

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Nílva Regina Gelamo Pelegrino

*Marcadores Inflamatórios Locais e
Sistêmicos em Tabagistas com e sem
Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica*

Botucatu-SP
2009

Nílva Regina Gelamo Pelegrino

**Marcadores Inflamatórios Locais e
Sistêmicos em Tabagistas com e sem
Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
“Fisiopatologia em Clínica Médica” da Faculdade de
Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista –
UNESP – para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof^a. Adjunta Dra. Irma de Godoy

**Botucatu-SP
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Pelegriño, Nilva Regina Gelamo.

Marcadores inflamatórios locais e sistêmicos em tabagistas com e sem
doença pulmonar obstrutiva crônica / Nilva Regina Gelamo Pelegriño. –
Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2009.

Orientadora: Irma de Godoy

Assunto CAPES: 40101002

1. Pulmões - Doenças obstrutivas - Estudo de casos 2. Tabagismo

CDD 616.24

Palavras chave: DPOC; Escarro induzido; Inflamação sistêmica; Tabagismo

Dedico esta tese à minha família, por ter sempre apoiado os meus projetos intelectuais e por termos juntos vencido tantos obstáculos, à minha orientadora que tanto me ensinou e com certeza também é responsável pelo meu crescimento profissional e a todos que depositaram alegria em minha vida.

Agradecimientos

A todos os indivíduos e pacientes que prontamente se dispuseram às nossas avaliações;

A Prof. Dra. Irma de Godoy, minha orientadora, que sempre me estimulou a crescer;

A Prof. Dra. Aparecida Yooko Outa Angeleli que acompanhou meu desenvolvimento profissional;

Aos queridos amigos de pesquisa: Renata Amaral, Fernanda, Márcia, Corina, Camila, Paulo, Suzana, Daniela, Karina, Renata Ferrari, Laura e Sandra que me ajudaram na coleta dos dados e, nas horas difíceis souberam apoiar e incentivar;

Às funcionárias do Laboratório de Função Pulmonar: Lurdinha, Lúcia, Eva e Mary que me ajudaram na recepção aos pacientes;

À Dra. Suzana Erico Tanni, médica pneumologista, e ao Hélio Rubens de Carvalho Nunes, estatístico do Grupo de Apoio à Pesquisa, que me auxiliaram na análise e interpretação dos dados;

À Associação Hospitalar de Bauru e ao Hospital Estadual de Bauru que, gentilmente, cederam horários para que eu pudesse desenvolver a pesquisa;

À minha família que, apesar de privados da minha convivência, sempre apoiaram minhas iniciativas.

Resumo

Introdução: A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) está associada a processo inflamatório; entretanto, a definição de quais marcadores participam do processo inflamatório local e sistêmico, e suas correlações com o tabagismo e com a intensidade de obstrução das vias aéreas, ainda não está esclarecida.

Objetivos: Avaliar simultaneamente a inflamação no sangue periférico e nas vias aéreas de tabagistas com e sem DPOC e avaliar a associação com o estado de tabagismo atual e com a gravidade da doença.

Casuística e Métodos: Foram avaliados 52 pacientes com DPOC moderada a muito grave com idade média de $63,6 \pm 8,9$ anos e $VEF_1(\%)$ $50,6 \pm 17,1$ e 20 indivíduos tabagistas com idade média de $49,1 \pm 6,2$ anos e $VEF_1(\%)$ $106,5 \pm 15,8$. Todos os indivíduos da pesquisa foram submetidos à avaliação clínica, espirometria pré e pós-broncodilatador, oximetria de pulso, avaliação nutricional, teste de caminhada de seis minutos (TC-6), indução e coleta de escarro e coleta de sangue para exames bioquímicos e dosagem dos seguintes mediadores inflamatórios: TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 e PCR.

Resultados: Os tabagistas sem obstrução das vias aéreas apresentaram maiores níveis séricos de TNF- α quando comparados aos pacientes com DPOC. Além disso, entre os pacientes com DPOC, aqueles que eram tabagistas ativos apresentaram elevação da concentração sérica de TNF- α em relação aos ex-tabagistas. A IL-6 e a PCR estavam elevadas nos pacientes com DPOC comparados aos tabagistas sem obstrução das vias aéreas. No escarro induzido os pacientes com DPOC apresentaram maiores níveis do TNF- α e da IL-10 em relação aos tabagistas. Em relação à gravidade da doença, houve aumento do TNF- α sérico nos pacientes com doença moderada em relação aos com DPOC grave ou muito grave, e elevação do TNF- α e da IL-10 no escarro induzido dos pacientes com doença muito grave quando comparados aos pacientes com DPOC grave e moderada. O estudo de regressão múltipla mostrou que o TNF- α está associado ao tabagismo ativo e a PCR com a presença da doença.

Conclusões: Em conclusão, indivíduos tabagistas e pacientes com DPOC apresentam processo inflamatório localizado e sistêmico, porém com diferenças entre os compartimentos e entre os grupos. O aumento de TNF- α sistêmico mostrou associação com o tabagismo ativo, enquanto em nível local apresentou associação com a presença da doença. Além disso, os níveis séricos de PCR e de IL-6 sérica parecem estar relacionados com a presença da DPOC.

Abstract

Introduction: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is an inflammatory disease; however, the markers that characterize the localized and systemic inflammation and their correlations with smoking status and the airways obstruction intensity are still unclear.

Objective: To evaluate simultaneously the inflammation in the peripheral blood and in the airways of smokers with and without COPD and also the association between inflammation, smoking status, and disease severity.

Methods: Fifty-two moderate to very severe COPD patients (mean age: 63.6±8.9 years; mean FEV₁(%): 50.6±17.1) and twelve smokers without COPD (mean age: 49.1±6.2; mean FEV₁(%): 106.5±15.8). All subjects underwent clinical evaluation, pre and post bronchodilator spirometry, gas exchange, body composition and six-minute walk distance measurements, and had peripheral blood and the induced sputum sampled. TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 and CRP concentrations were measured in the serum and induced sputum.

Results: Serum TNF- α was higher in smokers without COPD when compared to COPD patients. Besides, serum TNF- α was higher in active smokers patients with COPD when compared to ex-smokers COPD patients. Serum IL-6 and CRP were higher in COPD patients when compared smokers without airways obstruction. In induced sputum the COPD patients presented higher levels of TNF- α and IL-10 when compared with smokers without COPD. Values of the serum TNF- α were higher in patients with moderate COPD when compared with the patients with severe and very severe disease. TNF- α and IL-10 in induced sputum were higher in very severe COPD patients when compared with severe and moderate disease. Results of multivariate regression analysis showed that serum TNF- α was associated with active smoking. In contrast, serum CRP and sputum TNF- α were associated with the presence of COPD.

Conclusion: To summarize, smokers and COPD patients present local and systemic inflammatory process; however, there was differences between compartments and groups. The increase of serum TNF- α seems to be related with active smoking, whereas the mediator level in the sputum seems to be associated with presence of COPD. Besides, serum CRP and IL-6 levels seems to be related with the presence of COPD.

Palavras-Chaves

Palavras chaves:

DPOC, tabagismo, inflamação sistêmica, escarro induzido

Key words:

COPD, smoking, systemic inflammation, induced sputum

Lista de Tabelas e Figuras

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tabela 1. | Características gerais dos indivíduos estudados de acordo com a presença ou ausência de DPOC | 27 |
| Figura 1. | Box-plot das concentrações séricas de TNF- α (pg/mL) e IL-6 (pg/mL) nos indivíduos tabagistas sem DPOC e pacientes com DPOC | 28 |
| Figura 2. | Box-plot da concentração sérica da PCR (mg/L) nos indivíduos tabagistas sem DPOC e pacientes com DPOC | 28 |
| Tabela 2. | Indicadores séricos de inflamação dos indivíduos tabagistas sem DPOC e pacientes com DPOC | 29 |
| Figura 3. | Box-plot das concentrações de TNF- α (pg/mL) e da IL-10 (pg/mL) no sobrenadante do escarro induzido dos indivíduos tabagistas sem DPOC e pacientes com DPOC | 30 |
| Tabela 3. | Indicadores de inflamação no escarro induzido dos tabagistas sem DPOC e pacientes com DPOC | 30 |
| Figura 4. | a) Estudo da correlação entre a IL-8 (pg/mL) e a celularidade total ($\times 10^6$) do escarro induzido dos pacientes com DPOC; b) Estudo da correlação entre a IL-10 (pg/mL) do escarro induzido e o VEF ₁ (%) dos pacientes com DPOC.... | 32 |
| Tabela 4. | Características gerais dos pacientes com DPOC de acordo com o tabagismo atual | 33 |
| Tabela 5. | Indicadores séricos de inflamação nos pacientes com DPOC de acordo com o tabagismo atual | 34 |
| Tabela 6. | Indicadores de inflamação no sobrenadante do escarro induzido dos pacientes com DPOC de acordo com o tabagismo atual | 35 |
| Tabela 7. | Análise de regressão linear múltipla robusta com erro padrão para análise dos marcadores inflamatórios séricos e do escarro induzido | 36 |
| Tabela 8. | Características gerais dos pacientes com DPOC de acordo com a gravidade da doença | 38 |
| Tabela 9. | Classe de medicamentos em uso contínuo pelos pacientes estudados..... | 39 |
| Tabela 10. | Indicadores séricos de inflamação nos pacientes com DPOC de acordo com a gravidade da doença | 40 |
| Figura 5. | Box-plot das concentrações de TNF- α (pg/mL) e da IL-10 (pg/mL) no sobrenadante do escarro induzido dos pacientes com DPOC de acordo com a gravidade da doença | 41 |
| Tabela 11. | Indicadores de inflamação no sobrenadante do escarro induzido nos pacientes com DPOC de acordo com a gravidade da doença | 42 |

Lista de Abreviaturas

ATS: *American Thoracic Society*
CVF: Capacidade vital forçada
DP6: Distância percorrida em seis minutos
DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica
DTT: *Dithiothreitol*
GOLD: *Global initiative for obstructive lung disease*
IL: Interleucinas
IMC: Índice de massa do corpo
IMMC: Índice de massa magra do corpo
LBA: Lavado broncoalveolar
LPS: Lipopolissacáride
MCP-1: Proteína-1 quimiotática de monócitos
MMC: Massa magra do corpo
MMP: Metaloproteinases
MMP-9: Gelatinase-B
NF-κB: Fator nuclear kappa-B
ODP: Oxigenoterapia domiciliar prolongada
PaO₂: Pressão arterial de oxigênio
PBS: *Phosphate buffered saline*
PCR: Proteína C-reativa
SpO₂: Saturação periférica de oxigênio
sTNF-R: Receptor solúvel do fator de necrose tumoral alfa
TC-6: Teste de caminhada de seis minutos
TIMP-1: Inibidor de metaloproteinase tecidual
TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa
VEF₁: Volume expirado forçado no primeiro segundo
WHO: *World health organization*

| | |
|----------------------------|----|
| Introdução | 01 |
| Objetivos | 11 |
| Delineamento | 13 |
| Indivíduos e Métodos | 15 |
| Resultados | 26 |
| Discussão | 44 |
| Conclusões | 54 |
| Referências | 56 |
| Anexos | 70 |

Introdução

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença prevenível e tratável caracterizada pela limitação ao fluxo aéreo não totalmente reversível, geralmente progressiva, e associada a resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas ou gases nocivos (GOLD, 2007). O tabagismo é o principal fator de risco para a DPOC; entretanto, embora todos os fumantes apresentem evidências de inflamação pulmonar, somente na minoria a resposta inflamatória é amplificada e continua mesmo após a cessação do tabagismo (Turato et al. 1995; Willemse et al. 2005a; GOLD, 2007). De fato, a susceptibilidade genética individual e/ou a inadequada amplificação da resposta inflamatória ao estímulo tabágico são prováveis mecanismos de desenvolvimento da doença (Barnes et al. 2006).

Grande variedade de células incluindo macrófagos, neutrófilos e linfócitos distribuída ao longo das vias aéreas, vasculatura e parênquima pulmonar está envolvida na patogênese da DPOC (Chung & Adcock 2008). Entretanto, as características da inflamação que diferem os fumantes que desenvolvem a doença daqueles que não desenvolvem permanecem desconhecidas (Saetta et al. 1999; Retamales et al. 2001; Barceló et al. 2008). Entre os mecanismos celulares da inflamação destacou-se, inicialmente, o acúmulo de neutrófilos nas pequenas vias aéreas de pacientes com DPOC (Lams et al. 1998; Saetta et al. 1998). Estas células participam do desenvolvimento da doença por meio da liberação de enzimas proteolíticas que degradam a estrutura pulmonar e, também, de mediadores que atraem outras células inflamatórias; além disso, estão associadas com maior obstrução das vias aéreas (Saetta et al. 1999; Dentener et al. 2006; Franciosi et al. 2006; Rufino et al. 2007).

Além de neutrófilos, o processo inflamatório das vias aéreas e do parênquima pulmonar dos pacientes com DPOC também é caracterizado por aumento no

número de macrófagos e linfócitos CD8⁺ (Saetta et al. 1998, 1999). Os macrófagos alveolares liberam metaloproteinases (MMP) e citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 6 (IL-6) e 8 (IL-8). Estas citocinas ativam o endotélio vascular, o que aumenta a expressão das moléculas de adesão, e também promovem a quimiotaxia de neutrófilos. Estes neutrófilos liberam proteases que induzem destruição tecidual e perpetuam a produção de citocinas pró-inflamatórias. A produção aumentada de citocinas ativa proteínas como o fator nuclear kappa-B (NF- κ B) que atua na transcrição de genes pró-inflamatórios (TNF- α , IL-8 e MCP-1) colaborando com a perpetuação inflamatória (Barnes et al. 1997; Sadowska et al. 2005). Assim, o processo é amplificado pelo contínuo recrutamento de células e produção de mediadores inflamatórios.

Aumento da concentração de neutrófilos foi verificado no lavado broncoalveolar (LBA) de fumantes quando comparados aos não fumantes (Riise et al. 1995) e no escarro induzido de pacientes com DPOC em relação aos indivíduos saudáveis (Stănescu et al. 1996; Peleman et al. 1999; Rutgers et al. 2000; Betz et al. 2001; Malerba et al. 2006; Rufino et al. 2007). Pacientes com DPOC apresentam elevação da proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1) no escarro (de Boer et al. 2000), a qual é responsável pelo recrutamento de monócitos da circulação, aumento da proliferação e sobrevivência destas células dentro dos pulmões e, deste modo, aumenta o número de macrófagos no escarro destes pacientes (Traves et al. 2002). Os linfócitos T CD8⁺ também estão elevados nos fumantes com DPOC em relação aos não fumantes, sem diferença significativa quando os fumantes com DPOC foram comparados aos fumantes sem obstrução brônquica (Saetta et al. 1998, 1999). Estas células participam da destruição do parênquima pulmonar por meio da apoptose das células estruturais (Saetta et al. 1999).

Estudo recente mostrou alterações da subpopulação de linfócitos T em pacientes com DPOC; os autores observaram aumento de linfócitos T ativados (CD8+CD45RA+) e diminuição das células T regulatórias (CD4+CD25+) no LBA dos pacientes com DPOC quando comparados aos tabagistas com função pulmonar normal e ao grupo controle não-fumante. Na dosagem sérica nenhuma das subpopulações de linfócitos T estudadas apresentou diferença significativa entre os grupos. Assim, os autores sugerem que os linfócitos T CD8⁺ no LBA dos pacientes com DPOC estão na fase final de ativação-maturação que corresponde a fase com maior potencial de dano tecidual, e que há diminuição da modulação antiinflamatória, o que implicaria na amplificação do processo. Além disso, o estudo mostra que as respostas inflamatórias local e sistêmica são diferentes (Barceló et al. 2008).

Pacientes com DPOC também apresentam elevação das citocinas pró-inflamatórias nas vias aéreas (Vernooy et al. 2002; Donaldson et al. 2005; Willemse et al. 2005b). Keatings et al. (1996) mostraram aumento significativo do TNF- α no escarro induzido de pacientes com DPOC quando comparados aos fumantes sem obstrução das vias aéreas. No mesmo sentido, aumento do receptor solúvel de TNF- α R55 (sTNF-R55) no escarro induzido dos pacientes com DPOC comparados aos fumantes sem DPOC e correlação negativa entre o sTNF-R55 e o VEF₁(%) foram observados em outro estudo (Vernooy et al. 2002). Além disso, verificou-se aumento da produção de TNF- α por linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ do LBA dos pacientes com DPOC fumantes ativos comparados aos DPOC ex-fumantes e, também, nos pacientes com DPOC em relação aos fumantes sem obstrução da vias aéreas (Hodge et al. 2007). Turato et al. (1995) verificaram que a produção de TNF- α nas células da mucosa das vias aéreas de ex-tabagistas após 1 ano de

abstinência, é similar a dos fumantes ativos, sugerindo que a produção de TNF- α nas vias aéreas permanece mesmo após a cessação do tabagismo. Estudos em animais também mostraram elevação do TNF- α no LBA após exposição aguda e crônica ao cigarro (Churg et al. 2003, 2004). Por outro lado, alguns autores não observaram diferença estatística significativa nos níveis de TNF- α no escarro induzido de pacientes com DPOC quando comparados ao grupo de fumantes sem DPOC, controle saudável e pacientes asmáticos (Xiao et al. 2005; Dentener et al. 2006) ou associação significativa entre o TNF- α no escarro induzido e a gravidade da doença (Hacievliyagil et al. 2006).

O TNF- α pode estimular a produção e liberação de outras citocinas (Schulz et al. 2003, 2004). Patel et al. (2003) observaram que os níveis basais de IL-6 e IL-8 na cultura de células brônquicas foram similares entre os grupos com DPOC e fumantes sem DPOC; entretanto, após estímulo com TNF- α houve aumento da produção destas citocinas na cultura de células dos pacientes com DPOC, sem diferença significativa na cultura de células dos fumantes. A IL-8 é quimiotática e ativadora de neutrófilos (Richman-Eisenstat et al. 1993; Fujimoto et al. 2005) e estes, quando ativados, produzem elastase que é responsável pelo aumento da expressão do gene da IL-8 nas células epiteliais das vias aéreas, perpetuando o ciclo inflamatório (Nocker et al. 1996; Hill et al. 1999). De fato, estudos sugerem que as células epiteliais das vias aéreas são fontes de IL-8 (Cromwell et al. 1992; Schulz et al. 2003), e esta citocina participa do desenvolvimento da DPOC (Tanino et al. 2002). Diversos autores observaram elevação da IL-8 no LBA e da sua produção na cultura de células brônquicas de pacientes com DPOC comparados aos fumantes sem obstrução das vias aéreas e ao grupo controle não-fumante (McCrea et al. 1994; Pesci et al. 1998; Patel et al. 2003; Fuke et al. 2004;

Drost et al. 2005). A IL-8 também está aumentada no escarro induzido de fumantes com limitação ao fluxo aéreo quando comparados aos fumantes com espirometria normal (Kwon et al. 1994; Willemse et al. 2005b) e apresenta correlação positiva com o número de neutrófilos (Keatings et al. 1996; Yamamoto et al. 1997; Parr et al. 2006). Outros autores observaram correlação negativa da IL-8 no escarro com o VEF₁(%) (Vernooy et al. 2002; Ziora et al. 2007). Por outro lado, metanálise que estudou os marcadores inflamatórios na DPOC mostrou que há tendência de aumento da IL-8 a medida que aumenta a gravidade da doença, porém sem diferença estatística significativa entre os grupos (Franciosi et al. 2006).

A IL-6 é um marcador inflamatório com participação incerta na patogênese da DPOC. Pode apresentar efeito pró e anti-inflamatório, está ligada a ativação da NFκB e aumentada no escarro (Hacievliyagil et al. 2006), lavado broncoalveolar (Bronmik et al. 2000; Weidong et al. 2001) e condensado expiratório (Bucchioni et al. 2003) dos pacientes com DPOC em relação ao controle não-fumante. Donaldson et al. (2005) observaram que a IL-6 no escarro induzido dos pacientes com DPOC estável aumenta 9 pg/mL/ano e apresenta correlação negativa com o VEF₁(%).

Poucos estudos avaliaram o papel da IL-10 na regulação inflamatória em pacientes com DPOC. Takanashi et al. (1999) mostraram que a concentração de IL-10 estava diminuída no escarro induzido dos pacientes com DPOC comparados ao grupo fumante sem obstrução das vias aéreas, sugerindo déficit na regulação anti-inflamatória nestes pacientes. Outros autores observaram aumento da produção de IL-10 nos macrófagos do LBA de fumantes sem limitação ao fluxo aéreo em relação aos não-fumantes, antes e após estimulação com lipopolissacáride (LPS). Além disso, macrófagos após exposição a dosagens crescentes de IL-10,

apresentaram aumento na produção do inibidor de metaloproteinase tecidual-1 (TIMP-1) sem alteração na produção da gelatinase-B (MMP-9) e diminuição da produção e liberação de TNF- α (Lim et al. 2000). Este estudo sugere que a IL-10 participa da modulação do balanço das proteases e anti-proteases nos macrófagos das vias aéreas de indivíduos fumantes, sendo responsável pela diminuição da produção de citocinas como o TNF- α .

Além da inflamação local, os pacientes com DPOC apresentam inflamação sistêmica caracterizada por aumento de células inflamatórias no sangue periférico como neutrófilos, monócitos e linfócitos, aumento da proteína C-reativa (PCR) e dos mediadores inflamatórios sistêmicos como a IL-6, IL-8 e TNF- α (Dentener et al. 2001; Vernooy et al. 2002; Gan et al. 2004). Os mecanismos do processo inflamatório sistêmico em pacientes com DPOC ainda não está totalmente esclarecido e várias hipóteses para seu desenvolvimento e amplificação são propostas.

A exposição crônica ao cigarro promove aumento de 20-25% nos leucócitos no sangue periférico por meio da estimulação da hematopoiese e consequente liberação precoce das células para a circulação (van Eeden & Hogg 2000). Relata-se também, aumento da PCR em pacientes com DPOC comparados aos fumantes sem DPOC e controles não-fumante (Dentener et al. 2001; Gan et al. 2005; Pinto-Plata et al. 2006; de Torres et al. 2006; Higashimoto et al. 2008; Karadag et al. 2008). Além disso, pacientes com DPOC fumantes ativos tem aumento da PCR em relação aos DPOC ex-tabagistas (Pinto-Plata et al. 2006). Outros dados sugerem que a PCR não apresenta correlação com o prognóstico e gravidade da doença (de Torres et al. 2008; Karadag et al. 2008), mas mostra

correlação positiva com o nível sérico da IL-6 (Godoy et al. 2003; Sin et al. 2004; Broekhuizen et al. 2006).

A IL-6 estimula a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado e elevação no nível de IL-6 sérico foi descrito em pacientes com DPOC em relação ao controle fumante (Higashimoto et al. 2008) e não-fumante (Godoy et al. 2003; Broekhuizen et al. 2006). Além disso, Zeidel et al. (2002) verificaram aumento da secreção de IL-6 nas células mononucleares de indivíduos fumantes comparados aos não-fumantes. Por sua vez, outros autores não observaram diferença significativa na IL-6 sérica entre grupo DPOC e controle não-fumante, assim como não havia correlação entre a concentração sérica desta citocina e a gravidade da doença nos pacientes com DPOC (Karadag et al. 2008).

No estudo da fisiopatologia da doença outras citocinas séricas também foram pesquisadas. Alguns dados mostram que o TNF- α sérico está aumentado em pacientes com DPOC em relação a indivíduos sem doença respiratória e, no grupo com DPOC, está elevado no grupo tabagista comparado aos ex-tabagistas (Higashimoto et al. 2008); além disso, parece estar mais elevado nos pacientes com doença de maior gravidade ($VEF_1 < 50\%$) (Karadag et al. 2008). Outros autores verificaram que enquanto as células do escarro de tabagistas e pacientes com DPOC produziam TNF- α espontaneamente, sem aumento após estimulação com LPS, as células do sangue produziam TNF- α somente após estimulação. com LPS (Dentener et al. 2006). Assim, os estudos sugerem que há sobreposição do estado inflamatório local e sistêmico, mas com diferentes mecanismos reguladores em cada compartimento (Vernooy et al. 2002; Dentener et al. 2006). Na cultura de células mononucleares do sangue periférico, indivíduos fumantes apresentaram elevada produção de TNF- α em relação ao controle não-fumante (Zeidel et al. 2002). Alguns

autores verificaram se as alterações que ocorrem durante a evolução da doença poderiam ativar o processo inflamatório sistêmico. Assim, estudo verificou a relação entre a hipoxemia arterial e os níveis séricos de TNF- α e de seus receptores (sTNF-R55 e sTNF-R75) em pacientes com DPOC e observou correlação negativa entre o TNF e seus receptores e a pressão arterial de oxigênio (PaO₂) (mmHg), sugerindo que a hipóxia pode participar da ativação e amplificação do processo inflamatório (Takabatake et al. 2000).

Poucos estudos verificaram a dosagem sérica de IL-8 e IL-10 nestes pacientes. Kanazawa et al. (1996) observaram que pacientes com DPOC apresentaram elevação da IL-8 sérica em relação ao grupo controle não-fumante. Outros autores mostraram níveis similares de IL-8 sérico em pacientes com DPOC comparados a indivíduos sem doenças respiratórias (Higashimoto et al. 2008) e pacientes asmáticos (Hollander et al. 2007). Barceló et al. (2006) observaram semelhante expressão intracelular de IL-10 em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico entre os grupos de pacientes com DPOC, fumantes sem obstrução das vias aéreas e não-fumantes.

Em resumo, a DPOC está associada ao processo inflamatório localizado e sistêmico. No escarro induzido, os estudos mostram elevação do número de células inflamatórias como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos e das citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-8 nos pacientes com DPOC e possível correlação destes marcadores com a gravidade da doença. A IL-10 pode estar diminuída nestes pacientes, promovendo um desequilíbrio entre o estado inflamatório e a capacidade anti-inflamatória, responsável pelo desenvolvimento da doença. Em nível sérico, alguns estudos mostram elevação destes marcadores inflamatórios nos pacientes com DPOC; entretanto, a relação com a gravidade da doença não está estabelecida.

Os poucos estudos que avaliaram simultaneamente a inflamação na via aérea e no sangue periférico indicam que existem diferenças nas características dos mediadores e na modulação inflamatória em nível local e sistêmico. Assim, a definição de quais marcadores estão participando do processo inflamatório e suas correlações com a intensidade de obstrução das vias aéreas e com as alterações sistêmicas da doença, não está esclarecida. Portanto, o presente estudo foi desenvolvido no sentido de avaliar os marcadores inflamatórios localizados e sistêmicos em indivíduos fumantes com e sem DPOC, assim como suas correlações com o tabagismo e com o grau de obstrução das vias aéreas.

Objetivos

- ✚ Avaliar os marcadores de inflamação no escarro induzido e no sangue periférico de tabagistas com e sem DPOC;

- ✚ Avaliar a associação do estado inflamatório sistêmico e localizado com o tabagismo ativo;

- ✚ Avaliar a associação do estado inflamatório com a gravidade da doença.

Definimento

Delineamento

Este estudo é um dos projetos incluídos na pesquisa clínica intitulada “Papel dos Mediadores Inflamatórios e da Vitamina A em Diferentes Estádios e nas Manifestações Clínicas da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica” e no projeto de pesquisa “Padronização do Perfil Normal de Citocinas em Fumantes e Não Fumantes. Efeito do Sexo e do Envelhecimento”, ambos financiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [processos n° 2004/00517-4 e n° 2003/05285-1, respectivamente].

Todos os objetivos e procedimentos do estudo foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp (Ofício n° 370/2004 - CEP) (Anexo 1). Todos os pacientes receberam informações sobre o estudo e foram incluídos e avaliados após assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

Os pacientes foram convidados a comparecer em dia previamente agendado para realização de avaliação clínica, espirometrias pré e pós broncodilatador, dosagem dos gases arteriais nos pacientes com DPOC grave e muito grave, avaliação da oximetria de pulso em todos os sujeitos da pesquisa e avaliação nutricional. Em dia adicional, após 12 horas de jejum, os pacientes retornaram para coleta de sangue periférico para análise bioquímica e da inflamação sistêmica, realizaram procedimento para coleta do escarro induzido e teste de caminhada de seis minutos (TC-6). Em seguida, após lanche, os pacientes foram dispensados.

Indivíduos e Métodos

Indivíduos

Foram avaliados cinquenta e dois pacientes, de ambos os gêneros, com DPOC nos estádios II, III e IV (GOLD, 2007), atendidos no Ambulatório de Pneumologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp. O diagnóstico de DPOC foi realizado por meio da história clínica, exposição aos fatores de risco, e confirmado pela presença de obstrução ao fluxo aéreo na espirometria pós-broncodilatador [volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) /capacidade vital forçada (CVF) $< 0,70$, ou seja, $VEF_1/CVF < 0,70$] (Jardim et al. 2004; GOLD, 2007).

Os critérios de inclusão foram: estabilidade clínica caracterizada pela ausência de exacerbações nos últimos três meses e uso regular de medicação, incluindo o uso de oxigenoterapia domiciliar prolongada (ODP). Os critérios de exclusão foram: o uso de corticosteróide sistêmico nos últimos três meses, a presença de outras doenças respiratórias associadas, ou diagnóstico de outras doenças crônicas como diabetes mellitus (DM), câncer, insuficiência cardíaca, insuficiência coronariana, renal ou hepática. Também foram excluídos os pacientes que apresentaram, na espirometria, aumento do VEF_1 maior que 15% ou 200 mL após administração de broncodilatador.

No Serviço de Cessação do Tabagismo ou por meio de cartazes distribuídos no Hospital das Clínicas de Botucatu, foram selecionados vinte indivíduos fumantes, com carga tabágica > 10 anos/maço, sem diagnóstico de qualquer doença crônica ou uso de medicações e com espirometria após broncodilatador apresentando valores de $VEF_1/CVF > 0,70$.

Métodos

Avaliação clínica e laboratorial

Todos os sujeitos da pesquisa foram avaliados por meio da história clínica e exame físico completo. A avaliação laboratorial incluiu hemograma completo, glicemia de jejum, proteínas totais e frações, lipidograma, função hepática e renal. A gasometria arterial foi realizada apenas nos pacientes com DPOC grave e muito grave. Foi também realizado radiograma do tórax nas posições pósterio-anterior e perfil e eletrocardiograma de doze derivações.

Espirometria pré e pós broncodilatador

A espirometria foi realizada em sistema computadorizado de função pulmonar (Ferraris KOKO, Louisville, CO 80027, USA), de acordo com os critérios da *American Thoracic Society* (ATS, 1987). Foram medidos a CVF em litros (L) e o VEF₁ em litros (L) e calculada a razão entre as duas medidas (VEF₁/CVF), antes e vinte minutos após a administração do broncodilatador fenoterol (400mcg) por via inalatória. Os valores da CVF e do VEF₁ também foram expressos em porcentagem dos valores de referência (Knudson et al. 1983).

Gases Arteriais e Oximetria de Pulso

A saturação periférica de oxigênio (SpO₂) foi avaliada em todos os pacientes por meio de oxímetro portátil Onyx (Model 9500 Oximeter, Nonin Medical Inc., Plymouth, MN, USA). Nos pacientes com DPOC estadio III e IV os gases arteriais foram avaliados em sangue coletado por meio de punção da artéria radial, com o

paciente em repouso e respirando ar ambiente. A dosagem foi realizada em analisador de gases (Stat Profile 5 Plus – Nova Biomedical, Waltham, MA, USA).

Avaliação Nutricional

A composição do corpo foi avaliada por meio da antropometria e da impedância bioelétrica.

Antropometria: o peso do corpo (kg) e a estatura (m) foram quantificados em balança Filizola®, com o paciente descalço e utilizando roupas leves. O Índice de Massa do Corpo (IMC) foi calculado com base no peso e na estatura pela fórmula: [peso (kg) / altura (m)²] (Frisancho, 1981). No grupo de tabagistas foram considerados com sobrepeso os indivíduos que apresentassem IMC >24,9 kg/m², com obesidade IMC >29,9 kg/m² e com desnutrição IMC <18,5 kg/m² (WHO, 2000), e no grupo de pacientes com DPOC, foram considerados com sobrepeso IMC >24,9 kg/m², obesidade IMC ≥ 30,0 kg/m² e com desnutrição os pacientes com IMC < 20,0 kg/m² (WHO, 2007).

Impedância bioelétrica: a resistência e reatância foram medidas na posição supina, do lado direito do corpo, de acordo com o protocolo da ESPEN 2004 (BIA 101, RJL systems, Detroit, MI, USA) (Kyle et al. 2004). Nos pacientes com DPOC a estimativa da massa magra do corpo (MMC) em kilogramas (kg) foi feita por meio da equação de regressão para pacientes com insuficiência respiratória desenvolvida por Kyle et al. (1998): $MMC = -6,06 + (estatura \times 0,283) + (peso \times 0,207) - (resistência \times 0,024) + [sexo \text{ (masculino}=1; \text{feminino}=0) \times 4,036]$. Para a estimativa de MMC nos indivíduos tabagistas foi utilizada a equação de regressão específica para indivíduos saudáveis desenvolvida por Kyle et al. (2001): $MMC = -4,104 + (0,518 \times estatura^2/resistência) + 0,231 \times peso + (0,130 \times reatância) + 4,229 \times sexo$

(masculino=1; feminino=0). O Índice de Massa Magra do Corpo (IMMC) foi calculado pela divisão da MMC (kg) pela estatura² (m). O critério de depleção de massa magra foi: IMMC < 16 kg/m² para homens e < 15 kg/m² para mulheres (Schols et al. 1993).

Teste de caminhada de seis minutos

O teste de caminhada de seis minutos (TC-6) foi realizado de acordo com as recomendações da *American Thoracic Society* (ATS, 2002). Os pacientes foram instruídos a caminhar o máximo possível durante seis minutos em um corredor de 30 metros, com chão devidamente demarcado. Durante a caminhada foi realizado encorajamento verbal padronizado. Os pacientes podiam parar durante o teste, mas foram orientados a retomar a caminhada assim que se sentissem capazes. Após seis minutos, foram orientados a parar de andar e foi mensurada a distância total percorrida em seis minutos (DP6), em metros. Os pacientes com hipoxemia crônica ou que apresentaram SpO₂<85% durante o teste foram suplementados com oxigênio por meio de cateter nasal e um fisioterapeuta caminhava ao lado do paciente levando o cilindro de oxigênio em carrinho portátil.

Coleta de sangue

O sangue venoso colhido em tubo vacutainer de 10 ml com heparina foi centrifugado em centrífuga refrigerada (Eppendorf® 5403) a 1000 rpm durante 5 minutos e o plasma do topo dos tubos foi retirado e centrifugado novamente para a obtenção de plasma límpido. As amostras de 220µl foram armazenadas em freezer à -80°C para posterior análise.

Coleta e processamento do escarro Induzido

O escarro foi induzido pela metodologia modificada de Popov et al. (1995). Os indivíduos foram pré medicados com 2 *puffs* de 200µg de salbutamol (Pizzichini et al. 2002) e, após um período de 15 minutos, foi medido o pico de fluxo expiratório basal do paciente (Electronic Peak Flow/FEV₁ Meter, Ferraris Respiratory Europe Ltda, NW, UK). Após, os pacientes receberam inalações com solução salina hipertônica em concentrações crescentes de 3%, 4% e 5%, com duração de 7 minutos cada (Spanevello et al. 2000), realizadas em temperatura ambiente, com nebulizador ultrassônico (Schill Ultrasonic nebulizers LS260, Otto Schill GmbH & Co.KG, Villeneuve, LOT, France), com débito de 2,4 ml/min e geração de partículas de 4,5 µm (Kelly et al. 2002). Ao final de cada inalação os pacientes enxaguaram a boca com água e assoaram o nariz para minimizar a contaminação do expectorado com saliva e secreção pós-nasal, respectivamente (Pizzichini et al. 1996). Os pacientes realizaram manobra para tossir e coletaram o escarro em um mesmo recipiente estéril (Twaddell et al. 1996; Cai et al. 1998). Foram consideradas adequadas as amostras obtidas após período mínimo de 14 minutos de inalação e com volume de escarro coletado maior que 2 mL (Paggiaro et al. 2002). Após realizar cada inalação, os pacientes foram submetidos à reavaliação clínica e do pico de fluxo expiratório (Paggiaro et al. 2002) e, caso ocorresse queda de 20% ou mais do valor basal do mesmo ou piora clínica significativa, a indução era interrompida e cancelada (Tsoumakidou et al. 2003).

Todo o procedimento de indução do escarro foi realizado dentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp), acompanhado por médico e enfermagem para atendimento de eventuais intercorrências.

As amostras de escarro obtidas foram analisadas no prazo de, no máximo, 2 horas após a coleta (Efthimiadis et al. 2002). A secreção pulmonar coletada foi transferida para uma placa de Petri, separada a saliva e selecionadas as porções mais densas (Gibson et al. 1989) que foram colocadas em tubo de polipropileno (15 mL), onde foram pesadas. Com uma pipeta manual foi selecionada uma amostra do escarro e colocada uma gota sobre uma lâmina, realizando esfregaço simples que, após secar ao ar livre, foi corado com corante de Leishman (Saraiva-Romanholo et al. 2003). A contagem da celularidade diferencial foi realizada em microscópio óptico comum (Reichert-Jung model 150, Cambridge Instruments Inc., NY, USA), em aumento de 1000 vezes, considerando-se adequada a amostra com número de células escamosas menor que 80% (Pizzichini et al. 2002).

O material mucoso separado no tubo de polipropileno foi tratado com volume de dithiothreitol (DTT) igual a até quatro vezes o peso do escarro, em miligramas (Pizzichini et al. 1996). O material foi diluído em 0,1% de tampão fosfato (PBS – phosphate buffered saline) (Kanazawa et al. 1997), homogeneizado por 15 segundos em agitador (Maxi Mix II, model 37615, Boenstead/Thermolyne, Iowa, USA) e após, colocado em banho-maria a 37°C por 20 minutos (Efthimiadis et al. 2002). Em seguida, o material foi filtrado em filtro de nylon com poros de 48µm (BD Biosciences, BD Falcon REF 352340, MA, USA) para remover os restos celulares e o muco remanescente (Pizzichini et al. 1996). A suspensão resultante foi colocada em centrífuga (Shandon III, Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA) a 4°C, rotação de 4.000 rpm, por 10 minutos. Na seqüência, o sobrenadante foi aspirado em pipeta automática Eppendorf Research® e armazenado em tubos Eppendorf® a -80°C (Fahy et al. 1993; Prince et al. 2005)

para dosagens posteriores das citocinas. O botão de células foi re-suspenso em 100µL de PBS, ajustado para uma concentração de $1,0 \times 10^6$ /mL (Pizzichini et al. 1998), o número absoluto de células por mililitro de escarro foi calculado por meio de uma câmara de Neubauer e a viabilidade celular obtida pelo método de exclusão usando-se o corante *Trypan Blue* e considerando-se as coradas em azul como não viáveis (Pizzichini et al. 1996).

Dosagem dos mediadores inflamatórios no soro e no sobrenadante do escarro induzido

As dosagens das citocinas TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 no soro e no sobrenadante do escarro induzido foram realizadas em duplicata, por meio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) comercialmente disponíveis (BioSource International Inc., Ca, USA). Nas dosagens do sobrenadante do escarro induzido os kits apresentavam os seguintes limites de detectabilidade: TNF- α : kit ultra-sensível de 0,5 a 32,0 pg/mL (Human TNF α US – Cytoscreen) e de 0,16 a 10,0 pg/mL; IL-6: kit normal de 2,0 pg/mL (Human IL6 US – Cytoscreen); IL-8: kit normal de < 5,0 pg/mL (Human IL8 US – Cytoscreen); IL-10: kit ultra-sensível de 0,0 – 112,0 pg/mL e kit normal de 11 – 1335 pg/mL (Human IL10 US – Cytoscreen). As dosagens séricas foram realizadas com kits ultra-sensíveis com os seguintes limites de detectabilidade: TNF- α : 0,5 a 32,0 pg/mL (Human TNF α US – Cytoscreen); IL-6 : 0,16 a 10,0 pg/mL (Human IL6 US – Cytoscreen); IL-8: 0,39 a 25,0 pg/mL (Human IL8 US – Cytoscreen); IL-10: 0,0 a 112,0 pg/mL (Human IL10 US – Cytoscreen).

A técnica de dosagem das citocinas seguiu as recomendações da empresa fornecedora dos kits. Resumidamente, esta técnica corresponde a ELISA tipo “sanduíche” de fase sólida, em que as células da microplaca são cobertas pelo

anticorpo específico para a citocina em questão. Amostras, controle e padrão são pipetados nestas células. Durante a primeira incubação, a citocina liga-se ao anticorpo imobilizado no local (captura). Após lavagem, anticorpo biotilado específico para a citocina é adicionado. Durante a segunda incubação, este anticorpo liga-se à citocina capturada durante a primeira incubação. Após remoção do excesso do segundo anticorpo, a enzima estreptavidina-peroxidase é adicionada. Esta liga-se ao anticorpo biotilado para completar o sanduíche de quatro camadas. Após a terceira incubação e lavagem para remover toda a enzima não ligada, uma solução de substrato é adicionada, a qual age sobre a enzima ligada, para produzir cor. A intensidade do colorido é diretamente proporcional à concentração da citocina presente na amostra original.

Determinação da Proteína C Reativa (PCR) no sangue

A proteína C reativa (PCR) foi quantificada em duplicata, utilizando kit ultra-sensível comercialmente disponível (CardioPhase, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, USA) e com sensibilidade de 0,007mg/L. A técnica utilizada foi de imunonefelometria com a utilização do equipamento Dade Behring® (Behring Diagnostic Inc, Westwood MA). Este kit contém suspensão de partículas de poliestireno revestidas com anticorpo monoclonal específico derivado de rato que se liga à PCR humana, formando aglutinados que dispersam a luz irradiada. A intensidade da luz dispersa depende da concentração da respectiva proteína na amostra. A avaliação foi feita comparando-se com a curva de referência obtida por calibração dos pontos múltiplos por meio das diluições com N Standard reumatológico SL com N Diluente pertencente ao kit.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se os pacotes estatísticos SigmaStat 3.2 (Inc, Chicago, IL, USA), SPSS 12.0 versão 2003 (Inc, Chicago, IL, USA) e Stata software 9.0 (Stata Corp, College Station, Texas, USA).

A análise descritiva foi realizada para o estudo das características dos pacientes. As comparações de dois grupos (tabagista e DPOC) para variáveis de distribuição normal foi realizada utilizando-se o teste “t” de Student e para as variáveis com distribuição não-normal foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para comparação de mais de dois grupos (tabagistas e DPOC de acordo com a gravidade) foi utilizado a ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey para aquelas com distribuição normal e Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn’s para as variáveis com distribuição não-normal. Para comparação de mais de dois grupos com ajuste para a idade e para o tabagismo foi utilizada a ANCOVA seguida do teste de Tukey. A análise de duas variáveis qualitativas binárias com frequência esperada maior que cinco utilizou o teste Chi-quadrado e aquelas com frequência esperada menor que cinco utilizou o teste exato de Fisher.

Para o estudo de correlação entre as variáveis funcionais e inflamatórias foi utilizado teste de correlação de Pearson ou Spearman, para variáveis paramétricas e não-paramétricas, respectivamente.

Para a avaliação dos fatores associados com os marcadores de inflamação foi utilizado a regressão linear múltipla robusta com erro padrão. Foram incluídas duas variáveis independentes. As citocinas TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 e a PCR foram variáveis dependentes e a presença da doença (sim/não) e o tabagismo (sim/não) foram os fatores determinantes avaliados. As variáveis explicativas foram

selecionadas levando em consideração a conhecida associação com o atributo estudado.

Resultados

Características gerais dos indivíduos estudados de acordo com a presença ou ausência de DPOC

As características gerais dos 20 tabagistas sem DPOC e dos 52 pacientes com DPOC estão apresentadas na **Tabela 1**. Os grupos eram homogêneos quanto ao gênero; entretanto, os indivíduos tabagistas eram significativamente mais jovens que os pacientes com DPOC. Como esperado, a obstrução das vias aéreas avaliada por meio do VEF₁(%), CVF(%) e relação VEF₁/CVF(%) foi significativamente maior no grupo com DPOC que também apresentou maior carga tabágica e menores valores de SpO₂(%) e DP6 (m).

Não foram observadas diferenças significativas quanto aos valores médios dos atributos de composição do corpo entre os grupos. Entretanto, na análise individual, a prevalência de sobrepeso (IMC = 25,0 – 29,9 kg/m²) foi similar entre os grupos (25% nos tabagistas *versus* 27% no DPOC) e a de obesidade (IMC ≥30,0 kg/m²) foi maior no grupo DPOC (23% *versus* 10% nos tabagistas; p=0,020). O IMC < 18,5 kg/m² foi observado em 5% dos indivíduos tabagistas e IMC <20,0 kg/m² em 9% dos pacientes com DPOC. O IMC < 15 kg/m² para mulheres e < 16 kg/m² para homens foi observado em 15% dos tabagistas e 40% no grupo DPOC, sem diferença significativa entre os grupos.

Tabela 1: Características gerais dos indivíduos estudados de acordo com a presença ou ausência de DPOC.

| | Tabagistas N = 20 | DPOC N = 52 | Valor p |
|----------------------------|----------------------|----------------|---------|
| Idade (anos) | 49,1 ± 6,2 | 63,6 ± 8,9 | < 0,001 |
| Gênero (M/F) | 15 / 5 | 32 / 20 | 0,130 |
| VEF ₁ (L) | 3,1 ± 0,5 | 1,2 ± 0,4 | < 0,001 |
| VEF ₁ (%) | 106,5 ± 15,8 | 50,6 ± 17,1 | 0,006 |
| CVF (L) | 4,0 ± 0,7 | 2,3 ± 0,6 | < 0,001 |
| CVF (%) | 114,9 ± 15,4 | 84,8 ± 15,8 | < 0,001 |
| VEF ₁ /CVF (%) | 76,0 ± 4,0 | 50,0 ± 12,0 | < 0,001 |
| DP6 (m) | 518,5 ± 123,0 | 411,0 ± 89,1 | < 0,001 |
| Carga tabágica (anos/maço) | 34,0 ± 18,5 | 52,8 ± 32,9 | 0,007 |
| SpO ₂ (%) | 96,4 ± 1,2 | 90,3 ± 5,8 | < 0,001 |
| IMC (kg/m ²) | 23,9 ± 3,9 | 25,8 ± 5,4 | 0,163 |
| IMMC (kg/m ²) | 17,2 ± 1,8 | 16,0 ± 2,2 | 0,072 |

Os dados estão apresentados em média ± 1 desvio-padrão.

M/F = masculino / feminino; VEF₁ = volume expirado no primeiro segundo; CVF = capacidade vital forçada; DP6 = distância percorrida em seis minutos; SpO₂ = saturação periférica de oxigênio; IMC = índice de massa do corpo; IMMC = índice de massa magra do corpo.

Na análise dos indicadores séricos de inflamação os tabagistas apresentaram valores elevados de TNF- α [5,64 (4,38–6,69) pg/mL] quando comparados ao grupo DPOC [4,15 (3,46–5,41) pg/mL] ($p=0,004$) (**Figura 1**). Por outro lado, os pacientes com DPOC apresentaram níveis significativamente mais elevados de IL-6 [DPOC: 1,15 (0,65-1,50) pg/mL *versus* Tabagistas: 0,61 (0,32–0,95) pg/mL; $p=0,009$] (**Figura 1**) e da PCR [DPOC: 6,38 (2,67–9,37) mg/L *versus* Tabagistas: 1,57 (0,43–3,35) mg/L; $p<0,001$] quando comparados aos tabagistas (**Figura 2**). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação aos valores

séricos de IL-8 (pg/mL), IL-10 (pg/mL), albumina (mg/dL) e quanto ao número de linfócitos, neutrófilos e linfócitos no sangue periférico (**Tabela 2**).

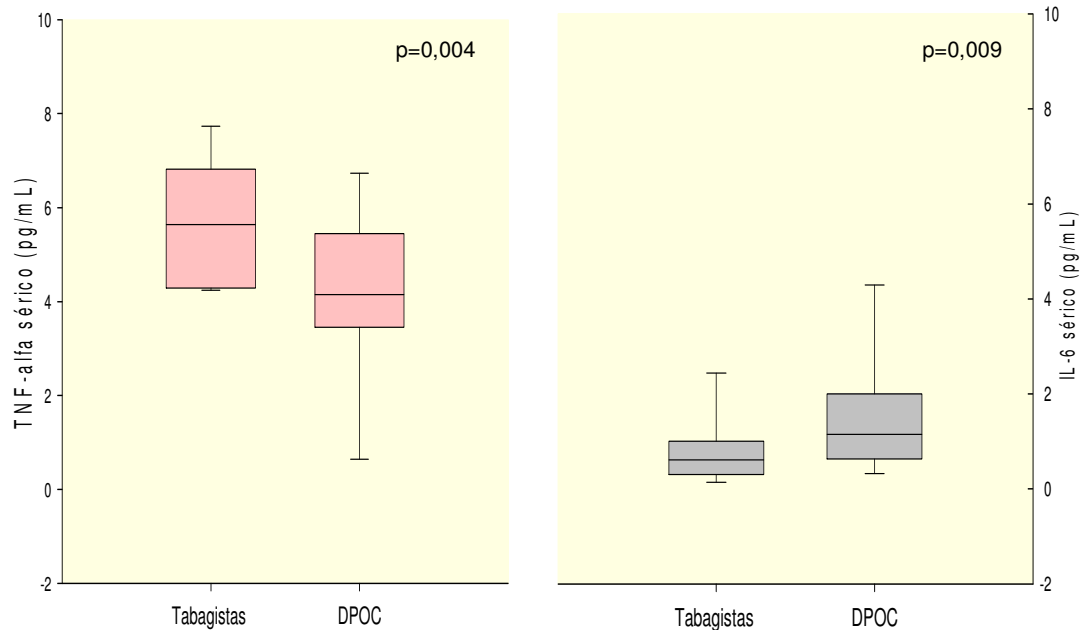


Figura 1: Box-plot das concentrações séricas de TNF- α (pg/mL) e IL-6 (pg/mL) nos indivíduos tabagistas sem DPOC e pacientes com DPOC.

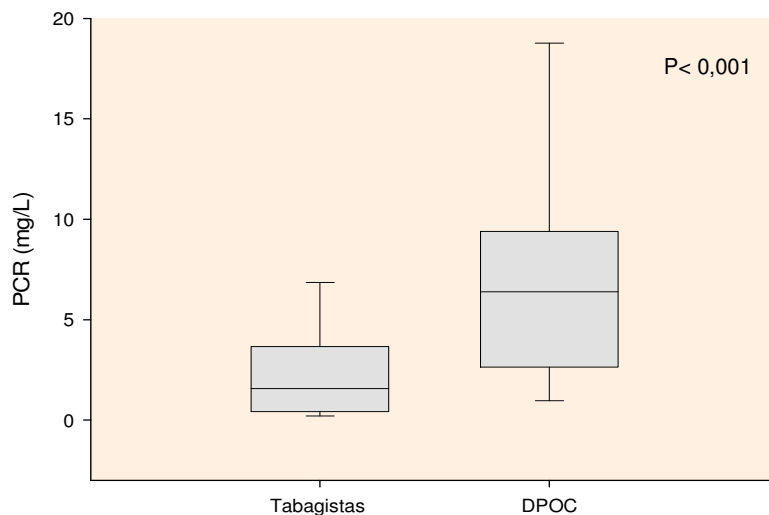


Figura 2: Box-plot da concentração sérica da PCR (mg/L) nos indivíduos tabagistas sem DPOC e pacientes com DPOC.

Tabela 2: Indicadores séricos de inflamação dos indivíduos tabagistas sem DPOC e pacientes com DPOC.

| | Tabagistas N = 20 | DPOC N = 52 | Valor p |
|------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| IL-8 (pg/mL) | 4,86 (3,99 – 8,61) | 4,86 (3,20 – 7,49) | 0,673 |
| IL-10 (pg/mL) | 0,69 (0,44 – 1,10)† | 0,78 (0,56 – 1,30)* | 0,222 |
| Albumina (mg/dL) | 4,30 (4,05 – 4,50) | 4,20 (4,00 – 4,60) | 0,701 |
| Leucócitos (n) | 7000 (5800 – 8375) | 8150 (7050 – 9150) | 0,245 |
| Neutrófilos (n) | 4076 (3540 – 5133) | 4741 (4075 – 5685) | 0,103 |
| Linfócitos (n) | 2066 (1587 – 2302) | 1758 (1445 – 2405) | 0,594 |

Os dados estão apresentados em mediana e intervalo interquartilico. † : n = 19; * : n = 50
IL-8 = interleucina 8; IL-10 = interleucina 10.

A análise dos indicadores da inflamação no sobrenadante do escarro induzido mostrou, de forma inversa ao observado no soro, mostrou que os valores de TNF- α foram estatisticamente maiores nos pacientes com DPOC [5,72 (1,56–15,42) pg/mL] quando comparados aos tabagistas [1,20 (0,70–1,81) pg/mL], assim como os valores de IL-10 [0,60 (0,19–0,94) no DPOC *versus* 0,20 (0,00–0,42) nos tabagistas; p=0,007] (**Figura 3**). Não houve diferença significativa nos níveis da IL-6 (pg/mL) e da IL-8 (pg/mL) entre os grupos (**Tabela 3**). A celularidade total do escarro estava elevada nos pacientes com DPOC, porém sem diferença estatística significativa (p=0,054). Não foram observadas diferenças na porcentagem e no número total de neutrófilos, macrófagos e linfócitos entre os grupos.

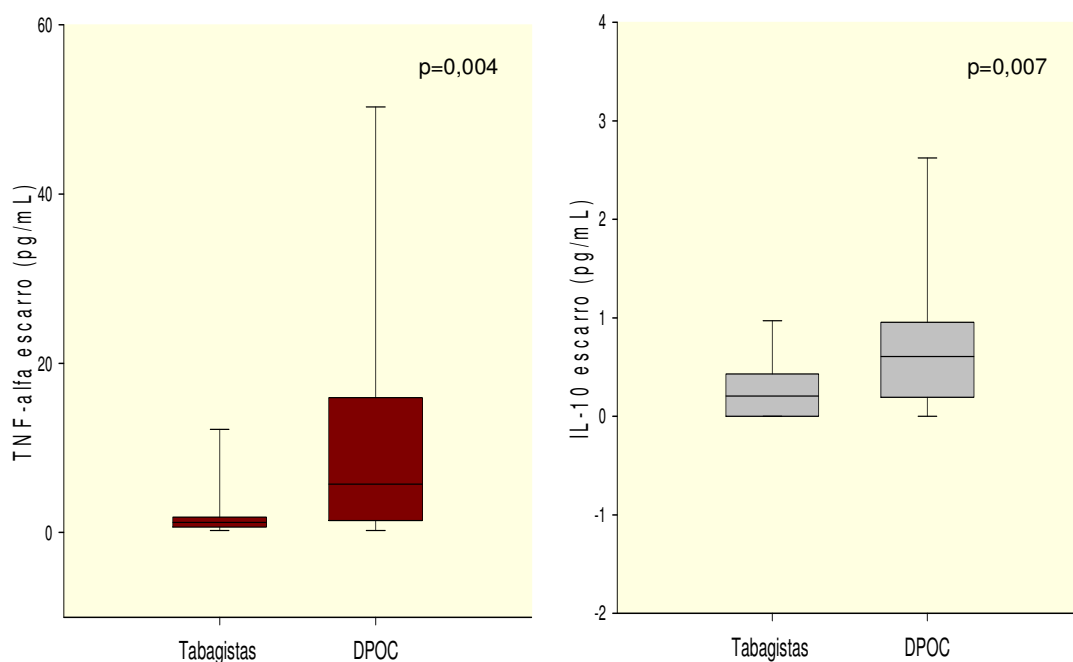


Figura 3: Box-plot das concentrações de TNF- α (pg/mL) e da IL-10 (pg/mL) no sobrenadante do escarro induzido dos indivíduos tabagistas sem DPOC e pacientes com DPOC.

Tabela 3: Indicadores de inflamação no escarro induzido dos tabagistas sem DPOC e pacientes com DPOC.

| | Tabagistas N = 20 | DPOC N = 52 | Valor p |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------|
| IL-6 (pg/mL) | 27,81 (13,75 – 92,30) | 19,79 (8,94 – 70,47) | 0,521 |
| IL-8 (pg/mL) | 6112 (2133 – 16052) | 10547 (2760 – 27839) | 0,195 |
| Celularidade total ($\times 10^6$) | 6,00 (3,40 – 15,80) | 14,80 (5,90 – 23,30) | 0,054 |
| Neutrófilos (%) | 61,50 (54,50 – 71,00) | 66,50 (55,50 – 72,00) | 0,334 |
| Macrófagos (%) | 31,00 (26,50 – 41,00) | 32,00 (25,00 – 42,00) | 0,239 |

Os dados estão apresentados em mediana e intervalo interquartilico.
IL-6 = interleucina 6; IL-8 = interleucina 8.

Associações entre as variáveis funcionais e os indicadores de inflamação séricos e no sobrenadante do escarro induzido nos pacientes estudados

Foi realizado estudo de correlação entre os marcadores de inflamação sistêmica e localizada e os atributos de função pulmonar para os indivíduos tabagistas e os pacientes com DPOC agrupados. Observamos correlação significativa positiva entre o VEF₁(%) e os valores séricos de TNF- α (pg/mL) ($r=0,486$; $p<0,001$) e negativa entre o VEF₁(%) e os valores de TNF- α (pg/mL) no escarro ($r= -0,335$; $p=0,008$).

Algumas correlações significativas foram observadas apenas no grupo de pacientes com DPOC. Em nível sérico, houve correlação significativa positiva entre os valores do TNF- α (pg/mL) e da SpO₂(%) ($r=0,416$; $p=0,002$). Os valores da IL-6 (pg/mL) apresentaram correlação significativa positiva com a PCR (mg/L) ($r=0,326$; $p=0,039$) e negativa com a SpO₂(%) ($r= -0,335$; $p=0,028$) e a IL-10 (pg/mL) correlação positiva com a carga tabágica ($r=0,352$; $p=0,010$). No escarro induzido houve correlação significativa positiva entre a celularidade total e o TNF- α (pg/mL) ($r=0,424$; $p=0,005$) e, também, com a IL-8 (pg/mL) ($r=0,486$; $p<0,001$) (**Figura 4a**). A IL-10 (pg/mL) apresentou correlação significativa negativa com o VEF₁(%) ($r= -0,387$; $p=0,004$) (**Figura 4b**).

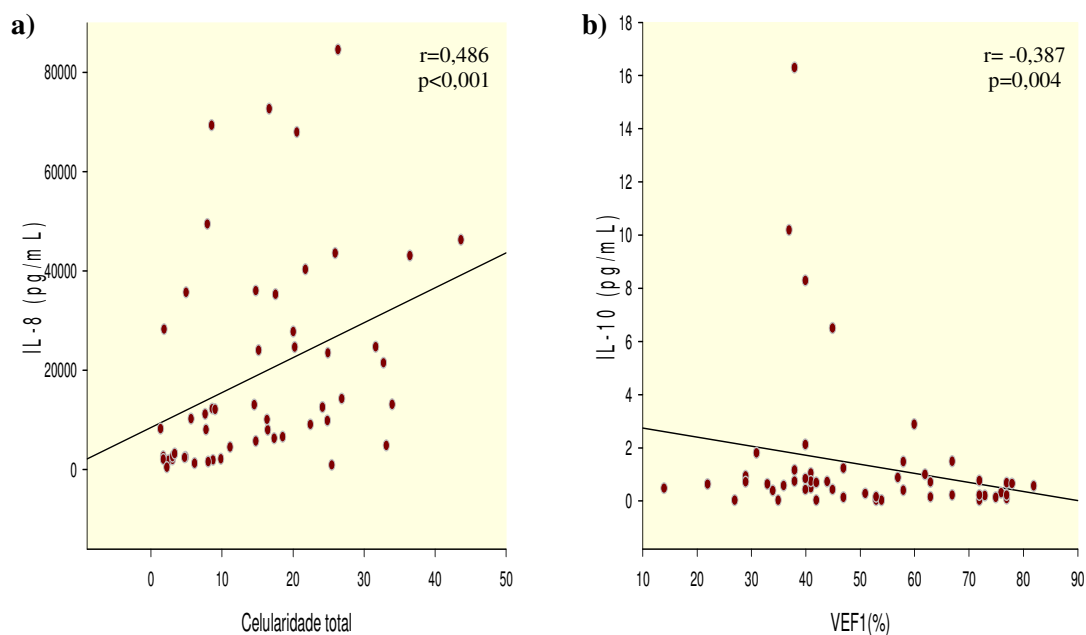


Figura 4: a) Estudo da correlação entre a IL-8 (pg/mL) e a celularidade total ($\times 10^6$) do escarro induzido dos pacientes com DPOC; **b)** Estudo da correlação entre a IL-10 (pg/mL) do escarro induzido e o VEF₁(%) dos pacientes com DPOC.

Comparação entre o grupo com DPOC tabagistas e ex-tabagistas

Como observamos diferenças significativas nos marcadores sistêmicos e localizados de inflamação entre os tabagistas e os pacientes com DPOC, realizamos a comparação entre pacientes com DPOC tabagistas e ex-tabagistas. A porcentagem de pacientes tabagistas foi de 32,7% e, neste grupo, a idade foi significativamente menor ($p=0,002$). Os valores médios da espirometria, da carga tabágica (anos/maço) e da DP6 (m) foram similares entre os grupos; entretanto, a SpO₂(%) estava significativamente diminuída nos pacientes com DPOC ex-tabagistas ($p=0,001$) (**Tabela 4**).

Dos pacientes com DPOC tabagistas 40% apresentavam doença moderada, 50% doença grave e 10% muito grave e, no grupo ex-tabagista, havia 31% com doença moderada, 18% DPOC grave e 51% muito grave. A prevalência de tabagismo foi menor nos pacientes com DPOC muito grave quando comparados aos com doença moderada e grave ($p=0,030$).

Não houve diferenças significativas quanto aos valores médios dos atributos de composição do corpo entre os grupos. O IMMC $< 15 \text{ kg/m}^2$ para mulheres e $< 16 \text{ kg/m}^2$ para homens foi observado em 23% dos DPOC tabagistas e 34% no grupo DPOC ex-tabagista, sem diferença significativa.

Tabela 4: Características gerais dos pacientes com DPOC de acordo com o tabagismo atual

| | DPOC Tabagistas N = 17 | DPOC Ex-Tabagistas N = 35 | Valor p |
|----------------------------|---------------------------|------------------------------|---------|
| Idade (anos) | 58,2 ± 9,6 | 66,3 ± 7,3 | 0,002 |
| Gênero (M/F) | 8 / 9 | 24 / 11 | 0,590 |
| VEF ₁ (L) | 1,1 ± 0,5 | 1,1 ± 0,4 | 0,832 |
| VEF ₁ (%) | 56,1 ± 15,9 | 47,9 ± 17,2 | 0,108 |
| CVF (L) | 2,3 ± 0,6 | 2,3 ± 0,6 | 0,720 |
| CVF (%) | 83,3 ± 15,2 | 80,7 ± 18,9 | 0,639 |
| VEF ₁ /CVF (%) | 0,5 ± 0,1 | 0,4 ± 0,1 | 0,159 |
| DP6 (m) | 415,0 ± 96,3 | 410,0 ± 86,5 | 0,853 |
| Carga tabágica (anos/maço) | 48,5 ± 17,3 | 54,8 ± 38,3 | 1,000 |
| SpO ₂ (%) | 94,0 ± 3,4 | 88,5 ± 5,9 | 0,001 |
| IMC (kg/m ²) | 25,1 ± 5,2 | 26,1 ± 5,5 | 0,507 |
| IMMC (kg/m ²) | 15,2 ± 2,1 | 16,4 ± 2,2 | 0,085 |

Os dados estão apresentados em média ± 1 desvio-padrão.

M/F = masculino / feminino; VEF₁ = volume expirado no primeiro segundo; CVF = capacidade vital forçada; DP6 = distância percorrida em seis minutos; SpO₂ = saturação periférica de oxigênio.

Dos indicadores séricos, os tabagistas apresentavam valores elevados de TNF- α [5,08 (3,66 – 6,24) pg/mL] em relação aos observados nos pacientes com DPOC em abstinência [3,93 (3,45 – 4,96) pg/mL] ($p=0,049$) (**Tabela 5**). Os outros marcadores inflamatórios não mostraram diferença estatística significativa entre os grupos.

Tabela 5: Indicadores séricos de inflamação nos pacientes com DPOC de acordo com o tabagismo atual.

| | DPOC Tabagistas N = 17 | DPOC Ex-Tabagistas N = 35 | Valor p |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------|
| TNF- α (pg/mL) | 5,08 (3,66 – 6,24) | 3,93 (3,45 – 4,96) | 0,049 |
| IL-6 (pg/mL) | 1,07 (0,43 – 1,66) | 1,23 (0,74 – 2,04) | 0,412 |
| IL-8 (pg/mL) | 4,87 (2,71 – 10,69) | 4,55 (3,67 – 7,35) | 0,977 |
| IL-10 (pg/mL) | 0,72 (0,48 – 1,00) [†] | 0,80 (0,58 – 1,48) [*] | 0,208 |
| Albumina (mg/dL) | 4,10 (3,90 – 4,50) | 4,30 (4,00 – 4,60) | 0,353 |
| PCR (mg/L) | 7,46 (4,14 – 11,45) | 4,64 (2,02 – 7,84) | 0,083 |
| Leucócitos (n) | 8600 (7175 – 9225) | 7600 (6925 – 8975) | 0,829 |
| Neutrófilos (n) | 5060 (4567 – 5667) | 3954 (3954 – 5693) | 0,629 |
| Linfócitos (n) | 1730 (1412 – 2352) | 1943 (1470 – 2420) | 0,953 |

Os dados estão apresentados em mediana e intervalo interquartilico. [†] : n = 16 ; ^{*} : n = 34
 TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; IL-6 = interleucina 6; IL-8 = interleucina 8; IL-10 = interleucina 10; PCR = proteína C reativa.

No escarro induzido, não houve diferença em nenhum dos marcadores inflamatórios entre os grupos DPOC tabagistas e ex-tabagistas (**Tabela 6**).

Tabela 6: Indicadores de inflamação no sobrenadante do escarro induzido dos pacientes com DPOC de acordo com o tabagismo atual.

| | DPOC Tabagistas N = 17 | DPOC Ex-Tabagistas N = 35 | Valor p |
|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------|
| TNF- α (pg/mL) | 5,72 (2,03 – 15,00) | 4,10 (1,13 – 17,98) | 0,978 |
| IL-6 (pg/mL) | 40,98 (14,03 – 78,40) | 18,43 (8,76 – 65,10) | 0,396 |
| IL-8 (pg/mL) | 12116 (2459 – 23612) | 9897 (3362 – 35424) | 0,733 |
| IL-10 (pg/mL) | 0,69 (0,19 – 1,45) [†] | 0,60 (0,14 – 0,78) [*] | 0,354 |
| Celularidade total ($\times 10^6$) | 14,80 (8,07 – 25,22) | 14,80 (5,17 – 22,32) | 0,612 |
| Neutrófilos (%) | 68,00 (60,50 – 73,00) | 62,00 (55,00 – 70,00) | 0,356 |
| Macrófagos (%) | 28,00 (20,00 – 39,50) | 32,00 (27,25 – 42,00) | 0,587 |

Os dados estão apresentados em mediana e intervalo interquartilico. † : n = 16; * : n = 29
TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; IL-6 = interleucina 6; IL-8 = interleucina 8; IL-10 = interleucina 10.

Análise de regressão linear múltipla robusta com erro padrão para análise dos marcadores inflamatórios séricos e do escarro induzido

Na análise de regressão linear multivariada houve associação do TNF- α sérico com o tabagismo ($p < 0,001$), e do TNF- α do escarro induzido com a presença da doença ($p = 0,038$). A IL-6 sérica e a PCR estavam associadas à presença da doença ($p = 0,009$) (**Tabela 7**).

Tabela 7: Análise de regressão linear múltipla robusta com erro padrão para análise dos marcadores inflamatórios séricos e do escarro induzido.

| Modelo | Coeficiente (95% intervalo de confiança) | |
|--|---|----------------------------------|
| | Tabagismo (sim/não) | Presença da doença (sim/não) |
| TNF-α (pg/mL) | | |
| Sérico | 1,048 (0,032 ; 2,063) | - 0,699 (-1,732 ; 0,333) |
| Escarro induzido | -16,093 (-38,126 ; 5,939) | 6,495 (0,156 ; 12,836) |
| IL-6 (pg/mL) | | |
| Sérico | -0,161 (-1,138 ; 0,814) | 0,845 (0,245 ; 1,444) |
| Escarro induzido | 14,085 (-14,701 ; 42,873) | -2,917 (-42,644 ; 36,810) |
| IL-8 (pg/mL) | | |
| Sérico | 0,011 (-2,779 ; 2,802) | -0,368 (-2,090 ; 2,826) |
| Escarro induzido | -6841,708 (-16953,180 ; 3269,767) | 798,840 (-10065,080 ; 11662,780) |
| IL-10 (pg/mL) | | |
| Sérico | -1,725 (-5,751 ; 2,299) | 0,847 (-1,922 ; 3,617) |
| Escarro induzido | 1,386 (-0,748 ; 3,521) | 1,976 (-0,083 ; 4,035) |
| PCR (mg/L) | | |
| Sérico | 5,372 (-1,239 ; 11,984) | 9,103 (2,881 ; 15,326) |

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL-6: interleucina 6; IL-8: interleucina 8; IL-10: interleucina 10; PCR: proteína C-reativa.

Características gerais dos pacientes com DPOC de acordo com a gravidade da doença

As características gerais dos pacientes com DPOC de acordo com a gravidade da doença estão apresentadas na **Tabela 8**. Foram avaliados 20 pacientes com DPOC moderada, 12 com doença grave e 20 muito grave. Os grupos eram homogêneos quanto ao gênero e a idade. Como esperado, a obstrução das vias aéreas avaliada por meio do VEF₁(%), CVF(%) e relação VEF₁/CVF(%) foi significativamente maior nos pacientes com DPOC estadios III e IV quando comparados aqueles com doença moderada. Os grupos eram similares quanto à

carga tabágica (anos/maço) e a DP6(m), porém os pacientes com DPOC IV tinham valores significativamente menores de SpO₂(%) quando comparados àqueles com DPOC II e III.

Os valores de IMC estavam significativamente elevados nos pacientes com doença moderada (p=0,010) e a análise da composição do corpo mostrou que a prevalência de obesidade (IMC \geq 30,0 kg/m²) foi significativamente maior nos pacientes com estadio II (40%) quando comparados àqueles com DPOC III (0%) e IV (20%) (p=0,048). Apenas dois pacientes do estadio III apresentaram IMC < 20,0 kg/m². O IMC < 15 kg/m² para mulheres e < 16 kg/m² para homens foi observado em 35% dos pacientes com DPOC II e IV, e em 50% com estadio III, sem diferença estatística significativa entre os grupos.

Tabela 8: Características gerais dos pacientes com DPOC de acordo com a gravidade da doença.

| | DPOC II N = 20 | DPOC III N = 12 | DPOC IV N=20 | Valor p |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------|
| Idade (anos) | 60,3 ± 7,9 | 66,7 ± 8,1 | 65,2 ± 9,5 | 0,084 |
| Gênero (M/F) | 9 / 11 | 9 / 3 | 14 / 6 | 0,679 |
| VEF ₁ (L) | 1,6 ± 0,4 ^a | 0,9 ± 0,1 ^b | 0,9 ± 0,1 ^b | < 0,001 |
| VEF ₁ (%) | 66,8 ± 9,4 ^a | 40,1 ± 3,6 ^b | 40,7 ± 15,5 ^b | < 0,001 |
| CVF (L) | 2,7 ± 0,4 ^a | 2,2 ± 0,4 ^b | 2,0 ± 0,6 ^b | < 0,001 |
| CVF (%) | 114,9 ± 15,4 ^a | 76,5 ± 14,2 ^b | 79,1 ± 18,3 ^b | 0,025 |
| VEF ₁ /CVF (%) | 59,7 ± 8,0 ^a | 43,4 ± 5,0 ^b | 45,2 ± 1,3 ^b | < 0,001 |
| DP6 (m) | 435,8 ± 83,3 | 421,9 ± 108,9 | 374,1 ± 70,8 | 0,106 |
| Carga tabágica (a/m) | 56,7 ± 31,1 | 47,5 ± 21,0 | 52,1 ± 40,6 | 0,427 |
| SpO ₂ (%) | 94,3 ± 2,3 ^a | 93,2 ± 1,9 ^a | 84,5 ± 5,2 ^b | < 0,001 |
| IMC (kg/m ²) | 28,6 ± 5,5 ^a | 23,2 ± 4,3 ^b | 24,5 ± 4,9 ^b | 0,010 |
| IMMC (kg/m ²) | 16,2 ± 2,2 | 15,7 ± 2,2 | 15,8 ± 2,4 | 0,781 |

Os dados estão apresentados em média ± 1 desvio-padrão.

Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

M/F = masculino / feminino; VEF₁ = volume expirado no primeiro segundo; CVF = capacidade vital forçada; DP6 = distância percorrida em seis minutos; a/m = anos/maço; SpO₂ = saturação periférica de oxigênio; IMC = índice de massa do corpo; IMMC = índice de massa magra do corpo.

Na **tabela 9** estão relacionadas as medicações de manutenção utilizadas pelos pacientes estudados; alguns utilizavam mais de uma classe de medicamentos. Não faziam uso regular de medicação regular 15% pacientes com DPOC moderado e 8% com doença grave. Quinze pacientes utilizavam oxigenoterapia domiciliar prolongada (ODP) e destes, dois pacientes apresentavam SpO₂ > 90%. Nestes casos, a indicação da suplementação de oxigênio foi devido à presença de poliglobulia e/ou *cor pulmonale*.

Não observamos correlação entre o uso regular de corticosteróides inalados e os valores das citocinas tanto séricas quanto do sobrenadante do escarro induzido.

Tabela 9: Classe de medicamentos em uso contínuo pelos pacientes estudados.

| | DPOC II N = 20 | DPOC III N = 12 | DPOC IV N=20 |
|--|-------------------|--------------------|-----------------|
| β_2 agonista de curta duração | 5 | 6 | 11 |
| β_2 agonista de longa duração | 4 | 5 | 7 |
| Brometo de ipratrópio | 4 | 5 | 8 |
| Brometo de tiotrópio | 0 | 1 | 1 |
| Corticosteróide inalado | 5 | 0 | 1 |
| β_2 agonista de longa duração + corticosteróide inalado | 5 | 2 | 3 |
| Oxigenoterapia domiciliar prolongada | 0 | 0 | 15 |
| Nenhuma medicação | 3 | 1 | 0 |

Entre os parâmetros séricos utilizados para avaliar o estado inflamatório, o TNF- α (pg/mL) estava significativamente elevado nos grupos de pacientes com DPOC moderada/grave quando comparados aos pacientes com doença muito grave ($p < 0,001$) (**Tabela 10**). Não foram observadas diferenças entre os valores da IL-6 (pg/dL), IL-8 (pg/mL), IL-10 (pg/mL), PCR, albumina sérica, e do número de leucócitos, neutrófilos e linfócitos entre as diferentes gravidades da DPOC.

Tabela 10: Indicadores séricos de inflamação nos pacientes com DPOC de acordo com a gravidade da doença.

| | DPOC II N = 20 | DPOC III N = 12 | DPOC IV N=20 | Valor p |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------|
| TNF- α (pg/mL) | 4,10 (3,70 – 4,50) ^a | 3,25 (3,03 – 8,65) ^a | 2,90 (0,60 – 3,30) ^b | < 0,001 |
| IL-6 (pg/mL) | 1,15 (0,63 – 1,51) | 0,60 (0,36 – 1,77) | 1,54 (0,91 – 3,24) | 0,068 |
| IL-8 (pg/mL) | 4,58 (2,70 – 9,06) | 4,71 (3,60 – 9,20) | 4,78 (3,55 – 7,20) | 0,608 |
| IL-10 (pg/mL) | 0,80 (0,51 – 1,30) [†] | 0,71 (0,48 – 3,10) [*] | 0,80 (0,69 – 1,38) [#] | 0,625 |
| Albumina (mg/dL) | 4,20 (4,00 – 4,50) | 4,15 (4,10 – 4,70) | 4,30 (4,00 – 4,55) | 0,524 |
| PCR (mg/L) | 6,63 (3,55 – 10,20) | 2,81 (1,37 – 7,31) | 6,51 (2,51 – 9,82) | 0,211 |
| Leucócitos (n) | 8450 (7150-9150) | 7300 (7150-9450) | 8150 (6850-8900) | 0,868 |
| Neutrófilos (n) | 4680 (4105-5081) | 5025 (4193-5645) | 4711 (3973-6360) | 0,354 |
| Linfócitos (n) | 2040 (1627-2555) | 1867 (1542-2360) | 1520 (1090-2051) | 0,068 |

Os dados estão apresentados em mediana e intervalo interquartilico.

Letras diferentes representam diferença estatística significativa. † : n = 19; * : n = 12; #: n = 19

TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; IL-6 = interleucina 6; IL-8 = interleucina 8; IL-10 = interleucina 10; PCR = proteína C reativa.

A análise dos marcadores de inflamação no sobrenadante do escarro induzido mostrou elevados valores de TNF- α nos pacientes com DPOC muito grave [12,02 (0,69 – 24,01) pg/mL] em relação às demais gravidades [moderado: 2,48 (2,09 – 7,20) pg/mL; grave: 8,20 (1,71 – 16,95) pg/mL] ($p=0,042$) (**Figura 5**). Observamos valores significativamente maiores da IL-10 nos pacientes do estadio III [0,69 (0,38 – 5,80) pg/mL] e IV [0,70 (0,54 – 1,15) pg/mL] quando comparados ao DPOC II [0,19 (0,11 – 0,63) pg/mL] ($p=0,011$). As citocinas IL-6 (pg/mL) e IL-8 (pg/mL) não mostraram diferença significativa entre os grupos estudados e também não houve diferença estatística entre os grupos em relação à celularidade total e as porcentagens de neutrófilos, macrófagos e linfócitos

(Tabela 11). A porcentagem de células epiteliais presente no esfregaço do escarro foi de 9,5 no DPOC II, 0,45 nos pacientes estadio III e 1,0 nos estadio IV.

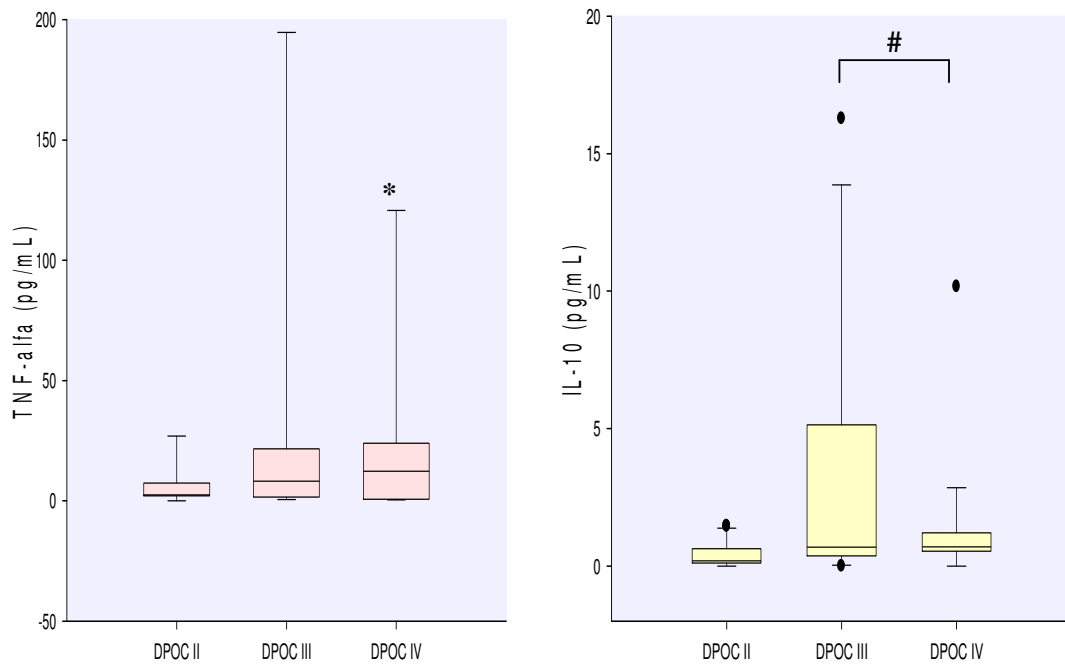


Figura 5: Box-plot das concentrações de TNF- α (pg/mL) e da IL-10 (pg/mL) no sobrenadante do escarro induzido dos pacientes com DPOC de acordo com a gravidade da doença.

* : $p < 0,05$ no DPOC IV em relação aos pacientes estadio II e III

: $p < 0,05$ no DPOC III e IV em relação aos pacientes estadio II

Tabela 11: Indicadores de inflamação no sobrenadante do escarro induzido nos pacientes com DPOC de acordo com a gravidade da doença.

| | DPOC II N = 20 | DPOC III N = 12 | DPOC IV N=20 | Valor p |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------|
| IL-6 (pg/mL) | 32,63 (12,45 – 80,51) | 17,33 (9,17 – 60,67) | 18,52 (8,76 – 50,91) | 0,481 |
| IL-8 (pg/mL) | 16714 (2402-31806) | 7836 (5399-19329) | 9311 (1929 - 33862) | 0,742 |
| Celularidade total (x10 ⁶) | 8,75 (4,95 – 20,45) | 17,05 (8,45 – 22,57) | 15,50 (8,00–24,50) | 0,629 |
| Neutrófilos (%) | 61,00 (55,00 – 72,00) | 67,00 (52,50 – 68,00) | 69,00 (58,00 – 76,00) | 0,582 |
| Macrófagos (%) | 29,50 (22,00 – 43,00) | 32,55 (32,00 – 44,55) | 30,00 (20,00 – 41,00) | 0,276 |

Os dados estão apresentados em mediana e intervalo interquartilico.
IL-6 = interleucina 6; IL-8 = interleucina 8.

Discussão

O presente trabalho avaliou simultaneamente o estado inflamatório nas vias aéreas e no sangue periférico de indivíduos tabagistas e pacientes com DPOC moderada a muito grave. Os resultados mostraram que em pacientes com DPOC e tabagistas a inflamação nas vias aéreas é diferente da observada em nível sistêmico. Enquanto os níveis plasmáticos de TNF- α parecem ter relação com o tabagismo ativo, a concentração do mediador nas vias aéreas parece estar associada à presença da doença. Os outros mediadores inflamatórios sistêmicos avaliados (PCR e IL-6) estão elevados nos pacientes com DPOC, sem relação com a gravidade da obstrução das vias aéreas e com o tabagismo ativo, o que sugere a relação destes marcadores com a presença da doença.

Os valores plasmáticos de TNF- α estavam aumentados nos tabagistas quando comparados aos pacientes com DPOC avaliados em nosso estudo. Além disso, entre os pacientes com DPOC, aqueles que eram tabagistas ativos apresentaram também maior concentração plasmática do mediador e a análise de regressão mostrou relação do TNF- α sérico com o tabagismo ativo. Por outro lado, nas vias aéreas, os pacientes com DPOC apresentaram valores de TNF- α mais elevados quando comparados a controles fumantes e a análise de regressão mostrou relação do mediador na via aérea com a presença de doença.. Poucos estudos prévios avaliaram concomitantemente a associação da obstrução das vias aéreas com o processo inflamatório local e sistêmico e os resultados são controversos (Vernooy et al. 2002; Dentener et al. 2006; Hodge et al. 2007). Em dois estudos, os investigadores não identificaram diferenças nas concentrações de TNF- α , no soro e no escarro induzido, entre tabagistas e pacientes com DPOC (Vernooy et al. 2002; Dentener et al. 2006). Entretanto, de forma similar ao encontrado em nosso estudo, a concentração do receptor solúvel de TNF- α R55

(sTNF-R55), que é mais estável e apresenta meia-vida mais longa que o TNF- α (Aderka, 1996), estava aumentada no escarro induzido dos pacientes com DPOC em relação aos tabagistas (Vernooy et al. 2002). Por outro lado, em contraste com nossos resultados, os autores observaram valores mais elevados do receptor solúvel de TNF- α R75 (s TNF- α R75) no plasma dos pacientes com DPOC quando comparados aos tabagistas (Vernooy et al. 2002). Aumento da produção de TNF- α pelos linfócitos CD8⁺ do sangue periférico nos pacientes com DPOC quando comparados a controles fumantes e não fumantes também foi verificado em outro estudo (Hodge et al. 2007).

A avaliação da influência do tabagismo ativo no estado inflamatório dos pacientes com DPOC também revelou resultado diferente do nosso estudo; Vernooy et al. (2002) mostraram que, enquanto os valores plasmáticos de TNF- α foram similares nos dois grupos, o escarro dos ex-fumantes apresentou maiores concentrações dos receptores de TNF- α . Por outro lado, Hodge et al. (2007) não mostraram diferenças na produção TNF- α pelos linfócitos CD8⁺ do sangue periférico quando pacientes com DPOC fumantes e ex-fumantes foram comparados; entretanto, nas vias aéreas os DPOC fumantes apresentaram maior produção que os ex-fumantes. Em comum com nosso estudo, estes dados mostram diferenças nas características da inflamação entre as vias aéreas e o sangue periférico (Vernooy et al. 2002; Hodge et al. 2007). No mesmo sentido, Dentener et al. 2006 observaram que as células do escarro produziam TNF- α espontaneamente, enquanto que as células do sangue produziam o mediador apenas após estímulo com LPS. Em resumo, embora os resultados disponíveis indiquem que há diferenças na inflamação entre as vias áreas e o sangue periférico e que há

influência do tabagismo ativo no processo inflamatório, os dados são insuficientes para estabelecer o sentido e a magnitude desta diferença.

Algumas investigações que avaliaram isoladamente a concentração de TNF- α plasmática ou nas vias áreas dão suporte à influência do tabagismo na concentração plasmática de TNF- α verificada em nosso estudo. De acordo com nossos resultados, em 89 pacientes com DPOC, classificados de acordo com o estado tabágico, o TNF- α sérico estava aumentado nos pacientes com DPOC tabagistas quando comparados aos ex-tabagistas; entretanto, em contraste com nossos resultados, os pacientes com DPOC apresentaram maior concentração de TNF- α quando comparados aos tabagistas (Higashimoto et al. 2008). Achados adicionais mostram que as células mononucleares do sangue periférico de tabagistas apresentam elevada secreção de TNF- α quando comparadas às células de controles não-fumante (Tappia et al. 1995; Zeidel et al. 2002).

Em relação à gravidade da doença, houve elevação do TNF- α sérico nos pacientes com DPOC moderada e grave quando comparados aos com doença muito grave. Este achado pode ser decorrente da maior prevalência de tabagismo nos pacientes com DPOC de menor gravidade. Em contraste, estudo recente correlacionou os níveis de TNF- α com a gravidade da doença, e verificou elevação do TNF- α sérico em pacientes com VEF₁<50% (Karadag et al. 2008).

Em sentido oposto ao verificado no sangue periférico, os pacientes com DPOC avaliados neste estudo apresentaram maiores concentrações de TNF- α no escarro induzido comparados aos tabagistas sem obstrução das vias aéreas. Nos pacientes com DPOC não encontramos diferença significativa do processo inflamatório no escarro entre os tabagistas e ex-tabagistas; entretanto, os valores foram significativamente mais elevados nos pacientes com obstrução mais grave.

Houve também correlação positiva entre a concentração de TNF- α e a celularidade total do escarro induzido. Estes resultados estão de acordo com estudo que mostrou que pacientes com DPOC grave apresentam concentração mais elevada de TNF- α no escarro induzido quando comparados a indivíduos fumantes sem obstrução das vias aéreas (Keatings et al. 1996). Em linha com nossos resultados, estudos anteriores que compararam pacientes com DPOC tabagistas e ex-tabagistas mostraram que mesmo após a abstinência ao fumo o processo inflamatório local persiste (Turato et al. 1995; Rutgers et al. 2000; Babusyte et al. 2007). De fato, Willemse et al. (2005a) observaram persistência da secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-8) e da celularidade no escarro induzido de indivíduos um ano após a cessação do tabagismo e a biópsia brônquica não mostrou diferença na expressão do TNF- α entre os grupos de DPOC tabagistas e ex-tabagistas (Gamble et al. 2007).

Dados de condensado expiratório e pesquisas experimentais em animais trazem suporte adicional para a influência do tabagismo na inflamação das vias aéreas mediada pelo TNF- α . Elevação significativa da concentração do TNF- α no condensado expiratório 30 minutos após fumar um cigarro em relação a não-fumantes foi observada em humanos (Garey et al. 2004). Além disso, aumento da liberação de TNF- α na cultura de macrófagos alveolares após 2 horas de exposição ao fumo que se manteve por 24 horas (Churg et al. 2003) e aumento do TNF- α e de seus receptores no LBA após 6 meses de tabagismo foram descritos em ratos (Churg et al. 2004; D'Hulst et al. 2006) .

Em relação à inflamação local e as diversas gravidades da doença, observamos elevação do TNF- α e da IL-10 nos pacientes com DPOC muito grave em relação aos com doença moderada e grave. Estudo anterior também observou correlação negativa do receptor de TNF- α com o VEF₁(%) (Vernooy et al. 2002).

Assim, aparentemente, os pacientes com doença muito grave apresentam nas vias aéreas amplificação do estado inflamatório (TNF- α), provavelmente compensada pela elevação da modulação anti-inflamatória (IL-10).

Em resumo, os resultados referentes ao TNF- α obtidos no presente estudo reforçam a hipótese que a inflamação nas vias aéreas dos pacientes com DPOC progride apesar da cessação do tabagismo e que o processo inflamatório, uma vez iniciado, é amplificado e permanente. Diferentemente, os dados referentes à inflamação sistêmica sugerem que o aumento de TNF- α sérico pode estar relacionado ao tabagismo ativo. Portanto, traz evidências adicionais também para a hipótese que os processos inflamatórios locais e sistêmicos são diferentemente regulados em tabagistas e pacientes com DPOC.

A elevação da PCR nos pacientes com DPOC quando comparados aos tabagistas, sem associação com a gravidade da doença, está de acordo com os resultados obtidos em estudos recentes (Pinto-Plata et al. 2006; Karadag et al. 2008). Nestes, os pacientes com DPOC apresentaram aumento da PCR quando comparados a controles tabagistas e não-tabagistas, mesmo após ajuste do modelo de regressão logística para idade, sexo, tabagismo, história de coronariopatia e IMC (Pinto-Plata et al. 2006; Karadag et al. 2008). Em metanálise de 652 estudos que avaliaram a inflamação em pacientes com DPOC, publicados no período de 1978 a 2003, também não se verificou correlação entre a PCR e a gravidade da doença (Franciosi et al. 2006). Em nosso estudo, houve tendência de aumento da PCR no grupo de pacientes com DPOC tabagistas em relação aos ex-tabagistas; entretanto, o resultado não alcançou significância estatística, o que está de acordo com os resultados de Higashimoto et al. (2008). Por outro lado, valores maiores de PCR nos

pacientes com DPOC e tabagismo ativo quando comparados a ex-tabagistas foram verificados por de Torres et al. (2006).

A ausência de associação entre a gravidade da obstrução das vias aéreas e os valores de PCR pode ter ocorrido devido ao tamanho da amostra avaliada no presente estudo. De fato, estudo que avaliou 1131 indivíduos mostrou correlação negativa da PCR com o VEF₁(%), que se manteve quando os grupos foram separados de acordo com tabagismo e após ajuste para idade, sexo, IMC, obesidade, carga tabágica, hipertensão arterial, diabetes, perfil lipídico, síndrome metabólica, uso de medicações e doença coronariana (Aronson et al. 2006). Na mesma linha, correlação negativa da PCR com o VEF₁(%) ocorreu em estudo que avaliou 7.685 indivíduos; os resultados mostram também que os fumantes ativos com menores valores de VEF₁(%) apresentaram elevação adicional da PCR (Gan et al. 2005).

Nossos resultados mostraram maior nível da IL-6 sérica nos pacientes com DPOC em relação aos tabagistas, no entanto, os valores obtidos no escarro induzido não diferiram entre os grupos. Houve também associação significativa positiva entre a concentração sérica da IL-6 e a PCR no grupo de pacientes com DPOC. Estudos anteriores também mostram aumento da IL-6 em pacientes com DPOC quando comparados a controles fumantes e não fumantes e correlação positiva entre a concentração sérica da IL-6 e a PCR (Godoy et al. 2003; Sin et al. 2004; Higashimoto et al. 2008). Além disso, comparação entre 54 pacientes com DPOC e níveis normais de PCR e 48 pacientes DPOC e elevados níveis de PCR (>4,21 mg/L) mostrou significativo aumento dos receptores de TNF- α e da IL-6 no grupo que apresentava maiores níveis da PCR (Broekhuizen et al. 2006). Não observamos associação entre o VEF₁(%) e a IL-6 em nossa amostra; entretanto,

estudos populacionais mostram correlação significativa negativa entre IL-6 e VEF₁(%) e entre o aumento da IL-6 e piora da função pulmonar (Yende et al. 2006; Walter et al. 2008). Além disso, estudo que acompanhou 148 pacientes com DPOC moderada a grave durante sete anos mostrou aumento gradativo da IL-6 no escarro e que aqueles com concentração de IL-6 acima da média geral do grupo apresentaram declínio anual do VEF₁ acima da média do grupo geral (Donaldson et al. 2005). Não encontramos estudos que avaliaram a IL-6 no soro e escarro dos mesmos indivíduos.

O papel da IL-10 na regulação inflamatória dos pacientes com DPOC foi pouco avaliado e os resultados permanecem controversos. Nossos resultados mostram que os pacientes com DPOC apresentam maior concentração da IL-10 no escarro induzido que o grupo de tabagistas, além de correlação negativa entre a IL-10 e o VEF₁(%). No mesmo sentido, porcentagem maior de linfócitos CD8⁺ positivos para IL-10 foi observada em pacientes com DPOC quando comparados a indivíduos fumantes sem obstrução das vias aéreas e aos não-fumantes e, também, houve correlação negativa entre a IL-10 e o VEF₁(%) (Barceló et al. 2006). De fato, macrófagos do LBA de fumantes expostos a concentrações crescentes de IL-10 diminuíram a secreção de TNF- α e a liberação de gelatinase-B (MMP-9) e aumentam a secreção do inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP-1), participando da modulação inflamatória e do balanço proteases/anti-proteases (Lim et al. 2000). Por outro lado, o escarro induzido de sete pacientes com DPOC moderada mostrou diminuição significativa da concentração de IL-10 quando comparados ao grupo de fumantes sem DPOC e de não-fumantes. Os autores sugerem que os pacientes com DPOC apresentam desequilíbrio da homeostase inflamatória causado pelo aumento das citocinas pró-inflamatórias e diminuição das

anti-inflamatórias (Takanashi et al. 1999). Em 74 pacientes com DPOC moderada e 44 indivíduos controles não-fumantes e não se observou diferença na concentração de IL-10 no escarro induzido entre os grupos (Xiao et al. 2005). Em nível local os pacientes com DPOC do nosso estudo apresentaram aumento de citocina pró-inflamatória (TNF- α e, conseqüente aumento modulatório da citocina anti-inflamatória (IL-10).

A celularidade total, o número de neutrófilos e macrófagos e as concentrações de IL-8 sérica e do escarro induzido entre os grupos avaliados neste estudo foram similares. De acordo com nossos resultados, Dentener et al. (2006) não observaram diferença nos níveis de IL-8 no escarro induzido de pacientes com DPOC em relação aos tabagistas sem obstrução das vias aéreas, assim como também não observaram diferença significativa na celularidade total e na porcentagem de neutrófilos e macrófagos entre os grupos. Nossos resultados também não mostraram diferença na concentração da IL-8 sérica ou do escarro induzido quando os pacientes foram analisados em relação ao tabagismo ativo e à gravidade da doença. De forma semelhante, estudo que avaliou 11 pacientes com DPOC fumantes e 22 com DPOC ex-fumantes também não verificou diferença na IL-8 do escarro entre os grupos (Yamamoto et al. 1997) e metanálise não mostrou correlação entre os níveis de IL-8 no escarro e a gravidade da doença (Franciosi et al. 2006). Em contraste, outros estudos observaram que pacientes com DPOC apresentavam elevação da concentração de IL-8, sérica e no escarro, e da porcentagem de neutrófilos no escarro quando comparados aos fumantes sem DPOC e controles não fumantes (Keatings et al. 1996; Willemse et al. 2005b). (Kanazawa et al. 1996) (Fujimoto et al. 2005; Malerba et al. 2006).

Algumas limitações podem ser apontadas em nossa investigação, como a diferença de idade entre grupos, justificada pela dificuldade de encontrar indivíduos tabagistas com idade avançada que não apresentem patologias e não façam uso de medicações. Na literatura, alguns estudos também apresentam diferença significativa na idade entre os grupos estudados (Keatings et al. 1996; Vernooy et al. 2002; Dentener et al. 2006; Pinto-Plata et al. 2006). A dificuldade em se obter escarro em indivíduos saudáveis e não tabagistas, ocasionou a ausência de grupo controle, limitando a interpretação dos resultados. Além disso, o tamanho da amostra em cada gravidade da doença pode reduzir o poder estatístico na análise dos dados, aumentando o risco de erro tipo β .

Em resumo, os resultados do presente estudo confirmam os dados da literatura relacionados à presença de inflamação sistêmica e local nos pacientes com DPOC e nos indivíduos tabagistas. Reforçam a hipótese de que há diferenças no processo inflamatório entre os compartimentos e entre os fumantes e pacientes com DPOC. De maneira relevante, o TNF- α sistêmico mostrou associação com o tabagismo ativo, enquanto em nível local apresentou associação com a presença da doença. Os outros mediadores inflamatórios sistêmicos avaliados como a PCR e a IL-6 sérica parecem também ter relação com a presença da DPOC.

Conclusões

- ✚ Tabagistas e pacientes com DPOC apresentam evidências de inflamação localizada e sistêmica com diferentes características entre os compartimentos e entre os grupos;

- ✚ O tabagismo ativo parece influenciar a inflamação sistêmica avaliado por meio do TNF- α ; entretanto, não há evidências da influência na inflamação das vias aéreas

- ✚ A inflamação sistêmica avaliada por meio da IL-6 e da PCR, e a inflamação local avaliada por meio do TNF- α e da IL-10, parecem estar associadas à presença da doença;

- ✚ Pacientes com DPOC muito grave fumam menos, apresentam valores de TNF- α sérico diminuído e elevação do TNF- α e da IL-10 no escarro induzido.

Referências Bibliográficas

- Aderka D. The potencial biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7(3): 231-240.
- American Thoracic Society Statement. Standardization of Spirometry – 1987 update. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136(5): 1285-1298.
- American Thoracic Society Statement. Guidelines for the Six-Minute Walk Test. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(1): 111-117.
- Aronson D, Roterman I, Yigla M, Kerner A, Avizohar O, Sella R, et al. Inverse association between pulmonary function and C-reactive protein in apparently healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(6): 626-632.
- Babusyte A, Stravinskaite K, Jeroch J, Lötvall J, Sakalauskas R, Sitkauskiene B. Patterns of airway inflammation and MMP-12 expression in smokers and ex-smokers with COPD. *Respir Res* 2007; 8(1): 81-89.
- Barceló B, Pons J, Fuster A, Sauleda J, Noguera A, Ferrer JM, et al. Intracellular cytokine profile of T lymphocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol* 2006; 145(3): 474-479.
- Barceló B, Pons J, Ferrer JM, Sauleda J, Fuster A, Agustí AGN. Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. *Eur Respir J* 2008; 31(3): 555-562.
- Barnes PJ, Karin M. Mechanisms of disease – nuclear factor kappa-B – a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New Engl J Med* 1997; 336(15): 1066-1071.
- Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, Magnussen H, Page CP, Postma D, et al. Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(1): 6-14.

- Betz R, Kohlhäufel M, Kassner G, Müllinger B, Maier K, Brand P, et al. Increased sputum IL-8 and IL-5 in asymptomatic nonspecific airway hyperresponsiveness. *Lung* 2001; 179(2): 119-133.
- Bhowmik A, Seemungal TAR, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD. *Thorax* 2000; 55(2): 114-120.
- Broekhuizen R, Wouters EFM, Wouters EFM, Creutzberg EC, Schols AMWJ. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* 2006; 61(1): 17-22.
- Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L, Barnes PJ. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respir Med* 2003; 97(12): 1299-1302.
- Cai Y, Carty K, Henry RL, Gibson PG. Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared with healthy children. *Eur Respir J* 1998; 11(4): 848-853.
- Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J* 2008; 31(6): 1334-1356.
- Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Dai J, et al. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor- α release. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(8): 1083-1089.
- Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor- α drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170(5): 492-498.

- Cromwell O, Hamid Q, Corrigan CJ, Barkans J, Meng O, Collins PD, et al. Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 β and tumour necrosis factor- α . *Immunol* 1992; 77(3): 330-337.
- de Boer WI, Sont JK, van Schadewijk A, Stolk J, van Krieken JH, Hiemstra PS. Monocyte chemoattractant protein I, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. *J Pathol* 2000; 190(5): 619-626.
- Dentener MA, Creutzberg EC, Schols AMWJ, Mantovani A, van't Veer C, Buurman WA, et al. Systemic anti-inflammatory mediators in COPD: increase in soluble interleukin 1 receptor II during treatment of exacerbations. *Thorax* 2001; 56(9): 721-726.
- Dentener MA, Louis R, Cloots RHE, Henket M, Wouters EFM. Differences in local versus systemic TNF- α production in COPD: inhibitory effect of hyaluronan on LPS induced blood cell TNF α release. *Thorax* 2006; 61(6): 478-484.
- de Torres JP, Cordoba-Lanus E, López-Aguilar C, Muros de Fuentes M, Garcini AM, Aguirre-Jaime A, et al. C-reactive protein levels and clinically important predictive outcomes in stable COPD patients. *Eur Respir J* 2006; 27(5): 902-907.
- de Torres JP, Pinto-Plata V, Casanova C, Mullerova H, Córdoba-Lanús E, Muros de Fuentes M, et al. C-reactive protein levels and survival in patients with moderate to very severe COPD. *Chest* 2008; 133(6): 1336-1343.
- D'Hulst AI, Bracke KR, Maes T, De Beecker JL, Pauwels RA, Joos GF, et al. Role of tumour necrosis factor-alpha receptor p75 in cigarette smoke induced pulmonary inflammation and emphysema. *Eur Respir J* 2006; 28(1): 102-112.
- Donaldson GC, Seemungal TAR, Patel IS, Bhowmik A, Wilkinson TMA, Hurst JR, et al. Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. *Chest* 2005; 128(4): 1995-2004.

- Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, Soler N, Roca J, Agusti A, et al. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax* 2005; 60(4): 293-300.
- Efthimiadis A, Jayaram L, Weston S, Carruthers S, Hargreave FE. Induced sputum: time from expectoration to processing. *Eur Respir J* 2002; 19(4): 706-708.
- Fahy JV, Wong H, Liu J, Boushey HÁ. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects". *Am Rev Respir Dis* 1993 ; 147(5): 1126-1131.
- Franciosi LG, Page CP, Celli BR, Gazzola M, Walker MJ, Danhof M, et al. Markers of disease severity in chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther* 2006; 19(3): 189-199.
- Frisancho AR. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr* 1981; 34(11): 2540-2545.
- Fujimoto K, Yasuo M, Urushibata K, Hanaoka M, Koizumi T, Kubo K. Airway inflammation during stable and acutely exacerbated chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2005; 25(4): 640-646.
- Fuke S, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Morikawa T, Katoh H, Nishimura M. Chemokines in bronchiolar epithelium in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31(4): 405-412.
- Gamble E, Grootendorst DC, Hattotuwa K, O'Shaughnessy T, Ram FSF, Qiu Y, et al. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis. *Eur Respir J* 2007; 30(3): 467-471.
- Gan WQ, Man SFP, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59(7): 574-580.

- Gan WQ, Man SFP, Sin DD. The interactions between cigarette smoking and reduced lung function on systemic inflammation. *Chest* 2005; 127(2): 558-564.
- Garey KW, Neuhauser MM, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Markers of inflammation in exhaled breath condensate of young healthy smokers. *Chest* 2004; 125(1): 22-26.
- Gibson PG, Girgis-Gabardo A, Morris MM, Mattoli S, Kay JM, Dolovich J, et al. Cellular characteristics of sputum from patients with asthma and chronic bronchitis. *Thorax* 1989; 44(9): 693-699.
- Godoy I, Campana AO, Geraldo RRC, Padovani CR, Paiva SAR. Cytokines and dietary energy restriction in stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur Respir J* 2003; 22(6): 920-925.
- GOLD - Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD executive summary - updated 2007. www.goldcopd.org.
- Hacievliyagil SS, Gunen H, Mutlu LC, Karabulut AB, Temel I. Association between cytokines in induced sputum and severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2006; 100(5): 846-854.
- Higashimoto Y, Yamagata Y, Taya S, Iwata T, Okada M, Ishiguchi T, et al. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma: similarities and differences. *Respirology* 2008; 13(1): 128-133.
- Hill AT, Bayley D, Stockley RA. The interrelationship of sputum inflammation markers in patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(3): 893-898.

- Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN, Hodge S. Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects. *Clin Exp Immunol* 2007; 150(1): 22-29.
- Hollander C, Sitkauskiene B, Sakalauskas R, Westin U, Janciauskiene SM. Serum and bronchial lavage fluid concentrations of IL-8, SLPI, sCD14 and sICAM-1 in patients with COPD and asthma. *Respir Med* 2007; 101(9): 1947-1953.
- Jardim JR, Oliveira JA, Nascimento O. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). *J Bras Pneumol* 2004; 30(S5): S1-S42.
- Kanazawa H, Kurihara N, Otsuka T, Fujii T, Tanaka S, Kudoh S, et al. Clinical significance of serum concentration of interleukin-8 in patients with bronchial asthma or chronic pulmonary emphysema. *Respiration* 1996; 63(4): 236-240.
- Kanazawa H, Shoji S, Yamada M, Fujii T, Kawaguchi T, Kudoh S, et al. Increased levels of nitric oxide derivatives in induced sputum in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(5): 624-629.
- Karadag F, Kirdar S, Karul AB, Ceylan E. The value of C-reactive protein as a marker of systemic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Intern Med* 2008; 19(2): 104-108.
- Keatings VM, Collins PD, Scott D, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(2): 530-534.
- Kelly MG, Brown V, Martin SL, Ennis M, Elborn JS. Comparison of sputum induction using high-output and low-output ultrasonic nebulizers in normal subjects and patients with COPD. *Chest* 2002; 122(3): 955-959.

- Knudson RJ, Lebowitz MD, Holberg CJ, Burrows B. Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging. *Am Rev Respir Dis* 1983 ; 127(6): 725-734.
- Kwon OJ, Au BT, Collins PD, Adcock IM, Mak JC, Robbins RR, et al. Tumour necrosis factor induced interleukin-8 expression in cultured human airway epithelial cell. *Am J Physiol* 1994; 267(4): L398-L405.
- Kyle UG, Pichard C, Rochat T, Slosman DO, Fitting J-W, Thiebald D. New bioelectrical impedance formula for patients with respiratory insufficiency: comparison to dual-energy X-ray absorptiometry. *Eur Respir J* 1998; 12(4): 960-966.
- Kyle UG, Genton L, Karsegard L, Slosman DO, Pichard C. Single prediction equation for bioelectrical impedance analysis in adults aged 20-94 years. *Nutr* 2001; 17(3): 248-253.
- Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gomez JM, et al. Bioelectrical impedance analysis – part I: review of principles and methods. *Clin Nutr* 2004; 23(6): 1430-1453.
- Lams BEA, Sousa AR, Rees PJ, Lee TH. Immunopathology of the small airway submucosa in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(5): 1518-1523.
- Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Chung F. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers – regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(4): 1355-1360.
- Malerba M, Ricciardolo F, Radaeli A, Torregiani C, Ceriani L, Mori E, et al. Neutrophilic inflammation and IL-8 levels in induced sputum of alpha-1-antitrypsin PiMZ subjects. *Thorax* 2006; 61(2): 129-133.

- McCrea KA, Ensor JE, Nall K, Bleecker ER, Hasday JD. Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150(3): 696-703.
- Nocker RET, Schoonbrood DFM, van de Graaf EA, Hack CE, Lutter R, Jansen HM, et al. Interleukin-8 in airway inflammation in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109(2): 183-191.
- Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanovic R, Maestrelli P, et al. Sputum induction. *Eur Respir J* 2002; 20(Suppl. 37): 3s-8s.
- Parr DG, White AJ, Bayley DL, Guest PJ, Stockley RA. Inflammation in sputum relates to progression of disease in subjects with COPD: a prospective descriptive study. *Respir Res* 2006; 7(1): 136-147.
- Patel IS, Roberts NJ, Lloyd-Owen SJ, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Airway epithelial inflammatory responses and clinical parameters in COPD. *Eur Respir J* 2003; 22(1): 94-99.
- Peleman RA, Ryttilä PH, Kips JC, Joos GF, Pauwels RA. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999; 13(4): 839-843.
- Pesci A, Balbi B, Majori M, Cacciani G, Bertacco S, Alciato P, et al. Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1998; 12(2): 380-386.
- Pinto-Plata VM, Müllerova H, Toso JF, Feudjo-Tepie M, Soriano JB, Vessey RS, et al. C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. *Thorax* 2006; 61(1): 23-28.

- Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(2): 308-317
- Pizzichini E, Pizzichini MM, Kidney JC, Efthimiadis A, Hussack P, Popov T, et al. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur Respir J* 1998; 11(4): 828-834.
- Pizzichini E, Pizzichini MMM, Leigh R, Djukanovic R, Sterk PJ. Safety of sputum induction. *Eur Respir J* 2002; 20(Suppl. 37): 9s-18s.
- Popov TA, Pizzichini MMM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J* 1995; 8(4): 559-565.
- Prince P, Bertrand M, Boulay ME, Bernier MC, Boulet LP. Optimization of the conditions for preservation of induced sputum – influence of freezing on cellular analysis. *Chest* 2005; 128(2): 980-985.
- Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciruba FC, et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(3): 469-473.
- Richman-Eisenstat JBY, Jorens PG, Herbert CA, Ueki I, Nadel JA. Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am J Physiol* 1993; 264(8): L413-L418.
- Riise GC, Ahlstedt S, Larsson S, Enander I, Jones I, Larsson P, et al. Bronchial inflammation in chronic bronchitis assessed by measurement of cell products in bronchial lavage fluid. *Thorax* 1995; 50(4): 360-365.

- Rufino R, Costa CH, Souza HSP, Madi K, Lapa e Silva JR. Perfil celular do escarro induzido e sangue periférico na doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol* 2007; 33(5): 510-518.
- Rutgers SR, Postma DS, ten Hacken NHT, Kauffman HF, van der Mark TW, Koëter GH, et al. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke. *Thorax* 2000; 55(1): 12-18.
- Sadowska AM, van Overveld FJ, Górecka D, Zdrzal A, Filewska M, Demkow UA, et al. The interrelationship between markers of inflammation and oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: modulation by inhaled steroids and antioxidant. *Respir Med* 2005; 99(2): 241-249.
- Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp E, et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(3): 822-826.
- Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, et al. CD8+ ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(2): 711-717.
- Saraiva-Romanholo BM, Barnabé V, Carvalho ALI, Martins MA, Sadiva PHN, Nunes MPT. Comparison of three methods for differential cell count in induced sputum. *Chest* 2003; 124(3): 1060-1066.
- Schols AM, Soeters PB, Dingemans AM, Mostert R, Frantzen PJ, Wouters EF. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147(5): 1151-1156.
- Schulz C, Wolf K, Harth M, Krätzel K, Kunz-Schughart L, Pfeifer M. Expression and release of interleukin-8 by human bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease, smokers, and never-smokers. *Respiration* 2003; 70(3): 254-261.

- Schulz C, Krätzel K, Wolf K, Schroll S, Köhler M, Pfeifer M. Activation of bronchial epithelial cells in smokers without airway obstruction and patients with COPD. *Chest* 2004; 125(5): 1706-1713.
- Sin DD, Lacy P, York E, Man SFP. Sin DD, Lacy P, et al. Effects of fluticasone on systemic markers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170(7): 760-765.
- Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, et al. Induced sputum cellularity – reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(3): 1172-1174.
- Stănescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, et al. Airway obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV₁ in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax* 1996; 51(3): 267-271.
- Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Inoue S, Hino T, Saito H, et al. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor- α system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(4): 1179-1184.
- Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Yamamoto K, Fujimoto K, Satoh K, et al. Interleukin-10 levels in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J* 1999; 14(2): 309-314.
- Tanino M, Betsuyaku T, Takeyabu K, Tanino Y, Yamaguchi E, Miyamoto K, et al. Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema. *Thorax* 2002; 57(5): 405-411.
- Tappia PS, Troughton KL, Langley-Evans SC, Grimble RF. Cigarette smoking influences cytokine production and antioxidant defences. *Clin Sci* 1995; 88(4): 485-489.

- Traves SL, Culpitt S, Russell REK, Barnes PJ, Donnelly LE. Increased levels of the chemokines GRO- α and MCP-1 in sputum samples from COPD patients. *Thorax* 2002; 57(7): 590-595.
- Turato G, Di Stefano A, Maestrelli P, Mapp CE, Ruggieri MP, Roggeri A, et al. Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(4): 1262-1267.
- Tsoumakidou M, Tzanakis N, Siafakas NM. Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respir Med* 2003; 97(8): 863-871.
- Twaddell SH, Gibson PG, Carty K, Woolley KL, Henry RL. Assessment of airway inflammation in children with acute asthma using induced sputum. *Eur Respir J* 1996; 9(10): 2104-2108.
- van Eeden SF, Hogg JC. The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking. *Eur Respir J* 2000; 15(5): 915-921.
- Vernooy JH, Küçükaycan M, Jacobs JA, Chavannes NH, Buurman WA, Dentener MA, et al. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease – Soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(9): 1218-1224.
- Xiao W, Hsu Y, Ishizaka A, Kirikae T, Moss RB. Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components, and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD, and asthma inflammation. *Chest* 2005; 128(4): 2316-2326.
- Walter R, Wilk J, Larson MG, Vasan RS, Keaney JF, Lipinska I, et al. Systemic inflammation and COPD: The Framingham Heart Study. *Chest* 2008; 133(1): 19-25.
- Weidong S, Jiangyun Z, Zhengang L. Interleukin-6 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with COPD. *Chin Med J* 2001; 114(11): 1140-1142.

- Willemse BWM, ten Hacken NHT, Rutgers B, Lesman-Leegte IGAT, Postma DS, Timens W. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J* 2005a; 26(5): 835-845.
- Willemse BWM, ten Hacken NHT, Rutgers B, Postma DS, Timens W. Association of current smoking with airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and symptomatic smokers. *Respir Res* 2005b; 6(1): 38-48.
- WHO - Consultation on obesity. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva, Switzerland: WHO Technical Report Series 894, 2000. www.who.int/en - acessado em março de 2008.
- WHO - Chronic Respiratory Diseases. Geneva, Switzerland: WHO Technical Report 2007. www.who.int/en - acessado em março de 2008.
- Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, et al. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest* 1997; 112(2): 505-510.
- Yende S, Waterer GW, Tolley EA, Newman AB, Bauer DC, Taaffe DR, et al. Inflammatory markers are associated with ventilatory limitation and muscle dysfunction in obstructive lung disease in well functioning elderly subjects. *Thorax* 2006; 61(1): 10-16.
- Zeidel A, Beilin B, Yardeni I, Mayburd E, Smirnov G, Bessler H. Immune response in asymptomatic smokers. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002; 46(8): 959-964.
- Ziora D, Dworniczak S, Jastrzebski D, Krzywiecki A, Kozielski J. Correlation of exhaled nitric oxide with nitrogen oxides and selected cytokines in induced sputum of chronic obstructive pulmonary disease patients. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58(Suppl 5): 791-799.

Anexos

Anexo 1: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu

 **Universidade Estadual Paulista**
Faculdade de Medicina de Botucatu 

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-8143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

 Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 13 de agosto de 2.004 OF 370/2004-CEP
MACAH asc

*Ilustríssima Senhora
Profª Drª Irma de Godoy
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina de Botucatu*

Prezada Profª Irma,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que em reunião de 02/08/2004, foi dado ciência aos membros do CEP, que aprovaram sua solicitação de agrupamento dos projetos a seguir: 1. Avaliação da função e massa muscular e do estado inflamatório em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, de autoria de Fernanda Figueiroa Sanches (aprovado pelo CEP 06/10/2003); 2. Qualidade de vida e inflamação de pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), de autoria de Suzana Erico Tanni (aprovado pelo CEP 01/12/2003); 3. Citocinas e função pulmonar em tabagistas, de autoria de Nilva Regina Gelamo Pelegrino (aprovado pelo CEP 01/12/2003), transformando-os no Projeto de Pesquisa intitulado "Papel dos mediadores inflamatório e da vitamina A em diferentes estádios e nas manifestações clínica da asma e da doença pulmonar obstrutiva crônica", de autoria de Fernanda Figueiroa Sanches, Suzana Erico Tanni e Nilva Regina Gelamo Pelegrino", sob orientação de Vossa Senhoria.

Atenciosamente,


*Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP*

Anexo 2: Termo de consentimento livre e esclarecido

TÍTULO DA PESQUISA:

“Papel dos mediadores inflamatórios e da vitamina A em diferentes estádios e nas manifestações clínicas da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica”

O objetivo deste estudo é avaliar a inflamação, o estado nutricional da vitamina A, a qualidade de vida e os músculos esqueléticos em indivíduos fumantes e/ou portadores de DPOC, conhecida como bronquite crônica e enfisema.

O Sr (a) está sendo convidado (a) a participar do estudo por ser fumante ou ser portador da DPOC. Durante o estudo serão realizadas avaliações de sua função pulmonar, qualidade de vida e seu estado nutricional. Será coletada uma amostra de escarro, após receber inalações com solução salina, e coletadas duas amostras de sangue para exames bioquímicos. Seus músculos serão avaliados por meio de testes em aparelhos de musculação e de tomografia computadorizada.

Os riscos associados aos procedimentos utilizados na realização do estudo são mínimos e o Sr (a) será acompanhado (a) por um médico durante os procedimentos, para eventuais intercorrências.

O estudo não envolve qualquer alteração nos tratamentos que esteja recebendo e as informações e dados pessoais serão utilizados apenas em reuniões de caráter científico e serão mantidos em sigilo profissional.

Qualquer dúvida em relação ao estudo será imediatamente esclarecida pelos responsáveis pelo estudo e Sr (a) receberá explicações detalhadas sobre os procedimentos e métodos que serão realizados. O Sr (a) não receberá remuneração para participar da pesquisa.

O Sr (a) estará livre para retirar seu consentimento e desistir de participar do estudo, em qualquer momento, sem interferência no relacionamento que tenha com a instituição.

Eu _____ entendo o que foi descrito acima e dou meu consentimento para ser incluído neste estudo.

Assinatura do participante

Eu declaro que expliquei ao participante acima a natureza e os objetivos da pesquisa, os prováveis benefícios e possíveis riscos com a participação neste estudo.

Assinatura da pesquisadora

Pesquisadores:

Nilva Regina Gelamo Pelegrino
Rua Bartolomeu de Gusmão, 2-102 – Bauru/SP – fone: 14-3227-3459
E-mail: nilpneumo@bol.com.br

Fernanda Figueirôa Sanches
Rua Liberdade 797 – Birigui/SP – fone: 18 – 36423323
E-mail: fersanchez@hotmail.com

Suzana Erico Tanni
Rua Laurindo Izidoro Jaqueta, 305
Jardim Paraíso – Botucatu/SP – fone: 14 – 38822969
E-mail: suzanapneumo@bol.com.br

Orientadora: Dra. Irma de Godoy
Pneumologia – Departamento de Clínica médica
Faculdade de Medicina de Botucatu – fone: 14-3882-2969 ou 38823822
E-mail: irma@fmb.unesp.br

