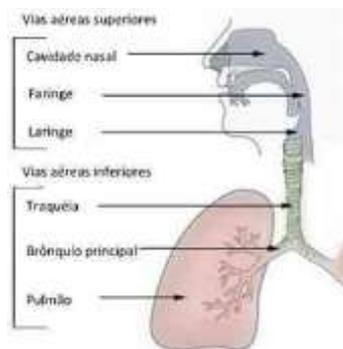


Figura1. Aparelho respiratório

1.2.EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS CRÔNICAS

As Doenças respiratórias crônicas (DRC) são aquelas que acometem as vias aéreas superiores e inferiores, sendo as mais comuns: asma, rinite alérgica e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e representam um dos maiores problemas de saúde no mundo, acometendo milhares de pessoas de todas as

idades e afetando a qualidade de vida, ocasionando grande impacto sócio econômico negativo. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2005, aproximadamente quatro milhões de pessoas morreram em decorrência de DRC (1). No estado do Espírito Santo, um estudo realizado entre 2005 e 2009, identificou as DRC como a oitava causa de internação no Sistema Único de Saúde (SUS), acometendo igualmente homens e mulheres, evidenciando uma maior frequência em idosos e crianças de zero a quatro anos (2).

Dentre as DRC, a rinite é considerada a de maior prevalência, apresentando uma incidência de 20 a 25% na população mundial, afeta a vida social, sono, escola, trabalho e pode causar doença grave e incapacitante (3). Dados do *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*, apontam que a prevalência média dos sintomas de rinite na população brasileira é de 29% entre adolescentes e 25,7% entre escolares, estando o Brasil entre os países com uma das maiores incidências da doença (1).

A asma, outra DRC, ocupa posição de destaque no Brasil, sendo responsável por 273 mil internações e 2500 óbitos por ano (1). A combinação de altas taxas de prevalência e falta de acesso para uma prevenção secundária eficaz através de medicações distribuídas no sistema público de saúde, resulta em alta morbidade e custo para as famílias e para o sistema de saúde (4).

Segundo a OMS, 210 milhões de pessoas foram afetadas no mundo pela DPOC em 2009, representando a sexta causa de morte, podendo se tornar a terceira em 2020 (5). É estimado que 10% da população mundial com idade superior a 40 anos, possa ser portadora de DPOC, impactando a qualidade de vida e sobrecarregando o sistema de saúde (5). No Brasil, a doença ainda é subdiagnosticada, e estimativa-se que existam 7,5 milhões de pessoas portadoras de DPOC (6). Entre os anos de 2000 e 2005, foi a causa de morte de mais de 33.000 pessoas a cada ano (1), sendo responsável por 170 mil admissões no SUS, com custo estimado por paciente/ano de US\$ 1.522,00 (1). No estado do Espírito Santo, não é diferente, no ano de 2007, a DPOC representou a sexta causa de internação (7).

O principal fator de risco para a DPOC é o tabagismo, que no ano de 2008, acometia mais de 1 bilhão de pessoas no mundo, com expectativa de duplicar até 2030 (8). No Brasil, neste mesmo ano, haviam 24,6 milhões de fumantes na população adulta, sendo que o número de homens era quase duas vezes maior em relação ao número de mulheres, em idade variando entre 45-64 anos (9). A maior prevalência de tabagismo no país foi observada na região Sul, onde 19% da população nesta faixa etária era fumante, enquanto que as regiões Centro-Oeste e Sudeste apresentaram menor prevalência de tabagistas nesta faixa etária (16,9%) (9,10). Desta forma, o tabagismo é considerado um entre os dez maiores contribuintes para a morte em todo o mundo (11), sendo responsável pelo aparecimento e/ou agravamento de doenças crônicas, como a DPOC

1.3. DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA

1.3.1. Definição

A DPOC é definida como uma doença inflamatória crônica, caracterizada pela persistente e, geralmente progressiva limitação ao fluxo aéreo associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas ou gases tóxicos, principalmente o tabaco (6,12). Além disso, relaciona-se a uma inflamação sistêmica, que pode contribuir ou agravar várias comorbidades (13), levando a um prejuízo da capacidade funcional e qualidade de vida do indivíduo (14).

A limitação ao fluxo aéreo é resultante de um remodelamento e estreitamento de pequenas vias aéreas, destruição do parênquima pulmonar, e das paredes alveolares (13), ocorrendo a perda dos seus anexos, diminuindo a elasticidade pulmonar e a capacidade das vias aéreas permanecerem abertas durante a expiração (15). O processo inflamatório pode produzir alterações em brônquios (bronquite crônica), bronquíolos (bronquiolite obstrutiva) e destruição do parênquima pulmonar caracterizando o enfisema pulmonar (16), definido como um aumento anormal e permanente dos espaços aéreos distais aos bronquíolos terminais, devido à destruição das paredes alveolares (17), e

bronquite crônica, como a presença de tosse produtiva diariamente por pelo menos três meses consecutivos, em dois anos (18,19).

1.3.2. Fatores de risco

A DPOC é uma doença de natureza multifatorial relacionada à associação de fatores genéticos e ambientais (18). Entre todos os fatores de risco, podemos destacar o tabagismo como sendo o principal fator para o desenvolvimento de DPOC. Porém, também se deve à poluição do ar, exposição ocupacional a poeiras orgânicas e inorgânicas, fumos (cachimbo, maconha, narguelê), inalação da fumaça de biomassa (madeira, fogão a lenha) (20), infecções pulmonares na infância e prematuridade (16).

O cigarro, seguido da queima de biomassa são as principais fontes de partículas inaladas (21). O cigarro possui mais de 4700 substâncias distribuídas em uma fase gasosa (nitrogênio, oxigênio, gás carbônico, monóxido de carbono, respectivamente em ordem decrescente, e em menor proporção de benzeno, amônia, tolueno) e outra fase particulada (composta por alcatrão, nicotina, colesterol, fenol, ácido fórmico, ácido acético, chumbo, e outros). A exposição a estas partículas, dependendo da composição, magnitude e duração, podem levar o indivíduo a apresentar perda da função pulmonar, aumento da hiperresponsividade brônquica, ou seja, aumento no estreitamento das vias aéreas devido à resposta aos estímulos broncoconstritores (22), doenças cardio e cerebrovasculares e principalmente a DPOC (21). Essas exposições produzem estresse oxidativo que geram espécies reativas de oxigênio (ROS), e como resultado, lesam as células do epitélio pulmonar através da liberação de mediadores vindos de uma resposta inflamatória (23).

1.3.3. Fisiopatologia

A inalação frequente de partículas de gases tóxicos, principalmente as derivadas da queima do tabaco, causam inflamação crônica, que leva a destruição parenquimatosa tecidual, rompimento do reparo normal e dos

mecanismos de defesa, ocorrendo mudanças nas vias aéreas, parênquima e vascularização pulmonar, causando aprisionamento aéreo e progressiva limitação do fluxo aéreo (16). Este conjunto de alterações aumentam a medida que a doença progride e conferem um componente irreversível. Os principais mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC são o estresse oxidativo e a inflamação.

A inflamação causada pela inalação de fumaça do cigarro, ou por inalação de partículas tóxicas, se deve a respostas tanto da imunidade inata como da adquirida. A imunidade inata caracteriza-se pela ação de diferentes tipos celulares, como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, mastócitos, células *natural killers* e células dendríticas, enquanto que na imunidade adquirida, as células envolvidas são linfócitos B e T (LB e LT) além de células estruturais, como as células do epitélio alveolar, endotélio e fibroblastos. É importante destacar que as células inflamatórias e epiteliais encontradas na superfície das vias aéreas liberam diversos fatores quimiotáticos além de produzirem ROS (13), responsáveis pelo estresse oxidativo exacerbado na DPOC

1.3.3.1. Alterações celulares

Células como neutrófilos, macrófagos, linfócitos, células epiteliais e dendríticas desempenham importante papel na inflamação da DPOC (9,24). Os macrófagos, cuja função é fagocitar partículas inaláveis e bactérias, estão localizados onde ocorre destruição da parede alveolar e parênquima pulmonar, e quando ativados, seu número aumenta em até dez vezes liberando mediadores inflamatórios e, conseqüentemente, grande quantidade de ROS (19,25,26). Entre os principais mediadores inflamatórios na DPOC, podemos destacar o fator de necrose tumoral (TNF) que tem sido associado à caquexia, atrofia muscular e fraqueza em pacientes com DPOC (25), e as interleucinas 6 e 8 (IL-6, IL-8), responsáveis pelo aumento das proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa (PCR) (25).

Os neutrófilos ativados, por sua vez, secretam serina, que são estimuladoras de muco, incluindo a elastase dos neutrófilos, proteinase-3 e

metaloproteínas de matriz (MMP-8, MMP-9), que contribuem para a destruição celular e dano tecidual (25). Quando em excesso, as elastases danificam a parede alveolar levando ao enfisema, e conseqüentemente a uma maior produção de ROS, observada principalmente nas exacerbações (27). Há uma correlação entre o número de neutrófilos circulantes, o declínio da função pulmonar e a severidade da DPOC com a hipersecreção mucosa (16).

Os LT aumentam no parênquima pulmonar e nas vias aéreas dos pacientes com DPOC, principalmente os do tipo CD8 em relação ao CD4, sendo que o direcionamento de células T para os pulmões depende de uma ativação inicial, como a inalação de substâncias estranhas, seguida de adesão e quimiotaxia seletivas (28). O LTCD8 tem a capacidade de causar citólise e apoptose de células do epitélio alveolar, levando a maior destruição alveolar e a severidade da obstrução do fluxo de ar (29).

As células dendríticas, localizadas próximo à superfície das vias aéreas e parênquima pulmonar, sinalizam a entrada de substâncias estranhas inaladas, ativando outras células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos, e imunitárias como LT e LB, desempenhando um papel importante na iniciação da resposta imune inata e adquirida (13).

As células epiteliais são importantes na defesa das vias aéreas, pois produzem muco, secretam anti-oxidantes, anti-proteases, mediadores inflamatórios e fatores de crescimento como o fator de crescimento transformador (TGF- β), que está envolvido no processo de remodelamento das pequenas vias aéreas e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que quando inibido leva a apoptose celular (30). Além disso, secretam defensinas e peptídeos catiônicos com efeito antimicrobiano participando da defesa inata e do processo de reparação dos tecidos (30).

As proteases, são enzimas que quebram as ligações internas de polipeptídeos liberadas pelas células inflamatórias que se encontram acumuladas nos tecidos periféricos dos pulmões devido ao tabagismo, que degradam ou danificam os componentes da matriz celular das paredes dos alvéolos, ductos alveolares e bronquíolos respiratórios (25). Em excesso, as

proteases contribuem para o alargamento do espaço aéreo, inflamação crônica do trato respiratório inferior e secreção de muco, amplificando a inflamação (31).

Todo este processo inflamatório persiste na DPOC mesmo após a cessação do tabagismo (31). O fumo e outros agentes nocivos comprometem a resposta imune inata e adquirida, aumentando a suscetibilidade a infecções (13) e, conseqüentemente, mais dano pulmonar. Além disso, é importante destacar que o processo inflamatório pode causar um aumento da proliferação celular, que quando observada nas células epiteliais, pode levar ao desenvolvimento de metaplasia escamosa, aumentando o risco de carcinoma de pulmão (30).

1.3.3.2. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando há uma produção excessiva de ROS, em relação aos mecanismos de defesa antioxidante do organismo (32), e é considerado o ponto chave na fisiopatologia da DPOC. Há uma ativação de genes inflamatórios, auto-imunidade, senescência celular, que levam ao envelhecimento acelerado, fagocitose defeituosa, aumento da inflamação e prejuízo no reparo celular (29).

As ROS, que incluem ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila ($\bullet OH$) (33), e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) que são óxido nítrico (NO), e peroxinitrito (34), são formadas de forma contínua e fisiológica, produzidas pelas mitocôndrias, cumprindo funções biológicas essenciais. A inalação de gases tóxicos, principalmente, os do cigarro constituem a principal fonte exógena de ROS na DPOC, visto que, em sua fase gasosa apresenta a liberação de milhares de radicais livres (35). Estas ROS se associam à produção endógena feita por macrófagos alveolares, eosinófilos, células epiteliais (35), levando ao estresse oxidativo característico da DPOC.

Os $O_2^{\bullet-}$, produzidos pela ação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato de hidrogênio (NADPH) oxidase são transformados em H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD) (29). O H_2O_2 é convertido em água pela catalase (CAT). $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 quando reagem com metais de transição como o ferro e o cobre, através da reação de Fenton, formam o $\bullet OH$ (radical

hidroxila), a mais reativa de todas as ROS. $O_2^{\bullet-}$ combinado com o NO geram peroxinitrito, outra ROS altamente reativa (15). A produção de NO na DPOC é feita pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que é expressa nos macrófagos do parênquima pulmonar (36). Peroxinitrito é um oxidante potente, que causa a peroxidação lipídica, gera danos ao DNA e ativa as metaloproteinases que degradam todos os componentes da matriz extracelular do parênquima pulmonar (37).

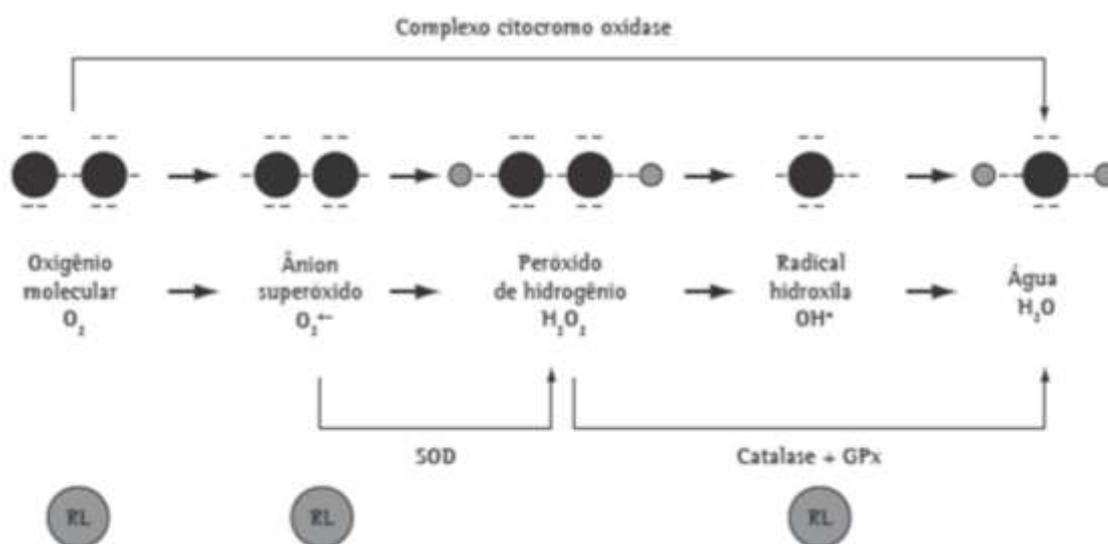


Figura 2: complexo citocromo oxidase. Fonte: Cavalcante AGM, et al.2009

A produção de oxidantes é equilibrada por vários mecanismos antioxidantes endógenos no trato respiratório humano. Os antioxidantes se dividem em enzimáticos, SOD, CAT, e glutaciona peroxidase (GPx), que constituem as principais vias relacionadas aos mecanismos antioxidantes das células (38) e as protegem dos danos oxidativos (31). E os não enzimáticos, como glutaciona, ascorbato, urato, bilirrubina e ácido lipóico (29,39). Os efeitos nocivos geram danos aos lipídios, proteínas e DNA, levando a um aumento global de células inflamatórias, hipersecreção mucosa, metaplasia escamosa epitelial, espessamento das paredes das vias aéreas, fibrose peribrônquica, exsudato infamatório luminal, destruição das paredes alveolares, apoptose de células epiteliais e endoteliais, dilatação e destruição dos bronquíolos

respiratórios, espessamento da camada íntima dos vasos no pulmão (38). Mesmo após a cessação do fumo, permanece a produção excessiva de ROS a partir das fontes endógenas, nas células epiteliais das vias respiratórias (40). Ocorrem estímulos inflamatórios contínuos formando um ciclo vicioso que culmina com a alteração dos brônquios, destruição do parênquima pulmonar, e consequente aparecimento dos sintomas clínicos (41) (Figura 1).

1.3.3.3. Alterações sistêmicas

Sendo uma doença complexa, a DPOC, que nos pulmões leva a obstrução do fluxo aéreo, pode também levar a alterações da função cardíaca e trocas gasosas, perda da massa muscular esquelética e caquexia, conferindo consequências sistêmicas, visto que se acredita ocorrer o extravasamento de mediadores inflamatórios na circulação (25), acarretando também, o início ou agravamento de doenças como isquemias cardíacas, insuficiência cardíaca, osteoporose, anemia normocítica, câncer de pulmão, depressão, diabetes.

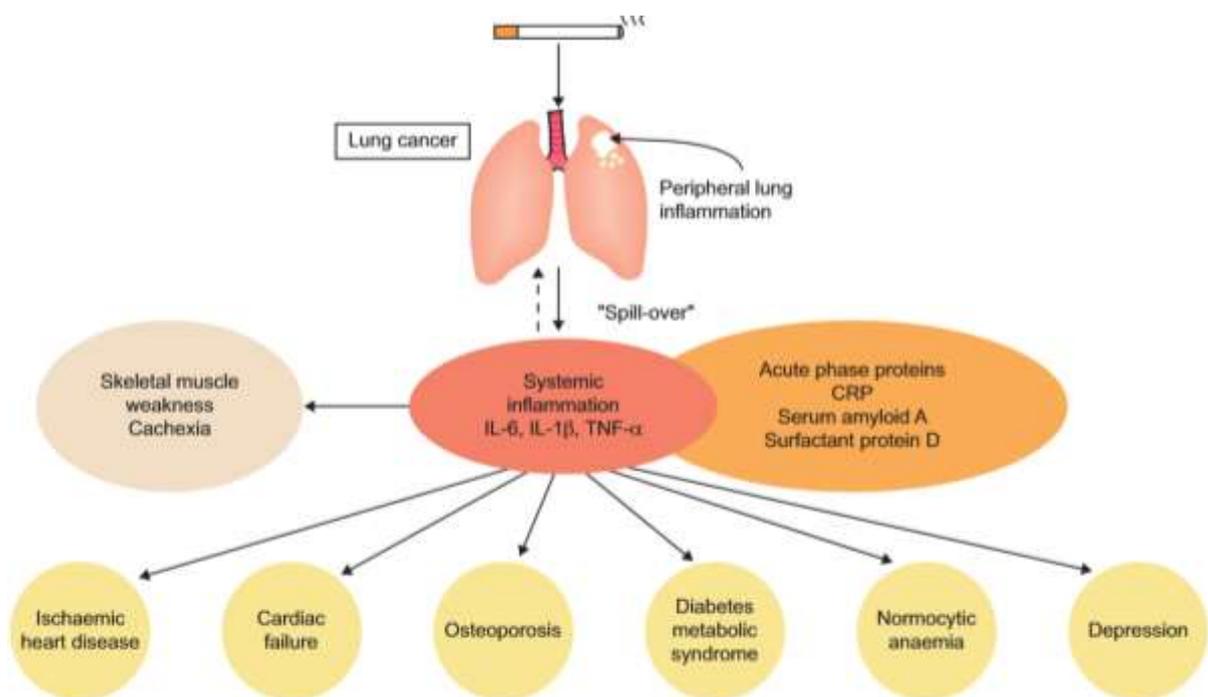


Figura 3: Inflamação causada pela inalação da fumaça do cigarro pode causar um extravasamento de citocinas (IL6, IL1-b, TNF), para a circulação sistêmica, levando a atrofia muscular, caquexia, iniciar ou piorar comorbidades e acelerar o câncer de pulmão. Modificado: Barnes PJ, et al., 2009

A fraqueza muscular esquelética, que precede a caquexia, é um dos efeitos sistêmicos da DPOC, e muitas vezes aparece acompanhada de perda de massa livre de gordura, estando associada à perda de força muscular, importante fator para determinar a capacidade de exercício em pacientes com DPOC e importante marcador de mortalidade (42). Em associação a estas alterações, ocorre aumento dos níveis plasmáticos de proteínas de fase aguda e outras citocinas inflamatórias, indicando inflamação sistêmica (42).

As doenças cardiovasculares agravadas pela DPOC, estão associadas a uma rigidez da parede arterial, e apresentam um prejuízo na vasodilatação, refletindo uma deficiência generalizada da função endotelial, alterando os mecanismos patológicos comuns levando a modificações no tecido conjuntivo, conferindo inflamação (42).

A anemia normocítica normocrômica, que pode ser evidenciada em pacientes com DPOC, apresenta uma elevada prevalência e é um fator contribuinte para a capacidade funcional reduzida e má qualidade de vida, pois sabe-se que o oxigênio depende diretamente do nível de hemoglobina que o transporta para a manutenção do metabolismo oxidativo nas células, podendo resultar em aumento da demanda ventilatória com conseqüente dispnéia (43).

Osteoporose está associada a vários fatores em pacientes com DPOC, como idade avançada, pouca mobilidade, tabagismo, má alimentação, altas doses de esteroides inalatórios e sistêmicos (44). Há evidências de aumento sérico de fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina 1 (IL1), implicados na fisiopatologia da osteoporose atuando como estimuladores dos osteoclastos que promovem absorção óssea (42).

Em pacientes com DPOC, o câncer de pulmão apresenta três vezes mais chance de se desenvolver, sendo provavelmente ligado ao aumento da inflamação e do estresse oxidativo, gerando um aumento das citocinas pró-

inflamatórias que promovem a angiogênese tumoral, que acelera o crescimento celular e metástases e da expressão dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) que promovem a proliferação epitelial (25) (Figura 3).

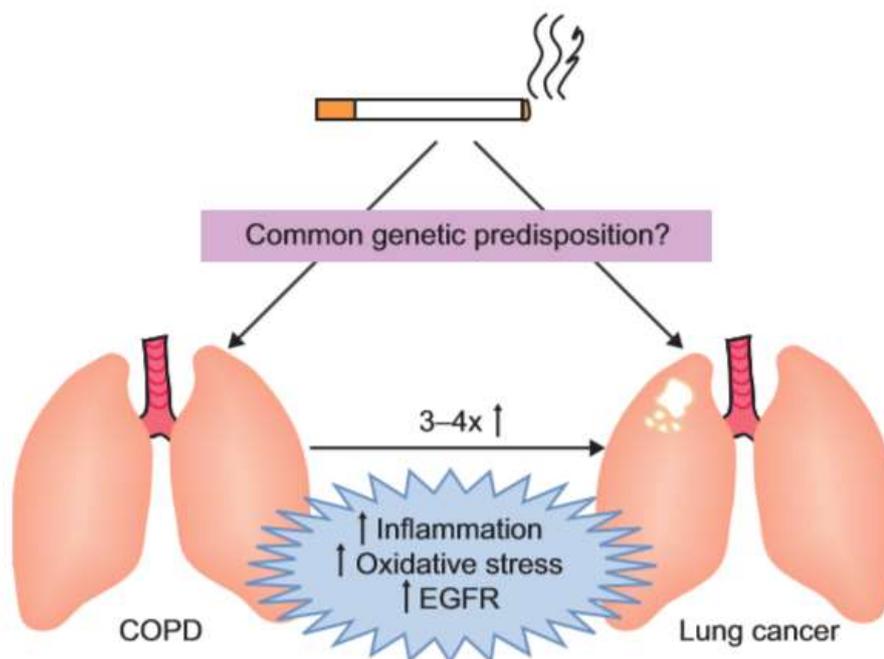


Figura 4. O aumento do câncer de pulmão na DPOC. Inflamação e aumento do estresse oxidativo na DPOC, pode aumentar o crescimento e surgimento de metástases do câncer de pulmão. Além disso, o aumento da expressão dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR), podem acelerar seu crescimento. Modificado: Barnes PJ, et al., 2009

A irritabilidade e falta de esperança, devido a sua deficiência física, fazem com que os portadores de DPOC fiquem frequentemente isolados e incapazes de realizar atividades diárias e sociais levando a depressão, porém os mecanismos são ainda desconhecidos, mas é certo que sejam de origem multifatorial, pois existem várias evidências de que a inflamação sistêmica e a interleucina 6 (IL-6) desempenham um papel importante (45) neste processo.

A prevalência da diabetes em portadores de DPOC está aumentada, explicada pelas citocinas pró inflamatórias, como TNF- α e IL-6, que induzem a resistência a insulina bloqueando a sinalização e aumentando o risco de diabetes tipo 2 (46).

1.3.4. Diagnóstico

A DPOC pode ser sugerida quando se faz a associação de indicadores como dispnéia progressiva e persistente que piora com o exercício, tosse crônica (com duração maior que oito semanas) que pode ser intermitente, não produtiva ou produtiva (41), história de exposição a fatores de risco como cigarro, queima de combustíveis fósseis (lenha, carvão), e história familiar (16). Sibilos e dor torácica não são sintomas específicos e variam entre os dias e exacerbações. O diagnóstico é firmado pela espirometria, porém exames adicionais são feitos e fazem parte do diagnóstico para avaliação e acompanhamento, como radiograma de tórax, avaliação de volumes pulmonares e capacidade de difusão que ajudam na avaliação da severidade da doença, oximetria de pulso para avaliar a saturação de oxigênio e indicação de oxigenioterapia domiciliar (47). Além disto, faz-se um questionário, o teste de avaliação da DPOC (CAT), que consiste em oito itens (tosse, secreção, aperto no peito, dispnéia ao exercício, limitação das atividades em casa, dormir bem e energia para realizar tarefas do dia-a-dia), com pontuação de 1 a 6, para avaliar o impacto da DPOC no estado de saúde (48).

O diagnóstico definitivo de DPOC é feito através da espirometria, um teste de função pulmonar que mede a limitação das vias aéreas (49). Estas são avaliadas como medidas de volumes pulmonares para cada indivíduo, comparando com valores de referência específicos para homens e mulheres de uma determinada população, idade, peso, altura e grupos étnicos (50). O indivíduo em um primeiro momento realiza as curvas definidas como volumes pulmonares iniciais, sendo interrompido o exame e administrado o uso de broncodilatador, em específico o salbutamol (broncodilatador de curta duração), para em seguida novas curvas serem feitas (51), completando o procedimento. Assim finalizado, são avaliados os principais volumes pulmonares que são o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) definido como o volume de ar forçado expirado no primeiro segundo, e capacidade vital forçada (CVF) que é o volume total de ar exalado após uma inspiração completa (50). Estes

resultados são expressos em gráficos de volume-tempo e fluxo-volume (Figura 4).

DPOC caracteriza-se por um declínio acentuado no VEF1 e a limitação do fluxo aéreo definida como a razão VEF1/CVF < 70% do previsto, sendo o normal $\geq 80\%$, e geralmente sem reversibilidade ao broncodilatador, sendo estes parâmetros, diagnóstico da DPOC (16). A gravidade da obstrução ao fluxo aéreo na DPOC é classificada com base no VEF1 pós broncodilatador, dividindo esta enfermidade em 4 estágios: estágio I - leve ($\text{VEF1} \geq 80\%$), estágio II – moderado ($50\% \leq \text{VEF1} < 80\%$ do previsto), estágio III – grave ($30 \leq \text{VEF1} < 50\%$ do previsto), estágio IV – muito grave ($\text{VEF1} < 30\%$ do previsto ou $\text{VEF1} < 50\%$ do previsto com insuficiência respiratória crônica) (16).

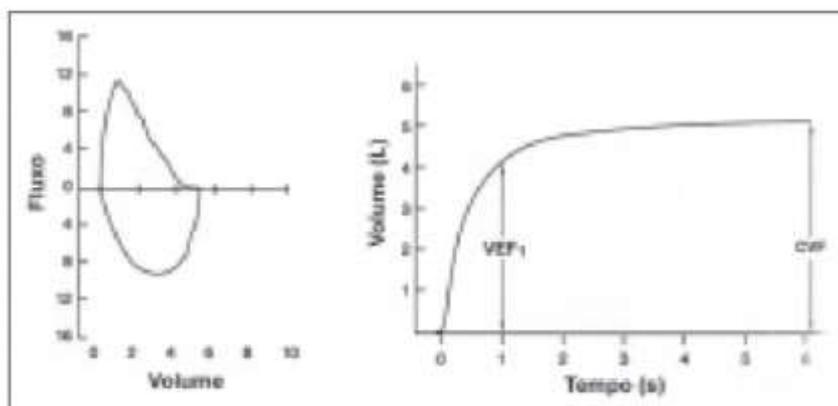


Figura 5. Curva fluxo/volume e tempo/volume. Fonte: J Pneumol, 2002

1.3.5. Tratamento

O tratamento na DPOC se baseia em uma diretriz internacional, o *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) e, de acordo com esta diretriz, são utilizados medicamentos inalatórios, cuja função é promover a melhoria dos sintomas, mas que não impedem o declínio da função pulmonar a longo prazo e não tratam o estresse oxidativo (16).

Os broncodilatadores são drogas de primeira linha no tratamento, sendo os tipos principais os receptores β 2-agonistas e os antagonistas dos receptores muscarínicos (M3) da acetilcolina (ACh) (16). Os receptores β 2-agonistas, se classificam como broncodilatadores de curta duração (SABAs), como o salbutamol, com duração de até quatro horas, e broncodilatadores de longa duração (LABAs), como o formoterol e salmeterol, com duração de até 12 horas (52). Eles estimulam os receptores beta-2 nos pulmões, relaxando a musculatura lisa das vias aéreas, promovendo o alívio efetivo dos sintomas, tolerância ao exercício, diminuindo a frequência de descompensações clínicas da DPOC (52), melhora dos volumes pulmonares e da qualidade de vida.

O outro broncodilatador, os anticolinérgicos, ipratrópio, um anticolinérgico de curta duração e os antagonistas dos receptores muscarínicos de longa duração (LAMAs), como o tiotrópio, que agem inibindo os receptores muscarínicos da musculatura lisa, provocando relaxamento nas vias aéreas causando um efeito broncodilatador, com efeito prolongado, e que apresenta eficácia comprovada pela melhoria da função pulmonar (53).

Os β 2-agonistas inalados além de ativar os receptores no músculo liso das vias aéreas, atuam no transporte mucociliar (52,53). Receptores β 2-agonistas são predominantemente dos músculos lisos dos brônquios e quando estimulados, levam à mudanças intracelular de cálcio e homeostase ocorrendo broncodilatação (52).

Os corticóides inalatórios (CI) são recomendados para o uso apenas quando ocorrem exacerbações repetidas e $VEF1 < 50\%$, pois não apresentam melhora no declínio da função pulmonar (54) em pacientes com baixos valores de $VEF1$, e em doses elevadas, aumentam o risco de pneumonia (55), não conseguem reduzir o componente inflamatório local (40). São geralmente associados ao LABA, e seu uso leva a redução da taxa de exacerbação e mortalidade na DPOC (16).

2. JUSTIFICATIVA

A DPOC é uma doença inflamatória crônica, que se caracteriza pela progressiva e persistente limitação ao fluxo aéreo associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas e gases tóxicos. A associação entre DPOC e estresse oxidativo, tem sido amplamente associada, uma vez que, o aumento da produção de ROS devido a soma da produção endógena e da carga de oxidantes do meio ambiente, ou da diminuição nas defesas antioxidantes apresentam papel central na patogênese desta doença.

Muitos estudos analisam os efeitos do excesso de ROS no pulmão de pacientes com DPOC, uma vez que se sabe que a produção exacerbada destas espécies reativas é tanto causa como consequência do desenvolvimento e/ou agravamento da doença, uma vez que leva à ativação de genes inflamatórios, resistência a corticóides e, conseqüentemente, redução da capacidade de resposta aos seus efeitos anti-inflamatórios. Além disso, é importante destacar que a DPOC tem sido associada ao surgimento ou agravamento de doenças cardíacas, diabetes, depressão e câncer de pulmão.

Portanto, atualmente, fazem-se necessários estudos capazes de determinar se o CI, utilizado no tratamento da DPOC, doença de grande incidência na população mundial, é capaz de diminuir o estresse oxidativo sistêmico e, conseqüentemente, os efeitos deletérios associados às comorbidades observadas na DPOC.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o nível de estresse oxidativo em pacientes com diferentes estágios de DPOC do Centro Regional de Especialidades do estado do Espírito Santo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o grau de obstrução ao fluxo aéreo de cada indivíduo, definir o diagnóstico da DPOC, e classificar seus estágios.

No sangue periférico dos pacientes avaliar por meio da citometria de fluxo, a produção citoplasmática de:

- ânion superóxido pela marcação com dihidroetídeo (DHE)
- peróxido de hidrogênio pela marcação com diclorofluoresceína (DFC)
- óxido nítrico pela marcação com triazolofluoresceína (DAF-2T)
- ânion peroxinitrito e radical hidroxila pela marcação com hidroxifenilfluoresceína (HPF)

4. METODOLOGIA

4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram selecionados 45 indivíduos ex-tabagistas, sendo 11 controle e 34 pacientes com DPOC, diagnosticados pela espirometria com a relação $VEF1/CVF < 70\%$ do previsto. Os voluntários do estudo eram indivíduos de ambos os sexos, com idade variando de 45 a 80 anos. Entre os portadores da DPOC, todos faziam uso de medicações inalatórias específicas para cada estágio da doença: 8 pacientes do estágio moderado ($50\% \leq VEF1 < 80\%$ do previsto), em uso de LABA, o Formoterol (Formocaps®, 12 µg duas vezes ao dia), classificados como DPOC estágio II, referido no texto como grupo DPOC II; 12 pacientes do estágio grave ($30\% \leq VEF1 < 50\%$ do previsto), em uso de LABA, o Formoterol (Formocaps®, 12 µg duas vezes ao dia), e LAMA, o Brometo de Tiotrópio (Spiriva Respimat®, 5 µg 1 vez ao dia) classificados como DPOC estágio III; e 14 pacientes do estágio muito grave ($VEF1 < 30\%$ do previsto ou $VEF1 < 50\%$ do previsto com insuficiência respiratória crônica), em uso de LABA, o Salmeterol associado a corticóide inalatório Fluticasona (Seretide®, 50/250µg duas vezes ao dia), e LAMA, o

Brometo de Tiotrópio (Spiriva Respimat®, 5 µg 1 vez ao dia), classificados como DPOC estágio IV, referido no texto como grupo DPOC IV; e 11 pacientes sem nenhuma doença pulmonar prévia, referidos no texto como grupo Controle. Todos indivíduos envolvidos no estudo eram ex-tabagistas, ou seja, pararam de fumar há mais de 1 ano.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os pacientes selecionados foram contatados através de telefone e solicitado para comparecerem no Centro Regional de Especialidades Metropolitano em uma data previamente agendada (agosto/2014) para serem realizados os seguintes procedimentos: responder a um questionário (Anexo 2). A seguir, foi coletado 5 ml de sangue periférico, por um profissional técnico em enfermagem, armazenados em caixa térmica e foram levados ao Laboratório de Fisiologia Translacional, pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, para determinação dos níveis citoplasmáticos de ROS. Em seguida, os voluntários foram submetidos ao exame espirométrico para confirmação do estágio da doença uma vez que, pelo Programa de DPOC, esta deve ser realizada anualmente.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos neste estudo pacientes portadores de DPOC, diagnosticados e pertencentes ao Programa de DPOC do Centro Regional de Especialidades do estado do Espírito Santo, em uso de medicações inalatórias distribuídas pelo estado através de um protocolo impresso no Diário Oficial do Espírito Santo em maio de 2009, e que cessaram o tabagismo há mais de 1 ano. Por outro lado, foram excluídos portadores de hipertensão arterial sistêmica, doenças metabólicas crônicas (35), asma, câncer, infecções respiratórias agudas (duração menor que 15 dias), estados febris agudos, tabagismo ativo.

Os pacientes foram incluídos no estudo após concordarem e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1), apresentado pela médica responsável Carla Cristiana de Castro Bulian, pela seleção dos mesmos e proponentes deste estudo. Além disso, o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Vila Velha pelo protocolo número 733.678 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, Vitória ES.

4.4 AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO

Foram coletados 5 mililitros (ml) de sangue periférico dos pacientes pela manhã, em seguida, as amostras foram encaminhados para o laboratório de Fisiologia Translacional pertencente ao programa de Pós graduação de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo , para realização da análise do estresse oxidativo.

4.5 DETERMINAÇÃO DO VEF1 E DA CVF POR ESPIROMETRIA

Realizada anualmente a prova de função pulmonar de cada paciente selecionado, e em uso de medicações inalatórias, utilizando o espirômetro (MicroQuark – Cosmed versão 8.0B, 2003). O diagnóstico de DPOC foi feito pela avaliação das medidas na espirometria de VEF1 e CVF, e a relação de $VEF1/CVF < 70\%$ do previsto (16). Em seguida, os pacientes foram agrupados de acordo com os resultados obtidos na espirometria, analisando os valores de VEF1 pós broncodilatador, classificando-os em estágio II, moderado ($50\% \leq VEF1 < 80\%$ do previsto), estágio III, grave ($30 \leq VEF1 < 50\%$ do previsto), e estágio IV, muito grave ($VEF1 < 30\%$ do previsto ou $VEF1 < 50\%$ do previsto com insuficiência respiratória crônica).

4.6 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO POR CITOMETRIA DE FLUXO

4.6.1 Determinação dos níveis citoplasmáticos de ânion superóxido

Os níveis de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pelo etídeo, que é produto da oxidação do dihidroetídeo ou hidroetidina (DHE). O DHE, forma reduzida do brometo de etídeo, entra livremente na célula e é relativamente mais sensível ao superóxido, entretanto pode reagir com outras ROS, como o radical hidroxila ($\bullet OH$), para formar etídeo. No citoplasma, o DHE é um fluorocromo azul (420nm), entretanto quando oxidado à etídeo, este se liga ao DNA causando a amplificação da fluorescência vermelha (518-605nm). As células sanguíneas foram ressuspensas em 1ml de PBS na concentração de 1×10^6 células/ml e incubadas, no escuro, com 160 μM de DHE em etanol absoluto, por 30 minutos à 37°C e, em seguida, mantidas resfriadas (4°C) e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro de fluxo (56). Os sinais foram obtidos utilizando o filtro de 585nm para etídeo. Como controle positivo, as células sanguíneas foram previamente incubadas com 50 μM H_2O_2 por 5 minutos, enquanto que para o controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em etanol. A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* FACSDiva, pela determinação da mediana da intensidade de fluorescência de 10.000 células.

4.6.2 Determinação dos níveis citoplasmáticos de peróxido de hidrogênio

Os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF) que é produto da oxidação do diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA). O H_2DCFDA é um éster, não-fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. Após entrar na célula, o H_2DCFDA perde o grupo diacetato, pela ação de esterases intracelulares, resultando na formação de diclorodihidrofluoresceína (DCFH), que pode ser oxidado a diclorofluoresceína (DCF). As células sanguíneas foram ressuspensas em 1ml de PBS na concentração de 1×10^6 células/ml e incubadas, no escuro, com solução de 20mM H_2DCFDA (57) em etanol absoluto, por 30 minutos à 37°C e,

em seguida, mantidas resfriadas (4°C) e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro. Os sinais foram obtidos utilizando o filtro de 530nm para DCF. Como controle positivo, as células sanguíneas foram previamente incubadas com 50µM H₂O₂ por 5 minutos, enquanto que para o controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em etanol. A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* FACSDiva, pela determinação da intensidade média de fluorescência de 10.000 células.

4.6.3 Determinação dos níveis citoplasmáticos de óxido nítrico

Os níveis de óxido nítrico (NO) foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pelo triazolofluoresceína (DAF-2T) que é produto da oxidação do diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA). O DAF-2DA é um éster, não-fluorescente, permeável à membrana celular. Após entrar na célula, o DAF-2DA é convertido à 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) pela ação de esterases intracelulares. O DAF-2 não é permeável à membrana celular permanecendo, portanto, no interior das células. Em pH fisiológico, o DAF-2 não é fluorescente mas, ao reagir com NO, resulta na formação de DAF-2T composto altamente fluorescente. Assim, a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração intracelular de NO. As células sanguíneas foram ressuspendidas em 1ml de PBS na concentração de 1x10⁶ células/ml e incubadas, no escuro, com solução de 2µM DAF-2DA (56,57) em etanol absoluto, por 180 minutos à 37°C e, em seguida, mantidas resfriadas (4°C) e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro. Como controle positivo, as células foram previamente incubadas com 100mM de nitroprussiato de sódio por 10 minutos, enquanto que para o controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em etanol. A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* FACSDiva, pela determinação da intensidade média de fluorescência de 10.000 células.

4.6.4 Determinação dos níveis citoplasmáticos de ânion peroxinitrito e radical hidroxila

Os níveis de peroxinitrito e $\bullet\text{OH}$ foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pela hidroxifenilfluoresceína (HPF). O HPF é uma molécula capaz de atravessar a membrana plasmática e que apresenta baixa fluorescência. Após internalizada, a HPF é oxidada, principalmente, por ONOO^- , pois apresenta baixa ou nenhuma afinidade por outras ROS (56). As células sanguíneas foram ressuspensas em 1ml de PBS na concentração de 1×10^6 células/ml e incubadas, no escuro, com solução de 5 μM HPF em etanol absoluto, por 15 minutos à 37°C e, em seguida, mantidas resfriadas (4°C) e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro. Os sinais foram obtidos utilizando o filtro de 530nm para HPF. A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* FACSDiva, pela determinação da intensidade média de fluorescência de 10.000 células.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados serão expressos como média \pm EPM para cada um dos grupos estudados. As médias dos valores comparando os diferentes grupos serão analisadas estatisticamente usando-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo *post hoc* de Tuckey. As diferenças serão consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Foram considerados elegíveis 45 indivíduos ex tabagistas, dos quais 34 portadores de DPOC, diagnosticados pela espirometria, apresentando a relação $\text{VEF1/CVF} < 70\%$ do previsto, foram divididos de acordo com o estágio da doença mostrado pelo valor de VEF1 pós broncodilatador. Pacientes no estágio II ($50\% \leq \text{VEF1} < 80\%$ do previsto), foram classificados como DPOC II (n=8). Pacientes no estágio III ($30\% \leq \text{VEF1} < 50\%$ do previsto), foram classificados como DPOC III (n=12). Pacientes no estágio IV ($\text{VEF1} < 30\%$ do previsto ou $\text{VEF1} < 50\%$ do previsto com insuficiência respiratória crônica), foram classificados como DPOC IV (n=14). E indivíduos ex tabagistas, com VEF1 pós broncodilatador com valor acima ou igual a 80% do previsto e a relação VEF1/CVF acima ou

igual a 80%, ou seja, valores normais, foram classificados como grupo controle (Controle) (n=11).

5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

5.1.1 Dados demográficos e relacionados ao tabagismo

Na tabela 1 são apresentados alguns dados demográficos e relacionados ao tabagismo na população avaliada no estudo. Inicialmente, podemos observar que entre as pessoas envolvidas no estudo, os pacientes do grupo Controle e DPOC II eram principalmente mulheres, enquanto que os grupos DPOC III e DPOC IV eram compostos principalmente por indivíduos do sexo masculino, como pode ser observado na tabela 1. Outro parâmetro demográfico avaliado foi a idade dos voluntários do estudo. Observamos que os pacientes com diagnóstico de DPOC apresentaram médias superiores às do grupo controle, uma vez que os indivíduos do grupo Controle apresentaram menor média de idade (49 ± 3 anos), enquanto que os pacientes dos grupos DPOC II (56 ± 2 anos), DPOC III (67 ± 3 anos) e DPOC IV (66 ± 2 anos) apresentaram idade mais avançada.

Outro parâmetro importante avaliado no estudo foi a carga tabágica, determinada em anos-maço. Como pode ser observado na tabela 1, os pacientes dos grupos DPOC III e DPOC IV apresentaram maior carga tabágica (DPOC III: 72 ± 17 ; DPOC IV: 57 ± 9 anos-maço) quando comparados aos indivíduos dos grupos Controle (31 ± 12) e DPOC II (39 ± 10). Entretanto, os pacientes do grupo DPOC IV apresentaram menor carga tabágica quando comparados ao grupo DPOC III. Não observamos diferença significativa entre os grupos Controle e DPOC II.

Ao analisar o tempo de cessação do fumo entre os voluntários do estudo, podemos observar que os pacientes do grupo DPOC III apresentaram maior média de tempo de cessação de fumo (38 ± 3 anos) quando comparados com os indivíduos do grupo Controle (10 ± 2 anos), DPOC II (16 ± 4 anos) e DPOC IV (12 ± 2

anos). Não observamos diferença significativa entre os grupos Controle, DPOC II e DPOC IV.

5.1.2 Dados espirométricos

Na tabela 1 também são apresentados dados obtidos por espirometria referentes aos voluntários do estudo. Como esperado, os indivíduos do grupo Controle apresentaram o maior valor de VEF1 ($3,06 \pm 0,18$ litros) entre os grupos. Entre os pacientes diagnosticados com DPOC, o grupo DPOCII apresentou maior valor de VEF1 ($1,77 \pm 0,20$ litros), quando comparado com os pacientes dos grupos DPOC III ($1,00 \pm 0,08$ litros) e DPOC IV ($0,57 \pm 0,03$ litros).

De forma semelhante, os indivíduos do grupo Controle apresentaram maior valor da % do previsto de VEF1 ($95,73 \pm 3,14$ % do previsto) quando comparados aos pacientes diagnosticados com DPOC, como era esperado. Entre os grupos DPOC, observamos uma diminuição progressiva deste valor relacionada ao agravamento da doença, ou seja, os pacientes do grupo DPOCII ($62,85 \pm 3,98$ % do previsto) apresentaram maior valor da % do previsto de VEF1 quando comparados aos pacientes dos grupos DPOCIII e DPOCIV ($38,63 \pm 1,51$ e $24,91 \pm 1,24$, % do previsto, respectivamente). É importante destacar que os pacientes do grupo DPOCIV apresentaram redução de aproximadamente 3 vezes no valor da % do previsto de VEF1 quando comparado ao grupo controle.

A análise da relação VEF1/CVF, conforme o esperado, foi maior nos indivíduos do grupo Controle ($83,36 \pm 1,29$) quando comparados aos pacientes dos grupos DPOC. Entre os grupos DPOC, observamos o maior valor da relação VEF1/CVF nos pacientes do grupo DPOC II ($60,50 \pm 2,68$) quando comparados com os pacientes dos grupos DPOC III ($45,82 \pm 2,59$) e DPOC IV ($36,12 \pm 2,18$).

Tabela 1: Características gerais da população total de pacientes estudados

Variáveis	Grupos			
	Controle	DPOC II	DPOC III	DPOC IV

Idade, anos	49±3	56±2*	67±3**	66±2**
Gênero, n (%)				
Masculino	0 (0%)	1	9	13
Feminino	11 (100%)	7	3	1
Carga tabágica, anos-maço	31±12	39±10	72±17**	57±9*&
VEF1, L	3,06±0,18	1,77±0,20*	1,00±0,08**	0,57±0,03**&
VEF1, % pred	95,73±3,14	62,85±3,98*	38,63±1,51**	24,91±1,24**&
VEF1/CVF	83,36±1,29	60,50±2,68*	45,82±2,59**	36,12±2,18**&
Tempo da cessação do fumo, anos	10±2	16±4	38±3**\$	12±2

Nota: valores expressos como média±EPM. * vs Controle; # vs DPOC II; & vs DPOC III; \$ vs DPOC IV

5.2 PRODUÇÃO CITOPLASMÁTICA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

5.2.1 Ânion superóxido

A figura 5 mostra a MFI da produção de ânion superóxido obtida a partir da análise citométrica de células sanguíneas incubadas com DHE. Como pode ser observado, os pacientes dos grupos DPOCII, DPOCIII e DPOCIV, apresentaram maior produção de ânions superóxido quando comparados ao grupo Controle (Controle: 3218±1,88; DPOC II: 5156±242; DPOC III: 6470±241; DPOC IV: 5223±151, a.u). É importante ressaltar que os pacientes do grupo DPOCIV, apesar de apresentarem o estágio mais grave da DPOC, apresentaram diminuição da produção de ânion superóxido quando comparado aos pacientes do grupo DPOCIII, sendo que esta diminuição nos níveis de ânion superóxido se mostraram quase iguais ao do grupo DPOCII cujos pacientes apresentam estágio menos grave da DPOC.

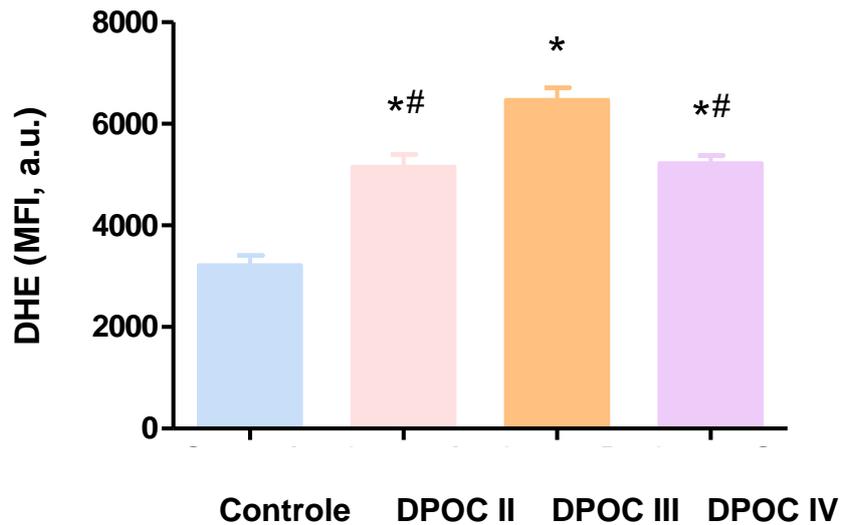


Figura 6. Gráfico de barras dos níveis de $O_2\bullet$ (fluorescência DHE) em pacientes do grupo Controle, DPOC II, DPOC III, DPOC IV. Valores indicam média \pm EPM. * *versus* grupo Controle. # *versus* grupo DPOC III.

5.2.2 Óxido nítrico

A figura 6 mostra a MFI da produção de óxido nítrico a partir da análise citométrica de células sanguíneas incubadas com DAF. Como pode ser observado, a maior produção de óxido nítrico foi apresentada pelos indivíduos do grupo Controle (3740 ± 221 , a.u) que são ex-tabagistas, não portadores de DPOC e não usam medicação inalatória, em comparação com os pacientes dos grupos DPOC II (2948 ± 150 , a.u), DPOC III (2734 ± 90 , a.u), DPOC IV (1889 ± 70 , a.u), todos ex tabagistas e em uso de medicações inalatórias. Dentre os pacientes portadores de DPOC, os do grupo DPOC IV, mostraram menor produção de óxido nítrico em comparação com os grupos DPOC II e DPOC III. Vale destacar que os pacientes dos grupos DPOC II e DPOC III apresentaram valores quase iguais dos níveis de oxido nítrico.

* vs Grupo Controle; ϕ vs Grupo A; # vs Grupo B

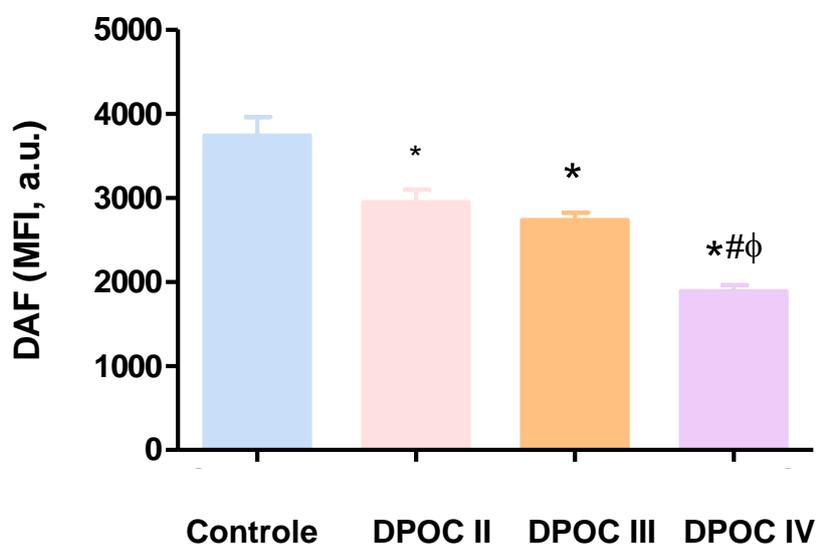


Figura 7. Gráfico de barras dos níveis de NO (fluorescência DAF) em pacientes do grupo Controle, DPOC II, DPOC III, DPOC IV. * *versus* grupo Controle. # *versus* grupo DPOC III. ϕ *versus* grupo DPOC II.

5.2.3 Peróxido de hidrogênio

A figura 7 apresenta a MFI da produção de peróxido de hidrogênio obtido a partir da análise citométrica de células sanguíneas incubadas com DCF. Como pode ser observado os indivíduos do grupo Controle apresentaram menor produção de peróxido de hidrogênio quando comparados com os pacientes dos grupos DPOC II, DPOC III, DPOC IV (Controle: 3034 ± 98 ; DPOC II: 4607 ± 271 ; DPOC III: 6524 ± 691 ; DPOC IV: 4825 ± 233 , a.u). Dentre os pacientes dos grupos DPOC, é importante ressaltar que os do grupo DPOC IV que são classificados como muito grave, apresentam menor produção de peróxido de hidrogênio em comparação com o grupo DPOC III, classificados como grave, sendo que esta diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio se mostram quase iguais aos do grupo DPOC II, classificado como moderado.

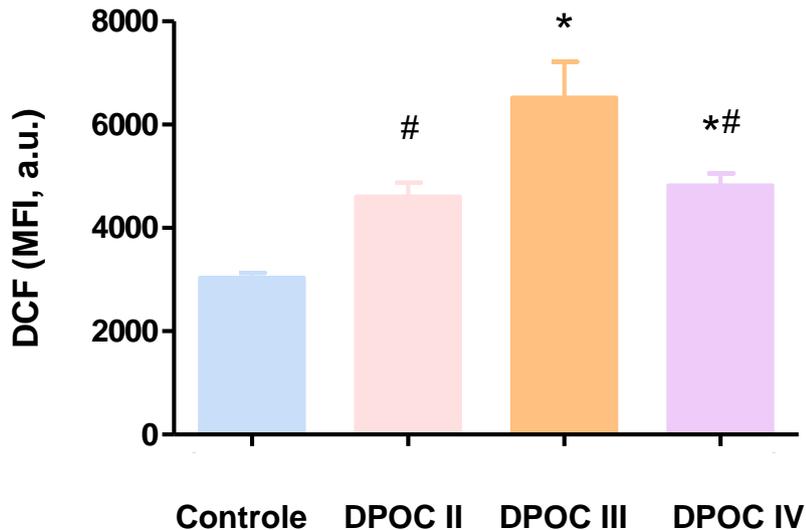


Figura 8. Gráfico de barras dos níveis de H₂O₂ (fluorescência DCF) em pacientes do grupo Controle, DPOC II, DPOC III, DPOC IV. * *versus* grupo Controle. # *versus* grupo DPOC III.

5.2.4 Radical hidroxila e peroxinitrito

A figura 8 mostra a MFI das produções de radical hidroxila e peroxinitrito obtidos a partir da análise citométrica de células sanguíneas incubadas com HPF. Como foi observado, os pacientes dos grupos DPOC II (1315±43, a.u), DPOC III (2289±43, a.u) e DPOC IV (1384±57, a.u) apresentaram maior produção de radical hidroxila e peroxinitrito quando comparados aos indivíduos do grupo Controle (771±20, a.u). Importante observar também, dentre os pacientes dos grupos DPOC, os do grupo DPOC IV apresentaram menor produção de radical hidroxila e peroxinitrito em comparação com os do grupo DPOC III, sendo que esta diminuição nos níveis de radical hidroxila e peroxinitrito se mostraram quase iguais ao do grupo DPOC II.

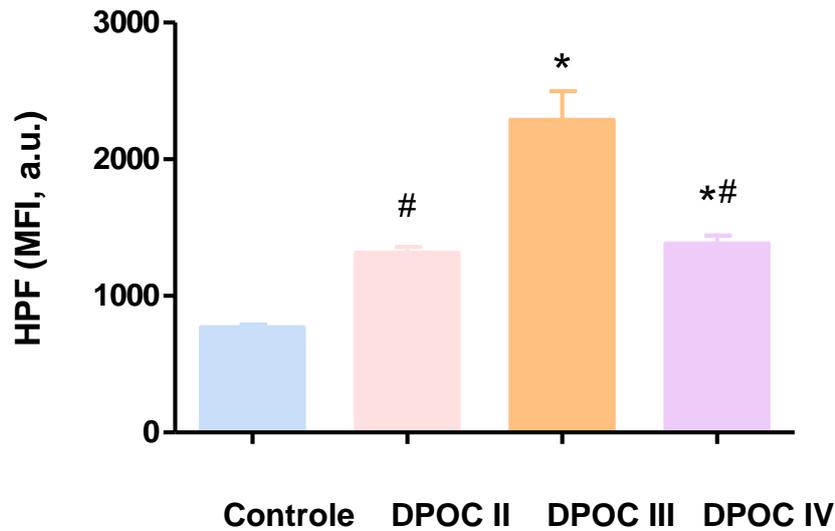


Figura 9. Gráfico de barras dos níveis de \bullet OH e proxinitrito (fluorescência HPF) em pacientes do grupo Controle, DPOC II, DPOC III, DPOC IV. * *versus* grupo Controle. # *versus* grupo DPOC III

6 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou a produção de ROS obtidas a partir da análise citométrica de células sanguíneas em pacientes portadores de DPOC, em uso de medicações inalatórias e em indivíduos, não portadores de DPOC e sem uso de medicações inalatórias, todos ex-tabagistas, tendo como principal descoberta a diminuição do estresse oxidativo sistêmico em pacientes em uso de medicações inalatórias para DPOC.

Sabe-se que a DPOC é uma doença altamente prevalente, com elevada mortalidade, sendo por isso, um importante problema de saúde pública em todo mundo (58). Definida como uma doença inflamatória crônica que agrupa tanto enfisema e bronquite crônica (59), apresenta caráter progressivo, causada pela inalação de partículas e gases tóxicos, principalmente a fumaça do cigarro (60). Através de estudos clínicos e epidemiológicos evidencia-se uma redução importante da qualidade de vida das pessoas acometidas (61), sendo uma das principais causas de morte no mundo (62). A faixa etária prevalente é acima dos 40 anos e acomete principalmente pessoas tabagistas e ex tabagistas, com uma maior incidência em homens que mulheres (16).

Alguns estudos demonstram esta prevalência de idade e sexo, como no estudo PLATINO (63), realizado em 5 cidades da América Latina, São Paulo, Montevideu, Santiago, Cidade do México, e Caracas que avaliou a relação da prevalência e mortalidade na DPOC, sendo observado uma maior incidência em homens com uma idade acima de 40 anos, mostrando variações nesta relação com a mortalidade nas diferentes cidades, explicada pelos diferentes estilos de vida. Outro estudo feito por Albert e colaboradores, envolvendo indivíduos de 17 países, demonstrou que a incidência de DPOC e suas manifestações clínicas raramente ocorrem antes dos 40 anos e em não fumantes, com maior prevalência no sexo masculino (64). Portanto, os dados obtidos no presente estudo, realizado em indivíduos ex-tabagistas, moradores do estado de Espírito Santo, portadores de DPOC e seus respectivos controles, são compatíveis com os outros autores, pois foi demonstrado uma média de idade entre 49-66 anos, sendo observada maior incidência da doença em homens, principalmente nos grupos DPOC III e DPOC IV.

O principal fator de risco para o aparecimento da DPOC é o fumo do cigarro (16). O tabagismo leva a uma resposta inflamatória local no trato respiratório com alterações patológicas nas vias aéreas proximais, distais, parênquima, vasculatura pulmonar (65), além de promover a formação de ROS (66), levando ao estresse oxidativo. Sabe-se que, mesmo após cessar o fumo, esta inflamação, e conseqüentemente, o estresse oxidativo permanecem por mecanismos ainda desconhecidos (31), sendo considerados fatores de risco para várias outras comorbidades e mortalidade. Vários estudos comprovam essa exposição como Sakata e colaboradores que avaliaram pessoas tabagistas que começaram a fumar antes dos 20 anos, mantendo um seguimento por 30 anos, sendo evidenciado que a mortalidade devido a várias outras doenças em pessoas tabagistas dobrou em relação com aquelas pessoas que nunca fumaram neste período de seguimento, além de diminuir a expectativa de vida em 10 anos (67). Outro estudo feito por Vollset e colaboradores avaliou a relação entre a taxa de mortalidade e o tabagismo, entre homens e mulheres na faixa etária de 40 a 70 anos, observando que a persistência do tabagismo aumenta o risco de morte devido a causas cardíacas e câncer de pulmão, enquanto que sua

cessação, diminui estes riscos, especialmente nas mulheres, que foi explicado por apresentarem baixo risco de complicações cardiovasculares (68).

A cessação do tabagismo é a única intervenção capaz de reduzir a progressão da doença, melhorar a sobrevida e reduzir a incidência de internações hospitalares (69), mesmo não interrompendo o processo inflamatório (70). Pacientes que cessam o tabagismo tem menos sintomas respiratórios e hiperresponsividade que aqueles que continuam fumando (71). Para elucidar estas afirmações vários estudos foram feitos como por Turato e colaboradores que avaliaram o processo inflamatório pulmonar através da pesquisa de macrófagos e neutrófilos por análise imunohistoquímica que foram obtidas por biópsia brônquica, em grupos tabagistas e ex-tabagistas que cessaram de fumar há 13 anos, com sintomas de bronquite crônica, evidenciando a presença destas células nos 2 grupos (72), comprovando a persistência da inflamação pulmonar após a cessação do tabagismo. Em um outro estudo Laperre e colaboradores demonstraram, por exame histológico comum através da coleta por biópsia, a inflamação brônquica, mostrando neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, mastócitos, e LT, em pacientes portadores de DPOC ex-tabagistas por mais de 2 anos e tabagistas, não mostrando diferença na contagem de neutrófilos, macrófagos, LTCD8 nestes dois grupos (73). Com isto se evidencia a permanência da inflamação pulmonar, devido a presença de células inflamatórias em tecido pulmonar obtido para biópsia, mesmo após a cessação do tabagismo.

Nosso estudo analisou no sangue periférico dos grupos a produção de ROS, mostrando que os pacientes do grupo DPOC III apresentaram a maior média de tempo de cessação do tabagismo, e também uma maior produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e peroxinitrito comparados com os grupos Controle, DPOC II, DPOC IV. Evidenciando assim, a persistência da produção de ROS mesmo após vários anos de cessação do tabagismo.

Os efeitos da inflamação crônica, a qual provoca uma obstrução do fluxo aéreo, levam aos sintomas estabelecendo o quadro clínico da DPOC (16). Este processo inflamatório na árvore brônquica é complexo, envolvendo

quimiorreceptores, citocinas e elastases, que provocam a redução dos batimentos ciliares, hiperplasia das glândulas mucosas, secreção de muco, inativação da defesa pulmonar do indivíduo (74), levando aos sintomas que variam mais durante o dia como dispneia, tosse crônica, expectoração além de sintomas noturnos como chiado e aperto no peito (75), porém podem ocorrer em qualquer momento nas 24 horas do dia. A dispnéia é um preditor de hospitalização e mortalidade nos pacientes com DPOC, e em alguns casos, correlacionados com sobrevida em até 5 anos (76). Estudos comprovam estas afirmações, como Monteiro e colaboradores que avaliaram a variabilidade dos sintomas respiratórios em pacientes com DPOC e seu impacto na vida diária, sendo demonstrado que a queixa diária mais frequentemente relatada foi dispnéia, seguida de aperto no peito, broncoespasmo, tosse e expectoração, interferindo nas atividades diárias do grupo estudado (77). Broekhoisen e colaboradores, mostraram que indivíduos com sintomas respiratórios de tosse crônica e dispnéia, pode-se sugerir ou excluir a DPOC pela clínica e exame físico, porém o diagnóstico definitivo se dá pela espirometria associada a estes parâmetros, pois a clínica, pode se assemelhar a outras doenças e o exame físico, pode ser normal no início desta enfermidade (78).

A utilização da espirometria na avaliação da obstrução ao fluxo aéreo é importante para o diagnóstico adequado de DPOC, e através de seu resultado, especificar a farmacoterapia adequada para cada estágio, beneficiando os portadores desta enfermidade (79). Os parâmetros volumétricos mostram uma relação VEF1/CVF menor que 70% do previsto, o qual seria > 80%, e auxilia na determinação dos 4 estágios da doença pelos valores de VEF1 (16). O tabagismo determina um declínio acentuado e progressivo da função pulmonar (80), e acelera o declínio do VEF1 (81), não há evidências que sua interrupção melhore este parâmetro, o que foi visto por Lee e colaboradores em uma revisão sistemática avaliando a função pulmonar de pessoas ex-tabagistas e tabagistas portadoras de DPOC, mostrando que mesmo após a cessação do tabagismo, evidencia-se nos primeiros anos, uma queda da VEF1, permanecendo neste nível baixo, porém estável ao longo do tempo (82). Outro estudo feito por Willense e colaboradores avaliando sintomas respiratórios, função pulmonar, hiper-reatividade das vias aéreas e inflamação, mostrou que a cessação do

tabagismo melhora os sintomas respiratórios, e normaliza o declínio acelerado do VEF1 em todos os estágios da doença (83).

Kanner e colaboradores, fizeram um estudo prospectivo em pacientes tabagistas portadores de DPOC moderado, avaliando a frequência de doenças respiratórias do trato inferior (parênquima pulmonar, traquéia e brônquios), e seus efeitos na função pulmonar, especificamente no VEF1, demonstrando que em pacientes com uma infecção do trato respiratório inferior por ano, apresentaram um aumento na perda de VEF1 de 7 ml, em cada ano, por 5 anos e mesmo com a cessação do tabagismo, a frequência de infecções não diminuiu, e sim, a perda acelerada da função pulmonar associada a estes eventos (84).

No presente estudo foi evidenciado que quanto maior a carga tabágica, ou seja, número de cigarros fumados por dia durante os anos de tabagismo, maior o declínio de VEF1, confirmando o descrito nos estudos acima, apesar de um dos critérios de exclusão ser infecções respiratórias agudas mostradas nos estudos prévios. Nos grupos DPOC III e DPOC IV, com maior carga tabágica em relação aos grupos Controle e DPOC II, apresentaram valores de VEF1 baixo, sendo que o grupo DPOC IV apresentou o menor valor comparado aos demais grupos.

Manifestações sistêmicas e comorbidades estão relacionadas à DPOC devido ao envolvimento da inflamação sistêmica, o que leva a um risco aumentado de doenças cardiovasculares, osteoporose, perda da massa muscular, diabetes, depressão (85). Como fator principal na fisiopatologia destas manifestações e do aparecimento da DPOC, tem-se o estresse oxidativo e o desequilíbrio da produção de proteases/anti-proteases (85). Os portadores de DPOC, tem níveis séricos aumentados de marcadores de inflamação sistêmica, um deles, o TNF α , se correlaciona com a disfunção do músculo esquelético, osteoporose, diabetes mellitus tipo II (86). Vários estudos comprovam esta teoria. Sindem e colaboradores, mostraram evidências que substâncias inaladas, como poluentes de ar, podem levar a uma resposta inflamatória, com aumento dos níveis de neutrófilos, macrófagos alveolares ativados, aumentando a produção de oxidantes e liberação de mediadores inflamatórios tais como TNF α simultaneamente nos pulmões e na circulação sistêmica (87). Vernooy e

colaboradores fizeram um estudo em portadores de DPOC e indivíduos saudáveis ambos tabagistas e ex tabagistas, e avaliaram a resposta inflamatória no escarro e no plasma, através da dosagem de TNF, IL-8, e receptores solúveis de TNF, sendo que o grupo de DPOC tabagista mostrou uma maior dosagem de TNF, IL-8 e receptores solúveis de TNF no escarro em relação aos fumantes saudáveis e no grupo DPOC ex tabagista, maior dosagem no plasma deste marcador quando comparados com o grupo saudável ex-tabagista, confirmando a inflamação local e sistêmica, mesmo após a cessação de tabagismo (88). Tabagismo por si só, induz a uma inflamação sistêmica de baixo grau, porém ocorre a persistência da inflamação sistêmica em ex-tabagistas portadores de DPOC (89).

É importante destacar que no presente estudo a produção citoplasmática de ROS foi determinada por citometria de fluxo, que é um método confiável, objetivo e de fácil interpretação para a detecção de parâmetros morfológicos, bioquímicos, fisiológicos de células individuais, além de ter uma sensibilidade aumentada para a determinação de estresse oxidativo (56). Este estudo representa uma inovação para o acompanhamento da evolução do tratamento de pacientes com DPOC, uma vez que aponta a possibilidade de monitorar a produção citoplasmática de ROS, podendo auxiliar na prevenção do agravamento da própria DPOC ou comorbidades associadas.

Em um outro estudo feito por Saetta e colaboradores, avaliou pacientes portadores de DPOC tabagistas, com carcinoma periférico localizado, sem uso de CI, divididos em pacientes com sintomas de bronquite crônica e alteração no valor de VEF1 e pacientes assintomáticos, sem alteração da função pulmonar, sendo realizada biópsia pulmonar e imuno histoquímica para avaliar o processo inflamatório das vias aéreas periféricas, concluindo que portadores de DPOC com sintomas de bronquite crônica e com alteração da função pulmonar, apresentam aumento de LTCD8 e espessamento do musculo liso (na biópsia pulmonar) nas vias aéreas periféricas em comparação com os portadores de DPOC assintomáticos, suportando a hipótese do papel do LTCD8 e remodelamento das vias aéreas na patogênese do DPOC (90). Identificando que sempre se mostra pelo menos algum tipo de célula inflamatória na DPOC, porém não é o mesmo tipo de célula presente em cada caso. Este estudo apresenta

diferenças metodológicas com nosso estudo, pois câncer de pulmão e tabagismo estavam entre os critérios de exclusão devido a interferência na inflamação pulmonar destas comorbidades e consequente formação de estresse oxidativo.

O estresse oxidativo inclui todas as alterações funcionais e estruturais causadas por ROS, e é considerado elemento fundamental para o desenvolvimento da patologia da DPOC (16). As ROS são produzidas no plasma e pulmão por neutrófilos, macrófagos, células epiteliais, e são neutralizadas através de antioxidantes e enzimas anti-oxidantes como SOD, CAT, GPx (35). Vários estudos foram feitos para elucidar o estresse oxidativo. Donohue e colaboradores demonstraram que o estresse oxidativo é medido principalmente através do NO exalado, por enzimas antioxidantes no sangue, escarro, lavado broncoalveolar e avaliação das manifestações sistêmicas através do efeito das ROS (91). Além deste estudo foi elaborado uma diretriz por Horváth e colaboradores, padronizando procedimentos na coleta de condensado exalado pulmonar (EBC), importante método para avaliar inflamação pulmonar, que é um método simples, seguro e não invasivo que avalia a medida de biomarcadores no ar exalado como NO, H₂O₂, 8-isoprostanos (92). Rahman e Swarska (93) analisaram portadores de DPOC em uso de CI e SABA, tabagistas saudáveis e grupo controle e correlacionaram a capacidade antioxidante do análogo da vitamina E (TROLOX) equivalente (TEAC) com a função pulmonar e observaram que os fumantes e portadores de DPOC tiveram TEAC diminuída em comparação com pessoas saudáveis não tabagistas, confirmando o desequilíbrio oxidantes/antioxidantes nestes grupos (93). Outro estudo feito por Arja e colaboradores, que avaliaram no plasma os níveis de CAT, SOD, GPx, e malondialdeído (MDA), sendo este um produto da peroxidação lipídica, em pacientes tabagistas portadores de DPOC, diagnosticados por espirometria e divididos em estágios, e mostraram uma quantidade aumentada de MDA, principalmente em tabagistas portadores de DPOC estágio IV, e níveis diminuídos de SOD, CAT, GPx (38). Apesar de antioxidantes não terem sido avaliados neste estudo, foi demonstrado que a produção de ROS na inflamação sistêmica analisada por citometria de fluxo é aumentada no grupo DPOC em relação ao grupo Controle. Porém é importante destacar que no grupo DPOC, esperava-se que quanto pior a função pulmonar, maior produção de ROS, mas

foi identificado uma maior produção no grupo DPOC III, estágio grave em comparação com os grupos DPOC IV e DPOC II, sendo que a produção de ROS destes dois grupos foi semelhante. As diferenças existentes entre os grupos DPOC III e DPOC IV foram o tempo de cessação de tabagismo, maior no grupo DPOC III e a adição do uso de CI no grupo DPOC IV, podendo ambos interferir na produção de ROS. Moussa e colaboradores compararam homens portadores de DPOC e tabagistas saudáveis, e avaliaram o estresse oxidativo pelos métodos de NO exalado (pulmões), MDA no plasma e marcadores no plasma de glutathiona (GSH), sendo demonstrado que os níveis de NO exalado foi semelhante nos 2 grupos, enquanto que os níveis de MDA estavam aumentados e os níveis de GSH diminuídos nos portadores de DPOC (94). Em outro estudo, Robins e colaboradores demonstraram uma maior produção de NO exalado fazendo comparação entre ex-tabagistas e tabagistas (95), mas não foi feita avaliação em portadores de DPOC.

Além das ROS sabe-se que o peroxinitrito, formado pela ligação de NO e $O_2^{\bullet-}$, e outras RNS tem potente ação inflamatória, ambos importantes na inflamação local e sistêmica na DPOC. Em um estudo feito no Japão, avaliando pessoas portadoras de DPOC, asma e indivíduos saudáveis, foi mostrado a quantificação das RNS no escarro induzido pela marcação da nitrotirosina e a quantificação do NO exalado, evidenciando células positivas para nitrotirosina mais elevadas no grupo DPOC em comparação com os asmáticos e indivíduos saudáveis, elucidando que o estresse oxidativo imposto pela RNS na DPOC é maior, porém a quantidade de NO exalado foi menor neste grupo (96). Foi sugerido que a formação de peroxinitrito tanto da ligação de NO e $O_2^{\bullet-}$ e/ou por mecanismos de oxidação de nitrito peroxidase dependente podem agir para consumir NO, explicando, em parte, o porque dos menores níveis exalados de NO no grupo DPOC (96). No presente estudo, os níveis de NO no plasma, foram identificados por citometria de fluxo, e mostraram resultado semelhante a este último trabalho feito com NO exalado. Importante destacar que no grupo Controle há maior produção de NO no plasma e menor produção de peroxinitrito em comparação aos demais grupos DPOC, em contrapartida, o grupo DPOC IV, com pior função pulmonar, apresenta o menor nível de NO e produção aumentada de peroxinitrito.

Marcadores de estresse oxidativo no ar exalado ou condensado, as ROS liberadas na forma de H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ podem estar elevadas em portadores de DPOC (97). Quando produzidos por neutrófilos no sangue periférico, podem ser avaliados no plasma pelo produto de peroxidação lipídica como o MDA e 8-isoprostano (98). No presente estudo, foi avaliado no sangue periférico, as produções citoplasmáticas por citometria de fluxo de $O_2^{\bullet-}$ pela marcação com DHE, a produção de H_2O_2 pela marcação com DFC, produção de NO pela marcação com DAF-2T, produção de $\bullet OH$ e ânion peroxinitrito pela marcação com HPF, todas avaliadas nos grupos Controle, DPOC II, DPOC III, DPOC IV. A produção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 foi extremamente elevada no grupo DPOC III, porém mostrou-se semelhante nos grupos DPOC II e DPOC IV, estes em comum apresentavam apenas o tempo de cessação de tabagismo semelhantes, sendo que no grupo Controle, apresentou produção diminuída. A produção de $\bullet OH$ e ânion peroxinitrito nos grupos DPOC II e DPOC IV, foram semelhantes, enquanto que no grupo DPOC III a produção foi elevada, em comparação com o grupo Controle. Apesar de não haver estudo na literatura sobre a produção de ROS no plasma em pacientes com DPOC, analisados por citometria de fluxo, vários outros estudos avaliam a produção de diferentes maneiras, como em um estudo feito Macnee mostrando que fumantes apresentam maior quantidade liberada de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , pelos leucócitos alveolares, em comparação com os não fumantes mostrados *in vitro* através da análise de secreção brônquica (99), porém não demonstraram as ROS em sangue periférico. Outro estudo feito por Aben e colaboradores para avaliar a quantidade de H_2O_2 exalado, comparando portadores de DPOC estável, DPOC exacerbado e pessoas saudáveis mostrou que é aumentada em portadores de DPOC, porém é muito maior na exacerbação da doença (97).

Outro estudo feito na Turquia para avaliar as diferenças na carga de estresse oxidativo, medindo H_2O_2 , MDA e 8-isoprostano no EBC, em pacientes com DPOC, indivíduos fumantes e indivíduos não fumantes, foi evidenciado níveis elevados e semelhantes de H_2O_2 e 8-isoprostano no grupo com DPOC e no grupo de tabagistas, em comparação com o grupo não fumante, além disso, pacientes com DPOC em uso de CI, comparados com indivíduos saudáveis, os níveis de H_2O_2 exalado foram semelhantes, podendo conceber que CI pode

suprimir processos inflamatórios que contribuem para diminuir e não cessar o estresse oxidativo local (98). No presente estudo, foi avaliado por citometria de fluxo, a produção de H₂O₂ no plasma, onde foi observado que o grupo DPOC III em uso de LABA e LAMA, mostrava uma maior produção de H₂O₂ em comparação com os grupos Controle, DPOC II, e DPOC IV. Importante destacar também que o grupo DPOC IV apresentou a menor produção de H₂O₂, que usava além de LABA, LAMA, o CI, porém seus níveis foram semelhantes ao do grupo DPOC II, em uso apenas de LABA.

As medicações inalatórias usadas para o tratamento da DPOC melhoram a qualidade de vida, mas não tratam a inflamação (16). As exacerbações da doença causam grande alteração na clínica e geram enorme impacto sócio-econômico (100). No acompanhamento dos pacientes, em uso de medicações inalatórias, se o controle da DPOC é insuficiente com a monoterapia, faz-se a combinação de LABA e/ou com CI, e LAMA (101). Os broncodilatadores de longa duração (LABA e LAMA) são o estio da terapia devido a sua comprovada eficácia, pois proporcionam melhorias em longo prazo na função pulmonar, na qualidade de vida e nas exacerbações, além de reduzir a hiperinsuflação pulmonar e a dispnéia (101). A broncodilatação conseguida por essa associação pode ser explicada pela ação de β_2 agonistas que podem amplificar o relaxamento do músculo liso bronquial induzidos pelo antagonista muscarínico, que promove a diminuição da liberação de acetilcolina através da neurotransmissão colinérgica (101) maximizando a resposta broncodilatadora. Um estudo feito na Bélgica, avaliando por 3 anos pacientes portadores de DPOC em uso de LAMA usado no início do quadro clínico e como monoterapia, apresentou uma melhora na qualidade de vida, e um aumento no final deste período de 93 ml no VEF1 pós broncodilatador, além de mostrar uma estabilização da progressão da doença (102). Estudos com uso de CI mesmo em doses elevadas não conseguiram demonstrar diminuição da taxa de declínio no VEF1, mas reduziram a taxa de severidade das exacerbações nesta doença (103). Ao contrário, Saha e colaboradores mostraram que o uso de corticoide oral (CO), em baixas dose em longo prazo, sugere reduções na frequência de exacerbações e na taxa de declínio de VEF1 (104), e também associa-se com uma redução da inflamação sistêmica.

Culpitt e colaboradores, avaliaram portadores de DPOC estágio grave e muito grave, em uso de Fluticasona 500 µg, 2 vezes ao dia, e a marcação da ativação dos neutrófilos pelo exame do escarro induzido, mostrando que não houve efeito na função pulmonar e nos índices inflamatórios nos portadores de DPOC, explicando que a não resposta ao tratamento com CI na inflamação pode ser devida ao constante estímulo de neutrófilos a secretarem proteases como a MMP, impedindo a cessação da inflamação pulmonar nestes pacientes (105). Outro estudo feito com pacientes portadores de DPOC estágios leve e moderado, em uso de Fluticasona 500 µg, 2 vezes ao dia, e CO 30 µg, 1 vez ao dia, por 8 semanas, avaliando a inflamação sistêmica através da dosagem sérica de PCR e foi observado a diminuição da PCR sérica tanto no grupo que usava CO, quanto no grupo que usava CI, mas sem melhora do VEF1 com CI (106). Em outro estudo foi avaliado o perfil celular inflamatório, feito com linfócitos CD8 e macrófagos, através da biópsia brônquica realizada em pacientes ex-tabagistas portadores de DPOC estágio moderado e grave, em uso de Fluticasona 500 µg, por 3 meses, mostrou que não há efeito de CI sobre os principais tipos de células inflamatórias pulmonares (107).

No presente estudo utilizando citometria de fluxo para a avaliação sérica de produção de ROS nos grupos Controle, DPOC II, DPOC III, DPOC IV, em uso das medicações inalatórias LABA, LABA e LAMA, LABA associado com CI, e LAMA respectivamente, foi evidenciado, como esperado que o grupo Controle apresentou a menor produção de ROS em comparação com os grupos DPOC, e uma maior produção de NO. Dentre o grupo DPOC, o grupo DPOC III é o que apresenta maior produção de ROS em comparação com os grupos DPOC II e DPOC IV.

Portanto, diante do exposto, acreditamos que a utilização de CI diminui a inflamação sistêmica, uma vez que os pacientes do grupo DPOC IV apresentaram diminuição nos níveis citoplasmáticos de ROS quando comparado ao grupo DPOC III. Além disso, o estresse oxidativo no grupo DPOC IV foi semelhante ao grupo DPOC II, que apresentava estágio menos grave de DPOC, sugerindo melhora da inflamação sistêmica devido a utilização de CI. Além disso, este estudo pode servir de base para a utilização da produção citoplasmática de

ROS em células sanguíneas no monitoramento do agravamento da DPOC ou desenvolvimento de comorbidades.

7 CONCLUSÃO

A análise de estresse oxidativo por citometria de fluxo, através da marcação com sondas fluorescentes com afinidade pelo ânion superóxido, pelo peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, radicais hidroxila e peroxinitrito, mostrou que os pacientes dos grupos DPOC II, DPOC III, DPOC IV apresentam aumento dessas espécies reativas, quando comparados ao grupo Controle, devido a piora da função pulmonar e, provavelmente pela continuação da inflamação causada pelo tabaco.

Além disso, a diminuição de produção de ROS observada no grupo DPOC IV, pode ser explicada pelo uso de CI que, provavelmente, foi capaz de diminuir a inflamação sistêmica, aproximando os valores do estresse oxidativo neste grupo aos valores observados no grupo DPOC II que apresenta estágio menos grave da doença.

Portanto, os achados deste estudo sugerem que a citometria de fluxo pode ser utilizada para avaliação do estresse oxidativo sistêmico em pacientes com DPOC, auxiliando no monitoramento do agravamento desta doença e também no desenvolvimento de comorbidades associadas, através da determinação da produção citoplasmática de ROS.

8 REFERÊNCIAS

1 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Doenças respiratórias crônicas/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

2 Epidemiologia e Serviços de Saúde. Revista Sistema Único de Saúde do Brasil. 2012; 21(2)

- 3 Bousquet J, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008. *Allergy* 2008; 63(86):8–160
- 4 Franco R, Nascimento HF, Cruz AA, et al. The economic impact of severe asthma to low-income families. *Allergy* 2009; 64:478–483
- 5 Lopez AD, Shibuya K, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J* 2006; 27:397–412
- 6 II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica – DPOC. *J Bras Pneum Tisiol* 2004; 30(5)
- 7 Secretaria de Estado da Saúde. GEPDI/NASTS/SIM e SIH Estadual 2008. Dados estatísticos oficiais sobre internações causadas por DPOC. SESA, 2007
- 8 Global Tobacco Surveillance System (GTSS): purpose, productions and potencial. *J. Sch. Health* 2005; 75(1):15-24
- 9 Facina T. Pesquisa especial de tabagismo (PETab)- Relatório Brasil. *Rev. Bras. Cancerol.* 2011; 57(3):425-430
- 10 Filho VW, Mirra AP, et al. Tabagismo e cancer no Brasil: evidências e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2010; 13(2):175-187
- 11 The World Healthy Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. Geneve: World Health Organization; 2002
- 12 Gorecki D, Szpinda M, Wosniack A. Oxidant- antioxidant balance in the blood of patients with cronic obstructive pulmonary disease after smoking cessation. *Oxid Med Cell Longev.* 2013 ; 2013:1-9
- 13 Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmmonary disease. *Clin Chest Med* 2014; 35(1): 71-86
- 14 Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease: effects beyond of lungs. *Plos Med*; 2010(7)
- 15 Cavalcante AGM, Bruim PFC. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. *J Bras Pnem*; 2009; 35(12)

16 GOLD 2014 (Global strategy for the diagnosis, management and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease). Available in <http://www.goldcopd.com>

17 Hogg JC, Senior RM. Chronic obstructive pulmonary disease - part 2: pathology and biochemistry of emphysema. *Thorax*,2012; 57:830-834

18 Vijayan VK. Chronic obstructive pulmonary disease. *Indian J Med Res* 2013; 137(2):251-269

19 Kim V, Criner GJ. Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 2013; 187:228-23

20 Hu G, Zhou Y, et al. Risk of COPD from exposure to biomass smoke. *Chest* 2010; 138(1):20–31

21 Sangani RG, Ghio AJ. Lung injury after cigarette smoking is particle related. *International Journal of COPD* 2011; 6:191–198

22 Rubim AS, Castro Pereira AC, et al. Hiperresponsividade brônquica. *J. Pneumol* 2002; 28(3)

23 Faux SP, Tai T, et al. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke. *Biomarkers* 2009; 14(1):90-96

24 Lin JL, Thomas PS. Current perspectives of oxidative stress and its measurement in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *COPD* 2010; 7:291-306

25 Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2009; 33:1165–1185

26 Porpodis KN, Zaragoulidis P, et al. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *J Thorac Dis* 2014; 6(SI):S167-S172

27 Pandey R, Singh M, et al. Oxidative/nitrosative stress and the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease; *J Clin Diagn Res* 2013; 7(3):580–588

- 28 Owen CA. Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:373-385
- 29 Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* 2004; 56:515–548
- 30 Takizawa H, Tanaka M, et al. Increased expression of transforming growth factor- 1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1476–1483.
- 31 Mori AH, et al. Hypothesis: Does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 2003; 58:832–834
- 32 Zeng M, Li Y, Jiang Y, et al. Local and systemic oxidative stress and glucocorticoid receptor level in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Can Resp J* 2013; 20(1):35-41
- 33 Birben E, Sahiner UM, Kalayci O. Oxidatives stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012; 5(1):9-19
- 34 Stowe DF. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(6):1373-1414
- 35 Rahman I. Pharmacological antioxidant strategies as therapeutic interventions of copd. *Bioc and Biop A* 2012; 1822:714–728
- 36 Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol* 1996; 271(40):1424-1437
- 37 Kanazawa H, Shiraishi S, et al. Imbalance between levels of nitrogen oxides and peroxynitrite inhibitory activity in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2003; 58:106–109
- 38 Arja C, Surapaneni KM, et al. Oxidative stress antioxidant enzyme activity in South Indian male smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 2013; 18:1069-1075

- 39 Tavitani H, Nadi E, et al. Oxidative stress in COPD patients smokers, and non-smokers. *Resp Care* 2012; 57(12):2090-2094
- 40 Kirkham PA, Barnes PJ. Oxidative stress in COPD. *Chest* 2013; 144(1):266–273
- 41 Kessler R, Partridge MR, et al. Symptom variability in patients with severe COPD: a pan-European cross-sectional study. *Eur Respir J* 2011; 37:264-72
- 42 Sinden NJ, Stockley RA. Chronic obstructive pulmonary disease: an update of treatment related to frequently associated comorbidities. *Ther Adv Chronic Dis* 2010; 1(2):43-57
- 43 Cote C, Zilberberg MD, et al. Haemoglobin level and its clinical impact in a cohort of patients with COPD. *Eur Respir J* 2007; 29:923–929
- 44 Ohara T, Hirai T, et al. Relationship between pulmonary emphysema and osteoporosis assessed by CT in patients with COPD. *CHEST* 2008; 134:1244–1249
- 45 Hill K, Geist R, et al. Anxiety and depression in end-stage COPD. *Eur Respir J* 2008; 31:667–677
- 46 Spranger J, Kroke A, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*, 2003; 52(3):812-817
- 47 Predictors of accuracy of diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease in general practice. *Med J Aust* 2011; 195(4):168-171
- 48 Kon SSC, Canavan JL, et al. Minimum clinically important difference for the COPD assessment test: a prospective analysis. *Lancet Respir Med* 2014; 2:195–203
- 49 Shahab L, Jarvis M J, et al. Prevalence, diagnosis and relation to tobacco dependence of chronic obstructive pulmonary disease in a national representative population sample. *Thorax* 2006; 61:1043-104

- 50 Miller MR, Hankinson J. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26: 319–338
- 51 Hanania NA, Celli BR, et al. Bronchodilator reversibility in COPD. *Chest* 2011; 140(4):1055-1063
- 52 Rossi A, Cazzola M, et al. Long-acting β 2-agonists (LABA) in chronic obstructive pulmonary disease: efficacy and safety. *Int J of COPD* 2008; 3(4):521–529
- 53 Wise RA, Anzueto A, et al. Tiotropium respimat inhaler and the risk of death in copd. *N Engl J Med* 2013; 369:1491-501
- 54 Ejiófor S, Turner AM. Pharmacotherapies for COPD. *Clin Med Insights Circ Resp Pulm Med* 2013; 25(7):17-34
- 55 Drummond MB, Dasenbrook EC, Pitz MW, Murphy DJ, Fan E. Inhaled corticosteroids in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *JAMA* 2008; 300:2407-2416
- 56 Campagnaro BP, et al. Renovascular hypertension leads to DNA damage and apoptosis in bone marrow cells. *DNA Cell Biol* 2013; (8):458-66
- 57 Tonini CL, et al. Effects of aging and hypercholesterolemia on oxidative stress and DNA damage in bone marrow mononuclear cells in apolipoprotein E-deficient mice. *Int J Mol Sci* 2013; 14(2):3325-42
- 58 Rennard S, Decramer M, et al. Impact of COPD in North America and Europe in 2000: subjects perspective of confronting COPD international survey. *Eur Respir J* 2002; 20:799–805
- 59 Kosacz NM, et al. Chronic obstructive pulmonary disease among adults- United States, 2011. *CDC* 2012; 61(46):938-943
- 60 Dourado VZ, Tanni SE, et al. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol* 2006; 32(2):161-171
- 61 Halbert RJ, Natoli JL, et al. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2006; 28:523–532

62 Calverley PM, Walker P. Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* 2003; 362:1053-1061

63 Menezes AMB, Padilla RP, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *The Lancet* 2005; 366:1875-1881

64 Halbert RJ, Isonaka S, et al. Interpreting COPD prevalence estimates. *Chest* 2003; 123:1684–1692

65 Ochsner NY , Rabe KF. Systemic manifestations of COPD. *Chest* 2011; 139(1):165–173

66 Yoshida T, Tuder RM. Pathobiology of Cigarette Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Physiol Rev* 2007; 87:1047–1082

67 Sakata R, Gale PM, et al. Impact of smoking on mortality and life expectancy in Japanese smokers: a prospective cohort study. *BMJ* 2012; 345- 357

68 Vollset SE, Tverdal A, et al. Smoking and deaths between 40 and 70 years of age in women and men. *Ann Intern Med* 2006; 144(6):381-389

69 Scanlon PD, Connett JE, et al. Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(2):381– 390

70 Gamble E, Barnes NC, et al. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis. *Eur Respir J* 2007; 30:467-471

71 Dye JA, Adler KB. Effects of cigarette smoke on epithelial cells of the respiratory tract. *Thorax* 1994; 49(8):825-34.

72 Turato G, Di Stefano A, et al. Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 152(4):1262-1267.

73 Lapperre TS, Postma DS, et al. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. *Thorax* 2006; 61:115–121

- 74 Hill AT, Bayley D, Stockley RA. The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:893–898
- 75 Miravittles M, Worth H, Cataluña JJS, et al. Observational study to characterise 24-hour COPD symptoms and their relationship with patient-reported outcomes: results from the ASSESS study. *Resp Research* 2014; 15:122-141
- 76 Parshall MB, Schwartzstein RM, et al. An official american thoracic society statement: update on the mechanisms, assessment, and management of dyspnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185(4):435–452
- 77 Monteros MJE, Peña C, et al. Variability of respiratory symptoms in severe COPD. *Arch Bronconeumol* 2012; 48:3-7
- 78 Broekhuizen BDL, Sachs APE, et al. diagnostic management of chronic obstructive pulmonary disease. *Neth J Med* 2012; 70(1):6-11
- 79 Joo MJ, Au DH, et al. Determinants of spirometry use and accuracy of COPD diagnosis in primary care. *J Gen Intern Med* 2011; 26(11):1272-1277
- 80 Lange P., Groth S., et al. Effects of smoking and changes in smoking habits on the decline of FEV1. *Eur Respir J* 1989; 2:811-816
- 81 Ramos FL, Krahnke JS, Kim V. Clinical issues of mucus accumulation in COPD. *Int Journal of COPD* 2014; 9:139–150
- 82 Lee PN, Fry JS. Systematic review of the evidence relating FEV1 decline to giving up smoking. *BMC Med* 2010; 8:84-113
- 83 Willemsse BWM, Postma DS, et al. The impact of smoking cessation on respiratory symptoms, lung function, airway hyperresponsiveness and inflammation. *Eur Respir J* 2004; 23:464–476
- 84 Kanner RE, Anthonisen NR, et al. Lower respiratory illnesses promote FEV1 decline in current smokers but not ex-smokers with mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:358–364

- 85 Gan WQ, Man SFP, et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59:574–580
- 86 Repine JE, Bast A, et al. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:341–357
- 87 Sinden NJ, Stockley RA. Systemic inflammation and comorbidity in COPD: a result of 'overspill' of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence. *Thorax* 2010; 65:930-936
- 88 Vernooij JH, Jacobs JA, et al. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1218–1224
- 89 Agustí AGN, Noguera A, et al. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21:347–360
- 90 Saetta M, Di Stefano A, et al. CD81 T-Lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:822–826
- 91 Donohue JF. Ageing, smoking and oxidative stress. *Thorax* 2006; 61:461–462
- 92 Horváth I, Hunt J, Barnes PJ. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26:523–548
- 93 Rahman I, Swarska E. Is there any relationship between plasma antioxidant capacity and lung function in smokers and in patients with chronic obstructive pulmonary disease? *Thorax* 2000; 55:189–193
- 94 Moussa SB, Sfaxi I, et al. Oxidative stress and lung function profiles of male smokers free from COPD compared to those with COPD: a case-control study. *Lybian J Med* 2014; 9:238-251
- 95 Robbins RA, Millatmal T, et al. Smoking cessation is associated with an increase in exhaled nitric oxide. *Chest* 1997; 112:313-18

- 96 Ichinose M, Sugiura H , et al. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:701–706
- 97 Dekhuijzen PN, Aben KK, et al. Increase exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(3):813-816
- 98 Inonu H, Doruk S, et al. Oxidative stress levels in exhaled breath condensate associated with COPD and smoking. *Resp Care* 2012; 57:413-419
- 99 MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:258–266
- 100 Karner C, Cates CJ, et al. Combination inhaled steroid and long-acting beta2-agonist in addition to tiotropium versus tiotropium or combination alone for chronic obstructive pulmonary diseases *Cochrane Database Syst Reve* 2013; 3:1-39
- 101 Tashkin DP, Fergunson GT. Combination bronchodilatador therapy in the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Resp Research* 2013; 14:49-62
- 102 Troosters T, Celli B, et al. Tiotropium as a first maintenance drug in COPD: secondary analysis of the UPLIFT1 trial. *Eur Respir J* 2010; 36:65–73
- 103 Jones PW, Willits LR, et al. Disease severity and the effect of fluticasone propionate on chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Eur Respir J* 2003; 21:68–73
- 104 Saha S, Silva R, et al. COPD: an inhaled corticosteroid-resistant, oral corticosteroid-responsive condition. *Eur Respir J* 2006; 27(4):863-865
- 105 Culpitt SV, Maziak W, et al. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1635–1639

106 Culpitt SV, Maziak W, et al. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1999; 160:1635–1639

107 Hattotuwa KL, Gizycki MJ, et al. The effects of inhaled fluticasone on airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165:1592–1596

ANEXOS

1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada Determinação dos níveis citoplasmáticos de espécies reativas de oxigênio em pacientes ex tabagistas com doença pulmonar obstrutiva crônica no estado do Espírito Santo, sob a responsabilidade da pesquisadora Carla Cristiana de Castro Bulian.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender através do estudo do sangue coletado, se ainda há alterações que precipitem a progressão da doença DPOC. Visto que já estão em uso de medicações inalatórias e pararam de fumar.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pelo pesquisador Carla Cristiana de Castro Bulian, no Centro Regional de Especialidades, onde será coletado o sangue.

Na sua participação você fará a coleta de 3 - 5 ml de sangue, que irá ser analisado no Centro de Pesquisas Fisiológicas da UFES e avaliará o stress oxidativo. Será respondido um questionário sobre medicamentos inalatórios usados, tempo de uso e de parada do tabagismo. Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Não há nenhum risco neste trabalho.

Os benefícios serão a sua ajuda para esclarecer melhor esta doença nos pacientes aqui do estado do Espírito Santo e futuramente, ser base para pesquisa de novos tratamentos para o DPOC.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Carla Cristiana de Castro Bulian, telefones: 999425912, 36362684. Endereço: Universidade Vila Velha, Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Campus Boa Vista. Avenida Comissário José Dantas de Melo, número 21. Boa Vista, Vila Velha.

Vila Velha, _____ de 2014

Carla Cristiana de Castro Bulian

Eu, _____, portador do CPF número _____, aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

2 QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES DO PROGRAMA DE DPOC DE ESTADO DO ESPIRITO SANTO

1.Nome:

2.Idade:

3.Endereço:

4.Valores de espirometria:

5.Estágio de DPOC

6. Medicamentos usados

7. Faz uso correto da medicação?

8. Há quantos anos parou de fumar?

9. Fumou por quantos anos? (carga tabágica)

10. Contato com fogão a lenha?

11. Quanto tempo apresentou contato com fogão a lenha?

12. Há quanto tempo não tem contato com fogão a lenha?

13. Faz uso de alguma outra medicação?