

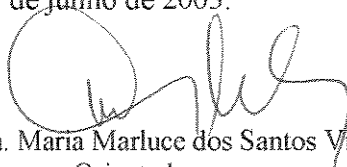
**CRISTINA FRIAS SARTORELLI DE TOLEDO PIZA**

**CORTICOSTERÓIDES MODULAM A LIBERAÇÃO  
DE ÂNION SUPERÓXIDO POR LEUCÓCITOS DE SANGUE  
PERIFÉRICO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES  
ATÓPICOS COM ASMA**

200505408

Este exemplar corresponde a versão final do exemplar da Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Pediatria.

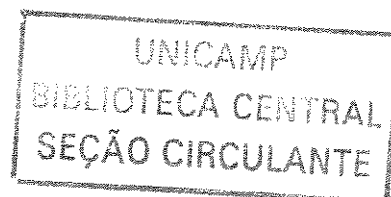
Campinas, 11 de junho de 2003.



Profa Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela  
Orientadora

**CAMPINAS**

**2003**



**CRISTINA FRIAS SARTORELLI DE TOLEDO PIZA**

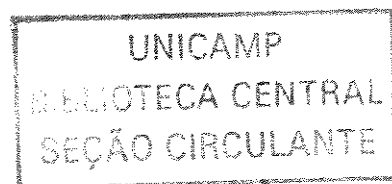
***CORTICOSTERÓIDES MODULAM A LIBERAÇÃO  
DE ÂNION SUPERÓXIDO POR LEUCÓCITOS DE SANGUE  
PERIFÉRICO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES  
ATÓPICOS COM ASMA***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do Título de Mestre em Saúde da  
Criança e Adolescente, área de Pediatria.*

**ORIENTADOR: PROF<sup>A</sup> DRA MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA**

**CAMPINAS**

**2003**



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

P689c

Piza, Cristina Frias Sartorelli de Toledo

Corticosteróides modulam a liberação de ânion superóxido por leucócitos de sangue periférico de crianças e adolescentes atópicos com asma. / Cristina Frias Sartorelli de Toledo. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : Maria Marluce dos Santos Vilela  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Radicais livres. 2. Glicocorticóides. 3. Inflamação. I. Maria Marluce dos Santos Vilela. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

|                            |                                       |
|----------------------------|---------------------------------------|
| UNIDADE                    | Bc                                    |
| Nº CHAMADA                 | 711/unicamp                           |
|                            | P689c                                 |
| V                          | EX                                    |
| TOMBO BC/                  | 62229                                 |
| PROC.                      | 16-26-05                              |
| C <input type="checkbox"/> | D <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO                      | 11,00                                 |
| DATA                       | 22/02/05                              |
| Nº CPD                     |                                       |

Bibid: 341566

# **Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

**Orientador:**

**Prof. Dr<sup>a</sup> Maria marluce dos Santos Vilela**

**Membros:**

- 1. Prof. Dr<sup>a</sup> Maria Marluce dos Santos Vilela**
- 2. Prof. Dr José Dirceu Ribeiro**
- 3. Prof. Dr Victor Nubelman**

**Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

**Data: 11 de junho de 2003**

## ***DEDICATÓRIA***

*À minha querida mãe e aos meus queridos irmãos*

*Ao meu amado esposo Edmur e,*

*Ao nosso amado filho Otávio*

Às crianças e aos adolescentes do ambulatório de Alergia, Imunologia e Pneumologia Pediátrica pela intensa colaboração.

Aos voluntários que fizeram parte do grupo de comparação.

À Prof<sup>a</sup> Dra Maria Marluce dos Santos Vilela, minha orientadora, pelo apoio como professora e amiga. Toda minha gratidão, respeito e admiração.

Ao Prof. Dr Antônio Condino Neto pelo apoio e colaboração em todas as etapas do estudo.

Ao Prof. Dr José Dirceu Ribeiro pelas críticas e sugestões

À Dra Adyléia Aparecida Toro, pelo auxílio no atendimento aos pacientes do ambulatório de Imunologia-Alergia e Pneumologia Pediátrica da FCM-UNICAMP.

À bióloga e amiga Jussara Rehder , companheira e competente profissional, pelo auxílio indispensável.

À colega e amiga Livia Esteves Marçal, pelo auxílio, participação e apoio durante e fora do estudo.

Aos colegas Dra Mônica de Freitas Leitão, Dra Ana Lúcia Amoras, Dra Anna Livia de Campos Mello e Dra Elianete B. Silva pelo incentivo.

À Elisabeth Cristina Cambiucci, Maria Helena C. Mazzola pelo apoio.

À Josefina Eliane Ribeiro, pelo auxílio nas provas de Função Pulmonar.

Às amigas Gisela de Resende Eugênio, Marisa Dilela Acherman, Enrichetta Cassoni e Célia Martins pelo apoio e amizade.

À Helymar da Costa Machado, responsável pela análise estatística dos dados.

À Simone Cristina Ferreira e Suely Araújo secretárias da Subcomissão de Pós-Graduação em Pediatria do CIPED, pela colaboração neste trabalho.

Aos funcionários do CIPOI e CIPED, pelo apoio.

À CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro a esta pesquisa.

|                                                          | <b>PÁG.</b> |
|----------------------------------------------------------|-------------|
| <b>RESUMO.....</b>                                       | <i>xiii</i> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                     | <i>xvi</i>  |
| <b>1- INTRODUÇÃO.....</b>                                | 19          |
| 1.1- Asma crônica e inflamação.....                      | 20          |
| 1.2- Radicais livres de oxigênio.....                    | 26          |
| 1.3- Radicais livres e inflamação.....                   | 28          |
| 1.4- Sistema NADPH-oxidase.....                          | 29          |
| 1.5- Radicais livres e asma.....                         | 30          |
| 1.6- Glicocorticóides.....                               | 32          |
| 1.7- Glicocorticóides e radicais livres de oxigênio..... | 34          |
| <b>2- OBJETIVOS.....</b>                                 | 37          |
| 2.1- Geral.....                                          | 38          |
| 2.2- Específicos.....                                    | 38          |
| <b>3- METODOLOGIA.....</b>                               | 39          |
| 3.1- Seleção dos participantes.....                      | 40          |
| 3.1.1- Pacientes.....                                    | 40          |
| 3.1.2- Grupo de comparação.....                          | 41          |
| 3.1.3- Critérios de exclusão.....                        | 42          |
| 3.4- Implementação do estudo.....                        | 42          |
| 3.5- Esquema terapêutico.....                            | 43          |
| 3.6- Ensaio laboratorial.....                            | 43          |

|                                                                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6.1- Determinação da liberação de ânion superóxido.....                                                                                           | 43        |
| 3.6.2- Teste cutâneo de leitura imediata.....                                                                                                       | 44        |
| 3.6.3- Prova de função pulmonar.....                                                                                                                | 45        |
| 3.6.4- Determinação do nível sérico de IgE.....                                                                                                     | 45        |
| 3.7- Análise estatística.....                                                                                                                       | 46        |
| 3.8- Aspectos éticos.....                                                                                                                           | 46        |
| <b>4- RESULTADOS.....</b>                                                                                                                           | <b>47</b> |
| 4.1- Caracterização do grupo de pacientes.....                                                                                                      | 48        |
| 4.2- Avaliação do VEF <sub>1</sub> .....                                                                                                            | 48        |
| 4.3- Determinação da liberação de ânion superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....                                                              | 50        |
| 4.3.1- Liberação de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por asmáticos e indivíduos saudáveis.....                                                           | 51        |
| 4.3.2- Liberação de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por asmáticos, classificados de acordo com<br>o VEF <sub>1</sub> e indivíduos saudáveis.....        | 52        |
| 4.3.3- Liberação de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por asmáticos, classificados de acordo<br>com o VEF <sub>1</sub> ,antes e após corticoterapia.....  | 55        |
| 4.3.4- Liberação de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por asmáticos antes e após corticoterapia de<br>acordo com a via de administração do esteróide..... | 57        |
| <b>5- DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                                            | <b>58</b> |
| <b>6- CONCLUSÕES.....</b>                                                                                                                           | <b>63</b> |
| <b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                           | <b>65</b> |
| <b>8- ANEXOS.....</b>                                                                                                                               | <b>81</b> |

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

|                |                                                    |
|----------------|----------------------------------------------------|
| AP-1           | “transcription factor activator protein”           |
| BAL            | lavado bronco-alveolar                             |
| EGF            | “epidermal growth factor”                          |
| FGF            | “fibroblast growth factor”                         |
| GM-CSF         | “granulocyte-macrophage colony-stimulating factor” |
| GR             | “glicocorticoid receptor”                          |
| Hsp            | “heat shock protein”                               |
| ICAM           | “intercellular adhesion molecule”                  |
| Ig             | imunoglobulina                                     |
| IL             | interleucina                                       |
| IFN            | interferon                                         |
| IGF            | “insulin-like growth factor”                       |
| MBP            | proteína básica maior                              |
| LT             | leucotrienos                                       |
| MCP            | “monocyte chemoattractant protein”                 |
| MDC            | “macrophage derived cytokine”                      |
| MIP            | “macrophage inflammatory protein”                  |
| NEP            | endopeptídeo neutro                                |
| NF- $\kappa$ B | “nuclear factor - $\kappa$ B”                      |
| PAF            | fator ativador de plaquetas                        |
| PDGF           | fator de crescimento derivado de plaquetas         |
| PG             | prostaglandina                                     |

|                |                                                                    |
|----------------|--------------------------------------------------------------------|
| RANTES         | “regulation upon activation, normal T cell expressed and secreted” |
| RIOs           | reativos intermediários de oxigênio                                |
| SOD            | superóxido dismutase                                               |
| TCA            | gene ativador da célula T                                          |
| TGF            | “transforming growth factor”                                       |
| T <sub>H</sub> | célula T “helper”                                                  |
| VCAM           | “vascular cell adhesion molecule”                                  |

|                                                                                                                                                                                                                                         | <b>PÁG.</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Tabela 1-</b> Características demográficas das crianças e adolescentes com asma.....                                                                                                                                                 | 48          |
| <b>Tabela 2-</b> Avaliação do VEF <sub>1</sub> (% do predito) de crianças e adolescentes com asma antes e após corticoterapia (via oral e/ou por aerogação) de acordo com o VEF <sub>1</sub> e a via de administração do esteróide..... | 49          |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>PÁG.</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Figura 1-</b> Comparação do VEF <sub>1</sub> médio de crianças e adolescentes com asma antes e após corticoterapia (por via oral e/ou aerogação) de acordo com o grupo e a via de administração do esteróide.....                                                                     | 50          |
| <b>Figura 2-</b> Liberação espontânea de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por granulócitos de crianças e adolescentes com asma antes da corticoterapia, após corticoterapia (por via oral e/ou por aerogação) e indivíduos saudáveis.....                                                     | 52          |
| <b>Figura 3-</b> Liberação espontânea de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por granulócitos de crianças e Adolescentes com asma antes da corticoterapia dos grupos I (60% < VEF <sub>1</sub> < 80%), grupo II (VEF <sub>1</sub> ≤ 60%) e indivíduos saudáveis.....                             | 54          |
| <b>Figura 4-</b> Liberação espontânea de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por granulócitos de crianças e adolescentes com asma após corticoterapia por via oral e/ou por aerogação dos grupos I (60% < VEF <sub>1</sub> < 80%), grupo II (VEF <sub>1</sub> ≤ 60%) e indivíduos saudáveis..... | 54          |
| <b>Figura 5-</b> Liberação espontânea de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por granulócitos de crianças e Adolescentes com asma do grupo I (60% < VEF <sub>1</sub> < 80%) antes e após corticoterapia por via oral e/ou por aerogação.....                                                     | 56          |
| <b>Figura 6-</b> Liberação espontânea de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por granulócitos de crianças e adolescentes com asma do grupo II (VEF <sub>1</sub> ≤ 60%) antes e após corticoterapia por via oral e/ou por aerogação.....                                                          | 56          |
| <b>Figura 7-</b> Liberação espontânea de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por granulócitos de crianças e adolescentes com asma antes e após corticoterapia por via oral ou por aerogação.....                                                                                                 | 57          |

***RESUMO***

Reativos intermediários do oxigênio, particularmente o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), estão implicados na injúria oxidativa presente em várias patologias inflamatórias, especialmente a asma.

Glicocorticóides são os agentes anti-inflamatórios mais potentes utilizados para o tratamento da asma crônica.

O objetivo deste estudo foi investigar a ação dos corticosteróides sobre a liberação de ânion superóxido por leucócitos de sangue periférico de crianças e adolescentes atópicos com asma.

Foram estudados 32 crianças e adolescentes ,com idade entre 6 e 18 anos (média  $11.7 \pm 2.44$ ) e 29 indivíduos adultos sadios .

Os pacientes foram classificados de acordo com o grau de obstrução de vias aéreas determinado pelo  $VEF_1$  : grupo I,  $VEF_1$  entre 60 e 80% do valor predito (  $n=19$ ) e grupo II ,  $VEF_1 \leq 60\%$  ( $n=13$ ).

Amostras de sangue periférico foram colhidas dos pacientes em fase de exacerbação da doença e após serem submetidos a tratamento com corticosteróide. Os indivíduos saudáveis foram submetidos a apenas uma coleta de sangue.

Para o rápido estabelecimento do estado estável da doença, todos os pacientes receberam prednisona por via oral , 2mg/Kg/dia (máximo de 60 mg/dia) por 7 dias . Após o curso de corticosteróide por via oral foram mantidos com corticosteróide por aerogação por ao menos um mês e no máximo 6 meses na mínima dose para o controle dos sintomas.

Para análise estatística foram utilizados teste de Tukey, Wilcoxon e ANOVA. Foi considerado intervalo de confiança de 95% ,  $p < 0,05$  para todos os testes.

Comparando-se a liberação de  $O_2^-$  por leucócitos de asmáticos e indivíduos sadios observamos que granulócitos de asmáticos do grupo II liberaram quantidade significativamente maior de  $O_2^-$ . Não foi observada diferença após os asmáticos serem submetidos à corticoterapia.

Comparando-se a liberação de  $O_2^-$  por leucócitos do mesmo indivíduo asmático antes e após corticoterapia, observamos que a liberação espontânea de  $O_2^-$  por granulócitos caiu significativamente nos pacientes do grupo I . Houve queda significativa na liberação espontânea de  $O_2^-$  por granulócitos de asmáticos após o uso de corticosteróide por via oral e por aerogação.

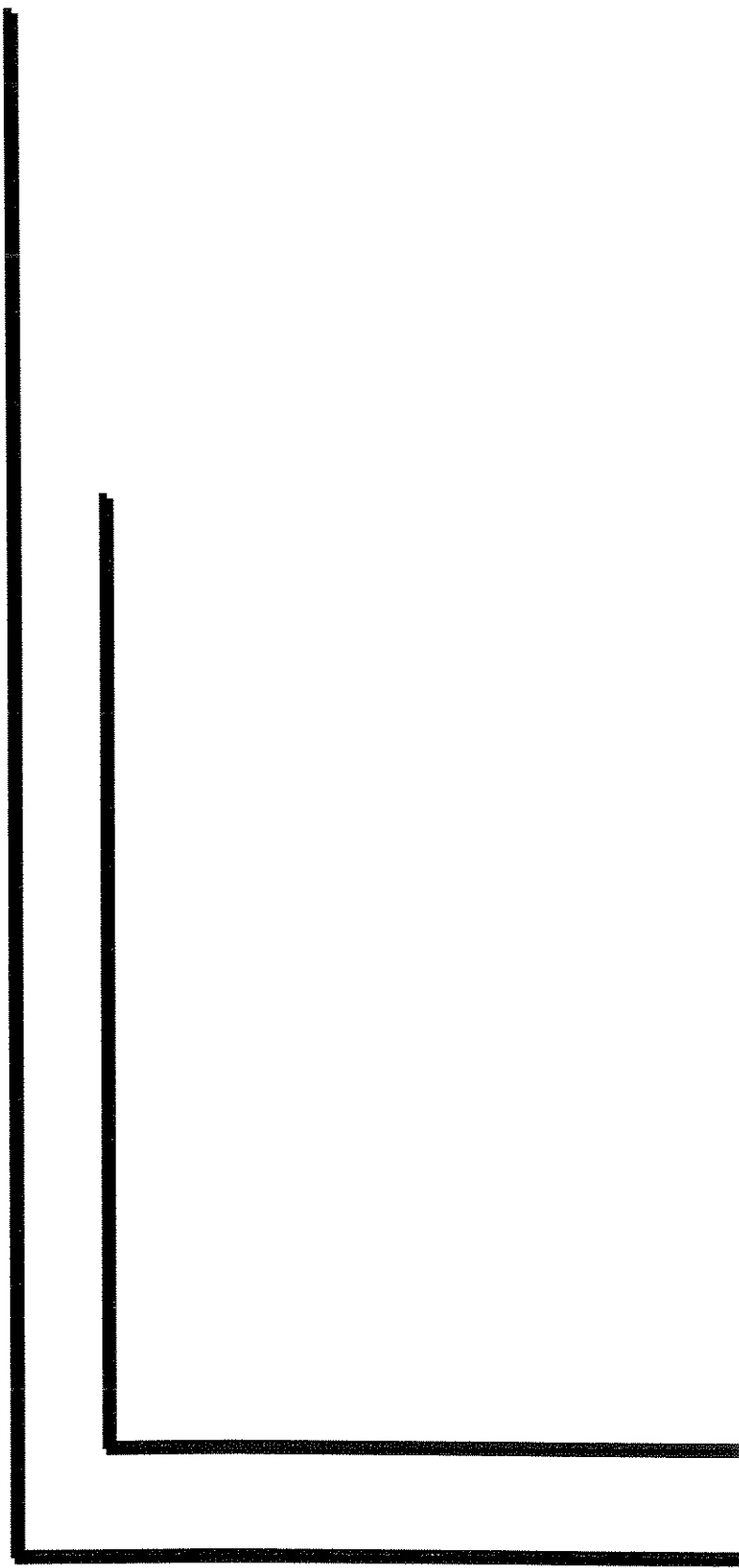
Todos os pacientes apresentaram aumento significativo nos valores de  $VEF_1$  após corticoterapia por via oral e por aerogação

Nossos resultados demonstram que a liberação de  $O_2^-$  está relacionada com a fase de exacerbação da asma sugerindo seu papel na inflamação.

Glicocorticóides inibiram a liberação de  $O_2^-$  de forma significativa nos indivíduos com menor grau de obstrução de vias aéreas sugerindo a persistência da inflamação nos pacientes mais graves.

Após corticoterapia, os valores de  $VEF_1$  se mantiveram abaixo do normal em 54% dos pacientes sugerindo quatro possibilidades: remodelamento de vias aéreas, resistência ao corticosteróide, bronquiólite obliterante ou não adesão ao tratamento.

A determinação da liberação de  $O_2^-$  por granulócitos de sangue periférico de asmáticos pode ser utilizada como marcador de inflamação e controle da eficácia da corticoterapia.



*ABSTRACT*

Reactive oxygen species (ROS), particularly superoxide anion  $O_2^-$ , have been implicated in the tissue oxidative injury present in a variety of inflammatory diseases including asthma.

Glucocorticoids are currently the most potent anti-inflammatories used to treat atopic patients with asthma and may affect the production of  $O_2^-$  through a mechanism which is not completely known.

The aim of this study was to investigate the effect of corticosteroid treatment on  $O_2^-$  release by peripheral blood leucocytes from atopic patients with uncontrolled asthma .

We studied 32 patients with uncontrolled asthma aged 6 to 18 (mean 11.7 years) and 29 healthy subjects as a comparative group. The asthma was classified according to the level of airflow obstruction measured by the forced expiratory volume in one second ( $FEV_1$ ) in two groups: group I  $60\% < FEV_1 < 80\%$  (n=19) and group II  $FEV_1 \leq 60\%$  (n=13).

Blood samples were collected from healthy subjects and from uncontrolled asthmatic patients before and after steroid therapy with oral prednisone, 2mg/Kg/day for seven days (n=19) and inhaled corticosteroids (n=13) for at least one month or 6 months as maximum (mean 3.0 months) We recommended the minimal dose of inhaled corticosteroid to control the symptoms. Granulocytes and mononuclear leukocytes were isolated for the evaluation of  $O_2^-$  release.

The Wilcoxon test was used to compare  $O_2^-$  release and  $FEV_1$  levels from patients before and after steroid therapy. The analysis of variance (ANOVA) and Tukey test were carried out to compare cellular  $O_2^-$  release among asthmatics and healthy subjects.

Comparing the  $O_2^-$  release by leukocytes from healthy subjects and uncontrolled asthmatics we observed that, the spontaneous release of  $O_2^-$  by granulocytes from patients from group II was significantly higher than the  $O_2^-$  release from cells from healthy subjects. No difference could be observed between the release of  $O_2^-$  by granulocytes from asthmatics submitted to oral or inhaled steroid therapy and the  $O_2^-$  release from cells from the comparative group.

Comparing the  $O_2^-$  release by leukocytes from asthmatics, before and after they had undergone steroid therapy we found that: after asthmatics were submitted to steroid therapy the spontaneous  $O_2^-$  release by granulocytes from patients from group I had a significant decrease, the spontaneous  $O_2^-$  release by granulocytes significantly decreased in patients who had undergone oral or inhaled steroid therapy .

Comparing the FEV<sub>1</sub> levels before and after asthmatics had undergone steroid therapy we found a significant improve in the FEV<sub>1</sub> levels in all asthmatics submitted to oral or inhaled corticosteroid therapy.

Our results showed that the release of  $O_2^-$  is correlated with uncontrolled asthma suggesting its role in airway inflammation.

Glucocorticoids modulate the exacerbated  $O_2^-$  release by granulocytes from uncontrolled asthmatics with higher FEV<sub>1</sub> suggesting that, regardless steroid therapy, airway inflammation persists in asthmatics with more severe disease.

In asthmatics, despites steroid therapy, the persistence of levels of FEV<sub>1</sub> above the normal values in 54% of the patients suggests four possibilities: the presence of airway remodeling, glucocorticoid-resistant asthma, non-adherent patients or bronchiolitis obliterans.

Superoxide release by peripheral blood granulocytes from asthmatics can be used as an inflammatory marker and a parameter for the evaluation of the efficacy of the therapy.

## ***1- INTRODUÇÃO***

## 1.1- ASMA CRÔNICA E INFLAMAÇÃO

A asma, como outras doenças atópicas, é caracterizada por distúrbios do sistema imunológico. Os mecanismos que regulam a resposta alérgica nas vias aéreas são complexos envolvendo células apresentadoras de antígeno, linfócitos T, mastócitos e eosinófilos, além da participação importante de células estruturais incluindo células epiteliais, endoteliais e músculo liso (WILLS-KARP M, 1999).

A resposta imune, induzida principalmente pela inalação do antígeno, aumenta a produção de imunoglobulina E (IgE) (MORRISON & HIGENBOTTAN, 1989) e mediadores inflamatórios como citocinas, leucotrienos e histamina levando a alterações funcionais de várias linhagens de células inflamatórias (DJUKANOVIC et al, 1990; KAY, 1991).

Em indivíduos atópicos com asma, a inalação do alérgeno desencadeia uma resposta inflamatória em vias aéreas chamada fase imediata da reação alérgica, caracterizada pela rápida ativação de mastócitos, liberação de histamina, eicosanóides e radicais livres de oxigênio (LUKACS, 2000). Aproximadamente 6 horas após o início da reação inflamatória ocorre a fase tardia da resposta alérgica marcada pelo recrutamento e ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, eosinófilos, basófilos, neutrófilos e macrófagos. A persistência destas células em vias aéreas interagindo entre si e com células estruturais de forma cognata e não cognata caracteriza a asma crônica (BUSSE, 1998).

Na asma crônica, células T<sub>H</sub>2 de memória são mantidas ativadas através da exposição contínua ao alérgeno sendo as responsáveis pela disfunção crônica do sistema imune e conseqüente manutenção do processo inflamatório (KON & KAY, 1999; LUKACS, 2000).

Um desbalanço entre células T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2, com predomínio T<sub>H</sub>2 pode ser detectado já no período neonatal nos indivíduos predispostos a desenvolver asma ou outras doenças atópicas (BUSSE & LEMANSKE, 2001).

A liberação pelas células de interleucinas (IL) 4 e 13 induz à produção, pela própria célula  $T_H2$ , de eotaxina, MCP-1 (“monocyte chemoattractant protein”), TCA3 (gene ativador de célula T) e MDC (“macrophage derived cytokin”) que agem recrutando novas células  $T_H2$  e eosinófilos. A secreção de IL-3 e IL-5 leva a produção e ativação de eosinófilos, já IL-4 e IL-13 estimulam a célula B a produzir IgE e RANTES (“regulation upon activation, normal T cell expressed and secreted”) quimiotáticos para eosinófilos, monócitos, basófilos e célula T. Células  $T_H2$  liberam ainda GM-CSF (“granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”) que prolonga a sobrevivência de eosinófilos atuando também sobre macrófagos e neutrófilos. Portanto, sob ação das células  $T_H2$ , células mononucleares e polimorfonucleares permanecem ativadas respondendo exageradamente aos estímulos (KOWNASTZKI, KAPP, UHRICH, 1988; KLEBANOFF, 1986; NATHAN, 1989; SULLIVAN, 1989).

Apesar de seu papel central, a célula  $T_H2$  parece não ser o único subtipo a participar do processo inflamatório da asma. A presença de IFN- $\gamma$  (interferon), citocina característica de  $T_H1$ , no soro de pacientes com asma grave não controlada sugere a participação ativa de  $T_H1$  no mecanismo fisiopatológico da doença (CORRIGAN & KAY, 1990). O IFN- $\gamma$  não só aumenta a expressão de CD69, HLA-DR, e ICAM-1 (“intercellular adhesion molecule-1”) em eosinófilos mas também a viabilidade de eosinófilos, sugerindo que este mediador contribua para ativação dos eosinófilos e ampliação da inflamação (HARTNELL et al., 1993).

A célula dendrítica, presente na submucosa e epitélio de vias aéreas, é especialmente importante na promoção do estímulo alérgico para as células T de mucosa. Sob ação de citocinas liberadas por  $T_H2$  esta célula adquire receptores Fc $\epsilon$ RI funcionalmente ativos que aumentam o englobamento de antígeno de 100 a 500 vezes (HOLGATE 1998).

Além da função de apresentadora de antígeno, células dendríticas secretam citocinas que são essenciais para o direcionamento da célula T, especificamente IL-12, IL-18 e IL-1 $\beta$ . No entanto, para que ocorra a diferenciação para  $T_H2$  é fundamental a participação das células epiteliais.

O epitélio brônquico, através de interações cognatas e não cognatas interage com o sistema imune associado à mucosa. O aumento da produção de prostaglandina (PG) E<sub>2</sub> pelo epitélio inibe a produção de IL-12 pela célula dendrítica levando à diferenciação da célula T preferencialmente para T<sub>H</sub>2 (HOLGATE, 1998).

O epitélio do asmático expressa um padrão diferente de proteínas de adesão, além do CD44 expressa também ICAM-1, envolvida na sinalização de leucócitos. O CD44 está presente no epitélio em regiões de dano possuindo cadeias capazes de ligar e apresentar fatores de crescimento como b-FGF (“fibroblast growth factor-b”), e mediadores como IL-8, GM-CSF e MIP-1 $\alpha$  (“macrophage inflammatory protein”), que podem atuar como quimioatraentes para eosinófilos e linfócitos e promover a sobrevivência e ativação dos linfócitos (WILLS-KARP, 1999).

Através da liberação de TGF- $\beta$  (“transforming factor- $\beta$ ), endotelina, b-FGF, IGF-1 (“insulin-like growth factor-1”) o epitélio de via aérea dirige uma resposta proliferativa fibrótica contribuindo para o remodelamento de vias aéreas, característico da asma crônica (LAUTINEN et al, 1996; HOLGATE, 1998).

O epitélio é fonte importante de 15-HETE, citocinas pro-inflamatórias, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11, LIF, GM-CSF, IL-16 e IL-18, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MCP, RANTES e eotaxina, relevantes para a resposta inflamatória da asma.

A célula endotelial, pela sua capacidade de expressar moléculas de adesão e liberar citocinas, está intimamente ligada ao processo inflamatório da asma. Sob ação de IL-1 e RANTES estas células expressam IL-1, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-15, CSF, GM-CSF, MCP-1 e RANTES contribuindo para o desenvolvimento da asma crônica (KRISHNASWAMY et al, 1999).

Em pacientes asmáticos atópicos o aumento no número de macrófagos pulmonares após o contato com o alérgeno, sugere um recrutamento ativo destas células da circulação para as vias aéreas. Nestes pacientes, o número de macrófagos com receptores Fc $\epsilon$ RII para IgE é substancialmente maior do que em indivíduos normais (KAY, 1991; POSTON et al, 1992).

Além de processar e apresentar o antígeno para célula T, fagócitos mononucleares têm a capacidade de produzir mediadores lipídicos, como eicosanóides, proteínas e peptídeos como IL-8, C5a, PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TNF, GM-CSF, IL-1, e fatores liberadores de histamina (KAY, 1991; KAY, 2001). Outra função atribuída aos macrófagos seria a de modular a inflamação através da liberação de IL-10 e IL-12 como sugerido por ZEIBECOGLOU et al (2000) que avaliaram a presença destas citocinas no escarro de pacientes com asma atópica.

O mastócito, célula efetora residente, tem papel fundamental na asma crônica. Com localização estratégica na interface do meio interno e externo no pulmão são capazes de responder rapidamente a alérgenos e outros estímulos exógenos.

Em pacientes sensibilizados, a inalação do antígeno leva à ativação de mastócitos via receptores de alta afinidade  $Fc\epsilon RI$  (MEKONI & METCALFE, 2000; BINGHAM & AUSTEN, 2000). Ao mesmo tempo em que ocorre a rápida liberação de mediadores autacóides, se inicia a síntese de metabólitos do ácido aracdônico,  $TXA_2$ ,  $PGD_2$ ,  $LTB_4$ ,  $LTC_4$ ,  $LTD_4$ , responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular, aumento da secreção de muco e broncoconstrição, e a transcrição para a produção de citocinas como  $TNF-\alpha$ , IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF e fatores de crescimento que irão atuar na asma crônica (HOLGATE, 2000).

O  $TNF-\alpha$ , tanto pré-formado como induzido, aumenta a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 (“vascular-cell adhesion molecule”) fundamentais para a adesão de células T ao endotélio. IL-4 e IL-13 contribuem de forma sinérgica com o  $TNF-\alpha$  para o estímulo da expressão de VCAM-1 atuando ainda sobre o rolamento de leucócitos dependente de P-selectina e induzido por histamina. Triptase, PAF (fator ativador de plaquetas) e  $PGD_2$ , IL-5 e GM-CSF levam a quimiotaxia, proliferação e citoproteção de eosinófilos. IL-4, IL-13 e IL-6 amplificam a resposta de  $T_H2$  e a produção de IgE. Triptase, FGF e  $TGF-\beta$  (“transforming growth factor”) recrutam e ativam fibroblastos induzindo a síntese de colágeno. Finalmente as proteases de mastócitos degradam membrana basal e amplificam a resposta através da ativação de metaloproteinases da matrix (BINGHAM & AUSTEN, 2000).

Os eosinófilos são células efetoras primordiais na resposta inflamatória da asma.

Um número aumentado de eosinófilos é encontrado em pacientes com asma crônica e durante exacerbações agudas, sendo o grau de eosinofilia proporcional à gravidade da asma (BIERMAN,1996; LOUIS, 2000). Sob ação de quimioatraentes como RANTES, MIP-1 $\alpha$ , e eotaxinas, as células circulantes migram para o pulmão. Dentro da matrix de vias aéreas sua sobrevivência é prolongada por IL-5 e GM-CSF (BUSSE & LEMANSKE, 2001).

Após a ativação, o eosinófilo contribui para a inflamação através da liberação de mediadores como proteínas granulares, EDN(“eosinophil-derived neurotoxin”), ECP (”eosinophil cationic protein”, MPB (”major basic protein”), EPO (”eosinophil peroxidase”), citocinas, IL1- $\alpha$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 e GM-CSF e eicosanóides. Proteínas granulares, lesam diretamente o tecido de vias aéreas promovendo hiperreatividade brônquica, causam degranulação de basófilos e mastócitos aumentando a gravidade da asma. Leucotrienos (LT), especialmente LTC<sub>4</sub>, contraem músculo liso, aumentam a permeabilidade vascular e recrutam mais eosinófilos para as vias aéreas .

Eosinófilos são capazes de prolongar sua sobrevivência através da geração de GM-CSF contribuindo ainda mais para a inflamação persistente de vias aérea (BUSSE & LEMANSKE 2001).

Apesar de seu papel marcante como célula efetora no processo inflamatório, o eosinófilo não é o único responsável pelas alterações que ocorrem na asma crônica.

Neutrófilos e seus produtos podem ser identificados na asma grave (JATAKANON et al., 1999) e durante crises de exacerbação de doença, demonstram um grau diferente de ativação e estimulação em comparação a células de indivíduos saudáveis (NORZILA et al., 2000; GIBSON et al., 1999; LOUIS et al., 2000). Questiona-se se o aumento destas células em vias aéreas seria consequência do uso crônico de corticosteróides ou característica de um tipo de doença mais grave (SAMPSON, 2000).

Atraídos para o sítio inflamatório por várias citocinas como LTB<sub>4</sub>, IL-8, PAF, GM-CSF, IL-6, FMLP e C5a estas células contribuem para a inflamação de vias aéreas através da liberação de lípidos, LTB<sub>4</sub>, PAF, TXA<sub>2</sub>, LTA<sub>4</sub>; citocinas, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ; proteases, elastase, collagenase; e reativos intermediários de oxigênio (RIOs) (KAY, 1991; SAMPSON, 2000).

Os basófilos estão aumentadas em biópsias pulmonares de indivíduos atópicos com asma tanto na fase estável da doença quanto durante exacerbações (MACFARLANE et al., 2000). Não se sabe se estas células contribuem ativamente para a fisiopatologia da asma ou se estão envolvidas em remover e modular os efeitos de outras células e dos mediadores que elas produzem (KAY, 1991).

Os miofibroblastos estão aumentadas em vias aéreas de pacientes com asma crônica (JEFFERY, 2001).

Sob ação de TGF- $\beta$ , IL-11, PDGF, IGF, fator de crescimento epidermal (EGF) e GM-CSF liberados por eosinófilos, fibroblastos, células do músculo liso, células epiteliais, glândulas mucosa, células T e macrófagos estas células são capazes de mudar para um fenótipo fibromiótico atuando como células efectoras de uma reação anormal desencadeada pela inalação ao alérgeno (JEFFERY, 2001).

O aumento no número e na ativação de miofibroblastos leva a uma maior produção de colágeno com conseqüente espessamento da lâmina reticular. A deposição de colágeno tipos III e IV somada ao acúmulo de fibronectina, tenascina e proteoglicanos seria a responsável pela fibrose subepitelial característica da asma (ROCHE et al., 1989; HUANG et al., 1999; QUITAYABA & MINSHALL, 2000).

Plaquetas são demonstradas no lavado bronco-alveolar (BAL) de asmáticos. Possuem receptores para IgE FC $\epsilon$  RII, liberam PAF e tromboxano A<sub>2</sub> sendo sua participação na fisiopatologia da asma sugerida em diversos estudos (METZGER et al., 1985; SULLIVAN et al., 2000; MORITANI et al., 1998).

Várias das células inflamatórias que participam da resposta inflamatória na asma são capazes de gerar radicais livres de oxigênio. A ativação de mastócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e plaquetas gera ânion superóxido e outras espécies reativas de oxigênio (BARNES, 1990; SALVEMINI et al., 1989).

## 1.2- RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO

Radicais livres são espécies químicas que possuem um elétron não pareado na sua órbita, considerados fragmentos de molécula são altamente reativos (HALLIWELL, 1994). A reatividade e parte do poder de lesar bactérias e tecidos circunvizinhos, vêm da sua instabilidade e conseqüente avidez por combinar-se com outras moléculas (KERR, 1996; HALLIWELL, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1994).

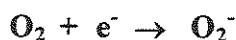
Os mais importantes radicais livres são os derivados do oxigênio.

O oxigênio molecular é usado primariamente na produção de energia celular através da síntese de trifosfato de adenosina (ATP) pelo processo de fosforilação oxidativa, o subproduto desta geração de energia são os radicais livres (KERR et al, 1996).

Estes radicais são ainda produzidos a partir da quebra de lípidos e proteínas, catabolismo de catecolaminas e inflamação (KERR et al, 1996; IKEDA & LONG, 1990).

A transferência de elétrons é o processo mais comum pelo qual radicais livres se formam, podendo ainda ser formados por perda ou adição de um único elétron a molécula normal, estes processos geram radicais livres positivamente carregados, negativamente carregados ou eletricamente neutros (CHEESEMAN & SLATER, 1993).

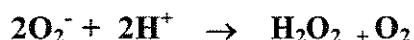
A redução do oxigênio por transferência de um único elétron produzirá o ânion superóxido ( $O_2^-$ )



Se o oxigênio recebe dois elétrons, o peróxido de hidrogênio é formado ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

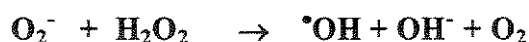


Peróxido de hidrogênio também pode ser gerado em sistemas biológicos via produção de superóxido:



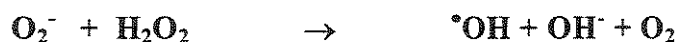
$\text{H}_2\text{O}_2$  não é um radical livre mas é considerado membro das espécies reativas de oxigênio que inclui também não radicais derivados do oxigênio que estão envolvidos na produção de radicais de oxigênio.  $\text{H}_2\text{O}_2$  juntamente com o oxigênio “singlet”, são importantes por participarem seletivamente na geração de radicais livres (KERR et al., 1996).

Quando o oxigênio reage com três elétrons, o mais reativo e lesivo dos radicais livres de oxigênio, o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) é formado.



O ferro e o cobre são considerados elementos de transição e facilitam a formação de radicais livres de oxigênio, na chamada reação de Fenton conforme proposto por HABER & WEISS (1934):

**íons ferro e cobre**



O  $O_2^-$  não é particularmente lesivo por si, sua importância está na formação de  $H_2O_2$ , redução de metais de transição e, em pH baixos, assumir a forma de radical perhidroxil ( $HO_2^\bullet$ ) uma espécie mais reativa e oxidante.

No indivíduo sadio existe o equilíbrio entre geração de RIOs (reativos intermediários de oxigênio) e sua remoção. A defesa anti-oxidante, superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e ácido úrico, trabalha para cessar a reação em cadeia causada pelos radicais livres através de sua remoção, prevenção de sua formação ou reparando o dano causado na estrutura celular (KERR, 1996; HALLIWELL, 1994).

O principal mecanismo de remoção de  $O_2^-$  é a reação de dismutação catalisada pela SOD (MAC CORD & FRIDOVICH, 1969):

#### **SOD**



Normalmente existe um balanço entre a geração de radicais livres e sua destruição mas, a geração de radicais livres que supere a defesa anti-oxidante resulta na destruição oxidativa de membranas celulares e séria lesão tissular (CHEESEMAM & SLATER, 1993).

### **1.3- RADICAIS LIVRES E INFLAMAÇÃO**

A importância dos radicais livres de oxigênio como bactericida foi inicialmente descrita reconhecendo-se a geração destes oxidantes no interior dos fagossomos de neutrófilos, eosinófilos e fagócitos mononucleares (BABIOR, 1978; BABIOR et al., 1975). A liberação destes radicais para o meio extracelular durante um processo inflamatório levaria à lesão oxidativa nos tecidos circunvizinhos.

Uma das reações oxidativas mais comuns é a peroxidação lipídica, onde um radical livre se combina com um ácido graxo, componente primário da membrana celular. Os produtos da peroxidação lipídica diminuem a fluidez de membrana, inibem a síntese protéica, bloqueiam a ação de macrófagos, alteram a quimiotaxia e a atividade enzimática (WINROW et al., 1993). Além da ação direta sobre a membrana celular pode haver a geração de metabólitos do ácido aracdônico através da ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> ou liberação de fosfolipase C ( SEDGWICK et al, 1990; RYRFELDT et al., 1993; CHAKRABORTI et al.,1989). A transferência de elétrons do radical livre para o ácido aracdônico cria mais radicais e inicia um processo auto destrutivo ( PRYOR, 1978).

Proteínas são particularmente sensíveis ao dano oxidativo. A lesão de estruturas protéicas com conseqüente degradação, fragmentação ou agregação molecular pode alterar substâncias relevantes para a inflamação como a imunoglobulina G e o inibidor de alfa-1-proteinase ( $\alpha$ -1-antitripsina) (KERR, 1996).

A injúria oxidativa pode atuar sobre carboidratos induzindo desestabilização de tecido conjuntivo e perda da viscosidade do fluido sinovial e sobre ácidos nucléicos levando à quebra de DNA (WISEMAN & HALLIWELL, 1996).

#### **1.4- SISTEMA NADPH- OXIDASE**

O sistema NADPH-oxidase é o responsável pela geração de ânion superóxido e outros reativos de oxigênio. A doença granulomatosa crônica é um exemplo de defeito nesta oxidase com conseqüente diminuição no consumo de oxigênio e dificuldade na eliminação de fungos e bactérias (QUIE, 1993; CURNUTTE, ORKIN & DINAVER,1994; DAHLGREN & KARLSSON 1999).

O sistema NADPH-oxidase, descoberto inicialmente por BALDRIDGE & GERARD (1933), forma uma cadeia de transporte de elétrons que resulta na oxidação do NADPH na superfície citoplasmática e na geração de O<sub>2</sub><sup>-</sup> na superfície externa da membrana celular (PARKOS et al., 1988; JESAITIS e al., 1980). O O<sub>2</sub><sup>-</sup> pode ser liberado para o interior do fagossomo ou para o meio extracelular (BABIOR, 1978).

A oxidase inativa é constituída por um elemento de membrana , o citocromo  $b_{558}$  formado por duas subunidades gp91-*phox* (glicoproteína, 91 kDa, phagocyte oxidase) e p22-*phox*; e quatro componentes citosólicos, p47-*phox*, p67-*phox*, p40 e rac 2.

A ativação do complexo NADPH oxidase de um estado de repouso para um gerador de  $O_2^-$  requer modificação química e translocação das subunidades citoplasmáticas para o complexo oxidase da membrana celular (McPHAIL et al., 1985; BABIOR, KUPER, CURNUTTE, 1988).

A ativação deste sistema pode ser feita através de fragmentos de complemento, IgG, phorbol-ésteres, IgE , fragmentos bacterianos (SHATWELL & SEGAL, 1996), IL-8 (BAGGIOLINI et al., 1989), IFN- $\gamma$  (DEMOLY et al.,1995), PAF, LTB<sub>4</sub>. Os sinais de transdução responsáveis por este mecanismo ainda não são totalmente conhecidos (KOO et al., 1982,1983; McPHAIL & SYNDERMAN, 1983; McPHAIL, CLAYTON, SNYDERMAN, 1984).

## 1.5- RADICAIS LIVRES E ASMA

O excesso de liberação de radicais livres por diversas células participantes do processo inflamatório tem sido amplamente demonstrado.

A ação de  $H_2O_2$ ,  $^{\bullet}OH$  e  $O_2^-$  sobre o músculo liso de vias aéreas levando a contração e hiperreatividade foi demonstrada em diversos estudos com animais. As espécies oxidantes atuam diretamente sobre o músculo liso mas também levariam à liberação de metabólitos do ácido aracdônico e à neutralização do efeito regulador do óxido nítrico com conseqüente contração da musculatura de vias aéreas (STEWART et al., 1981; BARNES et al.,1987; KATSUMATA et al., 1990 ; LANSING et al., 1991; POSTMA et al.; DE BOER et al., 1998).

SEYBOLD et al. (1992) em estudo com carneiros, demonstraram que a exposição aos produtos solúveis de *Pseudomonas aeruginosa* leva a inibição do batimento ciliar e transporte de muco, estes efeitos seriam parcialmente mediados por radicais livres de oxigênio produzidos por neutrófilos.

TAKEYAMA et al. (2000) demonstraram que, em cultura de células, o estresse oxidativo via ativação de uma proteína quinase causa a ativação de receptores do fator de crescimento epidérmico tendo como resultado final a síntese de mucina.

NIJKAMP et al. (1988) através da incubação de membranas pulmonares de cobaios com  $H_2O_2$ , observaram uma redução do número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, indicando um efeito tóxico direto, provavelmente via peroxidação lipídica, sobre estes receptores.

A lesão do epitélio de vias aéreas também pode ser atribuída, ao menos parcialmente, à ação dos RIOS (FREEMAN et al., 1982). O dano epitelial causado por eosinófilos purificados pode ser reduzido pela catalase indicando que parte deste efeito se deva à ação de metabólitos do oxigênio (YUKAWA et al., 1990).

TATE et al. (1982) em estudo com pulmão isolado de coelhos demonstraram que RIOS causam edema rico em proteínas através do aumento da permeabilidade de membrana alvéolo-capilar e ainda levam à vasoconstrição.

SEDGWICK et al. (1990) demonstraram que, sob estímulo com PMA, eosinófilos de sangue periférico de pacientes com asma leve liberaram mais  $O_2^-$  do que células de indivíduos saudáveis. SCHAUER et al. (1991) demonstraram uma maior liberação  $O_2^-$  por eosinófilos de crianças asmáticas com graus variados de obstrução de vias aéreas. KANAZAWA et al. (1991) estudando neutrófilos de asmáticos demonstraram um aumento na liberação de  $O_2^-$  quando comparado à liberação deste radical por células de indivíduos saudáveis. A liberação de  $O_2^-$  foi inversamente proporcional ao  $FEV_1$  e foi maior por neutrófilos de pacientes em fase de exacerbação do que naqueles com a doença sob controle.

VACHIER et al. (1992) demonstraram que, monócitos de asmáticos, estimulados por PMA, liberam mais  $H_2O_2$  que monócitos de indivíduos saudáveis. Para a liberação de  $O_2^-$ , as células de asmáticos apresentam um pico de geração de  $O_2^-$  é mais precoce e mais alto.

JARJOUR & CALHOUN (1994) estudaram células das vias aéreas de pacientes com asma leve e moderada e observaram um aumento na liberação de  $O_2^-$  quando comparada à liberação por células de indivíduos saudáveis. A produção deste radical livre correlacionou-se inversamente com o  $VEF_1$  predito.

O aumento da liberação de RIOS também foi demonstrado em estudos com  $H_2O_2$  expirado. DOHLMAN et al.(1993) relataram que asmáticos, principalmente aqueles com infecção aguda de vias aéreas superiores ou inferiores, exalam maior quantidade de  $H_2O_2$  que indivíduos sadios.

ANTCZAK et al. (1997) observaram que em asmáticos com  $VEF_1$  de  $68 \pm 9$  % a medida de  $H_2O_2$  no ar exalado foi 26 vezes maior do que em indivíduos saudáveis. Houve uma forte correlação inversa entre o conteúdo deste metabólito e o  $VEF_1$ .

Estes estudos confirmam a hipótese de que RIOS estão implicados no processo inflamatório da asma, correlacionando-se com a gravidade da doença e podendo ser utilizados como marcadores da inflamação.

## 1.6- GLICOCORTICÓIDES

Glicocorticóides são os agentes anti-inflamatórios mais potentes disponíveis para o tratamento da asma crônica.

Estes fármacos exercem sua ação através da ligação com um único receptor de glicocorticóide (GR) localizado preferencialmente no citoplasma das células. O GR inativo se encontra associado a um complexo protéico que inclui 2 moléculas de proteína de choque de 90 kd (hsp 90), uma imunofilina de 59 kd e várias outras proteínas inibitórias. A proteína hsp 90 atua como reguladora evitando que o GR não ocupado se transloque para o compartimento nuclear. Uma vez que aconteça a ligação glicocorticóide-GR, a hsp se dissocia ocorrendo a translocação do complexo ativado GR-glicocorticóide e sua ligação ao DNA (BARNES, 1996).

Corticosteróides produzem seu efeito nas células responsivas através da regulação da transcrição de certos genes de forma direta, indireta ou mista (GRONEMEYER, 1992; TRUSS, 1993).

A ação direta ocorre através da ligação do GR ativado aos chamados elementos de resposta ao glicocorticóide (GRE), presentes no DNA da célula alvo, alterando a taxa de transcrição levando à indução ou à repressão gênica. GR também pode inibir a síntese protéica através da redução da estabilidade do RNA mensageiro (mRNA).

No caso das células que não possuem GRE, glicocorticóides atuam através da inibição dos fatores transcripcionais como os fatores AP-1 (“activator protein-1”) e NF- $\kappa$ B (“nuclear factor - $\kappa$ B”) que estão envolvidos na regulação de vários genes que possuem papel central na inflamação (BARNES, 1996; STELLATO, 1997).

Através destes mecanismos glicocorticóides inibem a transcrição de genes para MHC classe I e II, collagenase, óxido nítrico sintetase indutível, fosfolipase A<sub>2</sub> indutível, endotelina-1, moléculas de adesão ELAM-1 e ICAM-1, citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-13, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, RANTES, MIP -1 $\alpha$  e SCF (BARNES, 1996; STELLATO, 1997; POWELL et al., 2001).

A maioria destas proteínas principalmente citocinas, produz também seu efeito nas células alvo através da ativação dos fatores transcripcionais AP-1 e NF- $\kappa$ B, ou seja, tanto a produção quanto a ação das citocinas ocorre via ativação destes fatores e pode ser inibida pelos glicocorticóides (SMITH et al., 1988).

O estímulo da síntese de proteínas anti-inflamatórias também contribui para o controle do processo inflamatório. Glicocorticóides induzem a síntese de lipocortina-1, que inibe a produção de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), diminuindo a síntese de metabólitos da via da cicloxigenase (PG, TBx e prostaciclina) e, menos substancialmente, da lipoxigenase (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE).

Esteróides possuem ainda efeito direto sobre algumas células inflamatórias. Inibem a liberação de mediadores por eosinófilos, ativam uma endonuclease responsável pela morte celular programada e reduzem o número de células circulantes. Atuam sobre a

célula T inibindo a liberação de mediadores, diminuem o número de mastócitos circulantes, inibem a expressão de GM-CSF e RANTES por células epiteliais (WILSON et al., 2001).

Destacam-se ainda: inibição de collagenase, elastase e ativador de plasminogênio derivado de macrófagos; estímulo do NEP (endopeptídeo neutro) que diminui a perda vascular e reflexos nervosos locais; de receptores beta-2, aumentando seu número e sensibilidade aos beta-2 agonistas (mecanismo responsável pela prevenção da “down” regulação em resposta ao uso prolongado de beta agonistas); de enzimas que degradam a substância P e outros neuropeptídeos, inibindo a inflamação neurogênica .

## **1.7- GLICOCORTICÓIDES E RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO**

A ação dos glicocorticóides sobre a liberação de radicais livres de oxigênio tem sido descrita em diversos estudos.

UMEKI et al. (1990) demonstraram que, hidrocortisona adicionada à cultura de neutrófilos inibe a liberação de RÍOs.

FUKUSHIMA et al. (1990) estudaram pacientes com diversas doenças inflamatórias sob corticoterapia diária e prolongada por via oral demonstrando a inibição na liberação de  $O_2^-$  por granulócitos de sangue periférico. A liberação estimulada por FMLP mostrou uma correlação inversa com a dose cumulativa de prednisolona.

MAJORY et al. (1998) avaliaram a liberação de  $O_2^-$  por monócitos de sangue periférico em pacientes asmáticos tratados com corticosteróides por três diferentes vias comparando-a com a de asmáticos não tratados. A produção de  $O_2^-$  , estimulada por PMA, dos pacientes tratados com corticosteróides administrados tanto por via oral como por aerogação foi menor do que aquela por asmáticos não tratados.

EZEAMUZIE et al. (1998) demonstraram que a dexametasona não diminuiu de forma significativa a liberação de  $O_2^-$ , induzida, por PAF por eosinófilos de sangue periférico de indivíduos com asma leve. Houve inibição da liberação deste metabólito quando utilizou-se a IL-5 como estímulo.

DWEIK et al. (1997), avaliando voluntários saudáveis, evidenciaram a capacidade da flunisolida administrada por aerogação durante 3 semanas em inibir a liberação de  $O_2^-$ , estimulada por porbol-éster, por células do lavado broncoalveolar. DAULETBAEV et al (1999), estudando pacientes portadores de fibrose cística, demonstraram não haver ação da fluticasona administrada por aerogação durante 3 semanas na geração de  $O_2^-$  por células do escarro, ao contrário, a produção estimulada por porbol-éster aumentou após o uso do corticosteróide.

DANDONA et al. (1998) comprovaram que, após uma única administração de hidrocortisona por via endovenosa a liberação de RIOS, induzida por fMLP, por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos sadios foi inibida.

A ação dos glicocorticóides sobre a produção de RIOS pode ocorrer através de vários mecanismos.

Durante o processo inflamatório, a liberação de diversos mediadores tais como metabólitos do ácido aracdônico, especialmente o PAF e  $LTB_4$ ; IL-5 ; IL-8 dentre outras citocinas atua como estímulo para a geração de radicais livres (SERHAM et al., 1984; SUMIMOTO et al., 1984). A produção e muitas vezes a ação sobre células alvo destes mediadores são inibidas pelos corticosteróides. DANDONA et al (2001) demonstraram que a inibição da geração de RIOS por hidrocortisona está associada a diminuição de NF- $\kappa$ B intracelular, sabidamente responsável por modular a resposta inflamatória incluindo geração de RIOS.

A ação dos esteróides sobre o sistema enzimático responsável pela produção de  $O_2^-$ , o sistema NADPH-oxidase também tem sido demonstrada.

CONDINO et al. (1998) provaram que a dexametasona utilizada *in vitro* atua inibindo a expressão de genes que codificam gp91-*phox* e p47-*phox*, componentes do sistema NADPH-oxidase .

MARUMO et al. (1998), em estudo com células do músculo aórtico, evidenciaram que a dexametasona diminuiu a expressão de RNA mensageiro para *p22-phox*.

DANDONA et al. (2001) demonstraram que os níveis da subunidade *p47-phox* em células mononucleares apresentou diminuição progressiva após a administração de hidrocortisona. Este efeito ocorreu em paralelo com a diminuição intracelular de NF- $\kappa$ B e o aumento de IL-10 plasmático. Parecendo que estas alterações podem causar efeito inibitório sobre a subunidade *p47-phox* e geração de RIOs por células mononucleares.

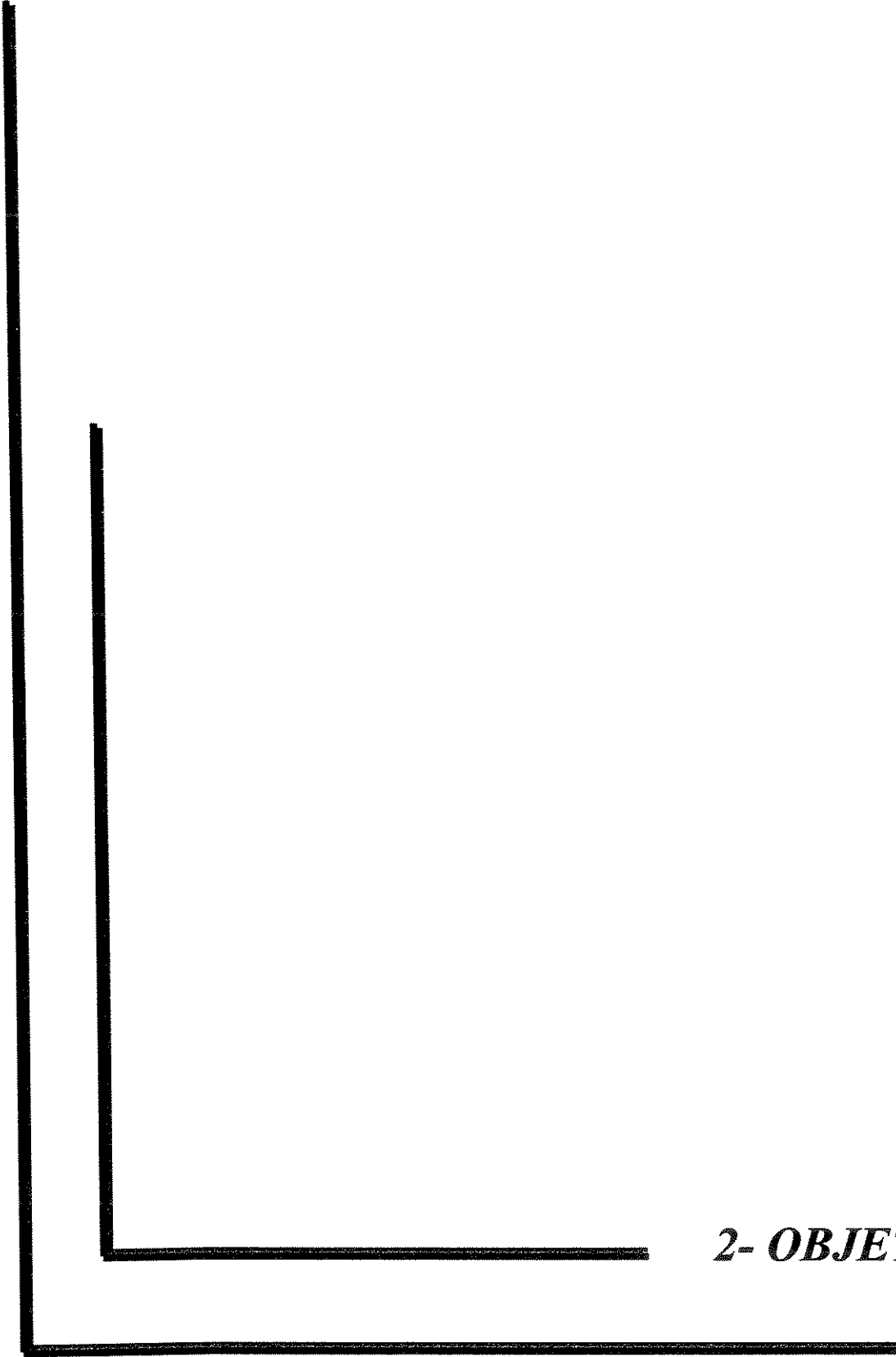
Glicocorticóides atuam ainda sobre os varredores de radicais livres de oxigênio.

YOSSEF et al. (1983) demonstraram que a atividade de SOD em granulócitos de pacientes com artrite reumatóide tratados com corticosteróides foi significativamente maior do que naqueles tratados com drogas anti-inflamatórias não hormonais.

MACCONI et al. (1993) comprovaram que a injeção intra-venosa de altas doses de metilprednisolona aumentou a expressão em granulócitos de genes codificadores para SOD-manganês e reduziu a formação de ânion superóxido por granulócitos e (Mn-SOD) em pacientes ANCA positivos. De RAEVE et al. (1997) demonstraram que a atividade de Mn-SOD em epitélio de vias aéreas foi maior em asmáticos sob corticoterapia por aerogação do que naqueles indivíduos fora de terapia e indivíduos saudáveis.

No entanto, PEREIRA et al. (1995) demonstraram que a incubação de macrófagos com dexametasona por 24 horas reduziu a atividade de Mn-SOD e GPX.

Nosso objetivo foi investigar o efeito da terapia com glicocorticóides sobre a produção de ânion superóxido por células mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico de crianças e adolescentes atópicos com asma em fase de exacerbação. Os pacientes foram agrupados de acordo com o grau de obstrução de vias aéreas determinado pelo VEF<sub>1</sub> e de acordo com a via de administração, oral ou por aerogação.



## ***2- OBJETIVOS***

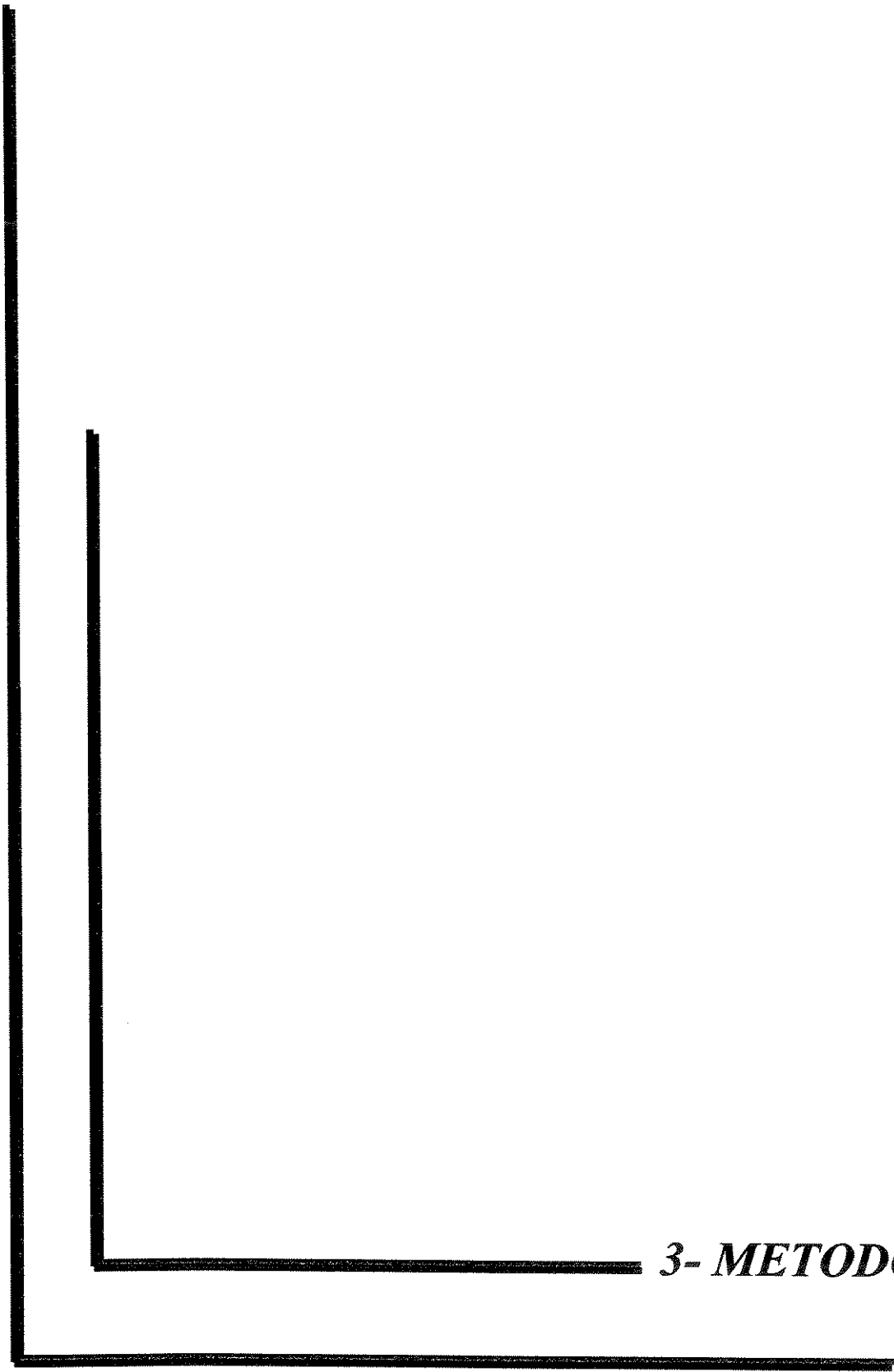
## 2.1- GERAL

Avaliar a liberação de  $O_2^-$  por granulócitos e células mononucleares de sangue periférico de crianças e adolescentes asmáticos sob corticoterapia.

## 2.2- ESPECÍFICOS

Avaliar a liberação de  $O_2^-$  em relação :

- ao grau de obstrução de vias aéreas determinado pelo  $VEF_1$
- à via de administração do corticosteróide



### ***3- METODOLOGIA***

### 3.1- SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

#### 3.1.1- Pacientes

Este estudo, clínico prospectivo, iniciou-se com 50 pacientes no entanto, devido a problemas técnicos ou pessoais a amostra reduziu-se a 32 pacientes. Foram incluídos neste estudo 32 crianças e adolescentes, com idade entre 6 e 18 anos (média  $11.7 \pm 2.44$ ), 13 do sexo feminino e 19 do sexo masculino; 16 caucasóides e 16 negróides com diagnóstico de asma atópica em fase de exacerbação. Os pacientes foram acompanhados no ambulatório de Imunologia Alergia e Pneumologia do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no período de março de 1998 a julho de 2001 e preencheram os seguintes critérios de inclusão:

1. diagnóstico de asma em fase de exacerbação estabelecido para cada paciente com base nos critérios relatados no GINA-NIH (“GLOBAL INIATIVE FOR ASTHMA”):

- história ou presença de sintomas episódicos de obstrução do fluxo aéreo caracterizados por chiado, sibilância, respiração curta, aperto no tórax ou tosse.
- obstrução de fluxo aéreo total ou parcialmente reversível, caracterizada funcionalmente por volume expiratório forçado em 1 segundo ( $VEF_1$ )  $< 80\%$  do predito,  $VEF_1 / CVF$  (capacidade vital forçada)  $< 65\%$  ou abaixo do limite inferior de normalidade segundo sexo, peso e idade.
- aumento no  $VEF_1$  de pelo menos  $12\%$  ou 200 ml, após o uso de  $\beta_2$ -adrenérgico por via inalatória ou, em caso negativo, após corticoterapia
- estar em fase de exacerbação dos sintomas, caracterizado por relato pessoal ou do responsável de piora clínica, aumento da necessidade de uso de  $\beta_2$ -agonistas e diminuição do  $VEF_1$  basal.

2. caracterização do estado atópico definido através de critérios clínicos e laboratoriais:

- relação causa-efeito positiva entre exposição a determinados antígenos e desencadeamento dos sintomas
- comprovação laboratorial de atopia:
  - teste cutâneo de hipersensibilidade imediata ( “prick test” )
  - RAST ( “radioallergosorbent test” ) positivo para aeroalérgenos mais comuns
  - nível sérico elevado de IgE (dois desvios padrão acima da média)
  - eosinofilia, excluindo-se doenças parasitárias
- antecedentes familiares positivos para atopia (parentes de primeiro grau)
- antecedentes pessoais para atopia ,concomitância não obrigatória de doenças alérgicas tais como rinite,urticária, dermatite e conjuntivite.

### 3.1.2- Grupo de comparação

Foram selecionados 29 voluntários adultos saudáveis, não atópicos, não fumantes e que não fizeram uso de quaisquer medicamentos nos 30 dias anteriores a coleta do exame, com idade média de 30,4 anos.

A escolha de adultos para compor o grupo de comparação foi devida à dificuldade em se conseguir uma amostra pareada por idade de voluntários saudáveis e baseada em dados da literatura que demonstram não haver diferença significativa na produção de intermediários reativos de oxigênio por adultos e crianças saudáveis (FRAZIER et al., 1982), este sistema se desenvolve precocemente na infância (ABRAMSON et al., 1996; JOBIS et al., 1997).

### 3.1.3- Critérios de exclusão

- pacientes que fizeram uso anti-inflamatório não esteróide (AINE), aminofilina, anti-leucotrienos, anti-histamínicos, corticosteróide sistêmico ou hemoderivados nos últimos 30 dias (LAPENNA et al., 1995; EZEAMUZIE & HAGE, 1998; CALHOUN et al., 1998)
- pacientes que fizeram uso de broncodilatador de ação curta ou longa respectivamente nas 12 horas e 18 horas precedentes à inclusão no estudo
- pacientes com doença inflamatória aguda ou crônica, infecções virais, bacterianas ou fúngicas nos últimos 30 dias, alterações anatômicas ou outras doenças pulmonares (KNIGHT, 1995).
- tabagistas (RAHMAN et al., 1996)

### 3.4- IMPLEMENTAÇÃO DO ESTUDO

Os pacientes foram avaliados clínica e funcionalmente, através de prova de função pulmonar, em 3 fases: fase I, no momento da inclusão no estudo, tendo o paciente preenchido os requisitos dos critérios de inclusão e após informação do responsável e seu consentimento por escrito; fase II após o uso de prednisona por via oral durante sete dias e; fase III após o uso de corticosteróide por aerogação durante 30 a 180 dias. Amostras de sangue para determinação da dosagem de ânion superóxido foram colhidas, de todos os pacientes na fase I, de 19 pacientes na fase II e de 13 pacientes na fase III.

Foram ainda realizados teste cutâneo de hipersensibilidade imediata para ácaros, fungos epitélio de cão e gato, poeira domiciliar e barata. Outros testes laboratoriais foram indicados de acordo com a necessidade de cada paciente.

Para o grupo de comparação foi realizada uma única coleta de sangue para a determinação da dosagem de ânion superóxido após anamnese e consentimento.

### 3.5- ESQUEMA TERAPÊUTICO

O tratamento medicamentoso foi baseado nas recomendações contidas no GINA-NIH (1997), cujo objetivo terapêutico é o restabelecimento do estado estável da doença.

O esquema terapêutico utilizado foi, prednisona via oral 2mg/Kg/dia , máximo de 60 mg, administrada em dose única diária pela manhã, durante uma semana e na manutenção fluticasona, flunisolida, beclometasona, budesonida e triancinolona, por aerogação, em dose ajustada para cada caso.

### 3.6- ENSAIO LABORATORIAL

O ensaio laboratorial da liberação de  $O_2^-$  foi realizado nos laboratórios de Imunologia Pediátrica e de Biologia Molecular no Centro de Investigação em Pediatria (CIPED) da UNICAMP.

Foram coletadas amostras de sangue venoso dos pacientes e dos voluntários sadios (20 ml). Granulócitos e células mononucleares foram fracionadas por centrifugação do sangue em Ficoll-Hypaque (Hystopaque® -1119 e 1077, Sigma Chemical Company) (BOYUM, 1968). Eritrócitos contaminantes foram removidos através de lise hipotônica. Após a contagem e cálculo da viabilidade das células , a suspensão foi ajustada para  $2 \times 10^7$  células/ml em solução de Hanks, sem cálcio, magnésio ou vermelho de fenol. Os leucócitos foram utilizados para a avaliação da atividade do sistema NADPH-oxidase.

#### 3.6.1- Determinação da liberação de ânion superóxido

A quantificação do  $O_2^-$  liberado por granulócitos e células mononucleares do sangue periférico foi realizada segundo a técnica de COHEN & CHOVANIC (1978), constituindo-se uma adaptação do método original descrito por MCCORD & FRIDOVICH (1969).

Esta técnica utiliza o método espectrofotométrico baseado na redução do ferricitocromo C e inibida pela SOD ( superóxido dismutase )( Mc CORD & FRIDOVICH, 1969; DIAS-DA-MOTA et al., 1996), sendo obtida espontaneamente (leucócitos incubados apenas com Hanks) e sob estímulo (leucócitos incubados com PMA-phorbol 12-myristate 13-acetate 30nM) metade dos tubos continham SOD (60U/ml).

Densidade óptica foi determinada com absorbância de 550 nm, em espectrofotômetro Beckman.

Foram realizadas medidas nos tempos 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos a partir do início da reação, durante os quais a solução foi mantida a 37 ° C. Foi considerado tempo zero ( t 0 ) o momento no qual foram adicionadas células à solução (HANKS, citocromo C, SOD +/-, PMA +/-) .

A liberação de  $O_2^-$  foi calculada utilizando-se um coeficiente de extinção de  $21.100 M^{-1} cm^{-1}$  e os resultados expressos em nMols/  $10^6$  cels / 60 min (COHEN & CHOVANIC,1978).

Os experimentos foram realizados em duplicata.

### 3.6.2- Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata

Os testes foram executados pelo método de puntura (skin prick test) pela técnica de PEPYS (1978), modificada por OSTERBALLE & WEEKE. Os antígenos utilizados, padronizados em UBE (unidade biológica equivalente) (International Pharmaceutical Immunology do Brasil SA), foram: pó domiciliar, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*, epitélio de cão, epitélio de gato, fungos I - *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Chaetomium globosum*, fungos II - *Mucor mucedo*, *Pullularia pullulans*. Histamina e solução salina foram utilizados como controles positivo e negativo respectivamente.

Uma gota de cada extrato alergênico foi colocada sobre a pele do antebraço, observando-se uma distância de 2 cm entre as gotas. A camada superficial da pele foi perfurada com uma lanceta plástica estéril mantida perpendicularmente à pele. Após 1 minuto, foram retiradas as gotas da pele com algodão, individualmente para cada extrato. A leitura foi realizada após 20 minutos, medindo-se o diâmetro da pápula, em milímetros. Considerou-se positivo a pápula com diâmetro  $\geq$  a 3 mm.

### **3.6.3- Prova de Função Pulmonar**

Realizada no Laboratório de Função Pulmonar do Departamento de Pneumologia do Hospital das Clínicas da FCM da UNICAMP por auxiliar técnica capacitada com espirômetro Anamed 4000 PC-sistema para análise de função pulmonar.

Sentados, os pacientes realizaram manobras de expiração forçada, com narinas tampadas com clipe nasal. Entre os testes realizados foram considerados para análise a melhor das três curvas obtidas e o traçado avaliado pelos critérios da American Thoracic Society ( Standardizaton of Spirometry, 1987)

### **3.6.4- Determinação do nível sérico de IgE**

A determinação do nível sérico de IgE foi realizada no laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP de forma quantitativa através de ensaio imunoenzimático automatizado (Elisa por automação), que utiliza micropartículas recobertas com anticorpo monoclonal anti-IgE através dos sistema “Cobas Core Automated immunoassay System”. São necessários 150  $\mu$ l de soro, 6 calibradores e 3 controles positivos (com valores alto, médio e baixo) para a realização de experimento. Após o contato do soro do paciente com o anticorpo ant-igE ocorre uma reação do tipo antígeno-anticorpo entre as imunoglobulinas E no soro e o anticorpo ant-igE aderido às micropartículas. O substrato (4-methylumbelliferyl phosphate) é então adicionado resultando na formação de um produto fluorescente que é detectado pela leitora óptica do aparelho. A sensibilidade do método é 0,048 UI/ml.

### 3.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Devido à liberação de  $O_2^-$  ter sido acompanhada em cada indivíduo nos seis tempos diferentes, utilizamos a análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas para comparar asmáticos e indivíduos saudáveis (MILKEN & JOHNSON, 1984; MONTGOMERY, 1991).

Para verificar as diferenças entre os grupos I, II e controle foi utilizado o teste de comparação múltipla de médias de Tukey (MILKEN & JOHNSON, 1984).

O teste de Wilcoxon para amostras relacionadas (CONOVER, 1971) foi utilizado para comparar a liberação de  $O_2^-$ , assim como os valores de  $VEF_1$  do mesmo paciente antes e após corticoterapia.

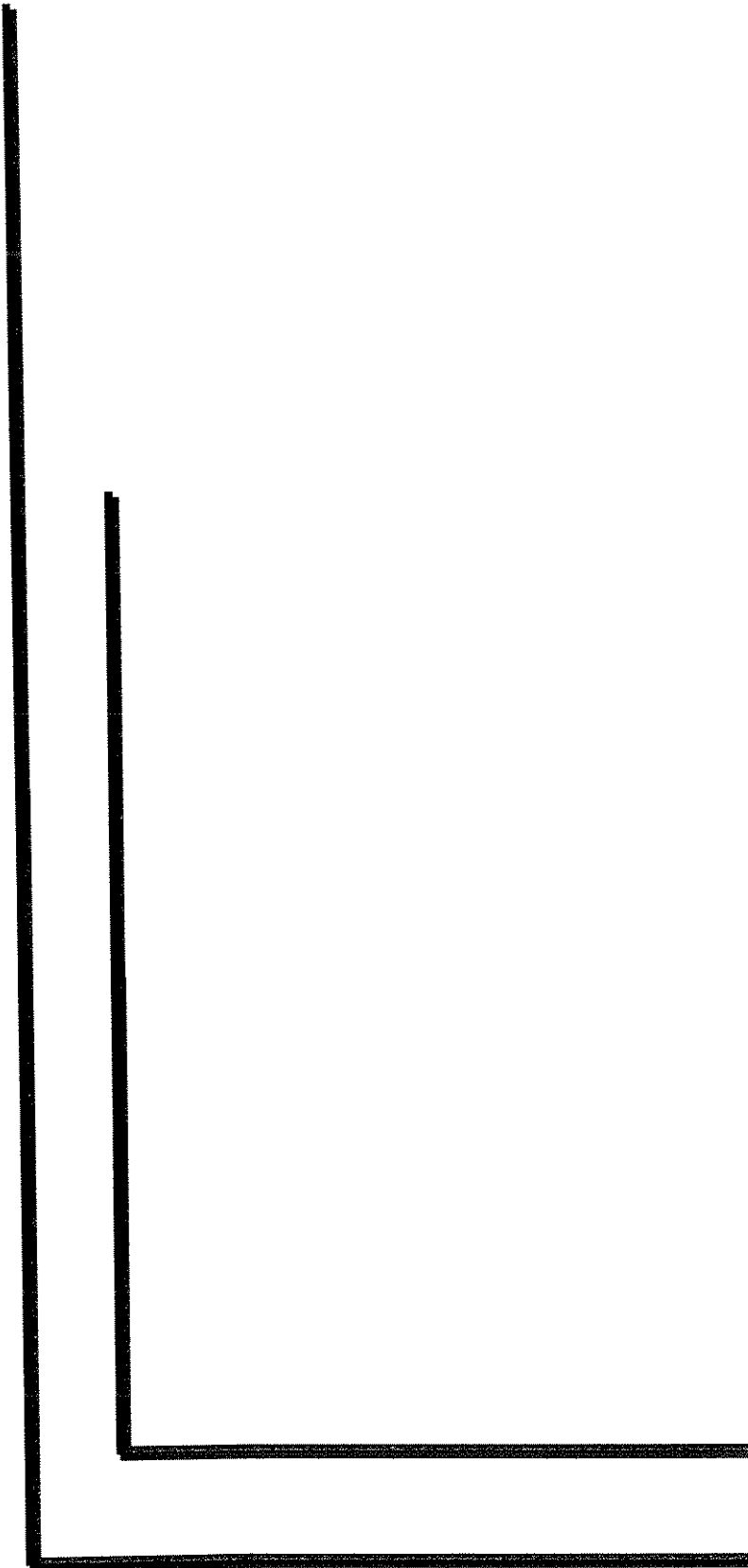
Os testes estatísticos foram realizados separadamente para cada tipo de célula e reação (granulócitos liberação espontânea e estimulada e mononucleares liberação espontânea e estimulada).

Foi considerado o intervalo de confiança de 95%, nível de significância de 5%, ou seja  $p < 0,05$ , em todos os testes.

### 3.8- ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi submetido à avaliação da Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP com parecer favorável.

Foi obtido consentimento pós-informação verbal e por escrito de todos os responsáveis pelos pacientes.



## ***4- RESULTADOS***

#### 4.1- CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE PACIENTES

Dos 32 pacientes, 20 (63%) apresentaram antecedente familiar positivo para atopia, 27 (84%) teste cutâneo positivo para ao menos 2 dos alérgenos testados. Os níveis de IgE sérica estiveram aumentados em todos os pacientes onde a dosagem foi realizada (n=24) com média de 1674 UI/ml (normal < 120 UI/ml).

No momento da inclusão no estudo 14 pacientes vinham fazendo uso de corticosteróide por aerogação: 10 do grupo I (8 em dose alta, 2 em dose média) e 4 do grupo II (5 em dose média, 5 em dose alta). Apesar da corticoterapia, todos os pacientes estavam com a doença em fase de exacerbação (tabela 1).

**Tabela 1-** Características demográficas das crianças e adolescentes asmáticos

|                        | * VEF <sub>1</sub> | gênero | *Idade    | antecedentes | teste     | *IgE              | corticoterapia |
|------------------------|--------------------|--------|-----------|--------------|-----------|-------------------|----------------|
|                        |                    | M / F  | anos      | familiares + | alérgico+ | UI/ml             | prévia         |
| <b>Grupo I</b><br>(19) | 70 ± 5,33          | 10 / 9 | 11,7±2,44 | 11           | 19 (19)   | 1693±<br>1276(19) | 10             |
| <b>GrupoII</b><br>(13) | 44,6±9,35          | 8 / 5  | 11,5±2,85 | 9            | 11 (12)   | 1927±<br>1381(8)  | 4              |

(n) número de pacientes avaliados, VEF<sub>1</sub> (volume expiratório final no 1º segundo),

\* média+ sd (desvio padrão), M (masculino), F (feminino)

#### 4.2- AVALIAÇÃO DO VEF<sub>1</sub>

A avaliação inicial do VEF<sub>1</sub> foi utilizada para a classificação dos pacientes em grupos: grupo I, 19 pacientes apresentando VEF<sub>1</sub> entre 60 e 80% (média 70± 5,33) e grupo II, 13 pacientes com VEF<sub>1</sub> ≤ 60% (média 44,62 ± 9,35).

Após os pacientes serem submetidos à corticoterapia por via oral e/ou por aerogação os valores de VEF<sub>1</sub> dos asmáticos apresentaram aumento significativo com médias de 84,53 ± 11,65 para o grupo I e 72 ± 25,1 para o grupo II (p<0,005, teste de Wilcoxon para amostras relacionadas)

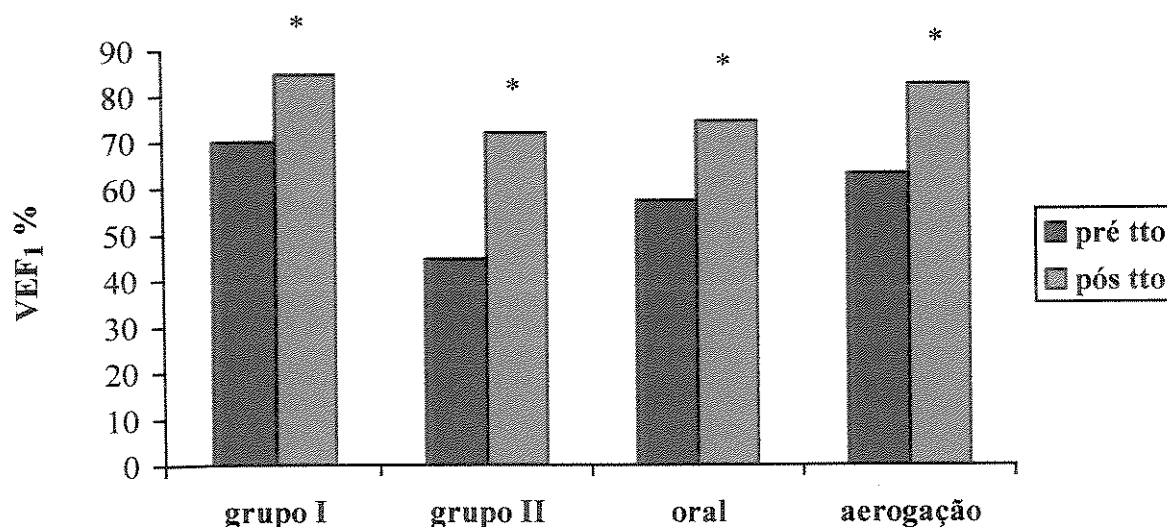
Avaliamos também a variação do VEF<sub>1</sub> dos pacientes submetidos à corticoterapia segundo a via de administração do corticosteróide: 19 pacientes analisados após terapia por via oral apresentavam VEF<sub>1</sub> inicial médio de 57,31 ± 17,24 chegando a 74,46 ± 24,71 após tratamento; 13 pacientes com VEF<sub>1</sub> de 63,09 ± 11,63 chegaram a 82,41 ± 11,07 após corticoterapia por aerogação (tabela 2, figura 1)

Os aumentos foram significativos para ambos os grupos (p<0,05, teste de Wilcoxon para amostras relacionadas).

**Tabela 2-** Avaliação do VEF<sub>1</sub> das crianças e adolescentes com asma antes e após corticoterapia por via oral e/ou aerogação

|                                | <b>Grupo I<br/>(19)</b> | <b>Grupo II<br/>(13)</b> | <b>Grupo oral<br/>(19)</b> | <b>Grupo aerogação<br/>(13)</b> |
|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| <b>VEF<sub>1</sub> pré tto</b> | 70 ± 5,33               | 44,62 ± 9,35             | 57,31 ± 17,24              | 63,09 ± 11,63                   |
| <b>VEF<sub>1</sub> pós tto</b> | 84,53 ± 11,65           | 72 ± 25,1                | 74,46 ± 24,71              | 82,41 ± 11,07                   |

valores expressos em média ± desvio padrão, (n) número de pacientes avaliados, VEF<sub>1</sub> (volume expiratório final no 1º segundo), tto (tratamento)



**Figura 1-** Comparação do VEF<sub>1</sub> médio (% do predito) de crianças e adolescentes com asma antes e após corticoterapia por via oral e/ou aerogação de acordo com o grupo e a via de administração do esteróide. VEF<sub>1</sub>(volume expiratório final no 1º segundo), tto (tratamento) \*p<0,05 ( teste de Wilcoxon para amostras relacionadas)

#### 4.3- DETERMINAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO

A atividade do sistema NADPH-oxidase foi detectada durante 60 minutos com dosagens de O<sub>2</sub><sup>-</sup> aos 0, 5, 15 25, 45 e 60 minutos do início da reação. Foi considerado tempo 0 ( t0) o momento do contato da célula com o citocromo c.

Os valores cumulativos de O<sub>2</sub><sup>-</sup> liberado por leucócitos de asmáticos foram crescentes no decorrer da reação, o pico ocorreu no t45 para a liberação por granulócitos de forma espontânea, e por monócitos espontaneamente ou sob estímulo com PMA, e no t25 para granulócitos estimulados com PMA.

Para o grupo de comparação, os valores de O<sub>2</sub><sup>-</sup> atingiram o pico no t45 exceto para a liberação por granulócitos sob estímulo com PMA onde o valor no t60 foi maior que no t45.

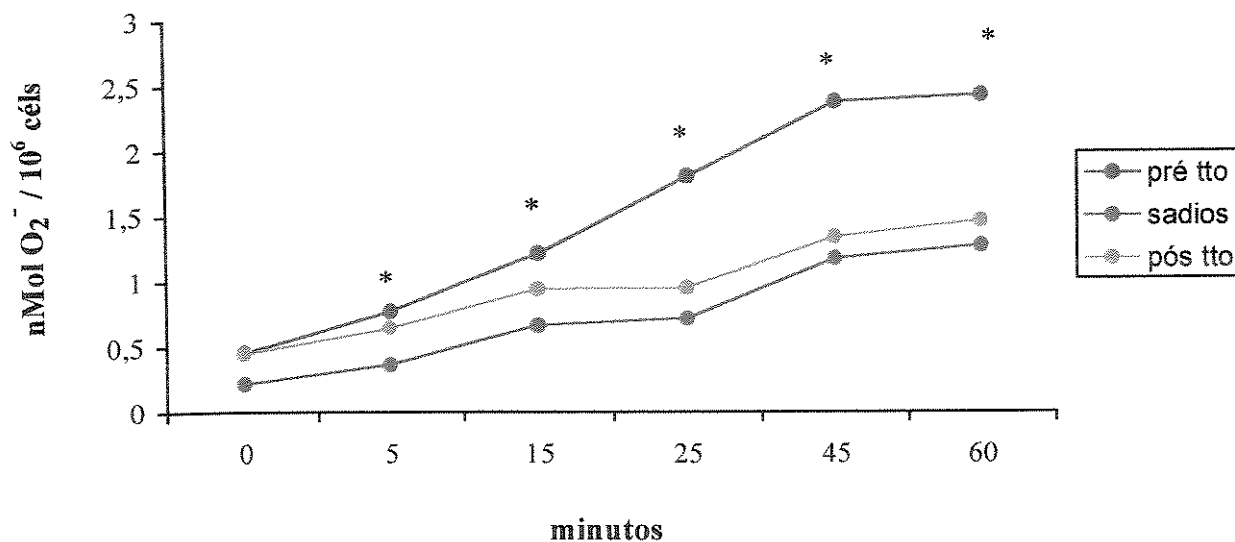
#### 4.3.1- Liberação de superóxido por asmáticos e indivíduos saudáveis

A análise de variância com medidas repetidas (ANOVA) foi utilizada para a comparação da liberação de  $O_2^-$  entre asmáticos (como um grupo único) e indivíduos saudáveis.

A liberação espontânea de  $O_2^-$  por granulócitos de sangue periférico de asmáticos antes da corticoterapia foi significativamente maior do que a liberação de  $O_2^-$  por granulócitos do grupo de comparação nos tempos 5, 15, 25, 45 e 60 min ( $p=0,0288$ ) (figura 2). Sob estímulo com PMA, granulócitos de indivíduos saudáveis liberaram quantidade significativamente maior de  $O_2^-$  que granulócitos de asmáticos no t 60 ( $p=0,0031$ ).

A liberação de  $O_2^-$  por células mononucleares de forma espontânea foi similar para os dois grupos. Sob estímulo com PMA células de asmáticos liberaram quantidade maior de  $O_2^-$  que as células mononucleares dos indivíduos saudáveis no t 0 ( $p=0,0082$ ).

Após os pacientes serem submetidos à corticoterapia, por via oral ou por aerogação, a liberação espontânea de  $O_2^-$  por granulócitos e por células mononucleares de asmáticos não mostrou diferença significativa em relação à liberação de  $O_2^-$  por células do grupo de comparação (figura 2). A liberação de  $O_2^-$  por células mononucleares sob estímulo com PMA manteve-se maior nos asmáticos sendo observada nos tempos 0 e 5 ( $p=0,0027$ ). A liberação de  $O_2^-$  por granulócitos estimulados com PMA foi maior no grupo de comparação nos tempos 45 e 60 ( $p=0,0011$ ).



**Figura 2-** Liberação espontânea de  $O_2^-$  por granulócitos de crianças e adolescentes com asma antes da terapia X indivíduos saudáveis e asmáticos após corticoterapia por via oral e/ou aerogação X indivíduos saudáveis. Tto (tratamento)

\*  $p < 0,05$  asmáticos antes da terapia X indivíduos saudáveis (ANOVA)

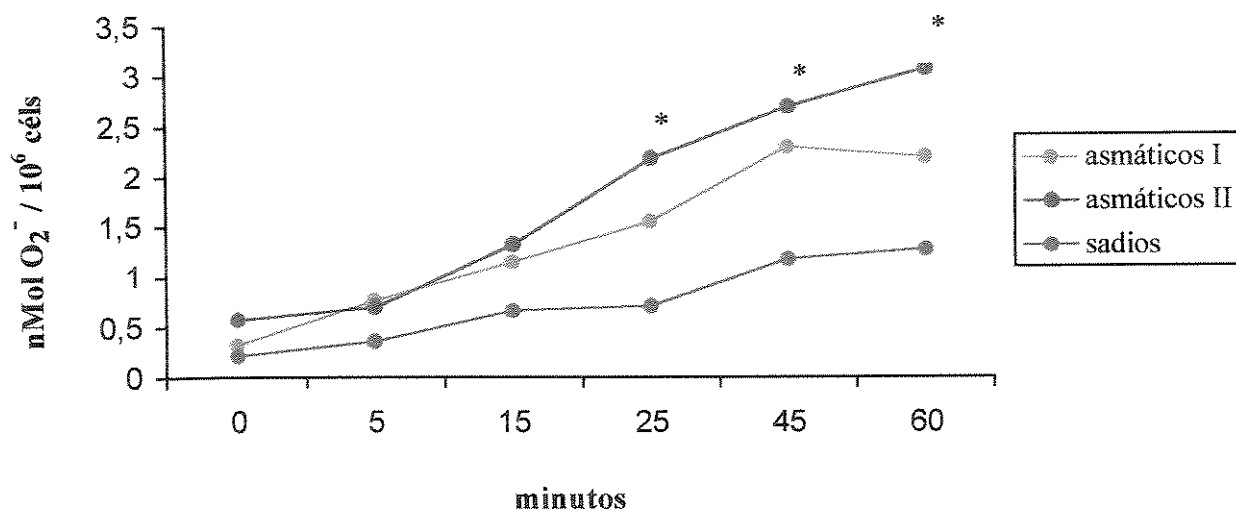
#### 4.3.2- Liberação de superóxido por asmáticos classificados de acordo com o $VEF_1$ e indivíduos saudáveis

Ao agruparmos os asmáticos de acordo com o  $VEF_1$  os resultados dos testes de comparação múltipla de Tukey mostraram que: a liberação espontânea de  $O_2^-$  por granulócitos de asmáticos do grupo II ( $VEF_1 \leq 60\%$ ) foi maior do que a liberação de  $O_2^-$  por células de indivíduos saudáveis nos tempos 25, 45 e 60 (figura 3). Após os pacientes serem submetidos à corticoterapia, por via oral ou por aerogação, granulócitos de asmáticos do grupo II e de indivíduos saudáveis liberaram quantidades semelhantes de  $O_2^-$  (figura 4). Não houve diferença entre a liberação espontânea de  $O_2^-$  por granulócitos de asmáticos do grupo I ( $60\% < VEF_1 < 80\%$ ) e indivíduos saudáveis.

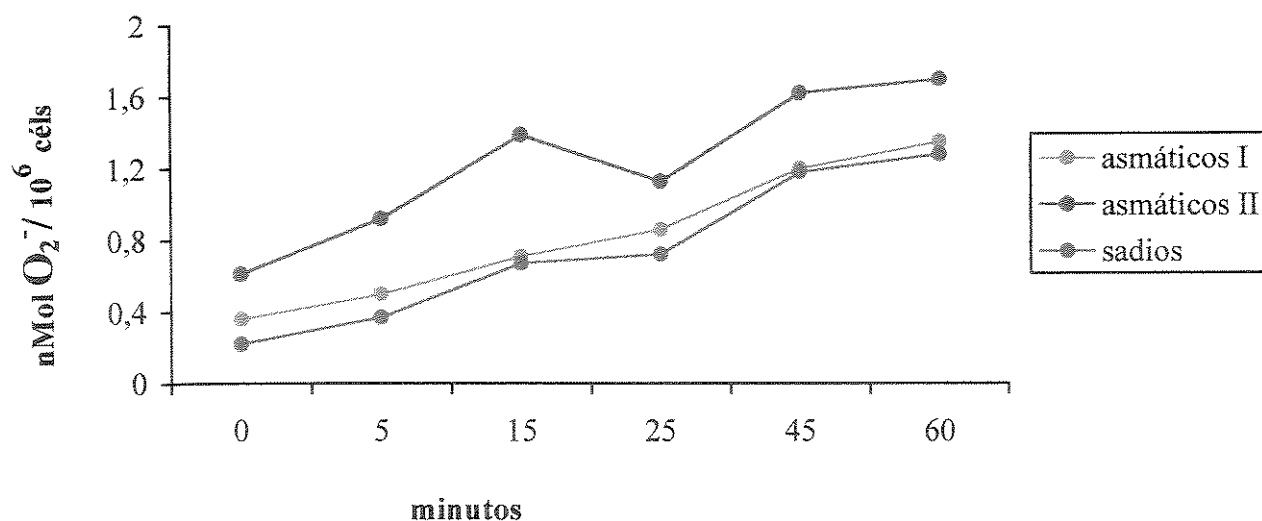
Sob estímulo com PMA, granulócitos do grupo de comparação liberaram mais  $O_2^-$  que granulócitos dos pacientes do grupo I no t60. Esta diferença foi observada antes e após os pacientes serem submetidos à corticoterapia.

As células mononucleares dos asmáticos do grupo II liberaram quantidade significativamente maior de  $O_2^-$ , espontaneamente, do que mononucleares do grupo controle no t 25. Após os pacientes serem submetidos à corticoterapia a liberação de  $O_2^-$  por células mononucleares foi semelhante para asmáticos e indivíduos saudáveis. Não houve diferença para a liberação espontânea de  $O_2^-$  por células mononucleares de asmáticos do grupo I e indivíduos saudáveis.

Sob estímulo com PMA, células mononucleares de asmáticos liberaram quantidades semelhantes de  $O_2^-$  que células mononucleares do grupo de comparação. Após os asmáticos serem submetidos a corticoterapia, células de pacientes do grupo I liberaram mais  $O_2^-$  do que as células dos indivíduos saudáveis no t 0. Asmáticos do grupo II liberaram quantidade semelhante de  $O_2^-$  que indivíduos saudáveis.



**Figura 3-** Liberação espontânea de  $O_2^-$  por granulócitos de crianças e adolescentes com asma antes da corticoterapia dos grupos I ( $60\% < VEF_1 < 80\%$ ) X indivíduos sadios e grupo II ( $VEF_1 \leq 60\%$ ) X indivíduos sadios. \* $p < 0,05$  (teste de Tukey) asmáticos do grupo II X indivíduos sadios.



**Figura 4-** Liberação espontânea de  $O_2^-$  por granulócitos de crianças e adolescentes com asma após corticoterapia por via oral e/ou por aerogação dos grupos I ( $60\% < VEF_1 < 80\%$ ) X indivíduos sadios e grupo II ( $VEF_1 \leq 60\%$ ) X indivíduos sadios.  $p < 0,05$  (teste de Tukey)

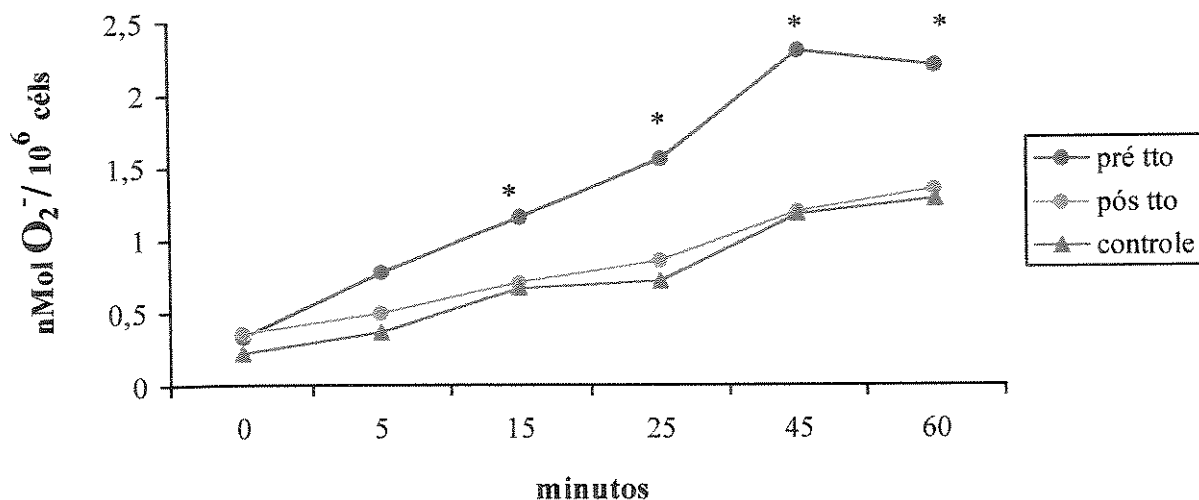
#### **4.3.3- Liberação de superóxido por asmáticos classificados segundo o VEF<sub>1</sub> antes e após corticoterapia**

O teste de Wilcoxon para amostras relacionadas foi utilizado para a análise da liberação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por asmáticos antes e após corticoterapia segundo o VEF<sub>1</sub>.

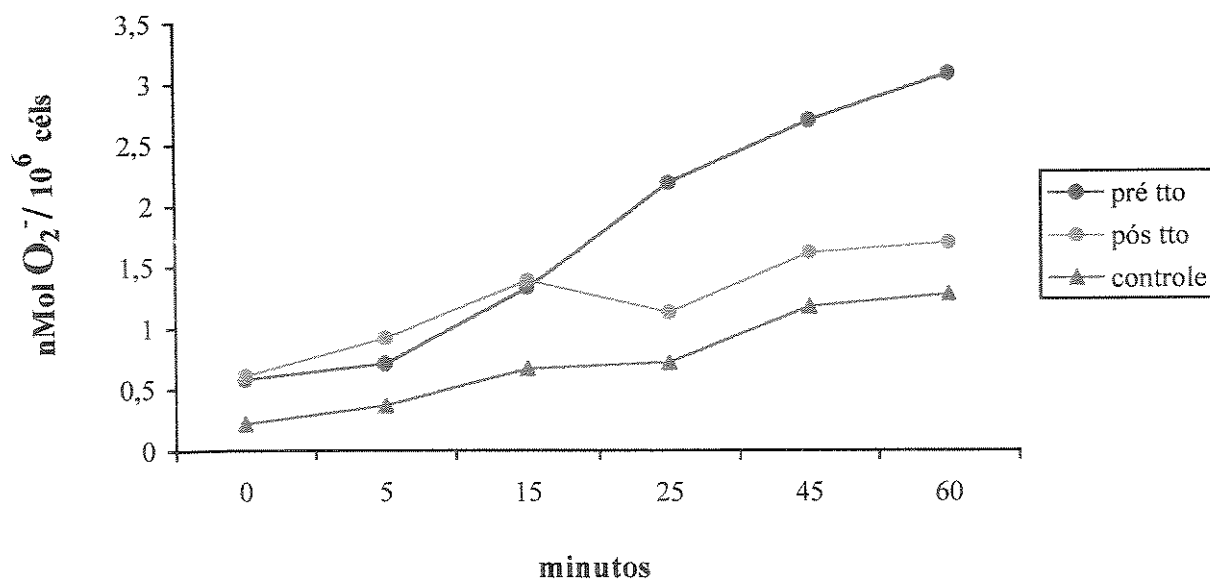
Comparando-se a liberação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> pelo mesmo indivíduo asmático antes e após corticoterapia por via oral e/ou por aerogação observamos queda significativa na liberação espontânea de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por granulócitos de pacientes do grupo I (60% < VEF<sub>1</sub> < 80%), nos tempos 15 (p=0,035), 25 (p=0,004), 45 (p=0,003) e 60 (p=0,001) (figura 5).

Para os pacientes do grupo II (VEF<sub>1</sub> ≤ 60%), após serem submetidos á corticoterapia por via oral e/ou por aerogação, houve queda na liberação espontânea de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por granulócitos mas sem relevância estatística (figura 6).

Não houve diferença na liberação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por células mononucleares de asmáticos do grupo I e do grupo II avaliados antes e após corticoterapia.



**Figura 5-** Liberação espontânea de  $O_2^-$  por granulócitos de crianças e adolescentes com asma do grupo I ( $60\% < VEF_1 < 80\%$ ) antes da corticoterapia (por via oral e/ou por aerogação) X após corticoterapia. Tto (tratamento) \* $p < 0,05$  (teste de Wilcoxon).



**Figura 6-** Liberação espontânea de  $O_2^-$  por granulócitos de crianças e adolescentes com asma do grupo II ( $VEF_1 \leq 60\%$ ) antes da corticoterapia (por via oral e/ou por aerogação) X após corticoterapia. Tto (tratamento)  $p < 0,05$  (teste de Wilcoxon).

#### 4.3.4- Liberação de superóxido por asmáticos antes e após corticoterapia de acordo com a via de administração do esteróide

O teste de Wilcoxon para amostras relacionadas foi utilizada para a avaliação da liberação de  $O_2^-$  por asmáticos que foram aqui analisados segundo a via de administração do corticosteróide, oral (n=19) ou por aerogação (n=13).

Para os pacientes analisados após o tratamento com esteróide por aerogação observamos redução significativa na liberação espontânea de  $O_2^-$  por granulócitos no T 60 (p=0,023). Não foram observadas diferenças significativas para a liberação de  $O_2^-$  estimulada com PMA e para a liberação de  $O_2^-$  por células mononucleares.

A avaliação da liberação de  $O_2^-$  por células de pacientes submetidos à corticoterapia por via oral mostrou que, após o uso de prednisona, houve queda significativa na liberação de  $O_2^-$  de forma espontânea por granulócitos nos tempos 25 (p=0,005), 45 (p=0,044) e 60 (p=0,017) (figura 7).

Não houve alteração significativa na liberação de forma estimulada ou para células mononucleares.

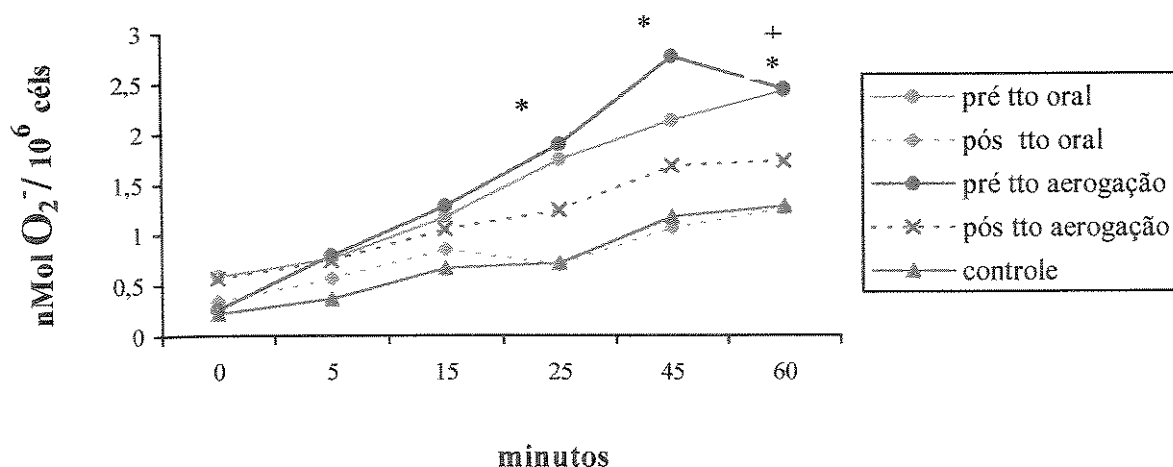


Figura 7- Comparação da liberação espontânea de  $O_2^-$  por granulócitos de crianças e adolescentes com asma antes X após corticoterapia por via oral; antes X após corticoterapia por aerogação. Tto (tratamento) p<0,05 (\*) oral e (+) aerogação.

## ***5- DISCUSSÃO***

Nosso estudo demonstrou que granulócitos de sangue periférico de pacientes asmáticos com a doença em fase de exacerbação apresentam uma liberação espontânea de  $O_2^-$  significativamente maior que células de indivíduos saudáveis. Esta diferença foi relevante naqueles indivíduos com maior grau de obstrução de vias aéreas ( grupo II)

A liberação aumentada de radicais livres de oxigênio por células participantes do processo inflamatório da asma tem sido demonstrada em vários estudos.

A liberação de  $O_2^-$  por eosinófilos estimulados com PMA é superior à quantidade liberada por neutrófilos do mesmo paciente (SEDGWICK et al. 1990). SHAUER et al (1991) através da pré-incubação de eosinófilos com PAF ou GM-CSF não observaram aumento na liberação de  $O_2^-$  pelas células de asmáticos, sugerindo uma ativação in vivo destas células na asma.

Monócitos de indivíduos asmáticos, quando aderidos ao vidro, geram maior quantidade de  $O_2^-$  do que células em suspensão (VACHIER et al. 1992). Na asma, marginação e aderência dos monócitos às células endoteliais e parede broncoalveolar parecem estar associadas ao aumento de espécies reativas de oxigênio. Embora asmáticos com a doença sob controle liberem quantidades aumentadas de  $O_2^-$ , avaliados durante a fase de exacerbação da asma estes pacientes apresentam uma liberação ainda maior deste metabólito (SEDWICK et al., 1990; JÖBIS et al., 1997; VARGAS et al. 1998).

No asmático, o grau de obstrução de vias aéreas e a reatividade brônquica à histamina se correlacionam fortemente com a liberação de  $O_2^-$  e outros RIOs tanto por células do sangue periférico quanto por células de mucosa brônquica, indicando a participação destes metabólitos nestes fenômenos (JARJOUR et al., 1992; ANTCZACK et al., 1997; e KATO et al., 1991; KANAZAWA et al., 1991).

Nossos resultados confirmam estudos prévios que demonstram uma maior liberação de RIOs por células de pacientes asmáticos, principalmente naqueles com  $VEF_1$  abaixo de 60%.

A comparação da liberação espontânea de  $O_2^-$  por granulócitos do mesmo indivíduo asmático, antes e após o uso de corticóide, demonstrou o efeito modulador dos esteróides, ou seja, houve redução na liberação de  $O_2^-$  após corticoterapia por via oral ou por aerogação, em asmáticos do grupo I ( $60 < VEF_1 < 80$ ) e do grupo II ( $VEF_1 \leq 60\%$ ). Esta diferença entretanto só teve significância estatística para os indivíduos do grupo I, sugerindo persistência da inflamação por exposição aos aeroalérgenos.

Nos asmáticos mais graves ( $VEF_1 \leq 60\%$ ), apesar do aumento significativo no  $VEF_1$  após o uso de corticosteróides por via oral e/ou por aerogação, apenas 40% dos pacientes alcançaram níveis normais de  $VEF_1$  ( $\geq 85\%$ ) sugerindo três possibilidades: persistência da inflamação por exposição contínua aos aeroalérgenos, bronquiolite obliterante ou remodelamento da mucosa brônquica da asma. O uso prolongado do corticosteróide por aerogação leva às melhoras clínica e funcional dos pacientes, no entanto, a porcentagem de asmáticos que atinge valores normais de  $VEF_1$  varia de 28 a 40% (BISGAARD, 1997).

O conceito de remodelação considera que a obstrução irreversível de vias aéreas seja secundária a fibrose subepitelial, hiperplasia de miofibroblastos, hipertrofia de músculo liso de via aérea, hiperplasia de células mucosas e glândulas e ruptura do epitélio resultando em espessamento de parede brônquica (BUSSE, 1998; REDINGTON, 2000; JEFFERY, 2001; HOLGATE, 2000; MARTIN, 2000).

A habilidade dos corticosteróides em reverter o remodelamento de vias aéreas poderia estar relacionado com a precocidade na introdução da terapia, dose do medicamento e gravidade da asma (BARNES et al., 2000; BOUSQUET et al., 1999; JEFFERY et al., 1992; WARD et al., 2002).

A administração do esteróide por via oral ou por aerogação resultou em redução da liberação de  $O_2^-$  por granulócitos, indicando a eficiência de ambas as vias. Confirmando adesão ao tratamento e o papel antiinflamatório da corticoterapia instituída. Comparando-se indivíduos sadios com os asmáticos após tratamento não se observou diferença em relação à liberação deste metabólito por granulócitos.

O uso diário e prolongado de glicocorticóides por via oral inibe a liberação de  $O_2^-$  por granulócitos de pacientes com patologias inflamatórias variadas, incluindo asma. (FUKUSHIMA et al., 1990). A pulsoterapia com metilprednisolona diminui a liberação de  $O_2^-$  por granulócitos de pacientes com vasculite ANCA positivos (MACCONI et al., 1993). A administração de hidrocortisona por via endovenosa inibe a liberação de radicais livres por células mononucleares de indivíduos sadios (DANDONA et al., 1998).

No entanto nos pacientes com asma de difícil controle não obtivemos redução de liberação de  $O_2^-$  significativa mesmo utilizando-se de 2mg/Kg por dia de prednisona por via oral ou corticosteróides por aerogação em doses elevadas sugerindo persistência da inflamação. Em asmáticos cortico-dependentes, o uso diário e prolongado de corticosteróide não modula a liberação de marcadores da inflamação como LTB4 e tromboxane (WENZEL et al., 1997). O uso de beclometasona por aerogação não é capaz de alterar os marcadores de inflamação eosinofílica (FAHY et al., 1998).

Um dos mecanismos para explicar esta modulação antiinflamatória dos corticóides refere-se a estudos *in vitro* com dexametasona demonstrando sua capacidade em inibir a expressão dos genes codificadores das subunidades protéicas do sistema NADPH-oxidase p47-phox (CONDINO et al., 1998) e p22-phox (MARUMO et al., 1998). O uso de hidrocortisona por via endovenosa levou à queda nos níveis de p-47phox em células mononucleares (DANDONA et al., 2001).

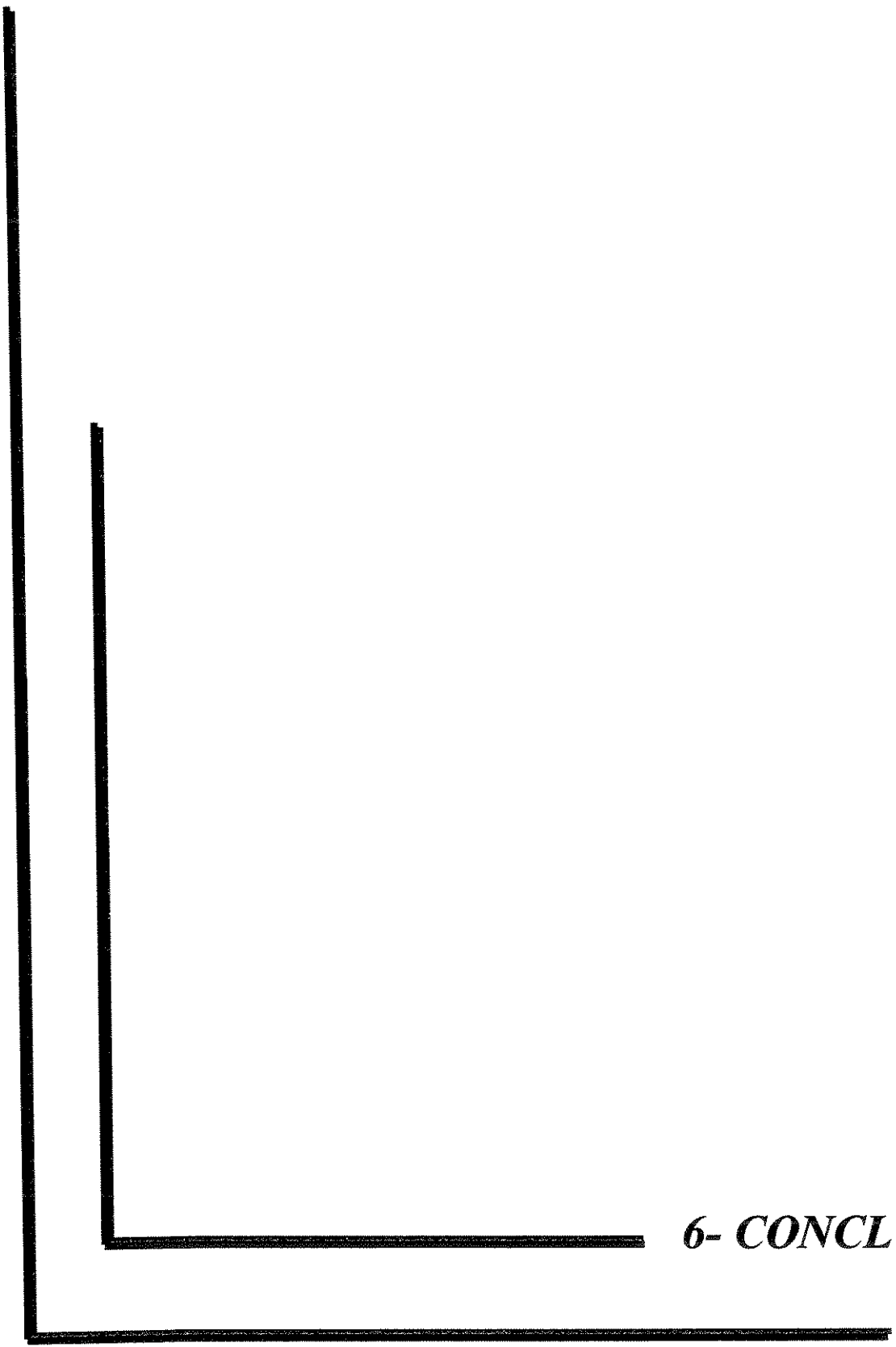
Não há consenso na literatura sobre a capacidade dos esteróides administrados por aerogação em inibir a liberação de  $O_2^-$  por leucócitos. Na realidade há estudo com indivíduo sadio demonstrando redução na liberação de  $O_2^-$  por células do lavado broncoalveolar após uso de flunisolida por três semanas (DWEIK et al., 1997), e ausência de qualquer modificação em indivíduo com fibrose cística após administração de fluticasona (DAULETBAEV et al., 1999). A budesonida por aerogação não inibiu a liberação de radicais livres por células do lavado broncoalveolar de cães submetidos à broncoprovocação com inalação de alérgeno (STEVENS et al. 1995).

Em pacientes com asma, até o momento, há apenas o trabalho de MAJORY et al. (1998) que, após administrar beclometasona em altas doses durante 6 meses mediu a liberação de  $O_2^-$  por monócitos e observou redução da liberação de  $O_2^-$  em relação aos asmáticos não tratados com este medicamento. Altas doses de corticosteróide administrados por aerogação estão associadas a um aumento na biodisponibilidade sistêmica da droga além de modular mecanismos hematopoiéticos na medula óssea e controlar o recrutamento de células para vias aéreas especialmente eosinófilos (BISGAARD, 1997; BARNES, 1998; DENBURG et al., 2000).

Nossos resultados concordam com a literatura existente reiterando a ação inibitória dos glicocorticóides sobre a liberação de  $O_2^-$  por células participantes do processo inflamatório. Na asma, o efeito anti-inflamatório dos glicocorticóides pode ser, ao menos em parte explicado por sua ação sobre a liberação de  $O_2^-$  e outros radicais livres de oxigênio.

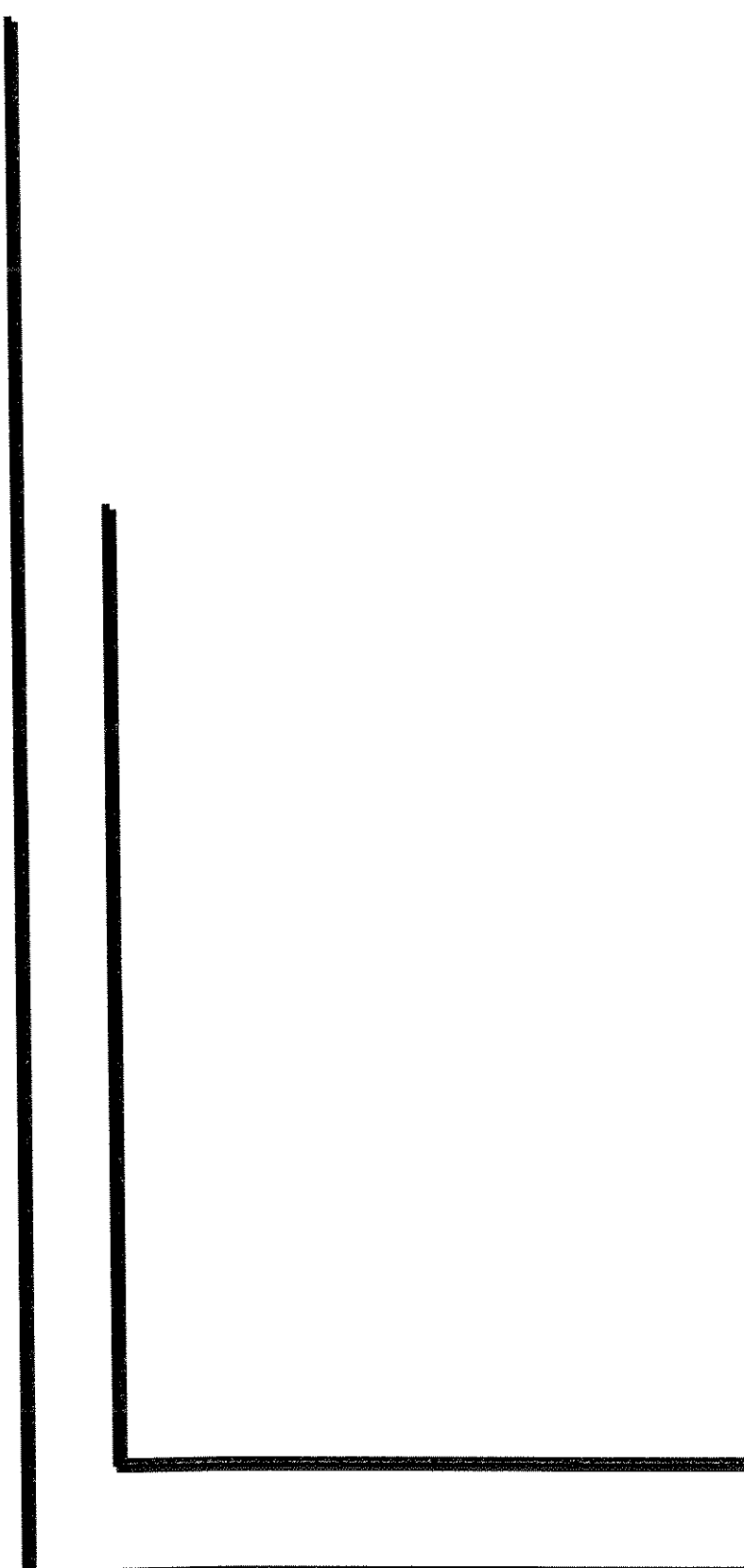
Uma análise após o uso do corticosteróide por tempo mais prolongado e/ou doses mais elevadas seria necessária para avaliar a ação deste fármaco sobre a liberação  $O_2^-$  pelos pacientes mais graves.

A determinação de  $O_2^-$  como marcador de inflamação e sua utilidade na avaliação da eficácia do tratamento pode ser sugerida. Especialmente para discriminar pacientes responsivos e os não responsivos ao corticosteróide.



## ***6- CONCLUSÕES***

- 1- Nas crianças e adolescentes asmáticos com maior grau de obstrução de vias aéreas ( $VEF_1 \leq 60\%$ ) houve maior liberação de  $O_2^-$  por granulócitos de sangue periférico comparada à liberação por células de indivíduos saudáveis.
- 2- O tratamento com corticosteróides levou à inibição significativa da liberação de  $O_2^-$  por granulócitos de pacientes com menor grau de obstrução de vias aéreas ( $60\% < VEF_1 < 80\%$ ).
- 3- Glicocorticóides administrados tanto por via oral quanto por aerogação foram capazes de reduzir a liberação de  $O_2^-$  por granulócitos do sangue periférico de asmáticos.
- 4- O papel dos corticosteróides no restabelecimento e manutenção do estado estável da asma é dependente da gravidade da doença.



## ***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

ABRAMSOM, J.S.; WHEELER, J.G.; QUIE, P.G. The polymorphonuclear leukocyte system. In: STIEHM, R.R.- **Immunologic disorders in infants and children**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1996. p. 94-112.

ABRHAM, W.M. Reactive oxygen species. In: BARNES, P.J.; GRUNSTEIN, M.M.; LEFF, A.R.; WOOLCOCK, A.J. **Asthma**. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 627-38.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Standardization of spirometry: update. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **136**: 1285-98, 1987.

ANTCKAK, A.; NOWAK, D.; SHARIATI, B.; KRÒL, M.; PIASECKA, G.; KURMANOWSKA, Z. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. **Eur. Respir. J.**, **10**: 1235-41, 1997.

BABIOR, B.M. Oxygen dependent microbicidal killing by phagocytes. Part I. **N. Engl. J. Med.**, **298**: 659-68, 1978.

BABIOR, B.M.; CURNUTTE, J.T.; KIPNES, R.S. Pyridine-nucleotide-dependent superoxide production by a cell-free system from human granulocytes. **J. Clin. Invest.**, **56**: 1035-42, 1975.

BARNES, P.J. Reactive oxygen species and airway inflammation. **Free Rad. Biol. Med.**, **9**: 235-43, 1990.

BARNES, P.J. Molecular mechanisms of steroid action in asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **97**: 159-68, 1996.

BARNES, N.C.; BURKE, C.M.; POULTER, L.W.; SCHLEIMER, R.P. The anti-inflammatory profile of inhaled corticosteroids: biopsy studies in asthmatic patients. **Respir. Med.**, **94**: S16-S21, 2000.

BARNES, P.J.; RHODEN, K.J. The effect of oxygen derived free radicals on airway smooth muscle responses. **Br J Pharmacol**, **90** (suppl: 142). 1987

BIERMAN, C.W.; PEARLMAN, D.S.; SHAPIRO, G.G.; BUSSE, W.W. Asthma. In: BIERMAN, C.W.- **Allergy, Asthma and immunology from infancy to adulthood**. Seattle, W B Saunders Co.1996. p. 546-70.

BINGHAM, C.O.; AUSTEN, F. Mast-cell responses in the development of asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **105**: S527-34, 2000.

BISGAARD, H. Use of inhaled corticosteroids in pediatric asthma. **Pediatr. Pulmonol.**, **S15**: 27-33, 1997.

BOUSQUET, J.; JEFFERY, P.K.; BUSSE, W.W.; JOHNSON, M.; VIGNOLA, M.A. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **161**: 1720-33, 2000.

BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, **21**(suppl 97): 1-77, 1968.

BUSSE W.W. Inflammation in asthma: The cornerstone of the disease and target of therapy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **102**: S17-S22, 1998.

BUSSE, W.W.; LEMANSKE, R.F. Advances in immunology. **N. Engl. J. Med.**, **344** (5): 350-62, 2001.

CALHOUN, W.J.; LAVINS, B.J.; MINKWITZ, M.C.; EVAMS, R.; GLEICH, G.J.; COHN, J. Effect of zafirlukast on cellular mediators of inflammation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **157**: 1381-9, 1998.

CHANEZ, J.P.; DENT, G.; YUKAWA, T.; BARNES, P.J.; CHUNG, K.F. Generation of oxygen free radicals from blood eosinophils from asthma patients after stimulation with PAF or phorbol ester. **Eur. Resp. J.**, **3**: 1002-1007, 1990.

CHAKRABORTI, S.; GURTNER, G.H.; MICHAEL, J.R. Oxidant-mediated activation of phospholipase A<sub>2</sub> in pulmonary endothelium. **Am. J. Physiol.**, **257**: L430-7, 1989.

CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. An introduction to free radical biochemistry. **British Med. Bull.**, **49 (3)**: 481-493, 1993

CONDINO-NETO, A.; WHITNEY, C.; NEWBURGER, P.E. Dexamethasone but not indomethacin inhibits human phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity by down-regulating expression of genes encoding oxidase components. **J. Immunol.**, **161**: 4960-7, 1998

CONOVER, W.J. In: **Practical Nonparametric Statistics**. New York, John Wiley & Sons, 1971b. p. 256-64.

CORRIGAN C.J., KAY A.B. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma: relationship to disease severity and atopic status. **Am. Rev. Resp. Dis.**, **141**:970-7, 1990.

CURNUTTE, J.T.; ORKIN, S.H.; DINAUER, M.C. Genetic disorders of phagocyte function. In: STAMATOYANNOPOULOS, G.; NEINHUIS A.W.; MAJERUS, P.W.; VARMUS, H. **The molecular basis of blood diseases**. Philadelphia, W.B. Saunders, 1994. p. 493-540.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **J Immunol Meth**, **232**: 3-14, 1999

DANDONA, P.; THUSU, K.; HAFEEZ, R.; ABDEL-RAHMAN, E.; CHAUDHURI, A. Effect of hydrocortisone on oxygen free radical generation by mononuclear cells. **Metabolism**, **47(7)**: 788-91, 1998.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; GHANIM, H.; MOHANTY, P.; HAMOUDA, W.; AL-HADDA, W. Acute suppressive effect of hydrocortisone on p47 subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. **Metabolism**, **50(5)**: 548-52, 2001.

DAULETBAEV, N.; VIEL, K.; BEHR, J.; LOITSCH, S.; BUHL, R.; WAGNER, T.O.F.; BARGON, J. Effects of short-term inhaled fluticasone on oxidative burst of sputum cells in cystic fibrosis patients. **Eur. Respir. J.**, **14**: 1150-55, 1999.

DE BOER, J.; POUW, F.M.; ZAAGSMA, J.; MEURS, H. Effects of endogenous superoxide anion and nitric oxide on cholinergic constriction of normal and hyperreactive guinea pig airways. **Free Rad**, **25(6)**: 635-644, 1998.

DE RAEVE, H.R.; THUNNISSEN, F.B.J.M.; KANEKO, F.T.; GUO, F.H.; LEWIS, M.; KAVURU, M.S.; SECIC, M.; THOMASSEN, M.J.; ERZURUM, S.C. Decreased Cu, Zn-SOD activity in asthmatic airway epithelium: correlation by inhaled corticosteroid in vivo. **Am. J. Physiol.**, **272**: L148-54, 1997.

DEMOLY, P.; VACHIER, I.; PENE, J.; MICHEL, F.B.; GODARD, P.; DAMON, M. IgE produces monocyte superoxide anion release: correlation with CD23 expression. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **93**: 108-16, 1994.

DENBURG, J.A.; SEHMI, R.; SAITO, H.; PIL-SEOB, J.; INMAN, M.D.; O'BYRNE, P.M. Systemic aspects of allergic disease: bone marrow responses. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **106**: S242-6, 2000.

DIAS-DA-MOTTA, P.M.; ARRUDA, V.R.; MUSCARA, M.N.; SAAD, S.T.O.; DE NUCCI, G.; COSTA, F.F.; CONDINO-NETO, A. The release of nitric oxide and superoxide anion by neutrophils and mononuclear cells from patients with sickle cell anaemia. **Br. J. Haematol.**, **93**: 333-40, 1996.

DLUHY, R.G. Clinical relevance of inhaled corticosteroids and HPA axis suppression. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **101**: S447-50, 1998.

DWEIK, R.A.; LEWIS, M.; KAVURU, M.; BUHROW, L.; ERZURUM, S.C.; THOMASSEN, M.J. Inhaled corticosteroids and beta-agonists inhibit oxidant production by bronchoalveolar lavage cells from normal volunteers in vivo. **Immunopharmacology**, **37(2-3)**: 163-6, 1997.

DJUKANOVIC, R.; ROCHE, W.R.; WILSON, J.W.; BEASLEY, C.R.W.; TWENTYMAN, O.P.; HOWARTH, P.H.; HOLGATE, S.T. Mucosal inflammation in asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **142**: 434-57, 1990.

DOHLMAN, A.W.; BLACK, H.R.; ROYALL, J.A. Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients. **Am Rev Respir Dis**, **148**: 955-960,1993.

EZEAMUZIE, C.I.; AL-HAGE, M. Effects of some anti-asthma drugs on human eosinophil superoxide anion release and degranulation. **Int Arch Allergy Immunol**, **115**: 162-168, 1998.

FAHY, J.V.; BOUSHEY, H.A. Effect of low-dose beclomethasone dipropionate on asthma control and airway inflammation. **Eur. Respir. J.**, **11(6)**: 1240-7, 1998.

FRAZIER, J.P.; CLEARY, T.G.; PICKERING, L.K.; KOHL, S.; ROSS, P.J. Leukocyte function in healthy neonates following vaginal and cesarian section deliveries. **J. Pediatr.**, **101**: 269-72, 1982.

FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab. Invest.**, **47**:412-426, 1982

FUKUSHIMA K.; ANDO M.; ITO K.; SUGA M.; ARAKI S. Stimulus and cumulative dose-dependent inhibition of superoxide production by polymorphonuclear leukocytes of patients receiving corticosteroids. **J Clin. Lab. Immunol.**, **33**: 117-123, 1990.

GIBSON, P.G.; NORZILA, M.Z.; FAKES, S.K.; SIMPSON, J.; HENRY, R.L. Pattern of airway inflammation and its determinants in children with acute severe asthma. **Pediatr. Pulmonol.**, **28(4)**: 261-70, 1999.

GRONEMEYER, H. Control of transcription activation by steroid hormone receptors. **FASEB J.**, **6**: 2524-9, 1992.

HABER, F.; WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proc. R. Soc. Surg. A.**, **147**: 332-51, 1934.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? **Lancet**, **344**: 721-4, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. **Lancet**, **23**: 1396-7, 1994.

HARTNELL, A.; ROBINSON, D.S.; KAY, A.B.; WARDLAW, A.J. CD69 is expressed by human eosinophils activated *in vivo* in asthma and *in vitro* by cytokines. **Immunology**, **80**:281-6, 1993.

HOLGATE, S.T. The inflammation-repair cycle in asthma: the pivotal role of the airway epithelium. **Clin. Exper. Allergy**, **28(S5)**: 97-103, 1998.

HOLGATE, S.T. Epithelial damage and response. **Clin. Exper. Allergy**, **30(S1)**: 37-41, 2000.

HOLGATE, S.T. The role of mast cells and basophils in inflammation. **Clin. Exp. Allergy**, **30(S1)**: 28-32, 2000.

HUANG, J.; OLIVENSTEIN, R.; TAHA, R.; HAMID,Q.; LUDWIG, M. Enhanced proteoglycan deposition in the airway wall of atopic asthmatics. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **160**: 725-9, 1999.

IKEDA, Y.; LONG, D.M. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. **Neurosurgery**, **27**: 1-11,1990.

JARJOUR, N.N.; BUSSE, W.W.; CALHOUN, W.J. Enhanced production of oxygen radicals in nocturnal asthma. **Am. Rev. Respir. Dis**,**146**: 905-911, 1992.

JARJOUR. N.N.; BUSSE, W.W.; CALHOUN, W.W. Enhanced production of oxygen radicals and asthma. **Am. Rev. Respir. Dis**. **146**: 905-11, 1992.

JATAKANON, A.; UASUF, C.; MAZIAK, W.; LIM, S.; CHUNG, K.F.; BARNES, P.J. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. **Am . J. Respir. Crit. Care Med.**, **160(5pt1)**: 1532-9, 1999.

JEFFERY, P. Inflammation and remodeling in the adult and child with asthma. **Pediatr. Pulmonol.**, **S21**: 3-16, 2001.

JEFFERY, P.K.; GODFREY, R.W.; ADELROTH, E.; NELSON, F.; ROGERS, A.; JOHANSON, S.A. Effects of treatment on airway inflammation and thickening of basement membrane reticular collagen in asthma. A quantitative light and electron microscopic study. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **145**(4 pt 1): 890-9, 1992.

JESAITS, A.J.; BUESCHER, E. S.; HARRISON,D.; QUINN, M.T.; PARKOS, C.A.; LIVESEY, S.; LINNER, J. Ultrastructural localization if cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. **J.Clin. Invest.**, **85**: 821-35, 1990.

JÖBIS, Q.; RAATGEER, H.C.; HERMANS, P.W.M.; JONGSTE, J.C. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased stable asthmatic children. **Eur Resp J**, **10**: 519-521,1997.

KANAZAWA, H.; KURIHARA, N.; HIRATA, K.; TAKEDA, T. The role of free radicals in airway obstruction in asthmatic patients. **Chest**, **100**: 1319-1322, 1991.

KATSUMATA, U.; MIURA, M.; ICHINOSE, M.; KIMURA, K.; TAKAHASHI, T.; INOUE, H; TAKISHIMA, T. Oxygen radicals produce airway constriction in anesthetized cats. **Am Rev Respir Dis**, **141**: 1158-1161, 1990

KAY, A.B. Asthma and Inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **87**: 893-910, 1991

KAY, A.B. Allergy and allergic diseases. **N. Engl. J. Med.**, **244**(1): 30-7, 2001.

KATO, M.; NAKANO, M.; MORIKAWA, A.; KIMURA, H.; SHIGETA, M.; KUROUME, T. Ability of polymorphonuclear leukocytes to generate active oxygen species in children with bronchial asthma. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **95**:17-22, 1991.

KERR, M.E.; BENDER, C.M.;MONTI, E.J. An introduction to oxygen free radicals. **Heart & Lung**, **25**: 200-9,1996.

KLEBANOFF, S.J.; VADAS, M.A.; HARLAN, J.M.; SPARKS,L.H.; GAMBLE,J.R.; AGOSTI, J.A.; WATERSDORPH, A.M. Stimulation of neutrophil by tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, **136**: 4220-5,1986.

KNIGHT, J.A. Diseases related to oxygen-derived free radicals. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, **25**: 11-21, 1995.

KON, O.M.; KAY, A.B. T cell and chronic asthma. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **118(2-4)**: 133-5, 1999.

KOWNASTZKI, E.; KAPP, A.; UHRICH, S. Modulation of human neutrophilic granulocytes function by recombinant human lymphotoxin. Promotion of adherence, inhibition of chemotactic migration and superoxide anion release from adherent cells. **Clin. Exp. Immunol.**, **74**: 143-8, 1988.

KRISHNASWAMY, G.; KELLEY, J.; YERRA, L.; SMITH, J.K.; CHI, D.S. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. **J. Interferon Cytokine Res.**, **19(2)**: 91-104, 1999.

LAITINEN, M.D.; LAITINEN, A.; ALTRAJA, A.; VIRTANEN, I.; KÄMPE, M.; SIMONSSON, B.G.; KARLSSON, S.; HAKANSSON, L.; VENGE, P.; SILASTU, H. Inflammatory Determinants of Asthma Severity. Bronchial biopsy findings in intermittent or early asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **98**: S3-6, 1996.

LANSING, M.W.; MANSOUR, E.; AHMED, A.; CORTES, A.; GARCIA, L.; LAUREDO, I.T.; WANNER, A.; ABRAHAM, W.M. Lipid mediators contribute to oxygen-radical-induced airway responses in sheep. **Am Rev Respir Dis**, **144**: 1291-1296, 1991.

LAPENNA, D.; DE GIOIA, S.; MEZZETTI, A.; CIOFANI, G.; FEST, D.; CUCCURULLO, F. Amonophylline: could it act as an antioxidant *in vivo*? **Eur. J. Clin. Inv.**, **25**: 464-470, 1995.

LOUIS, R.; LAU, L.C.; BRON, A.O.; ROLDAANA, C.; RADERMECKER, M.; DJUKANOVIC, R. The relationship between inflammation and asthma severity. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **161(1)**: 9-16, 2000.

LUCKACS, N.W. migration of helper T-lymphocyte subsets into inflamed tissues. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **106**: S264-9, 2000.

MACCONI, D.; ZANOLI, A.F.; ORISIO, S.; LONGARETTI, L.; MAGRINI, L.; ROTA, S.; RADICE, A.; POZZI, C.; REMUZZI, G. Methylprednisolone normalizes superoxide anion production by polymorphs from patients with ANCA-positive vasculites. **Kidney Int.**, **44(1)**: 215-20, 1993.

MAJORY, M.; VACHIER, I.; GODARD, P.; FARCE, M.; BOUSQUET, J.; CHANEZ, P. Superoxide anion production by monocytes of corticosteroid-treated asthmatic patients. **Eur. Respir. J.**, **11**: 133-38, 1998.

MARTIN, J. Learning from vascular remodeling. **Clin. Exp. Allergy**, **30 (S1)**: 33-36, 2000.

MARUMO, T.; SCHINI-KERTH, V.B.; BRANDES, R.P.; BUSSE, R. Glucocorticoids inhibit superoxide anion production and p22-phox mRNA expression in human aortic smooth muscle cells. **Hypertension**, **32**: 1083-88, 1998.

McCORD, J.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, **244**: 6044-55, 1969.

MACFARLANE, A.J.; KON, O.M.; SMITH, S.J.; ZEIBECOGLOU, K.; KHAN, L.N.; BARATA, L.T.; McEUN, A.R.; BUCKLEY, M.G.; WALLS, A.F.; MENG, Q.; HUMBERT, M.; BARNES, N.C.; ROBINSON, D.S.; KAY, A.B. Basophils, eosinophils, and mast-cells in atopic and nonatopic asthma in late-phase allergic reactions in lung and skin. **J. Allergy Clin. Immunol**, **105(1pt1)**: 99-107, 2000.

McPHAIL, L.C.; CLAYTON, C.C.; SNYDERMAN, R. The NADPH-oxidase of human polymorphonuclear leucocytes. Evidence for regulation by multiple signals. **J. Biol. Chem.**, **259**: 5768-75, 1984.

McPHAIL, L.C.; SHIRLEY, P.S.; CLAYTON, C.C.; SYNDERMAN, R. Activation of the respiratory burst enzyme from human neutrophils in a cell-free system. Evidence for a soluble cofactor. **J. Clin. Invest.**, **75**: 1735-9, 1985.

McPHAIL, L.C.; SNYDERMAN, R. Activation of respiratory burst enzyme in human polymorphonuclear leucocytes by chemoattractants and other soluble stimuli. Evidence that the same oxidase is activated by different transductional mechanisms. **J. Clin. Invest.**, **72**: 192-200, 1983.

MEKONI, Y.A.; METCALFE, D.D. Mast cell in innate immunity. *Immunol. Rev.*, **173**: 131-140, 2000.

METZGER, W.J.; HUNNINGHAKE, G.W.; RICHRESON, H.B. Late asthmatic reactions: inquiry into mechanisms and significance. **Clin. Rev. Allergy**, **3**: 145-65, 1985.

MILIKEN, G.A.; JOHNSON, D.E. In: **Analysis of Messy Data**. Volume I Designed Experiments. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1984.p. 322-50.

MONTGOMERY, D.C. In: **Design and Analysis of Experiments**. New York, John Wiley & Sons, 3<sup>rd</sup> ed. 1991, p. 50-87.

MORITANI, C.; ISHIOKA, S.; HARUTA, Y.; KAMBE, M.; YAMKIDO, M. Activation of platelets in bronchial asthma. **Chest**, **113(2)**: 452-8, 1998.

MORRISON, J.; HIGENBOTTAN, T. The molecular genetics of atopy. **N. Engl. J. Med.**, **320**: 271-2, 1989

NATHAN, C.F. Respiratory burst in adherent human neutrophils. Triggering by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G. **Blood**, **73**: 301-6, 1989.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE. BETHESDA (MD): Guideline for the diagnosis and management of asthma, **NIH Publication N° 97-4051**, 1997.

NORZILA, M.Z.; FAKES, K.; HENRY, R.L.; SIMPSON, J.; GIBSON, P.G. Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **161(3pt1)**: 769-74, 2000.

PARKOS, C.A.; ALLEN, R.A.; COCHRANE, C.G.; JESIATIS, A.J. The quaternary structure of the plasma membrane b-type cytochrome of human granulocytes. **Biochem. Biophys. Acta**, **932**:71-83, 1988.

PEYPES J. Skin tests for immediate, type I, allergic reactions. **Proc. R. Soc. Med.**, **65** (3): 271-72, 1972.

PEREIRA, B.; ROSA, L.F.; SAFI, D.A; BCHARA, E.J.; CURI, R. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. **Biochem. Pharmacol.**, **1995**, **50**(12): 2093-8, 1995.

POSTMA, D.S.; RENKEMA, T.E.J.; NOORDHOEK, J.A.; FABER, H.; SLUITER, H.J.; KAUFFMAN, H. Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic air-flow obstruction. **Am Rev Respir Dis**, **137**: 57-61, 1988.

POSTON, R.N.; CHANEZ, P.; LACOSTE, J.Y.; LITCHFIELD, T.; LEE, T.H.; BOUSQUET, J. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltration in asthmatic bronchi. **Am Rev Respir Dis**, **145**: 918-921, 1992.

POWELL, N.; TILL, S.J.; KAY A.B.; CORRIGAN, C.J. The topical glucocorticoids beclomethasone dipropionate and fluticasone propionate inhibit human T-cell allergen-induced production of IL-5, IL-3 and GM-CSF mRNA and protein. **Clin. Exp. Allergy**, **31**(1): 69-76, 2001.

PRYOR, W.A. The formation of free radicals and the consequences of their reactions *in vivo*. **Photochem. Photobiol.**, **28**:787-801, 1978.

QUIE, P.G. Chronic granulomatous disease of childhood. A saga of discovery and understanding. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **12**: 395-8, 1993.

OSTERBALLE, O.; WEEK, B. A new lancet for skin prick testing. **Allergy**, **34**: 209, 1979.

QUTAYABA, A.; HAMID, M.D.; MINSHALL, E.M. Molecular pathology of allergic disease. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **105**: 20-36, 2000.

- RAHMAN, I.; MORRISON, D.; DONALADSON, K.; NACNEE, W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. **Am. J. Crit. Care Med.**, **154**: 1055-60, 1996.
- REDINGTON, A.E. Fibrosis and airway remodeling. **Clin. Exper. Allergy**, **30(S1)**: 42-45, 2000.
- ROCHE, W.R.; BEASLEY, R.; WILLIAMS, J.H.; HOLGAT, S.T. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. **Lancet**, **1**:520-4, 1989.
- RYRFELDT, A.; BANNENBERG, G.; MOLDEUS, P. Free radicals and lung disease. **British Med. Bull.**, **49(3)**: 588-603, 1993.
- SALVEMINI, D.; DE NUCCI, G.; SNEDDON, J.M.; VANE, J.R. Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation, **Brit. J. Pharmacol.**, **97**: 1145-50. 1989.
- SAMPSON, A.P. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. **Clin. Exp. Allergy**, **30(S1)**:22-7, 2000.
- SCHAUER, U.; LEINHA, C.; JÄGER, R.; RIEGER, C.H.L. Enhanced superoxide generation by eosinophils from asthmatic children. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, **96**: 317-321, 1991.
- SEDWICK, J.B.; GEIGER, K.M.; BUSSE, W.W. Superoxide generation by hypodense eosinophils from patients with asthma. **Am Rev Respir Dis**, **142**: 120-125, 1990.
- SERHAM, C.N.; HAMBERG, M.; SAMULSSON, B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leucocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **81**: 5335-9, 1984.
- SEYBOLD, Z.V.; ABRAHAM, W.M.; GAZEROGLU, H.; WANNER, A. Impairment of airway mucociliary transport by *Pseudomonas aeruginosa* products. **Am Rev Respir Dis**, **146**: 1173-1176. 1992.
- SHATWELL, K.P.; SEGAL, A.W. NADPH oxidase. **Int J Biochem Cell Biol**, **28**: 1191-1195, 1996.

SMITH, L.I.; BODWELL, J.E.; MENDEL, D.B.; CIARDELLI, T.; NORTH, W.G.; MUNCK, A. Identification of cystein-644 as the covalent site of attachment of dexamethasone 21-mesylate to murine glucocorticoid receptor in WEHI-7 cells. **Biochem.**, **27**: 3747-53, 1988.

STELLATO, C.; SCHWIEBERT, L.M.; SCHLEIMER, R.P. Mechanisms of glucocorticosteroid action. In: BARNES, P.J.; GRUNSTEIN, M.M.; LEFF, A.R.; WOOLCOCK, A.J., editors- **Asthma**. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.p.1569-96.

STEVENS, W.H.; ADELROTH, E.; WOOLLEY, M.J.; WATTIE, J.; DAHLBACK, M.; O'BYRNE, P.M. The effects of an inhaled corticosteroid on oxygen radical production by bronchoalveolar cells after allergen or ozone in dogs. **Eur. J. Pharmacol.**, **293(30)**: 251-7, 1995.

SUMIMOTO, H.; TAKESHIGE, K.; MINAKAMI, S. Superoxide production of human polymorphonuclear leucocytes stimulated by LTB<sub>4</sub>. **Bioch Biophys. Acta**, **803**: 271-7, 1984.

SULLIVAN, P.J.; JAFAR, Z.H.; HARBINSON, P.L.; RESTRICK L.J.; PAGE, C.P. Platelet dynamics following allergen challenge in allergic asthmatics. **Respiration**, **67(5)**: 514-7, 2000.

TAKEYAMA, K; DABBAGH, K.; JEONG SHIM, J.; DAO-PICK, T; UEKI,I.F.; NADEL, J.A. Oxidative stress causes mucin synthesis via activation of growth factor receptor: role of neutrophils. **J Immunol**, **164(3)**: 1546-52, 2000.

TATE, R.M.; VANBENTHUYSEN, K.M.; SHASBY, D.M.; McMURTRY, I.F.; REPINE, J.E. Oxygen-radical-mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lungs. **Am Rev Respir Dis**, **126**: 802-806,1982.

TRUSS, M.; BEATO, M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. **Endocrinol. Rev.**, **14**: 459-79, 1993.

UMEKI, S.; SOEJIMA, R. Hydrocortisone inhibits the respiratory burst oxidase from human neutrophils in whole-cell and free-cell systems. **Biochim Biophys Acta**, **1052(1)**: 211-5, 1990.

VACHIER, I.; DAMON, M.; LE DOUCEN, C.; DE PAULET, A.C.; CHANEZ, P.; MICHEL, F.B.; GODARD, P. Increased oxygen species generation in blood monocytes of asthmatic patients. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **146**: 1161-6, 1992.

VARGAS, L.; PATIÑO, P.J.; MONTOYA, F.; VANEGAS, A.C.; ECHAVARRIA, A.; GARCIA DE OLARTE, D. A study of granulocyte respiratory burst in patients with allergic bronchial asthma. **Inflammation**, **22**: 45-55, 1998.

WARD, C.; PAIS, M.; BISH, R.; REID, D.; FELTIS, B.; JOHNS, D.; WALTERS, E.H. airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. **Thorax**, **57(4)**: 309-16, 2002.

WENZEL, S.E.; SZEFLER, S.J.; LEUNG, D.Y.; SLOAN, S.I.; REX, M.D.; MARTIN, R.J. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. **Am. J. Crit. Care Med.**, **156(3 pt 1)**: 737-43, 1997.

WILLS-KARP M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. **Am. Rev. Immunol.**, **17**: 255-81, 1999.

WILSON, S.J.; WALLIN, A.; DELLA-CIOPPA, G.; SANDSTROM, T.; HOLGATE, S.T. Effects of budesonide and formoterol on NF-kappa B, adhesion molecules, and cytokines in asthma. **Am. J. Crit. Care Med.**, **164(6)**: 1047-52, 2001.

WINROW, V.R.; WINYARD, P.G.; MORRIS, C.J.; BLAKE, D.R. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. **British Med. Bull.**, **49(3)**: 506-522, 1993.

YOUSSEF, A.A.; BARON, D.N. Leukocyte superoxide dismutase in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum. Dis.**, 42(5): 558-562, 1983.

ZEIBECOGLOU K., YING S., MENG Q.,POULTER L.W., ROBINSON D.S., KAY A.B. Macrophage subpopulations and macrophage-derived cytokines in sputum of atopic and nonatopic asthmatic subjects and atopic and normal control subjects. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 106(4): 697-704, 2000.

**8- ANEXOS**

# Anexo 1- características do grupo de asmáticos

| paciente | idade | gênero | grupo | medicação  | dose    | tempo | VEF <sub>1</sub> pré | VEF <sub>1</sub> pós |
|----------|-------|--------|-------|------------|---------|-------|----------------------|----------------------|
| AJC      | 17    | M      | I     | BUD        | 1200 µg | 3 m   | 68                   | 78                   |
| CGS      | 9     | M      | I     | BUD        | 1200 µg | 2 m   | 70                   | 98                   |
| DLC      | 11    | F      | I     | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 67                   | 73                   |
| DCO      | 12    | F      | I     | TRI        | 800 µg  | 2 m   | 74                   | 88                   |
| JCO      | 12    | F      | I     | FLT        | 750 µg  | 2 m   | 67                   | 88                   |
| JDFS     | 13    | F      | I     | FLN        | 1200 µg | 3 m   | 67                   | 88                   |
| MJPS     | 12    | M      | I     | BCL        | 1500 µg | 3 m   | 63                   | 71                   |
| JCF      | 11    | F      | I     | FLT        | 1000 µg | 3 m   | 64                   | 70                   |
| DMB      | 15    | M      | I     | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 72                   | 75                   |
| AAM      | 10    | M      | I     | BCL        | 750 µg  | 2 m   | 79                   | 99                   |
| LMF      | 12    | F      | I     | BCL        | 1000 µg | 2 m   | 61                   | 80                   |
| AMS      | 15    | M      | I     | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 67                   | 87                   |
| EAC      | 9     | M      | I     | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 74                   | 100                  |
| AP       | 12    | M      | I     | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 67                   | 100                  |
| JOC      | 10    | F      | I     | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 61                   | 85                   |
| RAT      | 14    | F      | I     | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 66                   | 105                  |
| RCS      | 12    | M      | I     | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 79                   | 81                   |
| ACP      | 12    | M      | I     | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 76                   | 92                   |
| CR       | 18    | F      | I     | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 71                   | 91                   |
| AR       | 9     | F      | II    | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 37                   | 47                   |
| AAG      | 8     | F      | II    | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 58                   | 89                   |
| ERS      | 11    | F      | II    | FLN        | 1200 µg | 6 m   | 47                   | 74                   |
| FKV      | 15    | F      | II    | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 39                   | 50                   |
| CDS      | 14    | M      | II    | BUD        | 1200 µg | 1 m   | 45                   | 78                   |
| AJDB     | 9     | M      | II    | TRI        | 800 µg  | 6 m   | 47                   | 80                   |
| TSA      | 12    | M      | II    | BCL        | 500 µg  | 6 m   | 42                   | 78                   |
| LMC      | 13    | F      | II    | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 24                   | 86                   |
| AAS      | 10    | M      | II    | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 44                   | 88                   |
| WANP     | 13    | M      | II    | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 54                   | 98                   |
| LCD      | 6     | M      | II    | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 24                   | 41                   |
| AMS      | 15    | M      | II    | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 45                   | 93                   |
| EAV      | 11    | M      | II    | prednisona | 2 mg/kg | 7 d   | 56                   | -                    |

BUD: budesonida, FLT: propionato de fluticasona, FLN:flunisolida, BCL:dipropionato de beclometasona, TRI: acetato de triancinolona; VEF<sub>1</sub> pré/pós: % do volume expiratório final em 1 segundo antes e após corticoterapia ; tempo: tempo de uso da medicação até a 2ª coleta de superóxido,m: meses, d:dias.

**Anexo 2-** valores cumulativos de superóxido liberado por asmáticos para cada célula e tempo antes da corticoterapia

| produção de $O_2^-$ para Mono esp |    |       |      |        |        | produção de $O_2^-$ para PMN esp |    |       |      |        |        |
|-----------------------------------|----|-------|------|--------|--------|----------------------------------|----|-------|------|--------|--------|
| t                                 | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                 | 25 | 0,27  | 0,33 | -0,41  | 0,99   | 0                                | 26 | 0,46  | 0,69 | -0,66  | 2,48   |
| 5                                 | 25 | 0,36  | 0,48 | -0,93  | 1,01   | 5                                | 26 | 0,78  | 0,66 | -0,02  | 2,54   |
| 15                                | 25 | 0,59  | 0,42 | -0,10  | 1,53   | 15                               | 26 | 1,22  | 0,88 | -0,21  | 3,94   |
| 25                                | 25 | 0,88  | 0,88 | -0,39  | 3,99   | 25                               | 26 | 1,81  | 1,07 | 0,44   | 4,61   |
| 45                                | 25 | 1,03  | 0,90 | -0,50  | 3,35   | 45                               | 26 | 2,38  | 1,75 | 0,12   | 6,56   |
| 60                                | 25 | 1,10  | 1,02 | -0,12  | 4,00   | 60                               | 26 | 2,43  | 1,79 | 0,22   | 6,80   |
| produção de $O_2^-$ para Mono pma |    |       |      |        |        | produção de $O_2^-$ para PMN pma |    |       |      |        |        |
| t                                 | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                 | 23 | 1,36  | 1,88 | -0,93  | 8,14   | 0                                | 27 | 4,20  | 3,96 | -0,59  | 14,26  |
| 5                                 | 23 | 2,75  | 2,81 | -0,70  | 10,00  | 5                                | 27 | 7,13  | 4,28 | 0,25   | 13,64  |
| 15                                | 23 | 4,14  | 3,29 | -0,32  | 13,00  | 15                               | 27 | 8,09  | 3,64 | 1,73   | 13,41  |
| 25                                | 23 | 4,94  | 3,69 | -0,03  | 14,12  | 25                               | 27 | 8,78  | 2,90 | 2,60   | 12,64  |
| 45                                | 23 | 5,86  | 3,84 | 0,20   | 13,69  | 45                               | 27 | 9,45  | 3,12 | 3,45   | 16,99  |
| 60                                | 23 | 5,87  | 3,92 | 0,38   | 13,93  | 60                               | 27 | 9,21  | 2,90 | 3,10   | 13,70  |

**Anexo 3-** valores cumulativos de  $O_2^-$  liberados por asmáticos para cada célula e tempo após corticoterapia

| produção de $O_2^-$ para Mono esp |    |       |      |        |        | produção de $O_2^-$ para PMN esp |    |       |      |        |        |
|-----------------------------------|----|-------|------|--------|--------|----------------------------------|----|-------|------|--------|--------|
| t                                 | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                 | 28 | 0,37  | 0,30 | -0,10  | 1,12   | 0                                | 31 | 0,45  | 0,47 | -0,40  | 1,54   |
| 5                                 | 28 | 0,46  | 0,32 | 0,09   | 1,39   | 5                                | 31 | 0,65  | 0,66 | -0,26  | 2,65   |
| 15                                | 28 | 0,55  | 0,55 | -0,10  | 1,70   | 15                               | 31 | 0,95  | 0,85 | -0,11  | 3,10   |
| 25                                | 28 | 0,71  | 0,71 | 0,12   | 1,78   | 25                               | 31 | 0,96  | 0,80 | -0,36  | 2,79   |
| 45                                | 28 | 0,83  | 0,83 | 0,01   | 1,62   | 45                               | 31 | 1,35  | 1,05 | -0,25  | 3,73   |
| 60                                | 28 | 0,92  | 0,92 | 0,27   | 2,25   | 60                               | 31 | 1,47  | 1,16 | 0,10   | 4,75   |
| produção de $O_2^-$ para Mono pma |    |       |      |        |        | produção de $O_2^-$ para PMN pma |    |       |      |        |        |
| t                                 | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                 | 29 | 1,23  | 0,98 | -0,11  | 3,52   | 0                                | 31 | 3,94  | 3,59 | -0,58  | 12,83  |
| 5                                 | 29 | 3,60  | 3,27 | 0,41   | 13,29  | 5                                | 31 | 6,69  | 3,75 | 1,21   | 13,29  |
| 15                                | 29 | 4,35  | 2,93 | 0,61   | 10,59  | 15                               | 31 | 8,33  | 3,39 | 2,75   | 13,10  |
| 25                                | 29 | 5,61  | 3,22 | 0,92   | 12,00  | 25                               | 31 | 8,88  | 2,61 | 3,95   | 13,41  |
| 45                                | 29 | 6,06  | 3,22 | 0,56   | 12,29  | 45                               | 31 | 9,26  | 2,15 | 3,74   | 13,13  |
| 60                                | 29 | 6,76  | 3,11 | 1,61   | 12,32  | 60                               | 31 | 9,25  | 2,05 | 4,79   | 12,36  |

**Anexo 4-** valores cumulativos de  $O_2^-$  liberados por asmáticos para cada célula e tempo, por grupo, antes da corticoterapia

|                                              |    |       |      |        |        |                                             |    |       |      |        |        |
|----------------------------------------------|----|-------|------|--------|--------|---------------------------------------------|----|-------|------|--------|--------|
| produção de $O_2^-$ para Mono esp<br>grupo I |    |       |      |        |        | produção de $O_2^-$ para PMN esp<br>grupo I |    |       |      |        |        |
| t                                            | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                           | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                            | 17 | 0,22  | 0,26 | -0,41  | 0,78   | 0                                           | 17 | 0,33  | 0,71 | -0,66  | 2,48   |
| 5                                            | 17 | 0,30  | 0,43 | -0,93  | 0,93   | 5                                           | 17 | 0,78  | 0,71 | -0,02  | 2,54   |
| 15                                           | 17 | 0,52  | 0,28 | -0,10  | 0,99   | 15                                          | 17 | 1,16  | 0,93 | 0,36   | 3,94   |
| 25                                           | 17 | 0,63  | 0,42 | -0,39  | 1,34   | 25                                          | 17 | 1,56  | 1,02 | 0,44   | 4,61   |
| 45                                           | 17 | 0,95  | 0,58 | -0,19  | 1,91   | 45                                          | 17 | 2,30  | 1,71 | 0,69   | 6,56   |
| 60                                           | 17 | 0,98  | 0,72 | -0,12  | 2,24   | 60                                          | 17 | 2,20  | 1,68 | 0,32   | 6,40   |
| grupo II                                     |    |       |      |        |        | grupo II                                    |    |       |      |        |        |
| t                                            | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                           | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                            | 13 | 0,36  | 0,43 | -0,41  | 1,10   | 0                                           | 13 | 0,58  | 0,61 | -0,47  | 1,25   |
| 5                                            | 13 | 0,50  | 0,49 | -0,42  | 1,11   | 5                                           | 13 | 0,71  | 0,54 | 0,14   | 1,63   |
| 15                                           | 13 | 0,66  | 0,50 | -0,05  | 1,53   | 15                                          | 13 | 1,33  | 0,76 | -0,21  | 2,70   |
| 25                                           | 13 | 1,17  | 1,07 | 0,00   | 3,99   | 25                                          | 13 | 2,19  | 0,96 | 0,69   | 4,08   |
| 45                                           | 13 | 1,16  | 1,11 | -0,05  | 3,35   | 45                                          | 13 | 2,70  | 1,79 | 0,12   | 6,00   |
| 60                                           | 13 | 1,28  | 1,20 | 0,03   | 4,00   | 60                                          | 13 | 3,08  | 1,97 | -0,22  | 6,80   |
| produção de $O_2^-$ para Mono pma<br>grupo I |    |       |      |        |        | produção de $O_2^-$ para PMN pma<br>grupo I |    |       |      |        |        |
| t                                            | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                           | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                            | 14 | 1,61  | 2,30 | -0,93  | 8,14   | 0                                           | 18 | 4,01  | 3,87 | -0,59  | 14,26  |
| 5                                            | 14 | 3,13  | 3,26 | -0,70  | 10,00  | 5                                           | 18 | 6,54  | 4,40 | 0,25   | 13,75  |
| 15                                           | 14 | 4,47  | 3,77 | -0,32  | 13,00  | 15                                          | 18 | 7,92  | 3,74 | 1,73   | 13,41  |
| 25                                           | 14 | 5,35  | 4,12 | -0,03  | 14,12  | 25                                          | 18 | 8,67  | 3,15 | 2,60   | 12,76  |
| 45                                           | 14 | 6,24  | 4,24 | 0,20   | 13,96  | 45                                          | 18 | 9,47  | 3,56 | 3,54   | 16,99  |
| 60                                           | 14 | 6,63  | 4,02 | 0,38   | 13,83  | 60                                          | 18 | 9,17  | 3,18 | 3,10   | 13,70  |
| grupo II                                     |    |       |      |        |        | grupo II                                    |    |       |      |        |        |
| t                                            | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                           | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                            | 13 | 0,99  | 0,87 | -0,13  | 2,59   | 0                                           | 13 | 4,39  | 3,97 | 0,26   | 12,44  |
| 5                                            | 13 | 2,36  | 1,88 | 0,18   | 5,26   | 5                                           | 13 | 8,82  | 4,25 | 1,74   | 13,38  |
| 15                                           | 13 | 4,28  | 2,93 | 1,10   | 10,25  | 15                                          | 13 | 9,25  | 3,49 | 3,30   | 12,45  |
| 25                                           | 13 | 5,34  | 3,63 | 1,10   | 12,33  | 25                                          | 13 | 9,95  | 2,57 | 5,07   | 13,15  |
| 45                                           | 13 | 6,43  | 3,64 | 1,82   | 12,05  | 45                                          | 13 | 10,17 | 2,16 | 5,61   | 12,83  |
| 60                                           | 13 | 6,12  | 3,98 | 0,77   | 12,70  | 60                                          | 13 | 9,82  | 2,21 | 5,99   | 12,45  |

**Anexo 5-** valores de  $O_2^-$  liberados por asmáticos para cada célula e tempo, por grupos, após corticoterapia.

| produção de $O_2^-$ para Mono esp |    |       |      |        |        | produção de $O_2^-$ para PMN esp |    |       |      |        |        |
|-----------------------------------|----|-------|------|--------|--------|----------------------------------|----|-------|------|--------|--------|
| grupo I                           |    |       |      |        |        | grupo I                          |    |       |      |        |        |
| t                                 | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                 | 19 | 0,38  | 0,30 | -0,04  | 1,12   | 0                                | 20 | 0,36  | 0,38 | -0,40  | 1,27   |
| 5                                 | 19 | 0,46  | 0,33 | 0,09   | 1,39   | 5                                | 20 | 0,50  | 0,44 | -0,26  | 1,81   |
| 15                                | 19 | 0,55  | 0,39 | -0,10  | 1,70   | 15                               | 20 | 0,71  | 0,67 | -0,11  | 2,36   |
| 25                                | 19 | 0,72  | 0,45 | -0,39  | 1,78   | 25                               | 20 | 0,86  | 0,73 | -0,10  | 2,52   |
| 45                                | 19 | 0,84  | 0,46 | 0,12   | 1,62   | 45                               | 20 | 1,20  | 0,95 | -0,25  | 3,73   |
| 60                                | 19 | 0,93  | 0,50 | 0,01   | 2,25   | 60                               | 20 | 1,35  | 1,00 | 0,10   | 3,90   |
| grupo II                          |    |       |      |        |        | grupo II                         |    |       |      |        |        |
| t                                 | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                 | 9  | 0,35  | 0,31 | -0,10  | 0,81   | 0                                | 11 | 0,61  | 0,59 | -0,05  | 1,54   |
| 5                                 | 9  | 0,45  | 0,32 | 0,09   | 0,93   | 5                                | 11 | 0,92  | 0,89 | -0,15  | 2,65   |
| 15                                | 9  | 0,55  | 0,27 | 0,20   | 0,95   | 15                               | 11 | 1,39  | 0,98 | 0,01   | 3,10   |
| 25                                | 9  | 0,68  | 0,39 | 0,14   | 1,19   | 25                               | 11 | 1,13  | 0,94 | -0,36  | 2,79   |
| 45                                | 9  | 0,80  | 0,42 | 0,16   | 1,28   | 45                               | 11 | 1,62  | 1,22 | -0,10  | 3,69   |
| 60                                | 9  | 0,91  | 0,41 | 0,29   | 1,59   | 60                               | 11 | 1,70  | 1,42 | 0,29   | 4,75   |

| produção de $O_2^-$ para Mono pma |    |       |      |        |        | produção de $O_2^-$ para PMN pma |    |       |      |        |        |
|-----------------------------------|----|-------|------|--------|--------|----------------------------------|----|-------|------|--------|--------|
| grupo I                           |    |       |      |        |        | grupo I                          |    |       |      |        |        |
| t                                 | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                 | 20 | 1,42  | 1,09 | -0,11  | 3,52   | 0                                | 20 | 4,40  | 3,52 | 0,15   | 12,83  |
| 5                                 | 20 | 3,65  | 3,04 | 0,41   | 13,10  | 5                                | 20 | 7,05  | 3,76 | 1,21   | 13,29  |
| 15                                | 20 | 4,59  | 3,10 | 0,61   | 10,59  | 15                               | 20 | 8,66  | 3,38 | 2,75   | 13,10  |
| 25                                | 20 | 5,95  | 3,32 | 0,92   | 12,00  | 25                               | 20 | 9,06  | 2,73 | 3,95   | 13,41  |
| 45                                | 20 | 6,29  | 3,37 | 0,56   | 12,29  | 45                               | 20 | 9,22  | 2,48 | 3,74   | 13,13  |
| 60                                | 20 | 7,18  | 3,19 | 1,61   | 12,32  | 60                               | 20 | 9,24  | 2,17 | 4,79   | 12,36  |
| grupo II                          |    |       |      |        |        | grupo II                         |    |       |      |        |        |
| t                                 | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                 | 9  | 0,82  | 0,54 | 0,05   | 1,80   | 0                                | 11 | 3,10  | 3,72 | -0,58  | 10,51  |
| 5                                 | 9  | 3,49  | 3,93 | 0,88   | 13,29  | 5                                | 11 | 6,03  | 3,84 | 2,20   | 12,78  |
| 15                                | 9  | 3,84  | 2,59 | 1,74   | 9,09   | 15                               | 11 | 7,74  | 3,48 | 3,24   | 12,55  |
| 25                                | 9  | 4,84  | 3,02 | 2,44   | 9,87   | 25                               | 11 | 8,56  | 2,46 | 4,37   | 12,02  |
| 45                                | 9  | 5,57  | 2,98 | 2,66   | 10,40  | 45                               | 11 | 9,34  | 1,47 | 6,82   | 11,64  |
| 60                                | 9  | 5,82  | 2,89 | 2,38   | 10,27  | 60                               | 11 | 9,27  | 1,91 | 5,88   | 11,69  |

**Anexo 6-** valores cumulativos de  $O_2^-$  liberados por asmáticos para cada célula e tempo, antes da corticoterapia, de acordo com a via de administração do esteróide.

| produção de $O_2^-$ para Mono esp<br>aerogação |    |       |      |        |        | produção de $O_2^-$ para PMN esp<br>aerogação |    |       |      |        |        |
|------------------------------------------------|----|-------|------|--------|--------|-----------------------------------------------|----|-------|------|--------|--------|
| t                                              | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                             | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                              | 10 | 0,29  | 0,33 | -0,41  | 0,78   | 0                                             | 10 | 0,26  | 0,50 | -0,66  | 1,06   |
| 5                                              | 10 | 0,38  | 0,56 | -0,93  | 1,01   | 5                                             | 10 | 0,80  | 0,62 | 0,26   | 2,42   |
| 15                                             | 10 | 0,70  | 0,48 | -0,10  | 1,42   | 15                                            | 10 | 1,29  | 1,03 | 0,50   | 3,94   |
| 25                                             | 10 | 0,97  | 0,83 | -0,39  | 2,37   | 25                                            | 10 | 1,90  | 1,34 | 0,44   | 4,61   |
| 45                                             | 10 | 1,36  | 1,16 | -0,19  | 3,35   | 45                                            | 10 | 2,77  | 2,11 | 0,52   | 6,56   |
| 60                                             | 10 | 1,52  | 1,42 | -0,12  | 4,00   | 60                                            | 10 | 2,45  | 1,99 | -0,22  | 6,40   |
| oral                                           |    |       |      |        |        | oral                                          |    |       |      |        |        |
| t                                              | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                             | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                              | 15 | 0,25  | 0,35 | -0,41  | 0,99   | 0                                             | 16 | 0,59  | 0,78 | -0,66  | 2,48   |
| 5                                              | 15 | 0,34  | 0,44 | -0,42  | 0,93   | 5                                             | 16 | 0,77  | 0,71 | -0,02  | 2,54   |
| 15                                             | 15 | 0,51  | 0,37 | -0,05  | 1,53   | 15                                            | 16 | 1,18  | 0,80 | -0,21  | 2,70   |
| 25                                             | 15 | 0,82  | 0,94 | 0,00   | 3,99   | 25                                            | 16 | 1,75  | 0,90 | 0,69   | 4,08   |
| 45                                             | 15 | 0,80  | 0,62 | -0,50  | 1,91   | 45                                            | 16 | 2,14  | 1,51 | 0,12   | 6,00   |
| 60                                             | 15 | 0,81  | 0,54 | 0,03   | 2,10   | 60                                            | 16 | 2,43  | 1,73 | 0,40   | 6,80   |
| produção de $O_2^-$ para Mono pma<br>aerogação |    |       |      |        |        | produção de $O_2^-$ para PMN pma<br>aerogação |    |       |      |        |        |
| t                                              | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                             | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                              | 9  | 1,20  | 1,51 | -0,93  | 3,90   | 0                                             | 10 | 4,13  | 4,69 | -0,59  | 14,26  |
| 5                                              | 9  | 3,08  | 3,38 | -0,70  | 10,00  | 5                                             | 10 | 8,14  | 4,74 | 1,77   | 13,38  |
| 15                                             | 9  | 4,67  | 4,01 | 0,11   | 13,00  | 15                                            | 10 | 9,92  | 3,28 | 4,96   | 13,23  |
| 25                                             | 9  | 5,44  | 4,41 | 0,76   | 14,12  | 25                                            | 10 | 10,54 | 2,03 | 6,60   | 12,57  |
| 45                                             | 9  | 6,16  | 4,35 | 1,48   | 13,96  | 45                                            | 10 | 11,74 | 2,52 | 6,77   | 16,99  |
| 60                                             | 9  | 6,79  | 4,34 | 2,29   | 13,83  | 60                                            | 10 | 11,34 | 1,85 | 6,83   | 13,70  |
| oral                                           |    |       |      |        |        | oral                                          |    |       |      |        |        |
| t                                              | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                             | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                              | 14 | 1,47  | 2,14 | -0,60  | 8,14   | 0                                             | 17 | 4,25  | 3,61 | -0,03  | 12,44  |
| 5                                              | 14 | 2,53  | 2,49 | -0,60  | 8,09   | 5                                             | 17 | 6,53  | 4,02 | 0,25   | 13,64  |
| 15                                             | 14 | 3,80  | 2,85 | -0,32  | 7,94   | 15                                            | 17 | 7,01  | 3,50 | 1,73   | 13,41  |
| 25                                             | 14 | 4,63  | 3,29 | -0,03  | 9,41   | 25                                            | 17 | 7,75  | 2,87 | 2,60   | 12,64  |
| 45                                             | 14 | 5,67  | 3,64 | 0,20   | 11,97  | 45                                            | 17 | 8,10  | 2,65 | 3,54   | 12,52  |
| 60                                             | 14 | 5,28  | 3,68 | 0,38   | 12,08  | 60                                            | 17 | 7,95  | 2,70 | 3,10   | 12,45  |

**Anexo 7-** valores cumulativos de  $O_2^-$  liberados por asmáticos para cada célula e tempo, após corticoterapia, de acordo com a via de administração do esteróide.

| produção de $O_2^-$ para Mono esp<br>aerogação |    |       |      |        |        | produção de $O_2^-$ para PMN esp<br>aerogação |    |       |      |        |        |
|------------------------------------------------|----|-------|------|--------|--------|-----------------------------------------------|----|-------|------|--------|--------|
| t                                              | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                             | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                              | 13 | 0,39  | 0,37 | -0,04  | 1,12   | 0                                             | 14 | 0,57  | 0,43 | 0,13   | 1,27   |
| 5                                              | 13 | 0,44  | 0,39 | 0,09   | 1,39   | 5                                             | 14 | 0,75  | 0,58 | -0,15  | 1,81   |
| 15                                             | 13 | 0,57  | 0,46 | -0,10  | 1,70   | 15                                            | 14 | 1,06  | 0,75 | -0,11  | 2,36   |
| 25                                             | 13 | 0,72  | 0,52 | 0,12   | 1,78   | 25                                            | 14 | 1,25  | 0,75 | 0,10   | 2,52   |
| 45                                             | 13 | 0,87  | 0,51 | 0,01   | 1,62   | 45                                            | 14 | 1,69  | 0,95 | 0,01   | 3,73   |
| 60                                             | 13 | 0,99  | 0,58 | 0,27   | 2,25   | 60                                            | 14 | 1,73  | 1,04 | 0,10   | 3,90   |
| oral                                           |    |       |      |        |        | oral                                          |    |       |      |        |        |
| t                                              | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                             | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                              | 15 | 0,35  | 0,23 | -0,10  | 0,81   | 0                                             | 17 | 0,34  | 0,49 | -0,40  | 1,54   |
| 5                                              | 15 | 0,47  | 0,27 | 0,09   | 0,93   | 5                                             | 17 | 0,57  | 0,72 | -0,26  | 2,65   |
| 15                                             | 15 | 0,53  | 0,23 | 0,20   | 0,95   | 15                                            | 17 | 0,86  | 0,93 | -0,01  | 3,10   |
| 25                                             | 15 | 0,70  | 0,34 | 0,14   | 1,25   | 25                                            | 17 | 0,71  | 0,78 | -0,36  | 2,79   |
| 45                                             | 15 | 0,79  | 0,39 | 0,16   | 1,34   | 45                                            | 17 | 1,07  | 1,07 | -0,25  | 3,69   |
| 60                                             | 15 | 0,86  | 0,34 | 0,40   | 1,59   | 60                                            | 17 | 1,26  | 1,24 | 0,29   | 4,75   |
| produção de $O_2^-$ para Mono pma<br>aerogação |    |       |      |        |        | produção de $O_2^-$ para PMN pma<br>aerogação |    |       |      |        |        |
| t                                              | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                             | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                              | 13 | 1,02  | 0,89 | -0,11  | 3,27   | 0                                             | 14 | 5,02  | 4,23 | 0,15   | 12,83  |
| 5                                              | 13 | 4,00  | 4,41 | 0,41   | 13,29  | 5                                             | 14 | 7,69  | 4,57 | 1,21   | 13,29  |
| 15                                             | 13 | 3,71  | 2,73 | 0,61   | 8,68   | 15                                            | 14 | 9,74  | 3,68 | 3,22   | 13,10  |
| 25                                             | 13 | 5,73  | 3,64 | 0,92   | 12,00  | 25                                            | 14 | 9,91  | 2,67 | 4,18   | 13,41  |
| 45                                             | 13 | 6,18  | 3,91 | 0,56   | 12,29  | 45                                            | 14 | 10,24 | 1,75 | 6,80   | 13,13  |
| 60                                             | 13 | 7,53  | 3,69 | 1,61   | 12,32  | 60                                            | 14 | 10,40 | 1,33 | 7,87   | 13,36  |
| oral                                           |    |       |      |        |        | oral                                          |    |       |      |        |        |
| t                                              | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                             | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                              | 16 | 1,40  | 1,05 | 0,05   | 3,52   | 0                                             | 17 | 3,05  | 2,77 | -0,58  | 10,51  |
| 5                                              | 16 | 3,27  | 2,05 | 0,88   | 7,18   | 5                                             | 17 | 5,87  | 2,80 | 2,66   | 12,78  |
| 15                                             | 16 | 4,87  | 3,06 | 1,74   | 10,59  | 15                                            | 17 | 7,17  | 2,71 | 2,75   | 12,52  |
| 25                                             | 16 | 5,51  | 2,95 | 2,44   | 11,73  | 25                                            | 17 | 8,03  | 2,29 | 3,95   | 12,38  |
| 45                                             | 16 | 5,97  | 2,66 | 2,66   | 11,55  | 45                                            | 17 | 8,46  | 2,15 | 3,74   | 11,64  |
| 60                                             | 16 | 6,13  | 2,51 | 2,38   | 11,02  | 60                                            | 17 | 8,30  | 2,07 | 4,79   | 11,60  |

**Anexo 8-** valores cumulativos de  $O_2^-$  liberados por indivíduos sadios para cada célula e tempo.

| produção de $O_2^-$ para Mono esp |    |       |      |        |        | produção de $O_2^-$ para PMN esp |    |       |      |        |        |
|-----------------------------------|----|-------|------|--------|--------|----------------------------------|----|-------|------|--------|--------|
| t                                 | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                 | 27 | 0,26  | 0,42 | -0,27  | 1,72   | 0                                | 29 | 0,22  | 0,51 | -0,85  | 1,38   |
| 5                                 | 27 | 0,36  | 0,42 | -0,15  | 1,77   | 5                                | 29 | 0,37  | 0,64 | -0,84  | 2,20   |
| 15                                | 27 | 0,45  | 0,42 | -0,27  | 1,66   | 15                               | 29 | 0,67  | 1,01 | -0,27  | 4,30   |
| 25                                | 27 | 0,52  | 0,47 | -0,44  | 1,79   | 25                               | 29 | 0,72  | 1,24 | -0,63  | 5,88   |
| 45                                | 27 | 0,73  | 0,53 | -0,34  | 2,11   | 45                               | 29 | 1,18  | 1,42 | -0,24  | 7,41   |
| 60                                | 27 | 0,83  | 0,50 | 0,13   | 1,74   | 60                               | 29 | 1,28  | 1,46 | -0,29  | 7,08   |
| produção de $O_2^-$ para Mono pma |    |       |      |        |        | produção de $O_2^-$ para PMN pma |    |       |      |        |        |
| t                                 | n  | média | SD   | mínimo | máximo | t                                | n  | média | SD   | mínimo | máximo |
| 0                                 | 27 | 0,57  | 0,69 | -0,25  | 2,68   | 0                                | 28 | 2,82  | 4,00 | -0,55  | 12,20  |
| 5                                 | 27 | 1,66  | 1,53 | 0,14   | 5,89   | 5                                | 28 | 4,98  | 4,76 | -0,12  | 13,50  |
| 15                                | 27 | 3,51  | 2,97 | 0,22   | 10,37  | 15                               | 28 | 7,18  | 4,48 | 0,79   | 14,67  |
| 25                                | 27 | 4,95  | 3,53 | 0,60   | 12,23  | 25                               | 28 | 8,94  | 3,34 | 2,77   | 13,63  |
| 45                                | 27 | 6,68  | 3,39 | 1,42   | 12,82  | 45                               | 28 | 10,66 | 2,14 | 4,69   | 14,24  |
| 60                                | 27 | 7,56  | 3,42 | 1,21   | 12,73  | 60                               | 28 | 10,99 | 1,59 | 7,10   | 13,26  |

## Anexo 9- Declaração de Consentimento Pós-informação

Projeto de pesquisa:

Produção de radicais livres de oxigênio em pacientes asmáticos sob corticoterapia oral e inalatória.

Responsáveis pelo estudo:

Profª Drª Maria Marluce dos Santos Vilela

Cristina Frias Sartorelli

Declaro estar ciente que este serviço está fazendo acompanhamento de crianças com asma, com idade entre 6 a 18 anos, com coleta de exames laboratoriais para avaliar o grau de inflamação pulmonar produzido por radicais livres de oxigênio e a ação dos corticosteróides sobre estas substâncias.

Estou ciente de que será coletada uma amostra de 20ml de sangue de veia periférica antes e após o tratamento instituído e de que terei que levar meu filho ao hospital para exames médicos e laboratoriais.

Fui alertada de que o estudo não implicará em nenhum gasto monetário, de que todas as informações são sigilosas e também que poderei ser informado sobre os resultados no momento em que desejar.

Sei ainda que o meu consentimento não é obrigatório e que a qualquer momento esta autorização poderá ser suspensa.

-----  
Profª Drª Maria Marluce dos Santos Vilela  
Cristina Frias Sartorelli

-----  
responsável pelo paciente

HC \_\_\_\_\_  
paciente \_\_\_\_\_  
endereço \_\_\_\_\_

responsável \_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Em caso de dúvida ligar para: comissão de ética 239-7910

Profª Drª Marluce 239-8155