

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

Renata Antonialli Ferreira do Amaral

Avaliação do Retinol no Escarro e no Soro de
Tabagistas e Pacientes com Doença Pulmonar
Obstrutiva Crônica e sua relação com o processo
inflamatório

Botucatu – SP
2010

Renata Antonialli Ferreira do Amaral

Avaliação do Retinol no Escarro e no Soro de Tabagistas e Pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica e sua relação com o processo inflamatório

Dissertação 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 mestre.

Orientadora: Prof^a. Adjunta Irma de Godoy

Botucatu-SP

2010

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

Amaral, Renata Antonialli Ferreira do.

Avaliação do Retinol no escarro e no soro de tabagistas e pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e sua relação com o processo inflamatório / Renata Antonialli Ferreira do Amaral. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientadora: Irma de Godoy
Assunto CAPES: 40105008

1. Tabagismo 2. Doença pulmonar obstrutiva

Palavras-chave: DPOC; Escarro induzido; Retinol; Tabagismo; Vitamina A

Dedicatória

Dedico este trabalho ao eixo central da minha vida: minha amada família, meus pais Paulo Eduardo e Edna Regina e meus irmãos João Paulo e José Eduardo pelo apoio incondicional e fraterno durante todos estes anos. Sem vocês, não chegaria até aqui! Muito obrigada! Amo muito vocês!

Ao meu noivo Rafael, que é o primeiro e principal integrante de outra linda família que está prestes a ser formada. Obrigada meu amor, pelo companheirismo, paciência, cumplicidade e amor sem limites, em todos os momentos. Obrigada por me reerguer e estabilizar sempre, sendo instrumento do mais puro amor de Deus em minha vida! Te amo infinito!

Agradecimento Especial

À Prof^a. Dra. Irma de Godoy, minha orientadora, exemplo de garra, determinação, humanidade, profissionalismo e principalmente paciência perante minhas fraquezas. Serei eternamente grata, por ter contribuído com meu crescimento pessoal e profissional e por ter me incentivado a chegar até aqui. Meu eterno carinho e gratidão!

Agradecimientos

A todos os participantes deste estudo que prontamente se dispuseram a contribuir com nosso trabalho.

À Prof^ª. Dra. Irma de Godoy, minha orientadora, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Alberto Rupp de Paiva, sempre disposto a contribuir com nosso trabalho, através de seu exímio conhecimento na área; além de auxílio na análise estatística e interpretação dos resultados. Muito obrigada!

À Prof^ª. Dra. Aparecida Yooko Outa Angeleli, não só pela atuação ativa, constante e essencial na concretização deste trabalho; mas principalmente, por ser uma das responsáveis pelo meu processo de formação humana, baseado essencialmente na fé e no amor. Cida querida, levo muito de você dentro de mim! Muito obrigada por todo o carinho e colo sempre disponível! Te amo de todo o coração!

À Dra. Suzana Erico Tanni, pela disponibilidade e auxílio na análise e interpretação dos dados; além de ter me apresentado a este grupo de pesquisa tão especial que guardo em meu coração!

Aos queridos amigos de pesquisa: Camila, Cida, Corina, Cris, Daniela, Fernanda, Karina, Laura, Márcia, Mariana, Nilva, Paulo, Renata, Sandrinha, Suzana e Thiago pela ajuda na coleta de dados, apoio e incentivo em todos os momentos!

Aos queridos amigos do Departamento de Clínica Médica: Alexandre, Bruno, Bruninho, Elisângela, Laura, Mário e Renato pelo carinho e disponibilidade a todo o momento.

As funcionárias do Laboratório de Função Pulmonar: Eva, Lúcia , Lurdinha e Mary que me ajudaram na recepção aos pacientes, sempre com muito carinho.

Ao GOU (Grupo de Oração Universitário – Ministério Universidades Renovadas) e aos amados amigos que o enriquecem ainda mais, levando o amor de Deus dentro e fora da Universidade: Atroveran, Betânia, Bruna, Carla, Cíntia, Gabriela, Jurandir, Léo, Luciana (Capitu), Maila, Mariana (Mikota), Marjorie, Meire, Nadja, Nicolas, Priscila Murador, e a todos que um dia passaram por ali e deixaram uma palavra, um sorriso ou até mesmo lágrimas. Muito obrigada pelo carinho, apoio e orações de todos vocês! Essa família MUR é sensacional!

Aos amigos do Grupo de Oração Divina Misericórdia, pelo carinho, oração e alegria contagiante!

À querida Meirinha, minha mãe, amiga de todos os segundos, escudeira fiel, à distância ou bem pertinho. Não tenho palavras para agradecer tudo o que fez e faz por mim, em todos os âmbitos de minha vida. Minha eterna gratidão, oração e amor! Amo você!

À Pamela, pelo carinho, companheirismo e paciência durante esses quatro anos. Muito obrigada!

Aos grandes e eternos amigos de Botucatu: Carol, Elisiane, Fernando, Priscila (“cumpa” do coração) que estiveram sempre à disposição para choro e gargalhadas. Muito obrigada meu amigos queridos, sem vocês Botucatu não seria a mesma coisa!

Às grandes amigas/irmãs da minha vida: Helen, Marina, Priscila, Renata, Susan e Thais que mesmo à distância estiveram sempre presentes em minha vida! Amo vocês!

À Família Cavalcante, pela acolhida, carinho, apoio, incentivo e por me darem um presente mais que especial: minha afilhada que tanto amo: Cíntia!

À Família Ferraz, que me ensinou com maestria a arte de viver: com muito amor, verdade e coerência! Minha eterna gratidão!

À Família Guimarães, em especial à Kátia, que soube mais do que ninguém, ocupar o papel de profissional fonoaudióloga, simultaneamente, ao papel de mãe, me dando suporte em um dos momentos mais delicados de minha vida. Obrigada família querida!

À Família Saran, minha família de sangue e coração em Botucatu, impossível agradecer em palavras o que fizeram e fazem por mim em cada instante vivido nesta cidade, desde o início. Muito obrigado por me acolherem como “filha do meio”! Amo demais vocês!

Ao Coral Canto & Encanto, que só encantou ainda mais minha vida em Botucatu. Em especial, à regente Rebecca Brisolla que foi muito mais que uma regente para mim, foi um exemplo de vida. Obrigada por

preencherem meus dias com muita alegria, amizades verdadeiras e acima de tudo: música de qualidade. Estão todos em meu coração!

Por fim, aos grandes responsáveis pela concretização deste trabalho e por todas as vitórias de minha vida: *Paizinho Amado do Céu e minha Mãezinha querida*. Sem a força que vem do Alto e sem tanta gente querida que me foi presenteada por Deus durante esse período, certamente eu nada seria. Muito obrigada Senhor, por inúmeras maravilhas e graças alcançadas durante essa fase tão especial vivida em Botucatu.

Epígrafe

Põe tua confiança no Senhor, e segue os seus caminhos. Ele te exaltar.

Salmo 36

RESUMO

Introdução: A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e o tabagismo são doenças inflamatórias que interferem no metabolismo da vitamina A; entretanto, o comportamento do retinol nas vias aéreas destes pacientes ainda é desconhecido.

Objetivos: Avaliar o retinol no escarro induzido e no soro de tabagistas e pacientes com DPOC e a associação destes valores com os marcadores da inflamação sistêmica e nas vias aéreas.

Participantes e Métodos: Foram avaliados 50 pacientes com DPOC moderada a muito grave [idade média = $64,0 \pm 9,0$ anos; $VEF_1(\%)$ $49,9 \pm 16,8$], 19 tabagistas [idade média = $49,0 \pm 6,4$ anos; $VEF_1(\%)$ $107,2 \pm 15,9$] e 31 indivíduos controles [idade média = $48,2 \pm 8,1$ anos; $VEF_1(\%)$ $111,8 \pm 15,5$]. Todos os indivíduos da pesquisa foram submetidos à avaliação clínica, espirometria pré e pós-broncodilatador, oximetria de pulso, avaliação da ingestão de vitamina A e do estado nutricional e coleta de sangue. A indução e coleta de escarro foi realizada em pacientes com DPOC e tabagistas. As concentrações de retinol e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-6 e IL-8 foram avaliadas no soro e no sobrenadante de escarro induzido. A concentração de PCR no soro também foi avaliada. O teste “t” de Student ou de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação entre dois grupos. As associações entre as variáveis foram analisadas por meio do teste de correlação de Pearson ou Spearman. Para a comparação de mais de dois grupos foi utilizada ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey ou Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn. A correção para idade foi realizada através da análise de covariância (ANCOVA).

Resultados: Os valores médios de vitamina sérica foram significativamente menores nos pacientes com DPOC ($1,80 [1,25-2,16]$ $\mu\text{mol/L}$) quando comparados aos tabagistas ($2,40 [1,95-3,14]$ $\mu\text{mol/L}$) ($p < 0,001$); enquanto que, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos controles ($1,98 [1,82-2,32]$ $\mu\text{mol/L}$) quando comparados a tabagistas e pacientes com DPOC. Os valores da IL-6 [controles: $0,36 (0,23-0,44)$ pg/mL: tabagistas: $0,46 (0,30-0,88)$ pg/mL: DPOC: $1,12 (0,80-1,90)$ g/mL] e da PCR [controles: $1,06 (0,65-1,65)$ mg/L: tabagistas: $1,69 (0,54-3,65)$ mg/L: DPOC: $6,38 (2,67-9,37)$ mg/L], no sangue periférico, foram

significativamente maiores nos pacientes com DPOC quando comparados aos controles e tabagistas. Não encontramos diferença significativa nos valores de retinol, IL-6(pg/mL), IL-8(pg/ mL), número de neutrófilos e de células totais no escarro entre tabagistas e pacientes com DPOC. Entretanto, pacientes com DPOC apresentaram maior concentração de TNF- α no escarro quando comparados aos tabagistas. Verificamos correlação significativa negativa entre o retinol no escarro e a porcentagem de neutrófilos no escarro ($r = -0,26; p = 0,002$) e correlação significativa positiva entre VEF₁/CVF (%) e retinol no soro ($r = 0,32; p = 0,006$). As correlações entre a ingestão de vitamina A, os valores séricos de retinol e a concentração de retinol no escarro não foram significativas.

Conclusões: A concentração de retinol no escarro induzido de tabagistas e pacientes com DPOC pode ser quantificada e é negativamente influenciada pela intensidade da inflamação localizada avaliada por meio da porcentagem de neutrófilos no escarro. O escarro induzido, método de fácil aplicabilidade, seguro e de baixo custo pode ser uma ferramenta não invasiva para avaliar o estado nutricional do retinol na traquéia e brônquios proximais.

Abstract

Introduction: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and tobacco smoking are inflammatory diseases that interfere with vitamin A metabolism; however, the retinol status in the airways of these patients is unknown.

Aim: The aim of this study was to evaluate retinol concentration in the induced sputum and serum of current smokers and COPD patients and to study the association between these values and those of systemic and airways inflammatory markers.

Participants and Methods: We evaluated 50 patients with moderate to very severe COPD [mean age = $64,0 \pm 9,0$ y; FEV₁ (%) $49,9 \pm 16,8$], 19 current smokers [mean age = $49,0 \pm 6,4$ y; FEV₁(%) $107,2 \pm 15,9$] and 31 control subjects [mean age = $48,2 \pm 8,1$ y; FEV₁ (%) $111,8 \pm 15,5$]. All subjects underwent to clinical evaluation, pre and post-bronchodilator spirometry, pulse oximetry, evaluation of vitamin A intake and of the nutritional status and blood sampling. Sputum induction was performed only in COPD patients and current smoker subjects. Retinol, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL)-6 and IL-8 were measured in serum and induced sputum. Serum concentration of C-reactive protein (CRP) was also measured. For comparison between two groups, we used either the Student "t" test or Mann-Whitney test. The associations among variables were analyzed by means of the Pearson correlation or using Spearman. For comparison of more than two groups we used one-way ANOVA followed by Tukey test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn. The correction for age was performed by analysis of covariance (ANCOVA).

Results: Mean values of serum retinol were significantly lower in COPD patients ($1,80 [1,25-2,16]$ $\mu\text{mol/L}$) when compared to current smokers ($2,40 [1,95-3,14]$ $\mu\text{mol/L}$) ($p < 0,001$); however, values were not significantly different between control subjects ($1,98 [1,82-2,32]$ $\mu\text{mol/L}$), current smokers and COPD patients. IL-6 [controls: $0,36 (0,23-0,44)$ pg/mL: smokers: $0,46 (0,30-0,88)$ pg/mL: COPD: $1,12 (0,80-1,90)$ g/mL] and of CRP [controls: $1,06 (0,65-1,65)$ mg/L: smokers: $1,69 (0,54-3,65)$ mg/L: COPD: $6,38 (2,67-9,37)$ mg/L], in peripheral blood, were significantly higher in COPD patients when compared to controls and smokers. Retinol, IL-6 (pg/mL), IL-8 (pg/(mL)), number of neutrophils and total cell count in sputum were

similar in smokers and COPD patients. However, COPD patients presented higher sputum concentration of TNF- α when compared to smokers. Negative statistically significant correlation was shown between retinol and the percentage of neutrophils in the sputum ($r = -0,26; p=0,002$) and positive statistically significant association between FEV₁/FVC (%) and serum retinol ($r=0,32; p=0,006$) was also found. Associations between vitamin A intake, serum and sputum retinol were not statistically significant.

Conclusions: Sputum concentration of retinol in current smokers and COPD patients is measurable and is negatively influenced by airway inflammation as measured by the percentage of neutrophils. Induced sputum, an easily applied and safe method, which has a low cost, can be a non-invasive tool to assess the nutritional status of retinol in the trachea and proximal bronchi.

Palavras-Chave

Palavras-chave:

DPOC; Escarro induzido; Retinol; Tabagismo; Vitamina A

Key words:

COPD; Induced sputum; retinol; smoking; vitamin A

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1:	Características gerais dos grupos controle, tabagista e DPOC.....	52
Tabela 2:	Resultados bioquímicos de controles, tabagistas e pacientes com DPOC.....	52
Tabela 3:	Valores de ingestão alimentar de controles, tabagistas e pacientes com DPOC.....	53
Figura 1:	Box-plot das concentrações séricas de IL-6 (pg/mL), PCR (mg/L) de α_1 -glicoproteína ácida e TNF- α (pg/mL) nos indivíduos controles, tabagistas sem DPOC e pacientes com DPOC.....	55
Tabela 4:	Resultados dos atributos avaliados no escarro em tabagistas e pacientes com DPOC.....	56
Figura 2:	Estudo de correlação entre retinol (μ mol/L) e neutrófilos (%) no escarro induzido de tabagistas e pacientes com DPOC.....	57
Figura 3:	Estudo de correlação entre retinol no soro (μ mol/L) e relação VEF ₁ /CVF (%) de tabagistas e pacientes com DPOC.....	57

Lista de Abreviaturas

AR: Ácido retinoico

CVF: Capacidade vital forçada

CYP: Citocromo P450

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

DTT: *Dithiothreitol*

EAR: Equivalente da atividade de retinol

ECRHS: *European Community Respiratory Health Survey*

GOLD: *Global initiative for obstructive*

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

IL: Interleucinas

IMC: Índice de massa do corpo

IMMC: Índice de massa magra do corpo

LBA: Lavado bronco alveolar

LPS: Lipopolissacéride

MMC: Massa magra do corpo

NHANES: *National Health and Nutrition Examination Survey*

ODP: Oxigenoterapia domiciliar prolongada

OMS: Organização Mundial de Saúde

PaO₂: Pressão arterial de oxigênio

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Proteína C-reativa

PFE: Pico de fluxo expiratório

RBP: Proteína ligadora do retinol

SpO₂: Saturação periférica de oxigênio

THF: Tetrahidrofurano

TNF- α : Fator necrose tumoral alfa

TTR: Transtirretina

VARA: Vitamina A e ácido retinoico

VEF₁: Volume expiratório forçado no primeiro segundo

Sumário

Introdução.....	29
Objetivos.....	38
Participantes e Métodos.....	40
Resultados.....	50
Discussão.....	58
Conclusões.....	64
Referências.....	66
Anexo.....	74

Introdução

INTRODUÇÃO

O termo “vitamina A” é genérico e usado para descrever todos os retinoides que têm atividade biológica de vitamina A, incluindo uma ampla variedade de compostos naturais na dieta. Vitamina A refere-se aos três compostos ativos pré-formados, que exibem atividade metabólica: o álcool (retinol), o aldeído (retinal ou retinaldeído) e o ácido (ácido retinoico). Estas formas ativas de vitamina A existem apenas em alimentos de origem animal. O retinol é com frequência esterificado com ácidos graxos de cadeia longa, principalmente com o palmitato, formando uma estrutura química denominada éster de retinil. Esta esterificação confere maior estabilidade ao retinol (Roncada, 2000; Ross, 2003; Mahan & Escott-Stump 2005). O principal órgão de armazenamento do retinol é o fígado; entretanto, os rins, o tecido adiposo, os pulmões e os músculos também o armazenam (Mahan & Escott-Stump 2005).

A vitamina A desempenha papel importante no crescimento e desenvolvimento, na manutenção e integridade de células epiteliais, na visão, na reprodução, no sistema imune e na modulação de inúmeras condições patológicas. O ácido retinoico (AR) induz regeneração de diversos tecidos e órgãos nos anfíbios e mamíferos (Ross et al., 2006). A vitamina A, sistêmica ou localizada, está envolvida na diferenciação e na maturação pulmonar e sua deficiência predispõe o aparecimento de infecções respiratórias (Geoergieff & Radmer, 1991; Biesalski & Stofft, 1992; Chytil, 1992; Zachman, 1995; Baybutt et al., 2000). Durante o período pós-natal, os pulmões são muito sensíveis à diminuição da vitamina A na dieta. Em animais com deficiência da vitamina ocorrem alterações na morfologia da traquéia e brônquios, como por exemplo, a substituição do epitélio mucossecretor por epitélio escamoso estratificado queratinizado (Chytil, 1996). A ramificação das vias aéreas dos pulmões na fase fetal, durante o desenvolvimento da árvore alveolar, é acelerado pela vitamina A (Chytil, 1996). Além disso, alguns estudos mostraram que a suplementação com ácido retinoico protegeu e restaurou parcialmente o enfisema pulmonar induzido pela elastase (Massaro & Massaro, 1996; Massaro & Massaro, 1997; Massaro & Massaro, 2000).

Estudos em animais e humanos mostram que existe relação entre o estado

nutricional da vitamina A, tabagismo e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Biesalski & Stofft, 1992; Mukherjee et al., 1995; Paiva et al., 1996; Li et al., 2003; Hittelman et al., 2007). Estudo experimental avaliou os efeitos da exposição à fumaça do cigarro sobre níveis de retinol no plasma, pulmão, lavado bronco alveolar (LBA) e fígado de porquinhos da Índia. Os animais dos grupos expostos à fumaça do cigarro apresentaram aumento dos níveis de retinol nos pulmões e redução do retinol no plasma quando comparados aos controles. Quando avaliados seis semanas após o final da exposição, apenas o aumento do retinol nos pulmões manteve-se estatisticamente significativo. Os autores sugerem que a diminuição de vitamina A no plasma e o aumento concomitante no pulmão podem ocorrer devido à mobilização da vitamina A do plasma para os pulmões. O estudo concluiu que o estado nutricional da vitamina A interfere nos efeitos deletérios da fumaça do cigarro tanto em tabagistas quanto em não tabagistas expostos ao fumo passivo (Mukherjee et al., 1995).

Por outro lado, em ratos expostos à fumaça de cigarro, por cinco dias/semana, durante seis semanas, os níveis de vitamina A diminuíram significativamente no sangue, pulmão e fígado dos ratos expostos mesmo sem alteração da dieta (Li et al., 2003). Houve relação inversa significativa entre a concentração de vitamina A nos pulmões e a gravidade do enfisema, apontando que a exposição à fumaça do cigarro induz à depleção de vitamina A e que esta depleção se associa com o desenvolvimento do enfisema (Li et al., 2003).

Em estudo clínico, Paiva et al. (1996), analisaram o estado nutricional da vitamina A em pacientes com DPOC, tabagistas e controles. Avaliaram 36 indivíduos com idades entre 43 – 74 anos separados em saudáveis (n=7), tabagistas (n=7), pacientes com DPOC leve (n=9), DPOC moderado-grave (n=7) e DPOC moderado-grave em agudização (n=6). Foi avaliada também a concentração sérica de éster de retinil, retinol, proteína ligadora do retinol (RBP) e transtirretina (TTR). Não houve diferença estatística significativa nos valores de ingestão de vitamina A entre os grupos. Indivíduos saudáveis, tabagistas e pacientes com DPOC leve não apresentaram diferença nas concentrações séricas de retinol, RBP e TTR. Entretanto, os pacientes com DPOC moderada a grave apresentaram diminuição da

concentração de RBP e TTR quando comparados aos indivíduos saudáveis. Adicionalmente, correlação positiva significativa foi encontrada entre a concentração sérica de éster de retinil e VEF₁/CVF em tabagistas e pacientes com DPOC moderado-grave, mas não houve associação entre estas variáveis nos indivíduos saudáveis e pacientes com DPOC leve (Paiva et al., 1996). Em outro estudo, que avaliou 777 homens e 839 mulheres, com idade entre 49-79 anos e sobrepeso, os autores verificaram que o retinol apresentou associação positiva independente com o VEF₁ (Shunemann et al., 2001). Relação positiva entre a concentração sérica do retinol e o VEF₁ foi descrita também em pacientes com DPOC candidatos a transplante pulmonar (Forli et al., 2002).

Diante dos resultados citados acima, é possível concluir que o tabagismo induz deficiência e/ou prejudica a função da vitamina A; entretanto, o mecanismo envolvido ainda não está estabelecido (Baybutt & Molteni, 2007). Liu et al. (2003) analisaram se a indução do citocromo P450 (CYP) leva ao catabolismo excessivo do ácido retinoico (AR) através de exposição ao cigarro e/ou a dose farmacológica de β -caroteno. Os animais do estudo foram separados em quatro grupos: expostos ao cigarro, suplementados com β -caroteno ou a combinação de exposição ao cigarro e suplementação com β -caroteno, comparados a grupo controle. O grupo com o tratamento combinado apresentou aumento dose-dependente dos níveis de metabólitos do AR no tecido pulmonar e maior concentração de AR no tecido pulmonar quando comparados com o grupo controle. Adicionalmente, o catabolismo do AR foi substancialmente (~50% a 80%) reduzido por um inibidor de CYP. Estes achados sugerem que baixos níveis de AR nos pulmões dos furões expostos a fumaça do cigarro e/ou dose farmacológica de β -caroteno pode ser causado pelo aumento do catabolismo via indução do CYP (Liu et al., 2003).

Além de função protetora pulmonar, a vitamina A apresenta importante função antiinflamatória e sua deficiência induz ou agrava a inflamação pré-existente (Camisa et al., 1982; Sharma et al., 1990; Sauer et al., 1995; Paquette et al., 1996; Wiedermann et al., 1996; Swamidas et al., 1999; Baybutt et al., 2000; Reifen, 2002). Durante a inflamação aguda ou crônica ocorre aumento da demanda por vitamina A devido ao aumento da reepitelização (Biesalski & Stoff, 1992). A diminuição dos

níveis de vitamina A pode ocorrer também como resultado do aumento da proliferação celular durante o reparo de tecidos o que pode acelerar o processo inflamatório (Reifen, 2002).

Dados extraídos do estudo multicêntrico, *III National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III), Stephensen & Gildengoorin (2000) analisaram PCR e retinol sérico, em indivíduos portadores de alguma forma de processo inflamatório sistêmico. A análise foi conduzida em duas fases de 1988 a 1994. Cada fase incluiu amostra randomizada de população americana não institucionalizada. No início do estudo, foram recrutados aproximadamente 40.000 participantes. A análise sérica do retinol e PCR foi realizada em 10.617 homens e 11.729 mulheres, totalizando 22.346 participantes. Os participantes do NHANES III tiveram concentrações de retinol sérico diminuídas e elevadas concentrações de PCR sérica. A concentração sérica do retinol aumentou gradualmente com a idade em ambos os sexos. No mesmo estudo, o cigarro e doença pulmonar crônica, foram associados com elevadas concentrações de PCR sérica (Stephensen & Gildengorin, 2000).

Tabagistas, com ou sem DPOC, apresentam aumento no processo inflamatório nas pequenas vias aéreas e parênquima pulmonar, caracterizado pelo número elevado de neutrófilos em comparação aos indivíduos saudáveis (Baraldo et al., 2004; Battaglia et al., 2007). Além da inflamação local, os pacientes com DPOC apresentam inflamação sistêmica, caracterizada por aumento de células inflamatórias como neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos T no sangue periférico (Agusti et al., 2003; Gan et al., 2004) e aumento de mediadores inflamatórios sistêmicos como as IL-6, IL-8, TNF- α e proteína C-reativa (PCR) (Vernooy et al., 2002; Agusti et al., 2003; Gan et al., 2004). Dados adicionais sugerem que pacientes com DPOC apresentam níveis maiores de PCR em relação a tabagistas sem DPOC e indivíduos saudáveis (Pinto-Plata et al., 2006). Além disso, a avaliação da inflamação sistêmica na DPOC, pela análise dos dados de Framingham Heart Study, mostrou que a PCR se associou com obstrução de via aérea grave (Walter et al., 2008).

Considerando que as alterações inflamatórias em tabagistas e pacientes com DPOC ocorrem inicialmente nas vias aéreas, se faz importante conhecer as concentrações locais de vitamina A e suas relações com os marcadores inflamatórios nas vias aéreas. Redlich et al. (1996), avaliaram os níveis de carotenóides totais, beta-caroteno, retinol e alfa-tocoferol em células de lavado bronco alveolar (LBA), tecido pulmonar e soro e a ingestão dietética de 21 indivíduos com patologia pulmonar, de ambos os sexos, idades de 47-80 anos, submetidos à cirurgia pulmonar. Dentre eles, nove eram tabagistas ativos e apenas dois não tinham história de tabagismo. A concentração de retinol no soro e no tecido pulmonar não apresentou correlação significativa com os valores de retinol da dieta e não houve associação entre a concentração de retinol no tecido pulmonar e aquela obtida no soro ou nas células do LBA. Entretanto, os autores conseguiram quantificar os níveis de carotenóides totais, retinol, beta-caroteno e alfa-tocoferol em tecido pulmonar humano e em células do LBA e concluíram que os valores destes nutrientes no soro e/ou nas células do LBA podem ser usados para predizer os níveis encontrados no tecido pulmonar (Redlich et al., 1996).

Estudo recente analisou a concentração de retinol total no fígado, plasma e pulmões de ratos suplementados no período pós-natal com placebo, vitamina A, ácido retinoico (AR) e combinação de vitamina A e AR (VARA). Outro grupo suplementado com os mesmo agentes recebeu dieta deficiente em vitamina A. Os autores observam que os ratos que receberam vitamina A, AR ou VARA no período pós-natal, apresentaram aumento do nível de retinol total no pulmão imediatamente após tratamento. O grupo com dieta deficiente em vitamina A mesmo com os suplementos apresentou níveis pulmonares diminuídos. Os resultados deste estudo sugerem que suplementação de vitamina A em dose alta mesmo se adequada para manter o retinol no plasma por um determinado período pode não ser boa estratégia para a manutenção da saúde dos tecidos incluindo os pulmões. Ou seja, a vitamina A pode estar diminuída nos pulmões mesmo com concentrações séricas normais reforçando a hipótese de depleção localizada de vitamina A (Ross & Li, 2007).

Fumantes e portadores de DPOC podem apresentar deficiências localizadas da vitamina A que podem ser revertidas por meio de suplementação; entretanto,

poucos estudos avaliaram o estado da vitamina A e os efeitos da suplementação em tabagistas e pacientes portadores de doenças pulmonares crônicas (Biesalski & Stoff, 1992, Paiva et al., 1996). Biesalski & Stoff, 1992, estudaram trinta indivíduos tabagistas crônicos com distúrbio de função pulmonar, que foram separados em dois grupos; um recebeu suplementação de vitamina A e o outro recebeu placebo. No grupo suplementado, a concentração sérica de éster de retinil aumentou de 65 ± 18 ng/mL para 584 ± 71 ng/mL, o que não ocorreu no grupo placebo. O retinol sérico permaneceu inalterado em ambos os grupos. A função pulmonar e o estado de vitamina A foram continuamente monitorizadas ao longo do período de 60 dias (30 dias de *washout*). Houve aumento significativo do VEF₁ e CVF após ingestão de 25.000 UI de vitamina A durante 30 dias; o VEF₁% aumentou de 64,1% para 82,5% no grupo suplementado e de 67,1% para 70,4% no grupo placebo (Biesalski & Stoff 1992).

Em outro estudo de suplementação, 12 homens tabagistas com DPOC leve e idade entre 45-61 anos, foram separados em dois grupos, no qual seis indivíduos foram suplementados por 30 dias com palmitato de retinila e o outro grupo recebeu placebo. Os autores não observaram diferença na concentração sérica de éster de retinil, após 30 dias de suplementação com palmitato de retinila entre os grupos suplementado e o placebo; entretanto, houve melhora dos valores espirométricos nos pacientes após suplementação. Os autores sugerem que a melhora dos testes de função pulmonar após a suplementação, ocorreu provavelmente devido à correção de deficiência local (pulmonar) da vitamina (Paiva et al., 1996).

Não encontramos estudos que avaliaram as concentrações de vitamina A em na via aérea e suas relações com os marcadores de inflamação em pacientes tabagistas e portadores de DPOC. Portanto, optamos pelo escarro induzido que é um método de fácil aplicabilidade, seguro e de baixo custo e pode ser uma ferramenta para avaliar o estado nutricional do retinol na traquéia e brônquios proximais de forma não invasiva (Drews et al., 2006). Além disso, o conhecimento do estado da vitamina A nas vias aéreas e a correlação com os níveis séricos podem trazer informações importantes para o conhecimento do metabolismo da vitamina em nível pulmonar local.

Hipótese

HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é que a concentração de vitamina A no escarro de tabagistas e pacientes com DPOC está inversamente associada com marcadores da inflamação local e sistêmica.

Objetivos

OBJETIVOS

- λ Avaliar o retinol no escarro induzido e no soro de tabagistas e ex-tabagistas com e sem doença pulmonar obstrutiva crônica;
- λ Avaliar a associação da concentração de retinol no soro e no escarro com marcadores de inflamação localizada e sistêmica.

Participantes e Métodos

PARTICIPANTES E MÉTODOS

Participantes:

Foram avaliados cinquenta pacientes com DPOC moderado a muito grave, 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 por meio da 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; Fabbri et al., 2006). 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, presença de outras doenças respiratórias associadas, ou diagnóstico de outras doenças crônicas como diabetes mellitus II, câncer, insuficiência cardíaca, coronariana, renal ou hepática. Foram excluídos os pacientes com aumento maior que 15% ou 200ml no VEF_1 após administração de broncodilatador.

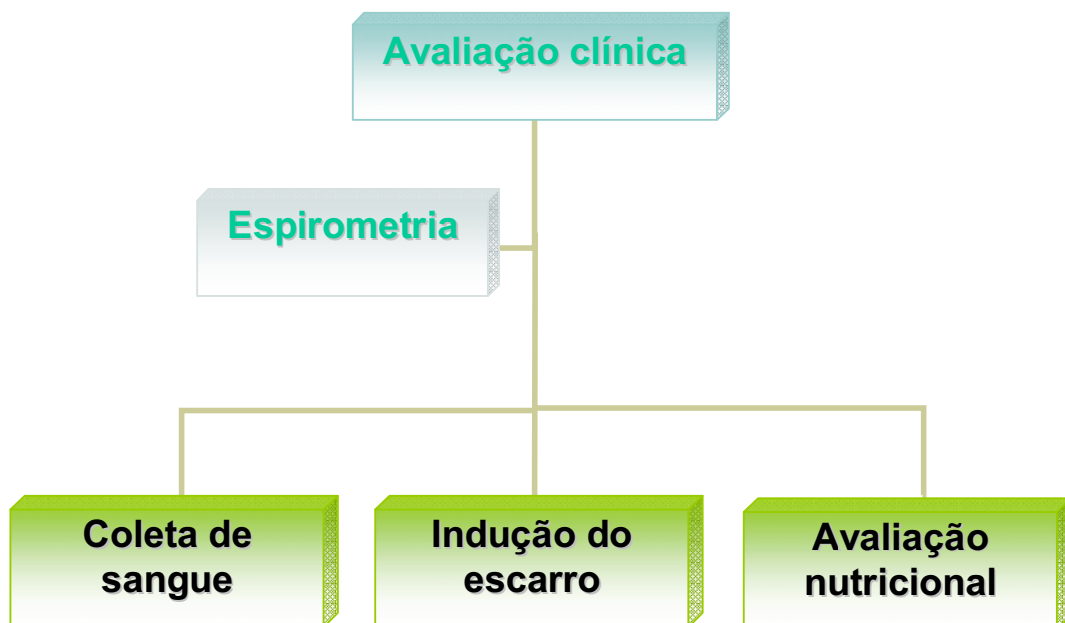
Foram também avaliados vinte tabagistas, com carga tabágica > 10 anos/maço, sem diagnóstico de qualquer doença crônica ou em uso de medicações e espirometria com valores de $VEF_1/CVF > 0,70$ (Jardim, 2004). Estes pacientes foram selecionados no Serviço de Cessação de Tabagismo e por meio de cartazes distribuídos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Grupo controle com o objetivo de avaliar a ingestão e os níveis séricos de retinol e de mediadores inflamatórios foi constituído por 31 indivíduos saudáveis voluntários, selecionados por meio de cartazes distribuídos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Não se realizou indução do escarro em indivíduos controles, pela dificuldade de obtenção de amostra suficiente para análise nestes indivíduos saudáveis que não apresentam expectoração espontânea (Trindade et al., 2007).

Controles, tabagistas e pacientes com DPOC foram devidamente esclarecidos quanto aos procedimentos do estudo e somente foram avaliados após

assinarem termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Delineamento

O delineamento do estudo está apresentado no quadro abaixo. Inicialmente, os indivíduos foram submetidos a avaliação clínica e espirometria. Em dia adicional foram realizadas a coleta de sangue periférico, indução e coleta de escarro induzido e avaliação nutricional.



MÉTODOS

Espirometria e Gases Sangüíneos

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 determinados o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1), a capacidade vital forçada, (CVF) e a relação (VEF_1/CVF), antes e após a administração de 400 mcg de fenoterol por via inalatória. O VEF_1 foi expresso em litros (l), em porcentagem da CVF e como porcentagem dos valores de referência (Knudson et al., 1983).

Foram determinados os valores da saturação periférica de oxigênio (SpO_2) por meio de oxímetro portátil Onyx (Model 9500 Oximeter; Nonin Medical Inc; Mineapolis, MN, USA). Esta variável foi utilizada como avaliação da troca gasosa nos indivíduos controles, tabagistas e em todos os pacientes com DPOC. Para caracterizar os pacientes com DPOC estádios III e IV, os gases arteriais foram colhidos por meio de punção na artéria braquial, estando o paciente em repouso e respirando ar ambiente utilizando analisador de gases (Stat Profile 5 Plus - Nova Biomedical, Waltham, MA, USA).

Avaliação da ingestão alimentar

A ingestão estimada de nutrientes diários durante 6 meses foi obtida através de questionário de frequência alimentar (Willet, 1990). Este instrumento lista 120 itens de alimentos e bebidas. Os dados referentes ao consumo alimentar diário (equivalente da atividade de retinol (EAR), energia, proteína e lipídeos) foram calculados no Programa de Apoio à Nutrição – versão 1.5 (UNIFESP, 2002), baseado na tabela de composição nutricional de alimentos segundo os critérios Philippi, 2002 (Philippi, 2002).

Composição do corpo

O peso (kg) e a estatura (m) foram medidos e o IMC calculado ($IMC = \text{peso}/\text{estatura}^2$). A estatura e o peso foram determinados em balança Filizola®, com

o paciente descalço e com roupas leves. Realizou-se também avaliação da composição do corpo por meio de impedância bioelétrica. A resistência e a reatância foram medidas na posição supina, do lado direito do corpo, de acordo com o protocolo da ESPEN 2004 (BIA101, RJL Systems, Detroit, MI, USA) (Kyle et al., 2004). Nos pacientes com DPOC a estimativa de 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): $MMC = -6,06 + (\text{estatura} \times 0,283) + (\text{peso} \times 0,207) - (\text{resistência} \times 0,024) + [\text{sexo (masculino} = 1, \text{feminino} = 0) \times 4,036]$ (Kyle et al., 1998). Para a estimativa de MMC nos indivíduos tabagistas foi utilizada a equação de regressão específica para indivíduos saudáveis desenvolvida por Kyle et al. (2001): $MMC = -4,104 + (0,518 \times \text{estatura}^2 / \text{resistência}) + 0,231 \times \text{peso} + (0,130 \times \text{reatância}) + 4,229 \times \text{sexo (masculino} = 1; \text{feminino} = 0)$. O Índice de Massa Magra do Corpo (IMMC) foi calculado pela divisão da MMC (kg) pela estatuta² (m). O critério de depleção de massa magra do corpo foi: $IMMC < 15 \text{ kg/m}^2$, para mulheres, e $< 16 \text{ kg/m}^2$, para homens (Schols, 1993).

Coleta, processamento e armazenamento das amostras 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 220µl foram armazenadas em freezer à -80°C posterior análise.

Coleta e avaliação do escarro induzido

Pacientes com DPOC e tabagistas, em fase estável da doença, foram pré-medicados com 2 puffs de 200mg de salbutamol (Pizzichini et al., 2002) e, após período de aproximadamente 15 minutos, foi medido o pico de fluxo expiratório basal (PFE) (Electronic Peak Flow/FEV₁ Meter, Ferraris Respiratory Europe Ltda., NW, UK). Em seguida, os pacientes realizaram inalações com solução salina hipertônica em concentrações crescentes de 3, 4, e 5%, durante 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 (Pizzichini et al., 1996). Em seguida, realizaram manobra para tossir e coletaram o escarro em recipiente estéril (Twaddell et al., 1996; Cai et al., 1998). Foram consideradas adequadas às amostras obtidas após período mínimo de 14 minutos de inalação e com volume de escarro coletado maior que 2mL (Paggiaro et al., 2002). Após cada inalação, os pacientes foram submetidos à reavaliação clínica e do PFE (Paggiaro et al., 2002) e, caso ocorresse queda de 20% ou mais no 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 enfermeiro para atendimento de eventuais intercorrências.

O material mucoso separado no tubo de polipropileno foi tratado com volume de dithiothreitol (DDT) igual a até quatro vezes o peso do escarro, em miligramas (Pizzichini et al., 2002). O material foi diluído em 0,1% de tampão fosfato (PBS – phosphate buffered saline) (Kanazawa et al., 1997), homogenizado por 15 segundos em agitador (Maxi Mix II, model 37615, Boenstead/Thermolyne, Iowa, USA) e 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, Sewickeley, PA) a 4°C, rotação de 4000 rpm, por 10 minutos. Na sequência, 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 considerando-se as coradas em azul como não viáveis (Pizzichini et al., 1996).

Dosagem de retinol no soro e no sobrenadante do escarro induzido

O retinol foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A amostra foi protegida da luz e armazenada a -80°C até o momento da análise. E foi preparada do seguinte modo: a) em alíquota de 200 μL de soro ou escarro, foi extraído o retinol pelo método descrito por Tang et al. (1993) (Tang et al., 1993). A amostra foi tratada com 2 mL de solução clorofórmio: metanol (2:1, v/v). Em seguida, adicionado 150 μL padrão interno (equinenona; Sigma, St. Louis, MO, USA) que foi diluído em etanol e, depois, 500 μL de solução fisiológica (8,5 g NaCl/L água). Os tubos contendo a solução soro-clorofórmio-metanol foram agitados, por um minuto, em agitador "vortex" e a seguir, centrifugados (3500 rpm) a 4°C , por 10 minutos. Em seguida, a parte de clorofórmio foi transferida para tubo de vidro de 13 x 100 mm e, no restante da amostra, isto é, a parte aquosa, acrescentou-se 3 mL de hexano. Os tubos contendo hexano-soro fisiológico foram agitados durante um minuto e centrifugados a 3500 rpm a 4°C , por 10 minutos; a parte de hexano foi transferida para o mesmo tubo de vidro de 13 x 100 mm, contendo a parte de clorofórmio. As duas partes extraídas foram combinadas e foi realizada a evaporação por meio de gás de nitrogênio; os tubos foram colocados em banho-maria a 40°C . O resíduo foi ressuspensionado com 150 μL de etanol, o tubo foi agitado e "sonicado" por 30 segundos, 50 μL da amostra foram injetados no cromatógrafo.

Utilizamos o cromatógrafo Alliance da Waters 2695 com detector Waters 2996 - fotodiodo. As condições operacionais para o método estão descritas a seguir: coluna - C18, Pecosphere-3. O comprimento de onda do detector foi colocado na faixa de 240 a 500 nm. Este método usou duas soluções, cada uma infundida por uma bomba de infusão, com a finalidade de se estabelecer um gradiente: solvente A - tetrahidrofurano (THF): acetonitrilo: água (20:50:30, v/v/v, com acetato de amônio 1% na água; solvente B -tetrahidrofurano (THF): acetonitrilo: água (50:44:6, v/v/v, com acetato de amônio 1% na água). O fluxo total foi de 1 mL/min durante todo o procedimento analítico na temperatura de 25°C . 1) Inicialmente, após a injeção da

amostra, do tempo zero até dois minutos, foi bombeada a fase móvel, na seguinte proporção: 85% do solvente A e 15% do solvente B. 2) No fim do segundo minuto, aumentou-se a infusão da bomba "B"; mantido o aumento linear do solvente B por sete minutos; neste tempo, a concentração do solvente B passou para 83%. 3) No tempo 16 minutos, ocorreu outro aumento linear do solvente B por sete minutos; neste tempo, a concentração do solvente B chegou a 100%. 4) Após, ocorreu aumento linear de três minutos do solvente A para a concentração de 60% do solvente A e 40% do solvente B, esta concentração foi mantida por quatro minutos. 5) A corrida terminou no tempo de 30 minutos. 6) No tempo 30 minutos a 31 minutos, ocorreu à diminuição do fluxo da bomba "B" até 15% (85% da solução A). Aguarda-se, então, mais sete minutos, que é o tempo suficiente para estabilizar novamente a coluna, possibilitando novas determinações. Esta técnica permitiu a determinação do retinol, com o comprimento de onda de 325nm. O retinol foi adequadamente separado por este método. Os cromatogramas foram quantificados pela comparação entre as relações área da substância/área do padrão interno (equinenona), obtidas na análise do soro e escarro e da amostra da solução padrão. Os valores das substâncias da solução padrão são corrigidos por seus coeficientes de extinção molar ($C = D/\mu^{1\%}1\text{cm}$). No escarro, ajustamos a concentração de retinol para a concentração de albumina, determinada através do método químico seco verde de bromocresol (Corcoran & Durnan, 1977).

Dosagem de mediadores inflamatórios no sangue periférico e sobrenadante do escarro induzido

As dosagens das citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-8) foram realizadas em duplicatas através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), comercialmente disponíveis de acordo com as recomendações do fabricante (BioSource International, Inc, Ca, USA). Para as dosagens no soro e no escarro, foram utilizados ELISA ultrasensíveis, com limites de detectabilidade de 32,0 pg/mL e sensibilidade para detecção mínima de valor menor que 0,09 pg/mL para TNF- α (Human TNF α US – Cytoscreen), 0,16 a 10,0 pg/mL para IL-6 (Human IL 6 US – Cytoscreen) e 0,39 a 25,0 pg/mL para IL-8 (Human IL 8 US – Cytoscreen).

A técnica de dosagens 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 por anticorpo específico para a citocina em questão. Amostras, controle e padrão são pipetadas 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 se liga 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 deste produto colorido é diretamente proporcional à concentração da citocina presente na amostra original.

A proteína C reativa (PCR) no soro foi quantificada em duplicatas em kits ultra-sensíveis da CardioPhase, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, USA. A sensibilidade do kit foi de 0,007mg/L. A técnica utilizada foi 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 a PCR humana, formando aglutinados que dispersam a luz irradiada. A intensidade da luz dispersa depende da concentração da respectiva proteína na amostra. Avaliação foi feita comparando-se com a curva de referência obtida por calibração de pontos múltiplos por meio das diluições com N Standard reumatológico SL com N Diluente pertencente ao kit.

Para avaliação da α 1 glicoproteína ácida no soro utilizou-se kit da Dade Behring® (Behring Diagnostic Inc, Westwood MA). As proteínas contidas no soro formaram imunocomplexos em uma reação imunoquímica com anticorpos específicos que dispersam a luz radiada. Esta avaliação realizou-se comparando com um padrão conhecido de concentração.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o pacote estatístico SigmaStat 3.2 (Inc, Chicago, IL, USA) e o SYSTAT 12 (Systat Software of Cranes Software Intenational Ltd. USA). Para as comparações de dois grupos com variáveis de distribuição normal foi utilizado teste “t” de Student e para as variáveis com distribuição não normal foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para o estudo de associações entre as variáveis, foi utilizado análise de coeficientes de correlações por meio do teste de correlação de Pearson ou Spearman, de acordo com a distribuição normal ou não das variáveis, respectivamente (Snedecor & Cochran, 1989). Para a comparação de mais de dois grupos foi utilizada a ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey para aquelas com distribuição normal e Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn para as variáveis com distribuição não normal. A correção para idade foi realizada através na análise de covariância (ANCOVA). O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes.

Resultados

RESULTADOS

As características gerais dos indivíduos estudados estão apresentadas na **Tabela 1**. Os grupos foram pareados quanto ao gênero; entretanto, os controles e os tabagistas eram significativamente mais jovens que os pacientes com DPOC. Como esperado, indivíduos tabagistas e pacientes com DPOC apresentaram maior carga tabágica quando comparados ao grupo controle. Os pacientes com DPOC apresentaram evidências de obstrução de vias aéreas, com valores de VEF_1 (%) e da relação VEF_1/CVF significativamente menores quando comparados aos controles e tabagistas.

Os atributos da composição do corpo não foram significativamente diferentes entre os grupos (IMC, MMC,IMMC) (Tabela 1); entretanto, a análise individual da composição do corpo de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (1998), mostrou que 51% dos controles, 26% dos tabagistas e 30% pacientes com DPOC apresentavam sobrepeso ($IMC > 24,9 \text{ kg/m}^2$). Obesidade ($IMC > 29,9 \text{ kg/m}^2$) não foi identificada entre os controles e estava presente em 10% dos tabagistas e em 20% dos pacientes com DPOC. Além disso, 0,5% dos tabagistas e 10% dos pacientes com DPOC apresentavam desnutrição ($IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$). Quando foram utilizados os critérios de desnutrição para pacientes com DPOC ($IMC < 21 \text{ kg/m}^2$ e/ou $IMMC < 15 \text{ kg/m}^2$ para mulheres e $< 16 \text{ kg/m}^2$ para homens) verificamos que nenhum controle, 21 % dos tabagistas e 18 % dos pacientes com DPOC apresentaram $IMC < 21 \text{ kg/m}^2$. O $IMMC < 15 \text{ kg/m}^2$ para mulheres e $< 16 \text{ kg/m}^2$ para homens foi observado em 22 % dos controles, 15 % dos tabagistas e 38% dos pacientes com DPOC.

Tabela 1: Características gerais dos grupos controle, tabagista e DPOC.

	Controle n=31	Tabagista N=19	DPOC n=50	Valor P
Idade (anos)	48,2 ± 8,1 ^a	49,0 ± 6,4 ^a	64,0 ± 9,0 ^b	<0,001
Gênero (M/F)	15/16	14/5	30/20	0,20
VEF₁ (%)	111,8 ± 15,5	107,2 ± 15,9	49,9 ± 16,8	<0,001
VEF₁/CVF (%)	82,0 (81,0–5,7) ^a	76,0 (72,2–79,0) ^a	48,0(38,0–61,0) ^b	<0,001
Carga Tabágica (anos/maço)	0,0 ^a	35,0 (26,2–41,5) ^b	50,0(30,0–60,0) ^b	<0,001
IMC (kg/m²)	24,9 ± 2,6	24,1 ± 4,1	25,6 ± 5,5	0,40
MMC (kg)	43,3 ± 12,4	47,3 ± 7,0	40,7 ± 7,2	0,08
IMMC (kg/m²)	16,1 ± 3,5	17,2 ± 1,9	16,0 ± 2,2	0,31

Os dados estão apresentados como média ±1 desvio padrão ou mediana (quartil 1-quartil 3); M/F=masculino e feminino; IMC = índice de massa do corpo; MMC = massa magra do corpo; IMMC = índice de massa magra do corpo; CVF= capacidade vital forçada; VEF₁ = volume expiratório forçado no primeiro segundo; a, b = letras iguais representam ausência de diferença estatística

Análise dos resultados dos exames bioquímicos mostrou que pacientes com DPOC apresentaram níveis glicêmicos maiores quando comparados aos controles. Os níveis de triglicérides de tabagistas eram elevados quando comparados aos controles. Os demais atributos não apresentaram diferença estatisticamente significativa (**Tabela 2**).

Tabela 2: Resultados bioquímicos de controles, tabagistas e pacientes com DPOC.

	Controle N= 31	Tabagista n= 19	DPOC n= 50	Valor de P
Hematócrito (%)	45,0 (41,4–48,8)	47,1(43,5–50,1)	46,3(43,6–49,9)	0,4
Hemoglobina (g/dL)	14,7±1,3	15,4±1,0	15,7±1,5	0,2
Glicemia (mg/dL)	86,0(81,0–89,0) ^a	89,0(82,0–95,0) ^{ab}	93,0(86,0–102,0) ^b	0,005
Colesterol (mg/dL)	188,1±31,7	203,5±40,1	197,6±41,5	0,3
HDL (mg/dL)	50,4±12,9	43,7±10,1	53,6±18,1	0,08
LDL (mg/dL)	115,8±31,7	126,2±33,4	116,1±36,1	0,6
Triglicérides (mg/dL)	110,3±56,8 ^a	161,6±68,9 ^b	136,0±66,5 ^{ab}	0,02

Os dados estão apresentados como média ±1 desvio padrão ou mediana (quartil 1-quartil 3); HDL= lipoproteínas de alta densidade; LDL= lipoproteínas de baixa intensidade; a, b = letras iguais representam ausência de diferença estatística

Os dados de ingestão da vitamina A estão apresentados na **Tabela 3**. A ingestão de energia (kcal e kcal/kg de peso), de carboidratos e lipídeos foi similar nos três grupos, por outro lado, indivíduos controles apresentaram maior ingestão de proteína em gramas quando comparado a pacientes com DPOC ($p=0,03$) (Tabela 3). Realizou-se ajuste de ingestão de vitamina A pela energia; entretanto, não observamos diferença entre as duas variáveis ($p=0,07$)

Tabela 3: Valores de ingestão alimentar de controles, tabagistas e pacientes com DPOC.

	Controle n=31	Tabagista n=19	DPOC n=50	Valor P
Energia (kcal)	2526 ± 786	2489 ± 582	2517 ± 974	0,9
Energia (kcal/Kg)	40,3 ± 15,2	40,4 ± 13,5	40,3 ± 15,2	0,4
Carboidratos (g)	360,1 ± 128,7	288,3 ± 136,3	353,2 ± 154,2	0,2
Proteína (g)	76,9(67,4-109,3) ^a	78,6(59,8-91,0) ^{ab}	68,2(43,4-89,4) ^b	0,03
Proteína (g/Kg)	1,26 ± 0,39	1,26 ± 0,50	1,05 ± 0,43	0,8
Lipídeos (g)	88,3 ± 36,6	84,5 ± 41,3	97,4 ± 36,8	0,3
Vitamina A (EAR)	1057(653-1625)	745(415-1719)	636(339-1349)	0,09

Os dados estão apresentados como média ± 1 desvio padrão ou mediana (quartil 1 – quartil 3), a;b: letras diferentes diferença estatisticamente significativa, EAR = equivalente da atividade de retinol.

Os valores médios de vitamina sérica foram significativamente menores nos pacientes com DPOC (1,80 [1,25-2,16] $\mu\text{mol/L}$) quando comparados aos tabagistas (2,40 [1,95-3,14] $\mu\text{mol/L}$) ($p<0,001$); enquanto que, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos controles (1,98 [1,82-2,32] $\mu\text{mol/L}$) quando comparados a tabagistas e pacientes com DPOC. Valor de vitamina A sérica compatível com deficiência ($<0,7$) (Ross, 2003) não foi observado em nenhum participante deste estudo.

Os resultados dos mediadores inflamatórios sistêmicos referentes aos controles, tabagistas e pacientes com DPOC estão apresentados na **Figura 1**. Os valores da IL-6 [controles: 0,36 (0,23-0,44) pg/mL: tabagistas: 0,46 (0,30-0,88) pg/mL: DPOC: 1,12 (0,80-1,90 g/mL] e da PCR [controles: 1,06 (0,65-1,65) mg/L: tabagistas:

1,69 (0,54-3,65) mg/L: DPOC: 6,38 (2,67-9,37) mg/L] no sangue periférico foram significativamente maiores nos pacientes com DPOC quando comparados aos controles e tabagistas (Figura 1). Por outro lado, o níveis de α_1 -glicoproteína ácida nos tabagistas (96,3 \pm 20,6 mg/dL) não foram diferentes quando comparados com controles (80,3 \pm 15,48 mg/dL) e pacientes com DPOC (108,7 \pm 30,1 mg/dL); entretanto pacientes com DPOC apresentaram maior nível de α_1 -glicoproteína ácida quando comparados aos controles. Além disso, os valores séricos de TNF- α foram significativamente maiores nos tabagistas [5,70 (4,61-7,16) pg/mL] e pacientes com DPOC [4,50 (4,10-5,12) pg/mL] quando comparados aos controles [3,70 (3,42-3,97) pg/mL] (Figura 1). Não foi observada diferença da concentração de IL-8 no sangue periférico entre os três grupos [controles: 5,44 (4,26-7,75) pg/mL: tabagistas: 4,2 (2,7-5,0)pg/mL: DPOC: 4,2 (3,3-7,2)pg/mL].

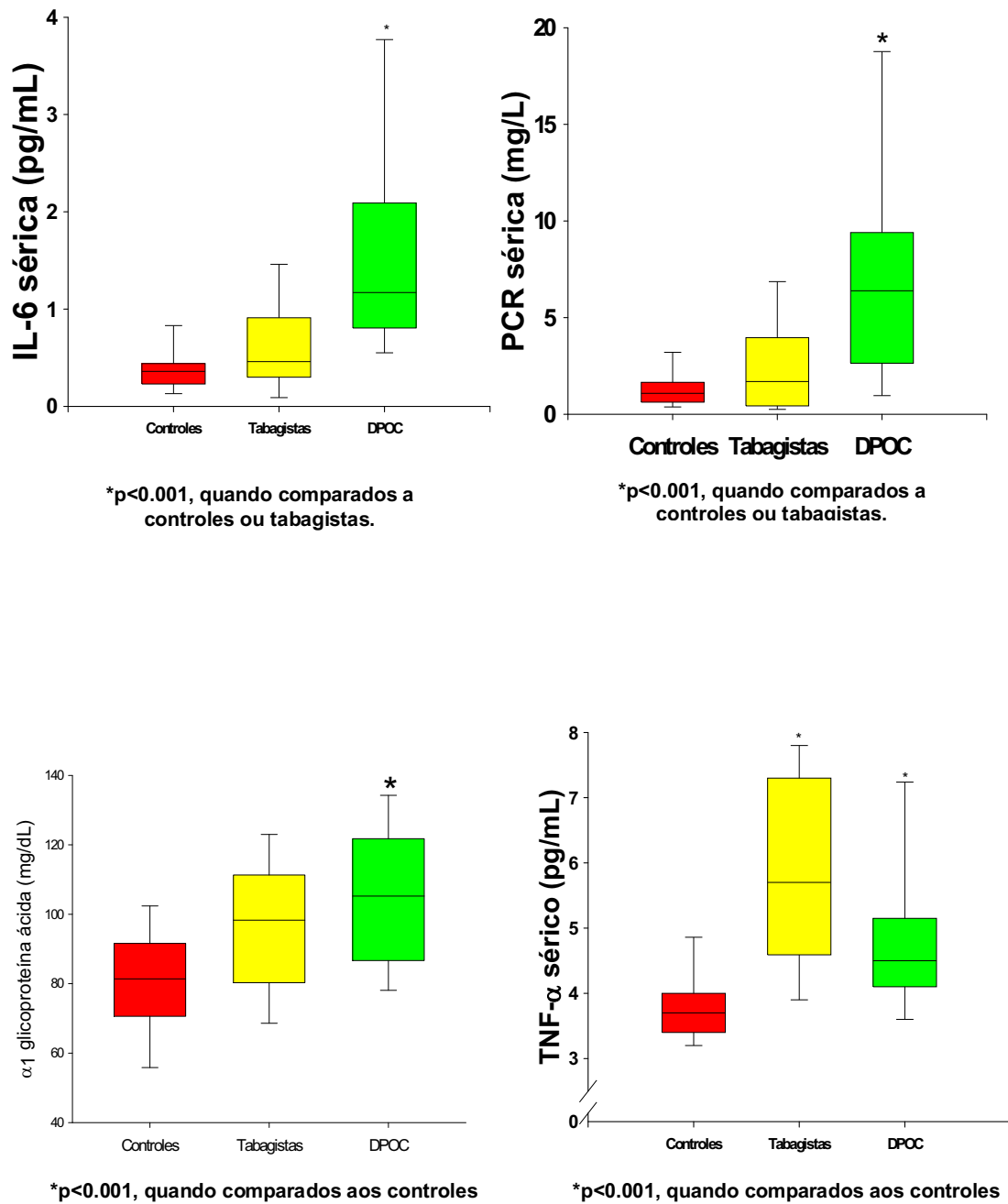


Figura 1: Box-plot das concentrações séricas de IL-6 (pg/mL), PCR (mg/L), de α 1-glicoproteína ácida e TNF- α (pg/mL) nos indivíduos controles, tabagistas sem DPOC e pacientes com DPOC.

Os resultados do retinol e dos mediadores inflamatórios no escarro, de acordo com o estabelecido em materiais e métodos, foram avaliados exclusivamente nos tabagistas e pacientes com DPOC e estão apresentados na **Tabela 4**. A concentração de retinol no escarro foi ajustada para a concentração de albumina. Não houve diferença estatística entre os valores de IL-6(pg/mL), IL-8(pg/mL), neutrófilos(n), e células totais no escarro entre os grupos. Entretanto, pacientes com DPOC apresentaram maior concentração de TNF- α quando comparados aos indivíduos tabagistas.

Tabela 4: Resultados dos atributos avaliados no escarro em tabagistas e pacientes com DPOC.

	Tabagista N=19	DPOC N=50	Valor P
TNF-α (pg/mL)	1,0 (0,38-6,86)*	8,18 (1,53-33,98)**	0,01
IL 6 (pg/mL)	14,30 (8,20-91,86)	19,26 (10,10-85,38)	0,64
IL 8 (pg/mL)	5887 (3568-1421)	8557 (3588-31149)	0,34
Celularidade total (x10⁶)	6,10(3,50-17,05)	14,80(5,70-22,50)	0,10
Neutrófilos (x10⁶)	3,54(1,84-13,34)	8,24(3,41-17,85)	0,10
Neutrófilos (%)	62,0 (55,7-71,0)	67,5 (55,0-72,0)	0,50
Retinol (g/dL)	28,79 (18,02-66,75)	34,50 (8,15-57,60)	0,37

Os dados estão apresentados como mediana e (quartil 1 – quartil 3), TNF- α :fator de necrose tumoral alfa, IL-6:interleucina 6; IL-8:interleucina 8; * n=13, ** n=32

Foi avaliada a associação entre parâmetros de função pulmonar, escarro e séricos para os tabagistas e pacientes com DPOC agrupados. Foram avaliadas associações entre a ingestão, concentrações de retinol e de mediadores inflamatórios no soro e no escarro. Verificamos correlação significativa negativa entre a vitamina A no escarro e porcentagem de neutrófilos no escarro ($r = -0,26; p=0,002$) (**Figura 2**), correlação significativa positiva entre VEF₁/CVF (%) e retinol no soro ($r=0,32; p=0,006$) (**Figura 3**) e correlação significativa positiva entre a concentração sérica de retinol e de TNF- α ($r=0,41; p=0,003$).

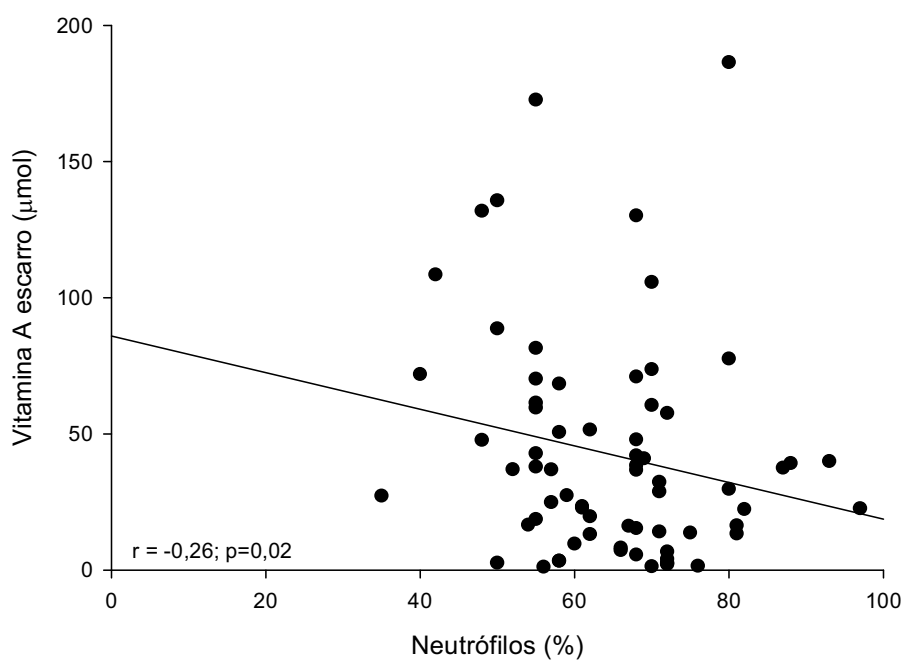


Figura 2: Estudo de correlação entre retinol ($\mu\text{mol/L}$) e neutrófilos (%) no escarro induzido de tabagistas e pacientes com DPOC.

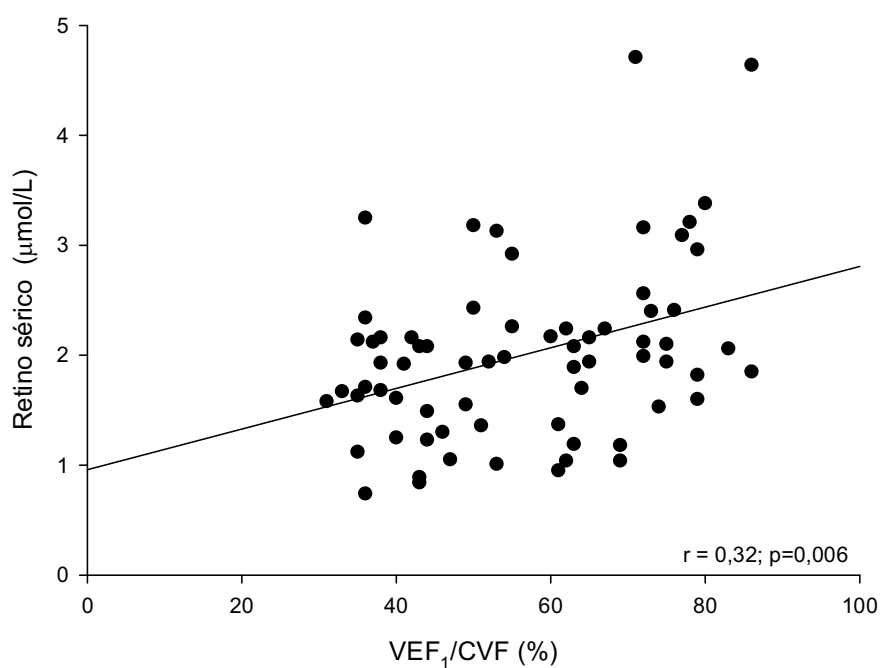


Figura 3: Estudo de correlação entre retinol no soro ($\mu\text{mol/L}$) e relação VEF_1/CVF (%) de tabagistas e pacientes com DPOC.

Discussão

DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou o estado nutricional da vitamina A no soro e escarro induzido e sua relação com marcadores inflamatórios nas vias aéreas e no sangue periférico de tabagistas e pacientes com DPOC moderada a muito grave. Os resultados mostraram que é possível quantificar o retinol no escarro induzido e que a concentração é influenciada negativamente pela porcentagem de neutrófilos no escarro. Análise realizada no soro mostrou diminuição dos níveis de retinol nos pacientes com DPOC quando comparados aos tabagistas.

Até o momento, este é o primeiro estudo que avaliou o retinol no escarro induzido em tabagistas e pacientes com DPOC. Não verificamos correlação significativa entre a ingestão de vitamina A, os valores séricos de retinol e a concentração de retinol no escarro. Este resultado está de acordo com o obtido em estudo prévio que também não encontrou associação significativa entre ingestão alimentar de vitamina A, a concentração sérica da vitamina e os valores detectados no lavado bronco-alveolar (LBA) e tecido pulmonar de indivíduos com patologia respiratória (Redlich et al., 1996). Por outro lado, os autores mostraram que a concentração de vitamina A no LBA se correlacionou com os valores obtidos no tecido pulmonar e sugerem que a concentração nas vias aéreas pode prever os valores dos nutrientes estudados no tecido pulmonar (Redlich et al., 1996). Embora em nosso estudo a concentração de retinol no tecido pulmonar não tenha sido avaliada, os achados sugerem que o escarro induzido, método de fácil aplicabilidade, seguro e de baixo custo pode ser uma ferramenta para avaliar o estado nutricional do retinol na traquéia e brônquios proximais de forma não invasiva (Drewes et al, 2006).

Os resultados da presente investigação e do estudo de Redlich et al. (1996) mostraram valores médios de ingestão de vitamina A dentro dos limites recomendados. Entretanto, os resultados do estudo de Redlich et al. (1996) indicam que mesmo na presença de ingestão dietética e concentrações séricas de vitamina A adequadas, as reservas pulmonares de retinol podem estar baixas (Redlich et al., 1996). Em suporte a este conceito, pacientes com ingestão e níveis séricos normais de vitamina A que receberam suplementação desta vitamina mostraram melhora da função pulmonar (Biesalski & Stoff, 1992; Paiva et al., 1996). Estes resultados

sugerem que depleção de vitamina A localizada no tecido pulmonar e vias aéreas podem ocorrer em indivíduos com doenças respiratórias crônicas (Biesalski & Stoff, 1992; Paiva et al., 1996). Estudo experimental também mostrou que os níveis séricos normais de vitamina A não garantem oferta adequada da vitamina para o pulmão (Ross & Li, 2007).

O estado nutricional de vitamina A é de fundamental importância para os pulmões, pois durante inflamação aguda ou crônica a deficiência da vitamina pode ocorrer como resultado da epitelização aumentada durante o reparo do tecido e pode acelerar o processo inflamatório (Stephensen, 2001; Reifen, 2002). Entretanto, ainda não está estabelecido se a redução da concentração de retinol ou da RBP durante a inflamação prejudica a entrega de retinol ao órgão alvo, como por exemplo, os pulmões. Por outro lado, sabe-se que a infecção por si só pode induzir dano no tecido e iniciar a resposta inflamatória que posteriormente prejudica o transporte e/ou aumenta o catabolismo de retinol (Ross & Stephensen, 1996).

Na análise de correlação, verificamos associação significativa negativa entre a concentração de retinol e a porcentagem de neutrófilos no escarro o que indica que quanto maior o processo inflamatório nas vias aéreas, menor a concentração local do retinol. De acordo com este resultado, estudos prévios apontam a neutrofilia como um marcador inflamatório característico no escarro de tabagistas ou ex-tabagistas com DPOC (Crapo et al., 2003; Baraldo et al. 2004). Entretanto, não identificamos diferença significativa entre as concentrações de retinol no escarro de tabagistas quando comparado ao de pacientes com DPOC. No mesmo sentido, quando os marcadores de inflamação no escarro foram comparados, verificamos que as concentrações de IL-6 (pg/mL), IL-8 (pg/(mL), número de neutrófilos e de células totais no escarro foram similares em ambos os grupos. Estes achados podem explicar, pelo menos parcialmente, os valores similares de retinol no escarro induzido dos dois grupos de estudo e estão de acordo com os resultados de investigações que mostraram pequena ou nenhuma diferença no grau de inflamação da via aérea de tabagistas quando comparados a pacientes com DPOC (Baraldo et al., 2004, Willemse et al., 2005a, Willemse et al., 2005b).

Os valores séricos de retinol foram significativamente menores nos pacientes com DPOC quando comparados a tabagistas sem a doença; entretanto, não foram detectadas diferenças entre a concentração sérica da vitamina entre os pacientes

com DPOC e os controles ou entre os controles e os tabagistas. Além disso, a análise individual não mostrou deficiência da concentração sérica de retinol nos participantes do estudo. Os pacientes com DPOC apresentaram concentrações séricas mais elevadas de IL-6 e PCR e concentrações de α 1-glicoproteína e TNF- α similares quando comparados aos tabagistas sem a doença. Portanto, o processo inflamatório sérico é mais intenso nos pacientes com DPOC e poderia explicar porque estes pacientes apresentaram menores valores de retinol no sangue quando comparados aos tabagistas sem a doença. Estes resultados estão de acordo com diversos estudos que mostram associação entre inflamação sistêmica e diminuição da concentração sérica de vitamina A (Filteau et al., 1999; Stephensen & Gildengoorin, 2000; Reifen, 2002). Análise dos dados do estudo multicêntrico, *III National Health and Nutrition Examination Survey*, Stephensen & Gildengorin mostraram que o retinol no soro estava diminuído em sujeitos com concentração de PCR aumentada e que apresentavam processo inflamatório sistêmico e este aumento também estava associado com o diagnóstico de doença pulmonar crônica e com o tabagismo. A associação entre diminuição da concentração sérica de vitamina A e inflamação pode ser parcialmente explicada pelo aumento da demanda de vitamina A como resultado da epitelização para reparar as conseqüências da inflamação aguda ou crônica (Reifen, 2002; Stephensen, 2001). Outros possíveis mecanismos que contribuem para a queda da vitamina A durante processo inflamatório são a redução da síntese da proteína ligadora do retinol (RBP) pelo fígado e aumento da permeabilidade vascular no local da inflamação, que permite o extravasamento da RPB para o espaço extravascular e a perda da vitamina na urina (Ross & Stephensen, 1996; Stephensen, 2001; Reifen, 2002)

Em pacientes com DPOC e em tabagistas, a inflamação sistêmica é considerada um fator chave na patogênese dos multicomponentes destas doenças (Wouters et al., 2009). Em nosso estudo, não observamos diferenças entre as concentrações séricas de retinol, de IL-6, PCR e α 1-glicoproteína quando comparamos tabagistas e controles. Os tabagistas apresentaram níveis séricos de TNF- α significativamente mais elevados quando comparados aos controles e similares aos observados em pacientes com DPOC. Por outro lado, nas vias aéreas, a concentração de TNF- α foi maior nos pacientes com DPOC. Além disso,

paradoxalmente, observamos correlação significativa positiva entre os valores séricos de retinol e de TNF- α . Estudos que avaliaram influência da concentração de TNF- α sistêmica ou localizada no metabolismo do retinol não foram identificados na literatura. Entretanto, seria esperado que fosse semelhante à observada em outras inflamações agudas ou crônicas e resultasse em valores menores da concentração sérica da vitamina (Thurnham et al., 2003; Thurnham et al., 2008). Portanto, não encontramos explicação fisiopatológica para os valores similares de vitamina A entre controles e tabagistas e controles e com DPOC e também para a associação positiva entre os valores séricos de TNF- α e retinol no soro. Entretanto, estudo em humanos mostrou associação entre deficiência de vitamina A e a diminuição da expressão de TNF- α pelas células NK CD3-CD56+ (Jiang Y et al., 2007). Além disso, em modelos experimentais de asma, ingestão e reservas elevadas de vitamina A resultaram em aumento da gravidade da inflamação de vias aéreas em camundongos (Shuster et al., 2008). Devemos ressaltar também que não avaliamos as reservas de vitamina A do organismo e, portanto, não podemos concluir que as mesmas estavam normais nos três grupos de estudo.

Nossos resultados mostraram também associação positiva entre nível sérico de vitamina A e relação VEF₁/CVF em tabagistas e pacientes com DPOC. Este achado está de acordo com estudo de Paiva et al. (1996), que mostrou associação significativa positiva entre o estado nutricional da vitamina A e a função pulmonar em tabagistas e pacientes com DPOC (Paiva et al., 1996,). Em estudo que avaliou 777 homens e 839 mulheres, com idade entre 49-79 anos e sobrepeso, os autores também verificaram que o retinol apresentou associação positiva independente com o VEF₁ (Shunemann et al., 2001). Adicionalmente, relação positiva entre a concentração sérica do retinol e o VEF₁ foi descrita também em pacientes com DPOC candidatos a transplante pulmonar (Forli et al., 2002). Assim, nossos achados suportam o conceito que a concentração sérica de retinol tem repercussões na permeabilidade das vias aéreas.

Em resumo, os achados do presente estudo mostraram, pela primeira vez, que o escarro induzido pode ser utilizado para avaliar a concentração de vitamina A nas vias áreas de tabagistas e pacientes com DPOC. Permitiram também confirmar nossa hipótese que vitamina A no escarro tem associação negativa com a

inflamação. Além disso, reforçam a importância das concentrações da vitamina na permeabilidade das vias aéreas.

Conclusões

CONCLUSÕES:

- A concentração de retinol no escarro induzido de tabagistas e pacientes com DPOC pode ser quantificada e é negativamente influenciada pela intensidade da inflamação localizada avaliada por meio da porcentagem de neutrófilos no escarro;
- O escarro induzido, método de fácil aplicabilidade, seguro e de baixo custo pode ser uma ferramenta para avaliar o estado nutricional do retinol na traquéia e brônquios proximais de forma não invasiva.

Referências

REFERÊNCIAS

- Agusti AGN, Noguera A, et al. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003;21:347-60.
- American Thoracic Society Statement. Standardization of Spirometry - 1987 Update. *Am Rev Respir Dis*. 1987;136:1285-98.
- Baraldo S, Turato G, et al. Neutrophilic infiltration within the airway smooth muscle in patients with COPD. *Thorax*. 2004;59:308-12.
- Battaglia S, Mauad T, et al. Differential distribution of inflammatory cells in large and small airways in smokers. *J Clin Pathol*. 2007;60:907-11.
- Baybutt RC, Hu L, et al. Vitamin A deficiency injures lung and liver parenchyma and impairs function of rat type II pneumocytes. *J Nutr*. 2000;130:1159-65.
- Baybutt RC, Molteni A. Vitamin A and emphysema. *Vitamin A*. 2007;75:385-401.
- Biesalski HK, Stofft E. Biochemical, morphological, and functional-aspects of aystemic andlocal vitamin-A-deficiency in the respiratory-tract. *Ann NY Acad Sci*.1992;669:325-31.
- Cai Y, Carty K, et al. Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared healthy children. *Eur Respir J*. 1998;11:848-53.
- Camisa C, Eisenstat B, et al. The effects of retinoids on neutrophil functions in vitro. *J Am Acad Dermatol*. 1982;6(4):620-9.
- Chytil F. The lungs and vitamin-A. *Am J Physiol*. 1992;262:L517-27.
- Chytil F. Retinoids in lung development. *Faseb J*. 1996;10:986-92.
- Corcoran RM, Durnan SM. Albumin determination by a modified bromcresol green method. *Clin Chem*. 1977;23:765-6.
- Crapo RO; Jensen RL et al. Airway inflammation in COPD: Physiological outcome measures and induced sputum. *Eur Respir J*. 2003;21:19S-28S.

Drews AC, Couto ES, Stein RT. Uso do escarro induzido na avaliação da inflamação das vias aéreas em pacientes com asma. *Sci Med, Porto Alegre:PUCRS*; 2006. v.16, n.3.

Efthimiadis A, Spanevello A, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J*. 2002;20:19S-23S.

Fabbri LM, Luppi F, et al. Update in chronic obstructive pulmonary disease 2005. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:1056-65.

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;147:1126-31.

Filteau SM. Vitamin A and the acute-phase response. *Nutrition*. 1999;15:326-8.

Forli L, Pedersen JI, et al. Vitamins A and E in serum in relation to weight and lung function in patients with advanced pulmonary disease. *Int J Vitamin Nutr Res*. 2002;72:360-8.

Gan WQ, Man SFP, et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2004;59:574-80.

Geoergeff MK, Radmer WJ. The effect of glucocorticosteroids on serum, liver, and lung vitamin A and retinyl ester concentration. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1991;13:376-82.

Hittelman WN, Liu DD, et al. Proliferative changes in the bronchial epithelium of former smokers treated with retinoids. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99:1603-12.

Jardim JR, Oliveira JÁ, et al. II Consenso Brasileiro de DPOC. *J Bras Pneumol*. 2004;30:S1-S42.

Jiang Y, Francis O, et al. Association of vitamin A deficiency with decrease in TNF- α expressing CD3-CD56+ NK cells Ghanaians. *Nutr Res*.2007;27:400-07.

Kanazawa H, Shoji S, et al. Increased levels of nitric oxide derivatives in induced sputum in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99:624-9.

Kelly MG, Brown V, et al. Comparison of sputum induction using high-output and low-output ultrasonic nebulizers in normal subjects and patients with COPD. *Chest.* 2002;122:955-9.

Knudson RJ, Lebowitz MD, et al. Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging. *Am Rev Respir Dis.* 1983;127:725-34.

Kyle UG, Bosaeus I, et al. Bioelectrical impedance analysis - part II: Utilization in clinical practice. *Clin Nutr.* 2004;23:1430-53.

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;17:248-53.

Kyle UG, Pichard C, et al. New bioelectrical impedance formula for patients with respiratory insufficiency: comparison to dual-energy X-ray absorptiometry. *Eur Respir J.* 1998;12:960-6.

Li T, Molteni A, et al. Vitamin A depletion induced by cigarette smoke is associated with the development of emphysema in rats. *J Nutr.* 2003;133:2629-34.

Liu C, Russel RM, et al. Exposing ferrets to cigarette smoke and pharmacological dose of β -carotene supplementation enhance in vitro retinoic acid catabolism in lungs via induction of cytochrome P450 enzymes. *J Nutr.* 2003;133:173-9.

Mahan LK, Escott-Stump S. *Alimentos, nutrição e dietoterapia.* São Paulo: Roca; 2005.

Massaro GD, Massaro D. Postnatal treatment with retinoic acid increases the number of pulmonary alveoli in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1996;14:L305-10.

Massaro GD, Massaro D. Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Nat Med.* 1997;3:675-7.

Massaro GD, Massaro D. Retinoic acid treatment partially rescues failed septation in rats and in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 278:L955-60.

Mukherjee S, Nayyar T, et al. Mainstream and sidestream cigarette smoke exposure increases retinol in Guinea pig lungs. *Free Radic Biol Med*. 1995.18:507-14.

Paggiaro PL, Chanez P, et al. Sputum induction. *Eur Respir J*. 2002;20:3S-8S.

Paiva SAR, Godoy I, et al. Assessment of vitamin A status in chronic obstructive pulmonary disease patients and healthy smokers. *Am J Clin Nutr*. 1996;64:928-34.

Paquette NC, Zhang LY, et al. Vitamin A deficiency enhances ozone-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1996;14:L475-82.

Philippi, ST. Tabela de composição de alimentos: Suporte para decisão nutricional. 2ed. São Paulo:Coronário, 2002.

Pinto-Plata VM, Mullerova H, et al. C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. *Thorax*. 2006; 61:23-8.

Pizzichini E, Pizzichini MMM, 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;154:308-17.

Pizzichini E, Pizzichini MMM, et al. Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:1511-7.

Pizzichini E, Pizzichini MMM, et al. Safety of sputum induction. *Eur Respir J*. 2002;20:9S-18S.

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;128:980-85.

Programa de Apoio à Nutrição (NUTWIN). Departamento de informática em saúde da Universidade Federal de São Paulo. UNIFESP, 2002.

Redlich CA, Grauer JN, et al. Characterization of carotenoid, vitamin A, and alpha-tocopherol levels in human lung tissue and pulmonary macrophages. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(5):1436-43.

Reifen R. Vitamin A as an anti-inflammatory agent. *Proc Nutr Soc.* 2002;61:397-400.

Roncada MJ. Vitaminas lipossolúveis. In: Dutra de Oliveira JE, Marchini JS. *Ciências nutricionais.* São Paulo: Sarvier; 2000. cap.10, p.167-89.

Ross AC. Vitamina A e retinoides. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC editors. *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença.* 9th ed. São Paulo: Manole; 2003. Cap. 17, p.325-49.

Ross AC, Ambalavanan N, et al. Vitamin A combined with retinoic acid increases retinol uptake and lung retinyl ester formation in a synergistic manner in neonatal rats. *J Lipid Res.* 2006;47:1844-51.

Ross AC, Li N. Lung retinyl ester is low in young adult rats fed a Vitamin A - deficient diet after weaning, despite neonatal vitamin A supplementation and maintenance of normal plasma retinol. *J Nutr.* 2007;137: 2213-8.

Ross AC, Stephensen CB. Vitaminan A and retinoids in antiviral responses. *FASEB J.* 1996;10:979-85.

Sauer JM, Hooser SB, et al. All-trans-retinol alteration of 1-nitronaphthalene-induced pulmonary and hepatic-injury by modulation of associated inflammatory responses in the male sprague-dawley rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995;133(1):139-49.

Schols A, Soeters PB, et al. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147:1151-6.

Schunemann HJ, Grant BJB, et al. The relation of serum levels of antioxidant vitamins C and E, retinol and carotenoids with pulmonary function in the general population. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1246-55.

Schuster GU, Kenyon NJ, et al. Vitamin A deficiency decrease and high dietary vitamin A increases disease severity in the mouse model of asthma. *J Immunol.* 2008;180:1843-2.

Sharma A, Lewandoski JR, et al. Retinol inhibition of in vitro human neutrophil superoxide anion release. *Pediatr Res.*1990;27:574-9.

Snedecor GW, Cochran WG. One way classifications: analysis of variance. In: *Statistical Methods.* Ames: Iowa State University Press;1989.

Spanevello A, Confalonieri M, et al. Induced sputum cellularity - reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:1172-4.

Stephensen CB. Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:167-92.

Stephensen CB, Gildengorin G. Serum retinol, the acute phase response, and the apparent misclassification of vitamin A status in the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:1170-8.

Swamidas GP, Basaraba RJ, et al. Dietary retinol inhibits inflammatory responses of rats treated with monocrotaline. *J Nutr.* 1999;129:1285-90.

Tang G, Dolnikowski GG, et al. Serum carotenoids and retinoids in ferret fed canthaxanthin. *J Nutr Biochem.* 1993;4:58-63.

Tsoumakidou M, Tzanakis N, et al. Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respir Med.* 2003;97:863-71.

Trindade SHK, Junior JFM, et al.,. Methods for studying mucociliary transport. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2007; 73-5

Thurnham DI, Mburu ASW, et al. Using plasma acute phase protein concentrations to interpret nutritional biomarkers in apparently healthy HIV-1-seropositive Kenyan adults. *Brit. J Nutr.* 2008;100:174-82.

Thurnham DI, McCabe GP, et al. Effects of subclinical infection on plasma retinol concentrations and assessment of prevalence of vitamin A deficiency:meta-analysis. *The Lancet*. 2003;362:2052-58.

Twaddell SH, Gibson PG, et al. Assessment of airway inflammation in children with acute asthma using induced sputum. *Eur Respir J*.1996;9: 2104-8.

Vernooy JH, Kucukaycan M, et al. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1218-24.

Walter RE, Wilk JB, et al. Systemic inflammation and COPD - The Framingham Heart Study. *Chest*. 2008;133:19-25.

Wiedermann U, Chen XJ, et al. Vitamin A deficiency increases inflammatory responses. *Scand J Immunol*. 1996;44:578-84.

Willemse BWM, ten Hacken NHT, et al. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J*. 2005;26:835-45.

Willemse BWM, ten Hacken NHT, et al. Association of current smoking with airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asymptomatic smokers. *Respir Res*. 2005;6.

Willett W. Food frequency methods. In: *Nutritional epidemiology and biostatistics*. Oxford :Oxford University Press;1990. cap.15, p.69-91.

Wouters EFM, Reynaert NL, et al. Systemic and local inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Is there a connection? *Am Thorac Soc*. 2009;6:638-47.

Zachman RD. Role of vitamin-A in lung development. *J Nutr*. 1995;125:S1634-8.

Anexo

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 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 – 6423323
E- mail: fersanchez@hotmail.com

Suzana Erico Tanni
Endereço?

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