

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia



Soraya El - Khatib

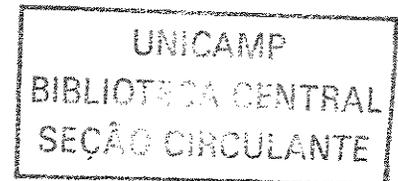
Biomarcadores de Estresse Oxidativo em Fumantes Crônicos e Indivíduos Portadores de Insuficiência Respiratória Crônica (IResC) Durante Oxigenoterapia Domiciliar Prolongada (ODP)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Soraya El - Khatib e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Molecular e Funcional, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo
Departamento de Bioquímica - IB
Unicamp

Campinas, 2003



2003.11.23

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	71 Unicamp
	EL 52b
V	EX
TOMBO BCI	55133
PROC.	16.124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	08/10/03
Nº CPD	

CM00187290-5

Biblot 297804

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

EL52b **El-Khatib, Soraya**
Biomarcadores de estresse oxidativo em fumantes crônicos e indivíduos portadores de insuficiência respiratória crônica (IResC) durante oxigenoterapia domiciliar prolongada (ODP)/Soraya El-Khatib. --
Campinas, SP:[s.n.], 2003.

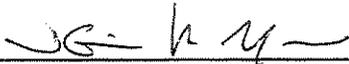
Orientadora: Denise Vaz de Macedo
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia

1.Fumantes. 2.Insuficiência respiratória. 3.Oxigênio – Uso terapêutico.
I.Macedo, Denise Vaz de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 20 de março de 2003

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo
(IB – Unicamp) – orientadora)



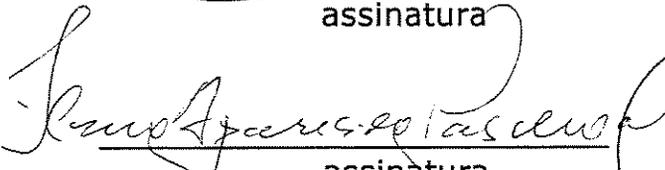
assinatura

Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
(Depto de Análises Clínicas e
Toxicológicas – USP)



assinatura

Profa. Dra. Ilma Aparecida Paschoal
(FCM – Unicamp)



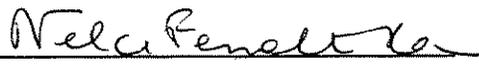
assinatura

Prof. Dr. Eduardo Mello De Capitani
(FCM – Unicamp)



assinatura

Profa. Dra. Nelci Fenalt Höehr
(FCM – Unicamp)



assinatura

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito
(IB – Unicamp)

assinatura

Profa. Dra. Lucia Pereira-da-Silva
(IB – Unicamp)

assinatura

Este trabalho foi realizado com a colaboração da Profa Dra Ilma Aparecida Paschoal e Dra. Mônica Corso Pereira (Disciplina de Pneumologia – Departamento de Clínica Médica – FCM - Unicamp). As análises estatísticas referentes à segunda fase do estudo foram realizadas com a colaboração do Prof. Dr. Guilherme Rosa (Departamento de Bioestatística – Faculdade de Medicina – Unesp – Botucatu).

“ A idéia da relação presente na vida humana, aponta-nos uma competência que além de ser construída, é também compartilhada. Uma pessoa não pode ser competente sozinha. A qualidade de seu trabalho não depende apenas dela, define-se na relação com os outros. As condições para a realização de um trabalho competente estão na competência do profissional e na articulação dessa competência com os outros e com as circunstâncias ” (Berger, 1976).



*Dedico este trabalho ao Vitor e Elson,
que me proporcionam momentos muito
felizes e me dão forças para seguir em
frente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

- À Profa.Dra. Denise Vaz de Macedo, pela confiança, amizade e paciência, a qual lhe devo muito do que sou.
- À Profa.Dra. Lucia Pereira-da-Silva pela paciência, compreensão e também pelo exemplo de pessoa dedicada que é.
- À Profa.Dra. Ilma Aparecida Paschoal pela oportunidade, confiança e assitência.
- À Dra. Mônica Corso Pereira, pelo apoio, atenção e dedicação, fatores os quais foram imprescindíveis para que pudéssemos realizar este trabalho.
- À Profa.Dra. Ana Maria Camino pelo apoio e atenção.
- Aos enfermeiros Cecília e Edson os quais estavam sempre prontos para resolver os problemas referentes às coletas das amostras.
- Às assistentes sociais Mônica e Laura, as quais contribuíram para que pudesse ter um contato mais próximo com os pacientes quando estes estavam ausentes.
- Aos meus amigos do LABEX: Agnes, Cláudio, Daniel, Fernando, Fernanda, Leonardo, Lucas, Neto, Rodrigo, Paulo e em especial ao Armindo, pela cooperação e oportunidade de conviver com uma pessoa que tem tanto a acrescentar em nossas vidas.
- Ao Prof. Dr. Guilherme Rosa por contribuir com os preciosos tratamentos estatísticos dos dados.
- Aos meus alunos pelo constante estímulo.
- À Profa.Dra. Nelci Fenalt Hoehr pelo incentivo.
- À Profa.Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito pelas sugestões e correções.

- Ao Eduardo e Daniela pelo apoio.
- Ao Luiz Fabrizio pela ajuda na construção dos gráficos.
- À Patrícia pelas concessões.
- Às secretárias Marina e Andréia, Margareth e Vera pela paciência e atenção.

Em especial:

- À minha mãe Leda Maria C. El- Khatib (*in memmorian*), que plantou muitas sementes mas infelizmente o destino não deixou-a colher muitos dos seus frutos em vida.
- Ao meu pai Nizar El- Khatib, grande companheiro, o qual lhe devo pelos preciosos ensinamentos.
- Aos meus irmãos Tarek, Simone e sobrinho Thamer pela cumplicidade, amizade e amor.
- Aos meus tios Omar e Mariluci, por estarem sempre presentes nos momentos mais importantes da minha vida.
- À Angélica por compartilhar nossas alegrias e tristezas.
- À toda minha família, pelo apoio e incentivo.
- Aos pacientes, fontes intermináveis de aprendizado; sem eles, este trabalho seria inviabilizado.

À todos, muito obrigada.

ÍNDICE

Capa	i
Ficha Catalográfica	ii
Banca Examinadora	iii
Colaboração	iv
Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Índice	viii
Índice de Figuras e tabelas	ix
Abreviações	x
Resumo	xi
Abstract	xii
Introdução	1
I. O pulmão	1
II. Insuficiência Respiratória Crônica	8
III. Radicais Livres e Sistema de Defesa Antioxidante	11
IV. Radicais Livres X DPOC	14
V. Biomarcadores de Estresse Oxidativo em portadores de DPOC	25
Objetivos	27
Materiais e métodos	28
- Escolha dos Pacientes	28
- Características dos Pacientes avaliados durante o estudo	29
- Procedimentos Experimentais	30
- Análise Estatística	34
Resultados	36
- Caracterização dos pacientes antes do tratamento diário com Oxigênio por tempo prolongado	36
- Análise dos marcadores nos pacientes com IResC após sete dias de tratamento diário com oxigênio por tempo prolongado	38
- Análise dos marcadores nos pacientes com IResC entre sete e duzentos e setenta dias de tratamento diário com oxigênio por tempo prolongado	41
- Apresentação gráfica dos resultados	44
Discussão	48
- Biomarcadores de estresse oxidativo e outros associados a IResC antes e após sete dias de ODP	48
- Biomarcadores de estresse oxidativo e outros associados a IResC após duzentos e setenta dias de ODP	54
Bibliografia	57
Anexos	69
- Anexo I	70
- Anexo II	71
- Anexo III	72
- Anexo IV	73
- Anexo V	74
Apêndice	75

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1	2
Figura 2	3
Figura 3	6
Figura 4	14
Figura 5	22

TABELAS

Tabela I	36
Tabela II	37
Tabela III	38
Tabela IV	40
Tabela V	41
Tabela VI	42
Tabela VII	43

GRÁFICOS

Gráfico 1	44
Gráfico 2	44
Gráfico 3	45
Gráfico 4	45
Gráfico 5	46
Gráfico 6	46
Gráfico 7	47
Gráfico 8	47

ABREVIÇÕES

ATP: adenosina trifosfato

ADP: adenosina difosfato

AU: ácido úrico

BHT: Butil Hidroxi Tolueno

CAT: catalase

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

DTNB: 5,5 Ditiobis (2 ácido nitrobenzóico)

ELF: fluido do revestimento epitelial

EROS: espécies reativas de oxigênio

FC: fumante crônico

GR: glutathione redutase

GPX: glutathione peroxidase

GST: grupo de sulfidril total

γ GCS: glutamyl cisteamine sintase

IResC: insuficiência respiratória crônica

ICC: insuficiência cardíaca congestiva

NF: não fumante

ODP: oxigenioterapia domiciliar prolongada

PC: proteína carbonilada

PO₂: pressão parcial de oxigênio

PCO₂: pressão parcial de gás carbônico

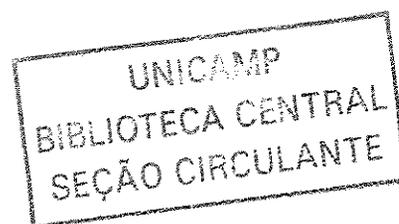
PMN: leucócitos polimorfonucleares

SaO₂: saturação arterial de oxigênio na gasometria

SpO₂: saturação por oximetria de pulso

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

VEF₁: volume expiratório forçado no primeiro segundo



RESUMO

Este trabalho consistiu em avaliar biomarcadores de estresse oxidativo em portadores de Insuficiência Respiratória Crônica (IResC) em três momentos: antes, após 7 e ao longo de 270 dias de oxigenioterapia domiciliar prolongada (ODP). Medimos as atividades das enzimas catalase (CAT) e glutatona redutase (GR) no hemolisado, as concentrações de hemoglobina, lactato e ácido úrico (AU) no sangue total e as concentrações de grupamentos sulfidrilas totais (GST) e proteínas carboniladas (PC) no plasma desses pacientes por método espectrofotométrico. A saturação de oxigênio (SpO₂) no sangue foi medida através de oxímetro de pulso. Comparamos, num primeiro momento indivíduos fumantes com pacientes com IResC e ambos com o grupo controle, de não fumantes. Observou-se que embora os dois grupos possuam níveis aumentados de estresse oxidativo, este foi muito maior no grupo IResC, representado principalmente pela diminuição nas atividades das enzimas CAT, GR e concentração plasmática de GST. Após sete dias de tratamento com oxigênio houve um aumento na SpO₂ ($P<0,05$), CAT, GR e AU ($P<0,05$). Por outro lado, a concentração de GST manteve-se diminuída nesse período ($P<0,05$). Os dados referentes aos pacientes submetidos a ODP ao longo de 270 dias mostraram que somente a atividade da GR apresentou-se significativamente diminuída nesse período ($P<0,05$), indicando que a hipoxemia crônica produz efeitos prejudiciais que não são revertidos com a administração prolongada de oxigênio, que não é capaz, portanto de impedir a evolução clínica da doença.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate several biomarkers of oxidative stress in patients with Chronic Respiratory Insufficiency (CResI) at three moments: before, after 7 and 270 days of Long Term Oxygen Therapy (LTOT). The blood catalase (CAT), and glutathione reductase (GR), the Hemoglobin (Hb), lactate and Uric Acid concentration (AU) in total blood were measured. The total sulphhydryls (TSH) and Protein carbonyls concentration were measured in plasma in these patients, using spectrophotometric techniques. The blood oxygen saturation (SpO₂) was evaluated using a pulse oxymeter. When compared Chronic Smokers (CS) with CResI group and both with Nonsmokers group (NS) observed that CResI group presented an increase in oxidative stress level, represented for decrease of three biomarkers: CAT, GR and TSH. After 7 days of LTOT the SpO₂, CAT and GR activity and AU concentration were increased ($P < 0,05$). On the other hand, the decrease on GST concentration was maintained in this period ($P < 0,05$). The patients submitted of 7 to 270 of LTOT showed a significant decrease on GR activity ($P < 0.05$). These results showed that the major level of oxidative stress in patients with CResI happened probably as consequence of chronic hypoxemia and the LTOT was not able to block the clinic evolution of disease.

INTRODUÇÃO

I. O pulmão

Na mitologia dos antigos gregos *pneuma*, ou respiração, era um espírito invisível, que dava vida a seu possuidor. Para as pessoas saudáveis a respiração é tomada como certa, pois é realizada quase sem esforço e na maior parte do tempo sem percepção consciente. Para aqueles que apresentam doenças pulmonares, cada incursão respiratória pode ter que ser duramente conquistada. Sabe-se que as doenças respiratórias ou pulmonares, na maioria das vezes, são desenvolvidas como consequência da inalação de ar contaminado. A má qualidade do ar é considerada um problema exclusivamente moderno, mas as autópsias de egípcios mumificados e os corpos congelados de inuitis pré-históricos recuperados no Alasca mostraram que a inalação de partículas de areia e de fumaça das fogueiras já causava doenças pulmonares muito antes da revolução industrial (Elsner et al., 1983). O conhecimento da morfologia pulmonar é essencial para a compreensão das diversas doenças que afetam os pulmões. Qualquer alteração morfológica que ocorra no pulmão poderá afetar as trocas gasosas entre oxigênio (O_2) e gás carbônico (CO_2), uma vez que é neste órgão que acontecem essas trocas.

Aspectos anatômicos e funcionais

O sistema respiratório liga o sistema circulatório à atmosfera, e com isso obtém o O_2 necessário para a produção de ATP nas células, sendo responsável também pela eliminação do CO_2 gerado durante o metabolismo oxidativo. As trocas gasosas em alguns anfíbios ocorrem pela difusão através da pele (respiração cutânea), e são suficientes para sustentar o metabolismo desses animais. Se o mecanismo das trocas gasosas nos seres humanos fosse o mesmo, o metabolismo desses requeria uma área de superfície corporal tão grande, que todo o plano corporal teria que ser diferente, a ponto de se tornar irreconhecível. Os pulmões constituem apenas uma pequena percentagem da massa corporal total, mas contém

em sua estrutura a grande superfície necessária para as trocas gasosas difusionais (Figura 1) (Crystal, et ali, 1991 ; Weibel, 1996).

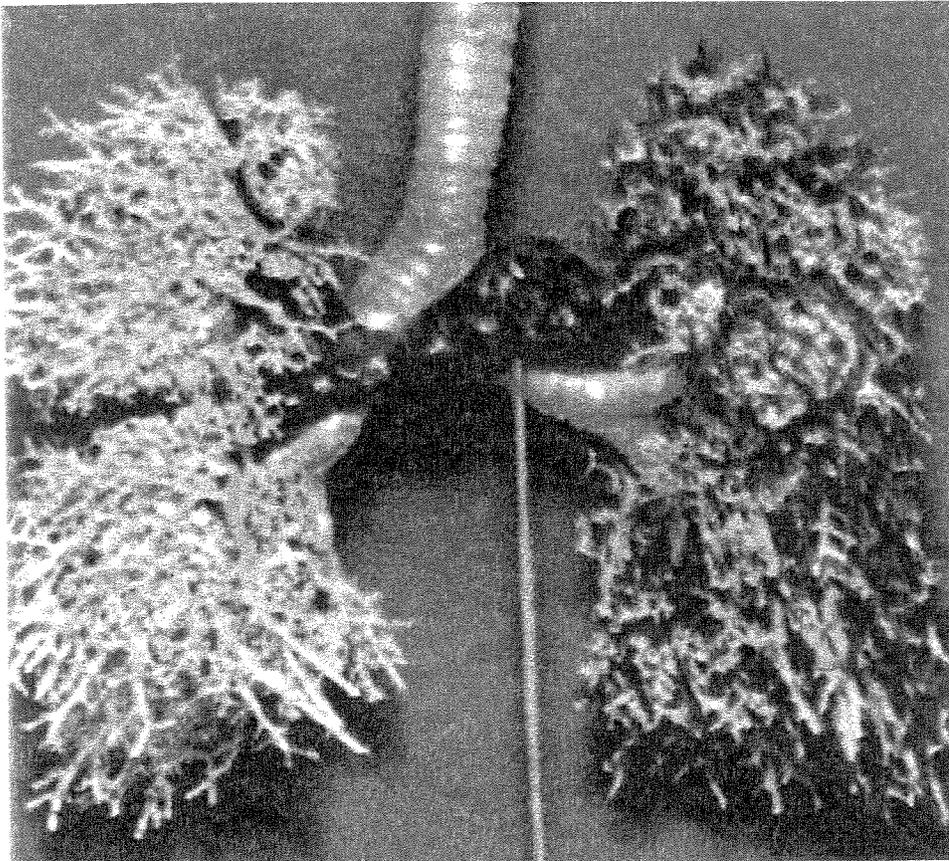


Figura 1. Localização anatômica dos pulmões direito e esquerdo (visão anterior).

A traquéia bifurca-se em dois brônquios principais (brônquios de 1ª ordem) que, a seguir, dão origem a dois brônquios lobares à esquerda e três à direita. A árvore brônquica é constituída pelos brônquios lobares que dão origem a cerca de vinte brônquios segmentares (brônquios de médio calibre), que têm aproximadamente 4 a 7 mm de diâmetro. Brônquios menores (0,8 a 4 mm de diâmetro) surgem a seguir, sucedidos pelos bronquíolos. Brônquios com diâmetro interno de 1 mm surgem em torno da 15ª - 16ª ordem de ramificação. O bronquíolo mais distal, que não tenha um alvéolo originário de suas paredes, é definido como

bronquíolo terminal. Os bronquíolos terminais estão aproximadamente na décima-sexta ordem de ramificação e dão origem aos bronquíolos respiratórios. O principal local onde ocorrem as trocas gasosas é no ácino, unidade funcional do pulmão que se situa distalmente a um bronquíolo terminal. Define-se ácino como sendo a unidade estrutural pulmonar distal presente em um único bronquíolo terminal, surgindo por volta da 18ª ordem de ramificação. O ácino é composto por três ordens de bronquíolos respiratórios, três a quatro ordens de ductos alveolares e uma ordem de sacos alveolares, constituindo a zona respiratória. Os pulmões contêm 300 milhões de alvéolos, onde passam os capilares sanguíneos trazendo o sangue para a troca gasosa entre O_2 e CO_2 , processo conhecido como hematose (Figura 2) (Crystal et ali,1991; Weibel, 1996).

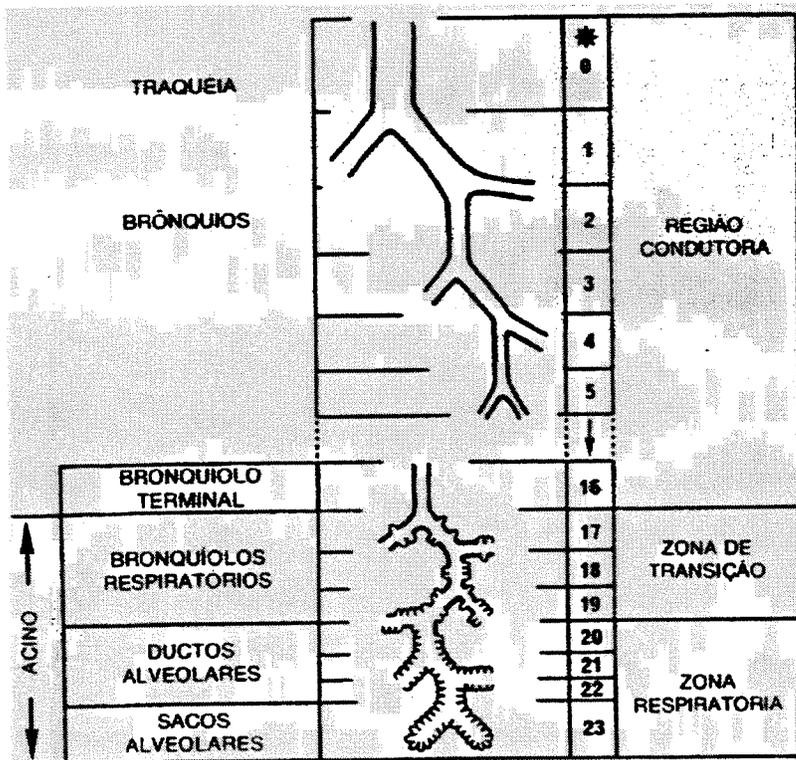


Figura 2 Representação em diagrama das zonas condutoras, transitórias e respiratórias dos condutos aéreos e componentes de um ácino. (Modificado por Weibel, E.R.: Morphometry of the human lung).

Respiração Celular

Na maioria das células o O_2 é reduzido a H_2O quando as coenzimas na forma reduzida $NADH + H^+$ (nicotinamina adenina dinucleotídeo) e $FADH_2$ (flavina adenina dinucleotídeo), formadas em conjunto com CO_2 no ciclo de Krebs e também na β -oxidação de ácidos graxos, são concomitantemente reoxidadas pelos complexos protéicos presentes na cadeia respiratória, localizada na membrana mitocondrial interna. O gradiente de prótons ($\Delta\mu H^+$) gerado por essas reações de óxido redução permite a conseqüente formação de ATP (adenosina trifosfato) pelo processo de fosforilação oxidativa. Desta forma, a respiração tem como principais objetivos o fornecimento de O_2 aos tecidos e a remoção do CO_2 formado pelas reações do catabolismo celular. Para que isso aconteça, colaboram quatro eventos principais:

- Ventilação pulmonar:

Qualquer circunstância que impeça o pulmão de desempenhar suas funções relacionadas à hematose (captação de O_2 a partir do ar atmosférico e eliminação de CO_2) leva a insuficiência respiratória. Para que a hematose aconteça, a renovação do ar alveolar deve ser regular, proporcional a freqüência respiratória e adaptada às necessidades do organismo. Esta função, também chamada de ventilação, depende de mecanismos neurais íntegros, músculos contraindo de modo apropriado e com força necessária, e ainda, conformação torácica normal. O músculo mais importante para a ventilação é o diafragma. Ele é responsável por 70% do volume corrente (volume de ar que entra nos pulmões a cada movimento inspiratório) e, ao contrair, reduz sua convexidade no interior do tórax, aumentando assim o diâmetro crânio-caudal da caixa torácica. Este aumento no volume do tórax faz com que a pressão intra-torácica, que já é sub - atmosférica fique ainda mais baixa e o ar é aspirado para o interior das vias aéreas. Qualquer interferência neste processo pode interromper ou diminuir a renovação do ar dos alvéolos (West, 1996).

Nossa atmosfera é composta principalmente de nitrogênio (N_2), O_2 e quantidades muito pequenas de outros gases. O O_2 compreende 20,93% do ar que respiramos, ao passo que o N_2 participa com 79,03%. O equilíbrio entre as necessidades teciduais e os processos de troca gasosa pulmonar é proporcionado

pelos tensões dos gases no sangue arterial. Normalmente, ao nível do mar, onde a pressão atmosférica é de aproximadamente 760 mm Hg, a pressão parcial de gás carbônico (PCO_2) alveolar é de aproximadamente 40 mmHg e a pressão parcial de oxigênio (PO_2) alveolar 100 mmHg, para uma pressão de vapor d'água de 47mmHg. Estes valores estão bem próximos aos da PCO_2 e PO_2 arterial (a 37°). Esta condição de equilíbrio entre as PCO_2 e PO_2 alveolar e arterial é essencial para uma ventilação pulmonar adequada. A comparação entre as tensões de O_2 alveolar e arterial proporciona, freqüentemente, uma informação útil para avaliação da natureza e amplitude de possíveis anormalidades que podem ocorrer nas trocas gasosas, pois a pressão necessária para mover o ar para dentro e para fora dos pulmões fica seriamente comprometida nas enfermidades pulmonares (Cuello et ali., 1987; Zin et ali., 1995).

- Regulação da ventilação:

A ventilação pulmonar é regulada pelo estado químico do sangue, particularmente pela PCO_2 , que é percebida pelos quimiorreceptores do bulbo, e pela diminuição da PO_2 , controlada pelos corpúsculos carotídeos e aórticos. O Sistema Nervoso Central (SNC) ajusta o valor da ventilação pulmonar quase que exatamente às demandas do corpo, de modo que a PO_2 e a PCO_2 são pouco alteradas, mesmo durante o exercício extenuante ou em alguns tipos de estresse respiratório (West, 1996).

- Difusão de O_2 e CO_2 entre os alvéolos e o sangue (hematose):

Após a ventilação, a etapa seguinte do processo respiratório é a difusão do O_2 dos alvéolos para o sangue pulmonar e do CO_2 em direção oposta, do sangue pulmonar para os alvéolos. Os gases O_2 e CO_2 se movimentam por difusão da área de alta para a de baixa pressão, até atingir o equilíbrio entre o sangue e os alvéolos pulmonares.

A concentração de O_2 nos alvéolos, bem como sua pressão parcial, é controlada de duas formas; primeiro, pela velocidade de absorção do O_2 para o sangue e segundo, pela velocidade de entrada de novo O_2 para os pulmões pela ventilação. Da mesma forma o CO_2 formado continuamente no organismo é descarregado nos alvéolos, sendo removido destes através da expiração. Os dois

fatores que determinam a concentração alveolar de CO_2 e da PCO_2 são: velocidade de eliminação do CO_2 do sangue venoso e velocidade em que o CO_2 é removido dos alvéolos pela ventilação alveolar.

A distribuição proporcional de ar e sangue para cada um dos milhões de alvéolos é fundamental. Falhas nesta proporcionalidade levarão ao aparecimento de alvéolos pouco ou não ventilados porém perfundidos, defeitos estes denominados de shunt pulmonar (nas alterações relativas, com pouca ventilação e perfusão normal) e shunt pulmonar verdadeiro (nas alterações absolutas, com total ausência de ventilação). De modo similar, a perfusão sanguínea nos alvéolos pode estar ausente ou relativamente diminuída, produzindo as alterações identificadas como efeito espaço morto funcional (West, 1996).

- Transporte de O_2 e CO_2 no sangue e nos líquidos corporais para dentro e fora das células:

Uma vez que o O_2 tenha se difundido nos alvéolos, o transporte de O_2 dos pulmões para os tecidos é efetuado pela hemoglobina (Hb), proteína presente nas hemácias dos organismos pluricelulares complexos. O O_2 também é transportado em pequena quantidade dissolvido no plasma; esta quantidade depende da PO_2 e da solubilidade do O_2 . Por outro lado, o CO_2 produzido nos tecidos pelo metabolismo oxidativo é convertido em H_2CO_3 (ácido carbônico), que se ioniza em HCO_3^- (bicarbonato) e H^+ dentro das hemáceas. O HCO_3^- deixa a hemácea e é transportado no plasma para os pulmões onde, através de reações reversíveis é eliminado como CO_2 . Os íons H^+ são removidos pela Hb que, além de transportar O_2 também exerce efeito tampão, contribuindo para que os íons H^+ não alterem o pH sanguíneo. Uma pequena parte de CO_2 é transportado dissolvido no sangue.

Uma molécula de Hb totalmente oxigenada contém quatro moléculas de O_2 (uma em cada grupo heme) e é denominada oxihemoglobina (HbO_2). A curva de dissociação da HbO_2 é sigmoide, devido ao mecanismo de cooperatividade. Este mecanismo proporciona uma resposta mais sensível às variações na concentração de O_2 . No sangue arterial que deixa os pulmões, a PO_2 é alta (100 mmHg) e a Hb fica 98% saturada com O_2 . Esta situação se altera nos tecidos onde o O_2 é liberado da Hb (West, 1996) (figura 3).

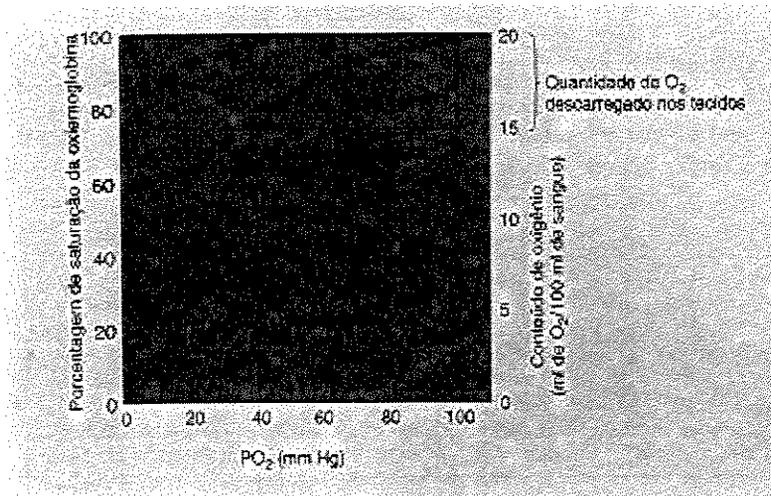


Figura 3. Curva de dissociação da oxihemoglobina. Mostra a relação entre PO₂ no sangue arterial e a saturação relativa da Hb com O₂.

O pulmão como órgão de defesa

A superfície respiratória possui 70-80 m² de extensão e representa a mais ampla superfície corpórea em contato direto com o ambiente externo. Os pulmões humanos ventilam ar contendo não apenas O₂, mas também quantidades elevadas de substâncias presentes no ambiente. Entre elas estão substâncias potencialmente patogênicas para o organismo como bactérias, vírus, substâncias sob a forma de corpúsculos inertes, partículas orgânicas, gases irritantes e tóxicos. Normalmente distinguem-se os mecanismos de defesa do pulmão em *atividades mucociliar, fagocitária (macrofágica) e imunitária (humoral e celular)*.

A *atividade mucociliar* representa a mais notável entre as modalidades de proteção das vias aéreas. Está ligada ao movimento ciliar e ao muco produzido pelas células caliciformes e glândulas túbulo-acinosas da traquéia e brônquios. Na ausência do muco o movimento ciliar seria ineficaz. Também por ineficiência deste movimento, o tapete mucoso (distribuição do muco sobre as extremidades dos cílios) seria submetido a profundas modificações, capazes de alterar suas funções fundamentais que são hidratação das vias aéreas, captação e transporte das partículas inaladas presentes no ar e eliminação biológica.

A *atividade fagocitária ou macrófaga* é exercitada principalmente pelos macrófagos alveolares (MA), células particularmente capazes de exercer as funções de captação e de fagocitose de corpúsculos inorgânicos, orgânicos ou também de células bacterianas. Os restos celulares oriundos da resposta macrófaga frente a microorganismos, produzem modificação das características do epitélio pulmonar originando o muco. As secreções brônquicas (contendo imunoglobulinas tipo IgA secretoras), macrófagos alveolares, linfócitos do tipo T (timo-dependentes), B (bursa-dependentes) e N (*null*) são responsáveis pela *atividade imunitária pulmonar (humoral e celular)*. (Mead,1996).

Além desses mecanismos de defesa, o pulmão apresenta antioxidantes no fluido que reveste o trato respiratório (ELF) como mucina, glutathione reduzida (GSH), ácido úrico (AU), proteínas (principalmente albumina) e ácido ascórbico. Estes antioxidantes exercem um papel de defesa importante nos pulmões contra xenobióticos e oxidantes presentes principalmente na fase gasosa do cigarro, constituindo a primeira linha de defesa nos pulmões (Chow, 1993; Eiserich et ali., 1995; Rahman and MacNee, 1996). A proteção eficaz das vias aéreas deriva da perfeita integração entre todos estes mecanismos de defesa.

II. Insuficiência Respiratória Crônica (IResC)

Definições

Qualquer circunstância que impeça o pulmão de desempenhar suas funções relacionadas a hematose leva a insuficiência respiratória. Muitas doenças pulmonares e extra-pulmonares podem levar a uma incapacidade de manutenção de trocas gasosas adequadas que perdura por meses ou anos (eventualmente muitos anos). Estes indivíduos conseguem encontrar um novo estado de equilíbrio dinâmico e permanecerem vivos, apesar das grandes limitações impostas pela doença. A progressão da doença pode fazer com que o indivíduo acometido tenha dispnéia até durante as atividades da vida diária. A IResC possui várias causas, sendo que a principal delas é a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC).

A American College of Chest Physicians (ACCP) e American Thoracic Society (ATS) define DPOC como obstrução crônica do fluxo aéreo pulmonar induzida por bronquite crônica ou enfisema, embora haja uma grande dificuldade de distinguir as duas doenças, pois elas podem coexistir em alguns pacientes. A DPOC é uma doença complexa, caracterizada pela obstrução do fluxo aéreo progressiva, com conseqüente diminuição no volume expiratório forçado no primeiro segundo (FEV_1), que pode estar associada a uma hiperrreatividade brônquica. É também freqüente a exacerbação da doença, devida principalmente à susceptibilidade desses pacientes a infecções bacterianas recorrentes (ACCP and ATS, 1975; Fletcher and Pride, 1984).

Bronquite crônica é definida pela ACCP e ATS como produção diária excessiva de muco e tosse produtiva por no mínimo três meses em 2 anos consecutivos, ocasionando um estreitamento persistente e difuso das vias aéreas pulmonares, o que determina um aumento na resistência ao fluxo aéreo. Esta obstrução pode ser causada tanto por inflamação dos espaços aéreos como por infecção bacteriana freqüente (ACCP and ATS, 1975).

Os pacientes com *enfisema* apresentam uma alteração anatômica do pulmão, caracterizada pelo aumento anormal dos espaços aéreos distais dos bronquíolos terminais, acompanhada por alterações destrutivas das paredes alveolares. Este processo ocorre devido à destruição de elastina, a proteína responsável pela manutenção da elasticidade das paredes alveolares. A perda da elastina também causa colapso alveolar e estreitamento dos bronquíolos, limitando o fluxo aéreo no pulmão. Pacientes com enfisema de origem hereditária apresentam deficiência de α_1 -antitripsina, enzima responsável por inibir a elastase (enzima que degrada elastina). Um desbalanço entre elastase e α_1 -antitripsina também ocorre em pacientes que apresentam enfisema desencadeado pelo fumo (ACCP and ATS, 1975; Petty, 2002).

Na DPOC, além da perda de elasticidade das paredes dos bronquíolos e alvéolos, a passagem do ar através dos bronquíolos se torna prejudicada pela presença de muco e estenose cicatricial das vias aéreas. Estes fatores impedem a saída de ar dos alvéolos. Este processo é conhecido como 'air trapping' ou aprisionamento de ar, tem como conseqüências a hipoventilação pulmonar com

diminuição da PO_2 , levando a uma condição de hipóxia. As principais causas da hipóxia no indivíduo que apresenta DPOC são:

- Existência de alvéolos pouco ventilados devido a estenose cicatricial dos bronquíolos e do acúmulo de muco. Esta alteração recebe o nome de desproporcionalidade entre ventilação e perfusão (ventilação é menor que perfusão).

- Alterações mecânicas, levando à hipoventilação global devido ao aumento do volume do pulmão, levando ao relaxamento da cúpula diafragmática.

Etiologia

A etiologia da DPOC ainda não foi totalmente caracterizada, mas acredita-se que sua principal causa seja a inativação de antiproteases pelos oxidantes existentes na fumaça do cigarro como o óxido nítrico (NO) e os produzidos por células fagocitárias, como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (MacNee, 2000). O hábito de fumar, portanto, é o principal fator para o desenvolvimento da DPOC, e deixar de fumar é a primeira conduta terapêutica que deve ser tomada com estes pacientes. Cerca de 85% dos casos de bronquite crônica e enfisema estão relacionados ao tabagismo crônico, sendo que 15% destes casos podem evoluir para um quadro clínico grave. Apenas 2% dos casos são de origem hereditária (deficiência de α_1 -antitripsina) e o restante (10%) está associado a diversos outros fatores como poluição atmosférica, poluentes profissionais e infecções respiratórias (STS Statement, 1995). O fumo contribui para o desenvolvimento de muitas outras doenças além da DPOC, como câncer e doenças coronarianas. Entretanto, é importante observar que nem todos os fumantes desenvolvem DPOC. A suscetibilidade genética parece ser um fator significativo, que explica porque somente 15 a 20% dos fumantes desenvolvem DPOC (Sandford et alii, 1997; Silverman, 2002).

Epidemiologia

Segundo Stephen (2002), atualmente a DPOC é considerada a 6ª causa de morte e a 12ª de morbidade no mundo, afetando cerca de 20 a 30 milhões de pacientes nos Estados Unidos, o que significa dizer que aproximadamente 4% a 6% dos homens adultos e 1% a 3% das mulheres adultas americanas apresentam DPOC. Nos últimos 15 anos, o número de pacientes com DPOC aumentou 42% naquele País. Em 2020 estima-se que a DPOC passe a ser a 3ª causa de morte. Stephen aponta ainda a DPOC como sendo um grande desafio para a indústria farmacêutica, medicina e sociedade (Stephen, 2002). Dados dos países europeus indicam que a prevalência desta doença é mais alta que nos Estados Unidos. Por outro lado, dados recentes do Consenso Latino Americano de Exacerbação Aguda de Bronquite Crônica sugerem que a incidência desta doença é ainda maior nos países Sul Americanos do que na Europa ou nos Estados Unidos.

O índice de mortalidade para DPOC é similar para homens e mulheres com idade até 55 anos. Aos 70 anos morrem duas vezes mais homens que mulheres e aos 85 anos, a morte entre homens é quatro vezes mais freqüente que nas mulheres. Pacientes com DPOC moderada a grave podem apresentar de 3 a 6 infecções por ano. Estas exacerbações têm um grande impacto na qualidade de vida destes pacientes, pois sua freqüência é um fator importante na determinação da gravidade da doença. A causa de uma exacerbação pode ser multifatorial e é acompanhada por inflamação dos espaços aéreos pulmonares. Exacerbações agudas de DPOC estão associadas a visitas freqüentes ao médico e hospitalizações. O custo anual para tratar DPOC nos Estados Unidos é estimado em 24 bilhões de dólares, incluindo hospitalizações e perda de dias de trabalho (Stephen, 2002).

III. Radicais Livres de Oxigênio e Sistema de Defesa Antioxidante

Define-se como radical livre toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados, o que implica em maior reatividade, pois necessitam de elétrons para se estabilizarem. Nesta definição, pode-se incluir os átomos de metais de transição e também o O_2 . O O_2 , no seu estado fundamental, possui dois elétrons

desemparelhados de spin iguais. Devido a esta característica, para o O_2 oxidar outro átomo ou molécula, ambos deveriam ser de spin também iguais. Biomoléculas como lipídios, carboidratos, proteínas e DNA são espécies não radicalares, com grande número de ligações covalentes, podendo ser alvos do ataque de radicais livres (Halliwell and Gutteridge, 1998).

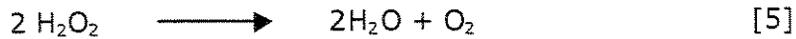
As EROS são resultado de reduções incompletas do O_2 molecular e incluem um amplo espectro de espécies radicalares, como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila ($\cdot OH$) e não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O caminho para a formação de EROS começa geralmente com a redução monoelétrica do O_2 , com formação do $O_2^{\cdot-}$ (reação 1), que pode ocorrer na cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, células fagocitárias, durante o processo de isquemia/reperfusão, entre outros locais. Dois desses radicais dismutam-se espontaneamente ou sofrem ação da enzima superóxido dismutase. Esta semi reação consome prótons e produz H_2O_2 (reação 2). O H_2O_2 atravessa membranas celulares facilmente e ao receber mais um elétron, proveniente do Fe^{2+} ou Cu^+ origina o $\cdot OH$ (reação 3), uma das espécies radicalares mais reativas que se conhece, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar (Boveris and Chance, 1972).



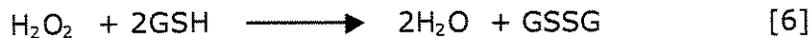
Da mesma forma que durante a evolução a maioria dos organismos vivos passou a utilizar o O_2 como elemento fundamental no processo de produção de energia, também foi desenvolvido um complexo sistema de proteção contra suas ações deletérias (Halliwell and Guteridge, 1998). O sistema de defesa do organismo contra os radicais livres age nos diferentes locais de produção dos mesmos, atacando as substâncias iniciadoras, neutralizando intermediários reativos ou ainda protegendo o transporte e estocagem de metais de transição. Podemos dividir o sistema antioxidante em dois grupos: enzimático e não-enzimático.

Fazem parte do *sistema antioxidante enzimático* pulmonar as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), as quais agem sobre $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 ,

respectivamente (reações 4 e 5) e o sistema da glutathiona peroxidase (GPX) e redutase (GR).



A GPX, constitui o principal mecanismo de defesa antioxidante intra e extracelular no pulmão (MacNee and Rahman, 1999). A GPX é uma enzima dependente de selênio, e decompõe peróxidos às custas do tripeptídeo glutathiona reduzida (GSH) (reação 6) e depende da ação simultânea da enzima glutathiona redutase (GR), que catalisa a redução do tripeptídeo oxidado (GSSG) pela reação 6, utilizando NADPH como doador de elétrons (reação 7). Este complexo sistema enzimático é conhecido como ciclo redox da glutathiona. Este ciclo, além do H_2O_2 age eliminando peróxidos lipídicos, hidroperóxidos e produtos das reações catalisadas pelas lipoxigenases (Halliwell and Gutteridge, 1998).



O espaço extracelular é, ao contrário do intracelular, pouco dotado de enzimas antioxidantes, tendo que contar com outros mecanismos para controlar o dano oxidativo à superfície do endotélio pulmonar, uma área muito vasta e, portanto, de alto risco de agressão por poluentes ambientais, fumo e produtos da inflamação. Dessa forma, as vias aéreas maiores contêm mucoproteínas de alto peso molecular, sintetizadas pelas células epiteliais e pelas glândulas secretoras, que aumentam a produção de muco na presença de inflamação, podendo proteger os pulmões contra agressões por oxidantes. O espaço alveolar pode recrutar recursos antioxidantes do fluido que reveste o epitélio; este contém grandes quantidades de GSH (cerca de 100 vezes a concentração do plasma), suficiente para proteger contra o H_2O_2 gerado pelos macrófagos alveolares quando estimulados. A CAT também está presente no fluido epitelial em grande quantidade. Outros antioxidantes tais como ceruloplasmina, transferrina, ácido ascórbico, vitamina E, ferritina e outros estão presentes em baixas concentrações (Chaudière and Ferrari-Iliou, 1999). Nas últimas décadas a N-acetilcisteína (NAC) tem

despertado muito interesse como agente terapêutico para as doenças broncopulmonares. Vários estudos têm demonstrado a sua eficácia em reduzir as exacerbações da bronquite crônica. Este efeito pode se atribuir, além de suas propriedades mucolíticas, às suas propriedades antioxidantes por conter grupos SH. Também tem se postulado que a NAC protege as células pulmonares dos oxidantes inalados ou daqueles gerados pela explosão respiratória por aumentar os teores de glutatona tanto extra como intracelular (Cotgreave et. ali., 1986).

Todo desbalanço entre produção de oxidantes e defesa antioxidante, gera uma situação conhecida como estresse oxidativo.

IV. Radicais livres X DPOC

A Figura 4 mostra as principais fontes geradoras de radicais livres no pulmão. São elas o fumo, as células fagocitárias, o processo hipóxia/reperfusão e a oxigenioterapia, sendo que as principais espécies reativas formadas são $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, $\cdot NO$ e $OCl\cdot$.

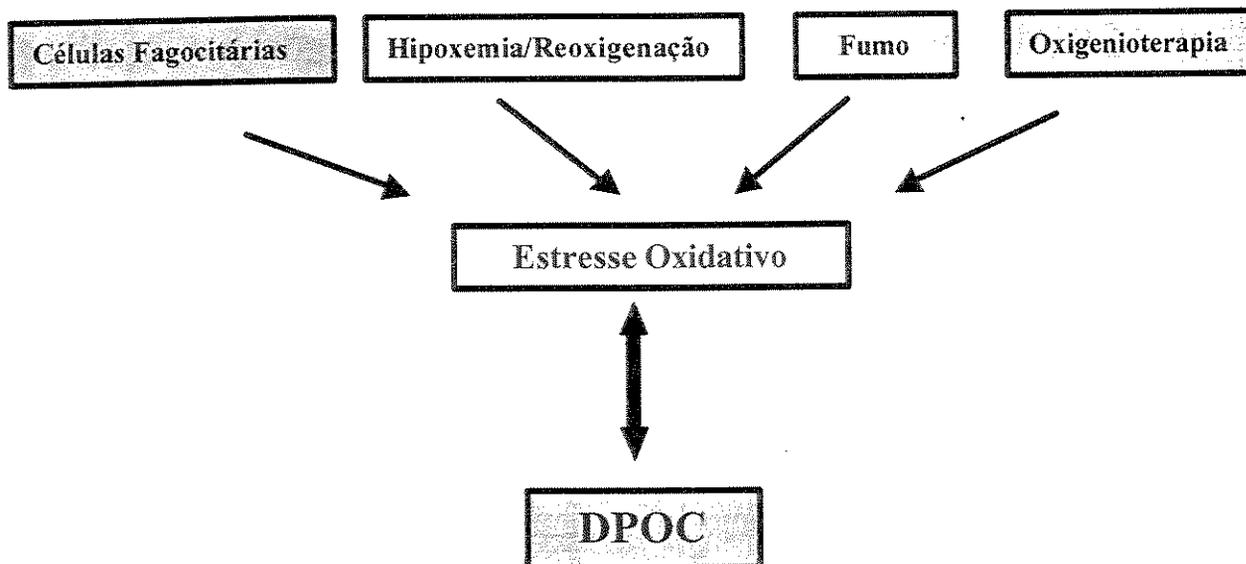


Figura 4. Fontes produtoras de radicais livres que contribuem para o desenvolvimento de DPOC.

Fumo

Os efeitos do cigarro têm sido correlacionados com a patogênese da DPOC, pois a fase gasosa do cigarro contém aproximadamente 10^{17} oxidantes por tragada. Existe a proposta na literatura de que ocorre um desbalanço entre produção de oxidantes/atividade do sistema antioxidante nos fumantes, sendo que um aumento excessivo na produção de oxidantes pode ocorrer tanto em fumantes como em pacientes com DPOC. O principal oxidante presente na fumaça do cigarro é o óxido nítrico (NO). O NO reage rapidamente com $O_2^{\cdot-}$ formando peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) e com radical peroxila para dar alquil peroxinitrito (ROONO), ambos oxidantes extremamente potentes (MacNee, 2000).

O excesso de oxidantes presentes no cigarro, por sua vez, aumenta o número de neutrófilos (cerca de 10 vezes) e macrófagos (cerca de 2 vezes ou mais) nos espaços alveolares, aumentando a produção de $O_2^{\cdot-}$. Estudos *in vitro* têm mostrado que a liberação de EROS por leucócitos alveolares de fumantes está aumentada em relação à dos não fumantes (Bast et ali., 1991, Antwerpen et ali, 1993, MacNee, 2000). Estes oxidantes são responsáveis por degradar a enzima α -1 antiprotease, provocando um desbalanço entre atividade elastase-anti-elastase (Pryor et ali, 1986; Taylor, 1986). Além disto, o cigarro estimula a liberação excessiva de elastase pelos leucócitos normalmente encontrados no pulmão. Como já foi dito, a elastase é a enzima responsável por degradar a elastina e uma variedade de proteínas da membrana extracelular como proteoglicanas e glicoproteínas, danificando os septos alveolares, contribuindo, portanto com a patogênese da DPOC (Janoff, 1983).

O ferro também exerce um importante papel no desenvolvimento da DPOC. Devido à sua alta reatividade, o ferro geralmente se encontra ligado a compostos como transferrina, ceruloplasmina e ferritina. A concentração de ferro mostrou-se aumentada em macrófagos alveolares de fumantes quando comparada a concentração de ferro de não fumantes; fluidos pulmonares obtidos de fumantes tinham mais ferro que os de não fumantes (Thompson et ali, 1991). A fonte de ferro em pulmões de fumantes é desconhecida, mas sabe-se que cada cigarro contém 0,042 μ g de ferro. Podemos salientar ainda que este elemento também tende a se acumular no organismo com o aumento da idade em ambos os sexos. Além disso,

os oxidantes presentes no cigarro podem liberar o ferro da ferritina nos portadores de DPOC (Thompson et ali, 1991).

Os oxidantes presentes no cigarro não só podem induzir danos oxidativos em DNA, proteínas e lipídios, como também ser os responsáveis por alimentar vários processos que poderiam levar ao desenvolvimento de DPOC. Por exemplo, os oxidantes aumentam a produção de glicoconjugados (muco) epitelial de alto peso molecular em cultura de células (Adler et ali., 1990) e prejudicam a função ciliar (Feldman et ali., 1994). Oxidantes também estimulam a formação de tromboxana, reduzem a atividade surfactante, provocam danos aos fibroblastos, promovem permeabilidade epitelial e produzem numerosos outros efeitos que poderiam diminuir os mecanismos de reparo em pacientes com DPOC (Jones et ali., 1980). É importante mencionar que o número total de cigarros consumidos por ano ('pack-years') está diretamente relacionado com aumento da tosse e produção de catarro. Nos fumantes que consomem meio maço de cigarros/dia, o risco de desenvolver tosse é de 40% a 50%, aumentando para 70% a 80% quando comparados com fumantes que consomem dois maços ou mais/dia (Eiserich et ali., 1995).

Duthie e colaboradores mostraram que eritrócitos de alguns fumantes apresentaram atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e glutathiona peroxidase (GPX) menor quando comparada com a atividade destas mesmas enzimas em não fumantes. Foi observado neste mesmo estudo que eritrócitos de fumantes foram mais susceptíveis a peroxidação lipídica *in vitro* que os de não fumantes, sendo que este efeito foi revertido na presença de vitamina E (Duthie et. ali., 1991). O primeiro fluido orgânico que entra em contato com a fase gasosa do cigarro é o ELF, o qual contém uma variedade de antioxidantes com função de proteger as células do trato respiratório contra o dano tecidual (Eiserich et. ali., 1995). O hábito de fumar tem sido associado também com a diminuição plasmática de ascorbato, β -caroteno, e vitamina C (Murata et ali., 1989).

Por outro lado, um outro estudo mostrou que alguns fumantes apresentavam um aumento dos antioxidantes no plasma quando comparados com não fumantes, apresentando também níveis diminuídos assim de peroxidação lipídica (Mezzetti et ali, 1995). Foi sugerido que este aumento nos antioxidantes poderia ser um último recurso para resistir ao estresse oxidativo em indivíduos que desenvolvem uma

tolerância ou adaptação bioquímica em resposta ao aumento de oxidantes, o que poderia ocorrer devido a composições genéticas individuais ou outras razões desconhecidas, poderia explicar porque muitos fumantes não desenvolvem DPOC (McCusker and Hoidal, 1990; Sandford, 1997). Apesar de existir muitos estudos correlacionando oxidantes, sistemas de defesa antioxidante e fumo, esta relação ainda é uma tarefa difícil para os pesquisadores da área devido às inúmeras variáveis que podem interferir com este sistema, tais como estilo de vida, dieta e classe social (MacNee, 2000).

Infecção, Inflamação e Células Fagocitárias

O fumo não é o único fator que contribui para o desenvolvimento da DPOC. Como visto, as infecções pulmonares contribuem com a exacerbação da doença. Os microorganismos mais comuns isolados de secreções presentes nas vias aéreas inferiores de pacientes com DPOC estável ou durante exacerbação aguda de bronquite crônica são bactérias gram-negativas como *Haemophilus sp*, *Moraxella catarrhalis* e *Streptococcus pneumoniae*. Estudos sorológicos sugerem que bactérias atípicas, como *Chlamydia* e *Mycoplasma* também podem ser responsáveis pela exacerbação da doença em um pequeno número de pacientes. A presença de bactérias nas vias aéreas de pacientes com DPOC contribui, não somente para exacerbação aguda da bronquite crônica, mas também para um declínio das defesas pulmonares. Portanto, o fumo e diminuição da função pulmonar são fatores de risco associados com a colonização bacteriana do trato respiratório inferior em pacientes com DPOC estável.

O hospedeiro responde à infecção bacteriana produzindo neutrófilos polimorfonucleares (NPM). Os NPM secretam enzimas como elastase e espécies oxidantes, as quais podem estimular a produção de muco e danificar as células epiteliais. Infecções persistentes resultam em inflamação, como consequência do dano epitelial, contribuindo para uma diminuição progressiva da função pulmonar. A inflamação pode causar limitação do fluxo aéreo pelo estreitamento do lúmen aéreo e constrição bronquiolar, fibrose, estenose cicatricial e também pode aumentar o tônus da musculatura lisa. As células inflamatórias mais importantes na DPOC são os NPM, macrófagos (MA), eosinófilos e linfócitos (Salvato, 1968). Os oxidantes

produzidos por células fagocitárias, como o $O_2^{\cdot -}$ e íon hipocloroso (OCl^-) são formados principalmente pelos NPM presentes em grande quantidade nas vias respiratórias baixas de fumantes. Como estas células possuem mitocôndrias, podem produzir $O_2^{\cdot -}$ pela cadeia transportadora de elétrons, com conseqüente formação de H_2O_2 e OH^{\cdot} . A produção destes oxidantes tem primariamente um significado defensivo, pois permite a estas células realizar uma lise rápida das bactérias fagocitadas. Já a produção excessiva pode levar a um aumento da atividade de elastases, colagenases e lisozimas (Pryor et al., 1986).

Os NPM ativados secretam também mieloperoxidase (enzima que apresenta atividade peroxidase não específica), levando à formação de OCl^- . Um dos principais alvos de ataque do OCl^- é a alfa-1 antiprotease, a maior inibidora das soro proteases circulantes. Além disto, OCl^- pode interagir com H_2O_2 formando oxigênio 'singlet' (1O_2), uma espécie altamente reativa. Estudos feitos com biopsia pulmonar de pacientes portadores de DPOC mostraram que fumantes possuíam um número aumentado de NPM em relação aos não fumantes. Foi observado que este aumento de NPM em pulmão de fumantes, estava correlacionado com o aparecimento de obstruções aéreas (Kilburn et al., 1975; Jordan et al., 1993). Brown e colaboradores mostraram que o número aumentado de NPM na fase aguda da doença poderia aumentar a quantidade de oxidantes no pulmão de pacientes com DPOC (Brown et al., 1993). Outros trabalhos mostraram que o número de eosinófilos estava aumentado tanto em biopsia como em secreção pulmonar de bronquíticos crônicos, sendo estas células as principais responsáveis pelo aumento de $O_2^{\cdot -}$ nestes pacientes (Saetta et al., 1993; Postma, 1998). A reversibilidade parcial da obstrução aérea correlacionada com obstrução bronquial em pacientes com DPOC sugeriu que eosinófilos contribuem para o estresse oxidativo pulmonar. Esta hipótese é suportada pelo fato de que eosinófilos produzem muito mais $O_2^{\cdot -}$ do que os NPM e MA *in vitro* (Postma, 1988; Zoratti et al., 1991).

Hipoxemia/Reoxigenação

Define-se hipóxia celular como uma limitação na quantidade de O_2 tecidual disponível para síntese de ATP mitocondrial. A hipóxia pode ser desencadeada por limitação na perfusão capilar ou fluxo sanguíneo (isquemia), diminuição na PO_2

arterial (hipoxemia) ou diminuição da concentração de Hb (anemia). A resposta celular a hipóxia é heterogênea, sendo que a extensão das anormalidades causadas pela hipóxia ou isquemia pode ser considerada tempo-dependente, ou seja, depende do tempo de exposição a estas condições (Crystal et ali., 1991). Células musculares retornam à função normal após 30 minutos de isquemia total e hepatócitos não apresentam danos irreversíveis, mesmo após 150 minutos de isquemia. Já as células cerebrais não suportam mais do que 6 minutos de hipoxemia sem lesão irreparável (Epstein, 1985). Diminuições na disponibilidade de O₂ desencadeiam uma série de mecanismos fisiológicos adaptativos com alterações bioquímicas celulares destinadas a manter a atividade celular num nível mínimo aceitável para a sobrevivência (Hochachka et ali, 1982). O fracasso destes mecanismos adaptativos pode levar à disfunção celular e acarretar danos irreparáveis. Dentre os principais mecanismos fisiológicos adaptativos à hipóxia podemos destacar aumento na densidade capilar, aumento na liberação de eritropoietina, policitemia, aumento na concentração de mioglobina, aumento na secreção de catecolaminas e acidose respiratória (Epstein, 1985). A hipóxia crônica pode levar também à vasoconstrição da rede arterial pulmonar, com conseqüente desenvolvimento de hipertensão pulmonar, insuficiência cardíaca congestiva direita ("cor pulmonale") (Weibel, 1996).

Entre as principais alterações bioquímicas celulares que podem estar ocorrendo durante a queda dos níveis de O₂ estão:

- *Queda dos níveis de ATP intracelular* levando, conseqüentemente, a um aumento na síntese de ATP pelo metabolismo anaeróbio através de basicamente dois processos: *glicólise anaeróbia*, também denominada de sistema do lactato, onde a quebra da glicose ou do glicogênio proporciona a formação de ATP, além de produzir também lactato no final do processo e aumento na atividade das *enzimas adenilato quinases*, que convertem de modo irreversível 2 moles de ADP em ATP e AMP. Esta reação leva ao acúmulo de AMP que pode ser desfosforilado a adenosina pela enzima 5'-nucleotidase. A adenosina assim formada deixa a célula e entra na circulação, onde age como um vasodilatador potente em muitos leitos vasculares, exceto na vasculatura renal. O acúmulo de AMP pode ainda ocasionar um aumento do metabolismo das purinas, levando a formação de adenosina, inosina,

hipoxantina, xantina e finalmente de ácido úrico pela ação da enzima xantina oxidase (Epstein, 1985; Sussman and Bulkley, 1990) (Figura 5).

- *Aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular*, que se mantido por um longo período de tempo, interrompe as funções mitocondriais relacionadas com os processos transdutores de energia, induz a formação de numerosas evaginações na membrana das células e ativa enzimas catabólicas dependentes de Ca^{2+} , tais como fosfolipases, endonucleases e proteases (Carafoli and Crompton, 1987). Roy e McCord 1983, observaram que em tecidos isquêmicos, a xantina desidrogenase (tipo D) pode ser convertida na sua forma xantina oxidase (tipo O) pela ação de proteases, que oxidam grupamentos sulfidríla desta enzima. Em condições pós isquêmicas, as xantinas oxidases tipo O transferem elétrons para o oxigênio molecular ao invés do NAD^+ , produzindo O_2^-/H_2O_2 como segue:



A xantina oxidase é largamente distribuída nos intestinos, pulmões, fígado, estando também presente em altas concentrações no endotélio vascular. Esta enzima é considerada como a maior fonte de O_2^- nos tecidos pós-isquêmicos (Demiryürek et ali.,1999). Vários trabalhos sugeriram que o dano celular causado por hipóxia ou isquemia seria conseqüência da produção de O_2^- formado pela enzima xantina oxidase durante o processo de reperfusão (Epstein, 1985; Sussman and Bulkley, 1990; Canãs, 1999 and Demiryürek et ali., 1999). Por sua vez, Gutierrez e colaboradores, usando coelhos como modelo experimental, observaram que o dano tecidual causado pela hipóxia foi maior que aquele causado pela isquemia. Isto porque no período pós-hipóxia a quantidade de ATP produzida pela fosforilação oxidativa não foi suficiente para a ressíntese de fosfocreatina (PCr). Já no período pós-isquêmico, fosfocreatina e ATP retornaram praticamente aos níveis normais (Gutierrez, 1988).

Green e colaboradores 1989, submetem 8 homens a uma câmara hipobárica a 282 Torr (equivalente a 8000 m de altitude) por 33 dias. Em todos os períodos, estes sujeitos realizaram atividades físicas. Observaram que a hipóxia e a

atividade física resultaram em redução de enzimas oxidativas como succinato desidrogenase e citrato sintase em amostras de biópsias quando comparadas a biópsia inicial (antes da exposição). Houve também uma redução na atividade das enzimas glicolíticas hexoquinase e fosfofrutoquinase. Além disso, observaram que a diminuição da PO_2 não levou à transformação dos tipos de fibras musculares, e sim a uma redução do tamanho destas fibras, indicando perda de massa muscular, a qual foi responsável pela perda de peso corpóreo observada nestes indivíduos após a exposição a hipóxia.

Jakobsson e colaboradores (1995), realizaram biópsias em 6 pacientes com DPOC submetidos a oxigenioterapia, 18 pacientes com DPOC não submetidos ao tratamento com O_2 e 7 sujeitos controle. Observaram que houve uma diminuição da atividade das enzimas oxidativas analisadas no grupo não submetido ao tratamento com O_2 (citrato sintase, succinato desidrogenase e 3 hidroxiacil coA desidrogenase) e aumento na atividade das enzimas glicolíticas (fosfofrutoquinase e lactato desidrogenase) em relação ao grupo controle, resultando em perda de massa muscular. Também não observaram alterações nas dosagens destas mesmas enzimas após sete meses de tratamento com O_2 . Da mesma forma, Maltais e colaboradores (1996) submeteram nove indivíduos com DPOC ao exercício físico progressivo e observaram que houve uma redução na atividade das enzimas oxidativas como citrato sintase e 3- hidroxiacil CoA desidrogenasè e um aumento na atividade das enzimas glicolíticas como hexoquinase, fosfofrutoquinase e lactato desidrogenase em biópsias musculares. Estes dados indicam que houve um aumento do metabolismo anaeróbio nestes indivíduos como consequência da adaptação à hipóxia. É importante salientar, que não há trabalhos em humanos com IResC, que correlacionem adaptação à hipóxia e estresse oxidativo.

Com o advento da reperfusão ou hiperóxia, pode ocorrer formação de oxidantes pela ativação da xantina oxidase pulmonar e pelo acúmulo de neutrófilos ativados. A exposição prolongada em condições de reperfusão, tal como as das condutas usuais para o tratamento de IResC, provoca dano celular que pode progredir até a total disfunção do órgão e morte. Nessa situação, ocorre o aumento do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias pulmonares. Durante a hipóxia vimos que ocorre uma diminuição da razão ATP/ADP, ocasionando uma redução na

atividade mitocondrial (Canãs, 1999). Com isso, os componentes da cadeia de transporte de elétrons se tornam progressivamente reduzidos e com o advento da reoxigenação ou reperfusão, pode haver um excessivo extravasamento de elétrons e conseqüente produção de $O_2^{\cdot-}$, que por sua vez pode dar origem ao H_2O_2 e radical hidroxila ($\cdot OH$), conforme já explicado anteriormente.

A maioria dos pacientes portadores de IResC, apresentam PaO_2 muito baixa, ou seja, menor ou igual a 55 mm de Hg em repouso. Portanto, nestas condições, deverão ser necessariamente submetidos à oxigenioterapia domiciliar prolongada domiciliar (ODP) (Stuart-Harris et ali., 1981). Com a ODP, estes pacientes estarão sujeitos à sofrer hipóxia/reperfusão e conseqüentemente, este processo poderá induzir morte celular devido a ação conjunta dos vários fatores já citados.

A Figura 5 mostra os mecanismos propostos para a produção de ($O_2^{\cdot-}$) pelo processo de isquemia/reperfusão.

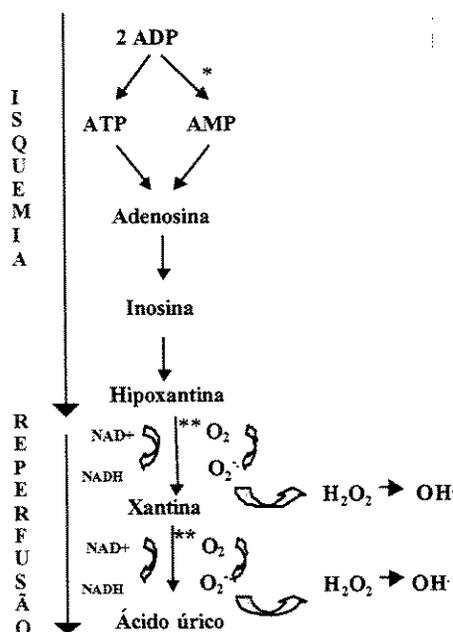


Figura 5. Mecanismo proposto para a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pelo processo de isquemia/reperfusão. Adenilato quinase (*) e xantina oxidase (**).

Oxigenioterapia

A qualidade e duração de vida em pacientes com IResC são atualmente um desafio. As metas terapêuticas específicas são reduzir os sintomas, preservar a função pulmonar, otimizar as trocas gasosas e limitar e/ou tratar as exacerbações agudas rapidamente. O primeiro estágio de tratamento para pacientes com IResC induzida pelo fumo é cessar o hábito e evitar exposição a agentes irritantes, como poluição ambiental ou ocupacional. Cessar o fumo diminui potencialmente muitas fontes de radicais que levam ao estresse oxidativo. A cessação do fumo por seis meses leva a uma redução considerável do número de MA e NPM no fluido broncoalveolar (Anthonisen et al, 1994). Além de cessar o fumo, se faz necessário o uso de broncodilatadores, agentes antiinflamatórios e/ou antibióticos. A suplementação nutricional, imunização, exercícios respiratórios e reabilitação pulmonar têm sido também utilizados como recursos adicionais ao tratamento. A suplementação com oxigênio continuada ou no período noturno é a última opção em tratamento para estes pacientes (Piquette and Rennard, 1996). O objetivo terapêutico da oxigenioterapia é adequar a oxigenação tecidual sem provocar toxicidade. A indicação para oxigenoterapia domiciliar prolongada (ODP) é feita através da determinação de parâmetros gasométricos, desde que o paciente esteja estável clinicamente, e já usando todo arsenal terapêutico possível para seu caso.

Nesse tratamento o O_2 é administrado através de cânulas nasais em fluxos baixos e variados, necessários para manter a PaO_2 acima de 60 mm de Hg. A fração inspirada de O_2 está em torno de 24% quando o fluxo da cânula é de 1 L/min, 28% quando 2 L/min e 32% com fluxo de 3 L/min. Excepcionalmente usam-se fluxos maiores que 3 L/min. Estes pacientes devem utilizar o O_2 por no mínimo 12 horas/dia (Cooper et al, 1987). O O_2 pode ser armazenado em cilindros, que o mantêm gasoso sob pressão em baixas temperaturas ou pode ser obtido por aparelhos que concentram O_2 a partir do ar ambiente, conhecidos como concentradores de oxigênio (Cooper et al, 1987).

Iniciada a ODP, o acompanhamento é realizado através de consultas mensais, bimestrais ou trimestrais, quando o paciente vai ao hospital e é avaliado pela equipe médica e outros profissionais. Nas consultas, é realizada rotineiramente oximetria de pulso, técnica não invasiva que permite o acompanhamento da

porcentagem de saturação de O₂ pela hemoglobina, facilitando assim eventuais ajustes na dose de O₂ utilizada. A ODP, além de melhorar a insuficiência cardíaca direita ('cor pulmonare'), pode reverter e controlar a policitemia secundária que ocorre em função da hipóxia, observando-se também uma melhora no desempenho dos pacientes em testes neuropsicológicos e em suas atividades cotidianas (Cooper, 1994).

Vários estudos foram realizados em pacientes hipoxêmicos portadores de DPOC, que demonstraram um aumento da sobrevida com a utilização contínua de oxigênio a fluxos baixos (Nocturnal Oxygen Therapy Group, 1980; Medical Research Council Working Party, 1981; Maltais et ali., 1996). Desde então a suplementação domiciliar de O₂ vem sendo prescrita para o tratamento de pacientes com DPOC grave. Entretanto, o mecanismo envolvido no aumento da sobrevida ainda não é totalmente compreendido. A administração aguda de O₂ abaixa a pressão na artéria pulmonar, que é mantida baixa com ODP e essa queda parece ser um fator fundamental (Cooper et ali., 1987). Entretanto, a melhora observada pela utilização da ODP parece ser temporária, existindo trabalhos que demonstraram uma sobrevida de 26% nos indivíduos submetidos a este tratamento em 10 anos. Embora o quadro de hipertensão pulmonar permaneça razoavelmente controlado com a ODP, a obstrução do fluxo aéreo como consequência das alterações brônquicas e parenquimatosas observada em pacientes com DPOC é progressiva, e parece não ser afetada pela ODP (Weitzenblum et ali., 1984). É importante destacar que o aumento na disponibilidade de O₂ ao paciente com DPOC, por um lado pode melhorar sua insuficiência respiratória e reverter parcialmente algumas alterações bioquímicas e fisiológicas desencadeadas pela hipóxia; por outro lado, a ODP pode aumentar os níveis de estresse oxidativo de uma forma semelhante ao gerado pela reperfusão pós-isquemia (Figura 5).

Como salientado anteriormente, ainda não há estudos sobre estresse oxidativo induzido pela hipóxia e nem a possibilidade de piora da agressão tecidual pelo uso de O₂ de modo intermitente ou continuado. Por esta razão, há grande necessidade de se realizar um acompanhamento efetivo ao longo do uso da ODP, com o intuito de avaliar o grau de estresse oxidativo a que estes pacientes estão sujeitos durante o tratamento, podendo assim, obter critérios de tratamento mais

consistentes. Tais critérios possibilitarão sugerir terapias antioxidantes no momento adequado, com objetivo de proporcionar uma melhor qualidade de vida a estes indivíduos.

V. Biomarcadores de Estresse Oxidativo em Portadores de DPOC

Estudos recentes têm avaliado o balanço entre oxidantes/antioxidantes em fumantes e pacientes com DPOC. Muitos autores têm demonstrado atualmente grande interesse em investigar a resposta sistêmica ao estresse oxidativo nestes mesmos grupos. Miller e colaboradores (1993) demonstraram que a capacidade antioxidante do plasma poderia ser comparada com a do Trolox, um antioxidante sintético, hidrossolúvel, análogo da vitamina E. Os principais antioxidantes que contribuem para mensurar a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) são albumina, urato, ascorbato e α -tocoferol séricos. Rahman e colaboradores (1996) encontraram numa mesma faixa etária uma diminuição significativa em TEAC no plasma tanto em fumantes (após a exposição ao cigarro) quanto em pacientes com DPOC quando comparadas ao plasma de sujeitos controles, não fumantes. Estes autores sugeriram uma diminuição em TEAC nos fumantes e pacientes com DPOC pode ser devida a uma depleção de grupamentos sulfidrila plasmáticos. Outros investigadores têm mensurado antioxidantes plasmáticos como ácido ascórbico, α -tocoferol, ácido úrico, e grupamentos sulfidrila totais em fumantes. Alguns destes estudos mostraram a depleção de ácido ascórbico, vitamina E, β caroteno e selênio no soro de fumantes crônicos. (Duthie et alii, 1991; Antwerpen, et alii, 1993 and Mazzetti et alii., 1995). Theron et alii (1990), observaram uma diminuição dos níveis de vitaminas C e E também em leucócitos de fumantes.

Cross e colaboradores em 1993, demonstraram que a exposição *in vitro* do plasma de indivíduos normais à fase gasosa levou a uma diminuição nas concentrações de grupamentos sulfidrila totais, de bilirrubina e de ácido ascórbico. As concentrações de ácido úrico e α -tocoferol não foram significativamente reduzidas no plasma por este tratamento. A depleção destes antioxidantes plasmáticos foi associado ao aumento no nível de proteínas carboniladas e peróxidos lipídicos, produto do ataque de oxidantes à proteínas e lipídios

respectivamente (Halliwell and Chirico, 1993). Outros trabalhos mostraram que o ONOO⁻ formado a partir do NO[•] presente no cigarro e O₂^{-•} liberados pela ativação das células fagocitárias, diminuem a capacidade antioxidante do plasma por oxidar rapidamente o ácido ascórbico, ácido úrico e grupamentos sulfidrila. Aparentemente, o ONOO⁻ está diretamente envolvido com o dano oxidativo em fumantes (Rahman et al, 1997).

Alguns estudos mostram que os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) estão aumentados no plasma de pacientes com DPOC tanto na fase aguda quanto na crônica (Doelman and Bast, 1990, Repine et al, 1997) e no plasma e lavado pulmonar de fumantes, pacientes com enfisema, bronquite crônica e asma (Bridges et al, 1993). Exposição *in vitro* do plasma de indivíduos normais ao cigarro produziu aumento da peroxidação lipídica (Cross et al., 1993). Achados importantes nesta área se baseiam em medir os níveis de isoprostanos-F2 livres e esterificados (compostos bioativos como prostaglandina F2, que são formados pela peroxidação do ácido araquidônico) aumentados em fumantes quando comparado com não fumantes (Morrow et al, 1995). Os níveis destes compostos diminuíram quando alguns indivíduos deixaram de fumar por duas semanas. Em alguns indivíduos fumantes estes compostos estavam dentro dos valores normais ou levemente aumentados. Estes dados são consistentes com a possibilidade de certos indivíduos serem mais resistentes ao estresse oxidativo, talvez como consequência do aumento de suas defesas antioxidantes (Morrow et al, 1995).

OBJETIVOS

Os dados existentes na literatura a respeito da correlação entre pacientes com diagnóstico de IResC submetidos a ODP e estresse oxidativo são escassos, porque existe uma dificuldade implícita em acompanhar estes pacientes fora do período de internação, e também por existir uma inconsistência nos dados atuais publicados, devido às diferentes formas de estudos realizados nesta área. Dessa forma, os objetivos desta tese foram:

- Caracterizar os efeitos da hipoxemia crônica em pacientes com IResC com indicação para oxigenioterapia através de alguns biomarcadores sistêmicos de estresse oxidativo e determinação da saturação da hemoglobina (Hb) pelo oxigênio por oximetria de pulso e dosagem de Hb e lactato, utilizando um grupo de indivíduos não fumantes e fumantes como grupos controle;
- Avaliar a evolução adaptativa da IResC após sete dias de ODP,
- Avaliar a evolução adaptativa da IResC durante a exposição crônica ao O₂ (de 7 até 270 dias, em 5 momentos).

MATERIAIS E MÉTODOS

Escolha dos Pacientes

O projeto do presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética Médica (anexo I) e Comitê de Ética em Pesquisa (anexo II) do HC-Unicamp. Foram incluídos neste estudo pacientes admitidos no serviço de Pneumologia do Hospital das Clínicas da Unicamp que apresentavam um quadro clínico e gasométrico que indicasse a prescrição de ODP. O grupo controle foi proveniente do banco de sangue do Hemocentro-FCM-Unicamp. Foi obtida a aquiescência individual de cada indivíduo selecionado, através da assinatura de um termo de consentimento pós-informação (anexo III).

Os equipamentos utilizados para a ODP (cilindros de O_2 comprimido e aparelhos concentradores de oxigênio) foram fornecidos pelo HC da Unicamp. As análises clínicas de rotina foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do HC da Unicamp. As análises bioquímicas constantes nesta tese foram executadas no Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labex), Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Unicamp.

Os critérios para indicação de ODP já estão bem estabelecidos, e podem ser assim sumarizados (Zièlinski, 1999):

- Pressão Arterial de O_2 (PaO_2) < ou = 55 mmHg ou SaO_2 < ou = 88%;
- PaO_2 entre 56 a 59 mmHg ou SaO_2 = 89% com:
 - * Evidência clínica e/ou laboratorial de cor pulmonale;
 - * Hematócrito > 56%

Para indicação formal e prescrição de ODP por parte do médico, o paciente teve que estar em condições clínicas adequadas, utilizando todas as medidas medicamentosas e fisioterápicas disponíveis e indicadas para ele.

Foram utilizados os seguintes critérios de exclusão:

- Pacientes que apresentavam um quadro clínico muito grave, que os incapacitava de comparecer regularmente ao hospital ou que os tornava refratários à percepção de qualquer melhora de suas limitações;
- Pacientes que tinham distúrbios psicológicos como ansiedade, depressão ou quadros psicóticos;
- Pacientes que não queriam participar do estudo;
- Indivíduos que utilizavam terapias antioxidantes;
- Pacientes que realizavam menos que 8 horas de oxigenioterapia diárias.

Características dos pacientes avaliados durante o estudo:

Os pacientes foram admitidos a partir de data estabelecida e acompanhados pela equipe de Pneumologia da FCM-Unicamp. Na primeira fase do estudo, várias dosagens bioquímicas foram realizadas utilizando dois grupos controle, constituídos de indivíduos sem IResC não fumantes (NF) e fumantes crônicos (FC), do sexo masculino com a mesma faixa etária dos pacientes com IResC (40 - 80 anos) e SpO₂ na faixa da normalidade (96 - 99%). A segunda fase do estudo, foi caracterizada pelo acompanhamento do tratamento com oxigênio. Nesta fase, foram feitas as mesmas dosagens bioquímicas realizadas na fase anterior antes da suplementação de oxigênio, após uma semana ou 7 dias de tratamento e então, a cada dois ou três meses de ODP, obedecendo ao retorno natural para reabilitação destes pacientes, ou seja, todas as análises realizadas nesta fase do estudo, foram feitas em 5 momentos (7, 60, 120, 180 e 270 dias). Considerando que 21 indivíduos participaram desta segunda fase e que foram utilizados 10 parâmetros bioquímicos realizados em triplicata para cada indivíduo, somaram-se 3780 análises. As características dos pacientes submetidos a ODP estão apresentadas na Tabela I no item Resultados.

Todos os pacientes responderam a um questionário, o qual foi aplicado antes de iniciar a ODP (anexo IV). Este questionário consistiu de avaliação do estado nutricional, suplementação com antioxidantes e outras doenças além da IResC, medicamentos consumidos e tempo de consumo de cigarros. É importante salientar que nenhum dos indivíduos que participaram do estudo

utilizavam suplementação com antioxidantes e 90% deles apresentavam uma dieta pobre em frutas, legumes e verduras. Dos pacientes selecionados, 99% apresentavam outras doenças além da IResC como hipertensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva (ICC), poliglobulia e osteoporose. Ainda, 80,1% dos pacientes eram ex-fumantes, sendo que o tempo de utilização de cigarros variou de 15 a 45 anos. As classes dos medicamentos mais consumidos foram as dos anti-hipertensivos, diuréticos, broncodilatadores, antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais. Foram realizadas medidas gasométricas antes do início da ODP. No presente trabalho, utilizamos o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) como parâmetro para avaliar a função pulmonar. A SpO_2 foi avaliada utilizando um oxímetro de pulso (Pulsox^M 3-Minolta) em todos os retornos dos pacientes para reabilitação pulmonar. A oximetria de pulso é considerada o melhor método para triagem e acompanhamento de pacientes com hipoxemia. O oxímetro de pulso posicionado no dedo ou no lóbulo da orelha nos fornece através da pele e por leitura imediata, a saturação arterial do oxigênio (SpO_2) no ato do exame. O oxímetro é bastante sensível e fidedigno, com erro estimado de 1 a 2%, quando comparado com obtido pela gasometria arterial (Pilling & Cutaia, 1999).

Procedimentos Experimentais

- *Preparo das amostras de sangue:*

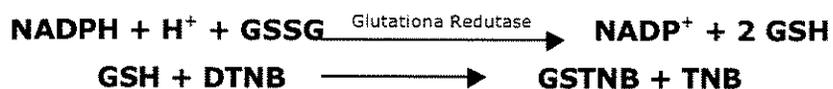
O sangue foi retirado da veia antecubital e coletado em tubos contendo heparina. Em seguida, parte do sangue total foi utilizado para as dosagens das concentrações sanguíneas de lactato, AU e Hb. Outra parte foi centrifugada a 4000 rpm (3000 x g) por 10 minutos para separar as células sanguíneas do plasma, que foi armazenado a $-80^{\circ}C$ por no máximo 15 dias, após ser tratado com butilhidroxitolueno (BHT) $90\mu M$, um antioxidante, para posterior análises das concentrações de PC e GST. As hemácias foram separadas por histopaque -1077 (Boyum, 1968) e em seguida foram hemolisadas na proporção 1:1 (v/v) e armazenadas a $-80^{\circ}C$ para posterior análise das atividades das enzimas GR e CAT.

- *Quantificação da concentração de Hemoglobina (Hb):*

Em uma alíquota de 500 μL de hemácias adicionou-se água gelada na proporção de 2:1, a fim de hemolisar a amostra. Separou-se a amostra em tubos eppendorf e centrifugou-se por 2 min (centrifuga de eppendorf Incibrás). Transferiu-se o sobrenadante para outro eppendorf e foram adicionados 200 μL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Em seguida, centrifugação foi feita novamente por 2 min. A determinação da concentração de Hb foi realizada através do método de Drabkin (1946), onde a Hb em presença de 1mL de reagente de Drabkin (10% de KCN, 30% $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) forma um composto, a cianometahemoglobina, que absorve em 540 nm, e cujo coeficiente de extinção milimolar é 11,5 (Drabkin, 1946).

- *Glutathione redutase (GR) no hemolisado:*

Os ensaios foram realizados de acordo com Smith et al (1988). O princípio do método está baseado na redução do 5,5 ditiobis (2 ácido nitrobenzóico) (DTNB) com conseqüente aumento na absorbância a 412 nm:



Ao meio de incubação contendo tampão KH_2PO_4 0,2 M e EDTA 1 mM em pH 7,5 foram adicionados 250 μL de DTNB 3 mM, H_2O para completar o volume de 1 mL e NADPH a calcular a partir do seu coeficiente de extinção milimolar que é 6,2 a 340 nm. Após todas estas adições, fez-se a leitura do branco. O hemolisado (5 μL) e a GSSG 20 mM foram misturados para iniciar a reação. A velocidade da reação é linear por 3 minutos. Então, é possível medir a atividade da GR através da velocidade com que o DTNB é reduzido pela GSH, provocando um aumento no valor da absorbância a 412 nm. Para o cálculo da atividade da enzima no sangue foi utilizada a seguinte equação:

$E = 100 \times A / (\text{Hb})$, onde E é a atividade da enzima por g de hemoglobina, A é a atividade da enzima presente na amostra e Hb é a

concentração de hemoglobina no hemolisado em g.dl^{-1} . O valor de A foi calculado utilizando-se a equação:

$A = (\Delta D / 13.600) \cdot (V_H \cdot V_C)$, onde ΔD é a diferença de absorvância a 412 nm em um minuto, $13.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ é o valor do coeficiente de extinção molar do TNB a 412 nm, V_H é o volume do hemolisado adicionado e V_C é o volume total da solução. Os resultados foram expressos em UI.gHb^{-1} .

- *Catalase (CAT) no hemolisado:*

Os ensaios da amostra de hemolisado foram realizados de acordo com Aebi (1984). O meio básico de reação continha tampão fosfato 50 mM pH 7,0. Após 2 minutos da adição da amostra ao meio acrescentou-se H_2O_2 10 mmol.L^{-1} para iniciar a reação. A medida da atividade da CAT ocorre através da velocidade com que o H_2O_2 é reduzido pela ação da enzima, provocando uma diminuição no valor da absorvância a 240nm. A diferença na leitura das absorvâncias a 240 nm, em um determinado intervalo de tempo, nos permite determinar a velocidade de redução do H_2O_2 , que é proporcional à velocidade da reação enzimática catalisada pela CAT (Aebi, 1984). Os resultados foram expressos em k.gHb^{-1} .

- *Quantificação de grupamentos sulfidríla totais no plasma (GST):*

Uma alíquota de 50 μL do plasma foi misturada com 1mL de tampão Tris-EDTA. As amostras foram colocadas em cubetas de 1cm de caminho ótico e a medida realizada espectrofotometricamente num comprimento de onda de 412 nm (medida A_1). Após foram adicionados 20 μL de DTNB 10 mmol.L^{-1} diluído em metanol. Esperou-se 15 minutos, à temperatura ambiente, para que fosse feita outra leitura (A_2) junto com um branco contendo somente DTNB e tampão Tris-EDTA (Hu, 1994). Os grupamentos sulfidríla totais foram calculados da seguinte forma:

$$(A_2 - A_1 - B) \times 1,57 \text{ mmol.L}^{-1}$$

Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol.mL}^{-1}$.

- *Quantificação de proteínas carboniladas em plasma (PC):*

Este método foi proposto por Levine et al 1990. O composto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) se complexa com os grupos carbonila das proteínas, formando bases de Schiff que absorvem a 380 nm. A amostra de plasma (100 μ L) foi diluída com 900 μ L de H₂O deionizada e tratada com ácido tricloroacético 20% para precipitação das proteínas. A solução resultante foi centrifugada a 3000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. A uma das alíquotas (amostra) adicionou-se 1 mL de DNPH 0,01 M em HCl 2 M sendo que na outra alíquota (branco) foi adicionado somente HCl 2 M. Incubou-se por 60 minutos a 37°C com agitação a cada 15 minutos. Após a adição de 1mL de ácido tricloroacético 20% as alíquotas foram centrifugadas a 3000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi novamente descartado. Lavou-se o precipitado com 1 mL de solução etanol/acetato de etila (1:1) para remover o reagente em excesso (ácido tricloroacético). Após 10 minutos o sobrenadante foi descartado. Essas lavagens foram repetidas até se obter um sobrenadante claro que foi descartado. A seguir, dissolveu-se o precipitado em 1 mL de solução de guanidina 6M (com tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 2,3 corrigido com ácido tricloroacético). Incubou-se por aproximadamente 20 minutos a 37°C. Após a leitura da absorbância da amostra e do branco a 380 nm, subtraiu-se o branco da amostra e calculou-se a concentração das bases de Schiff usando-se o coeficiente de extinção molar de 22000.M.cm⁻¹. Os resultados foram expressos em μ mol.mL⁻¹ (Levine et. al, 1990).

- *Quantificação das concentrações de Hb e AU no sangue total:*

Trinta e dois μ L do sangue total foram utilizados para análise das concentrações de Hb total e ácido úrico até no máximo 5 horas após sua coleta. Todas as dosagens foram realizadas através de fitas reativas pelo aparelho (REFLOTRON, Böehringer Mannheim). O aparelho REFLOTRON mede reflectometricamente a variação de cor que acontece durante a reação na fita reativa através de uma esfera de Ulbrich. Esta esfera, regula o comprimento de onda e a compensação do zero de acordo com a dosagem a ser realizada.

Todas as informações específicas a respeito da dosagem executada estão contidas num código magnético na própria fita reativa, que é lido automaticamente pelo aparelho antes de iniciar a dosagem da amostra, propriamente dita (Braun et alii, 1987). Os resultados referentes a Hb e AU foram expressos em g.L^{-1} e U.L^{-1} respectivamente.

- *Dosagem de lactato no sangue total:*

As dosagens de lactato sanguíneo foram feitas com auxílio do lactímetro Accusport (Böehringer Mannheim) que também opera através de fitas reativas específicas. Os resultados referentes ao lactato foram expressos em mmol.L^{-1} .

Análise Estatística

As variáveis gasométricas avaliadas anteriormente ao início do tratamento com O_2 nos indivíduos com IResC (PO_2 , PCO_2 , pH e HCO_3^-) foram analisadas a partir de teste t para a comparação de homens (H) e mulheres (M) (ver tabela II, item resultados).

Os dados obtidos dos grupos NF, FC e IResC antes do início do tratamento com O_2 , foram expressos como mediana, 1º e 3º quartis e valores máximo e mínimo. Nesta **primeira fase** do estudo, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparar os parâmetros entre os grupos estudados (ver tabela III, item resultados).

A análise dos dados referentes às variáveis avaliadas no grupo de indivíduos com IResC submetidos a ODP durante aproximadamente 270 dias, fez parte da **segunda fase** do estudo, que foi dividida em duas etapas:

- A primeira etapa foi relativa à primeira semana de tratamento com O_2 , utilizando-se somente os valores referentes aos dias 0 (D0) e 7 (D7) de cada indivíduo. Nesta etapa foi utilizada a Análise Multivariada de Perfis para dois grupos experimentais (Morrison, 1967), utilizando-se o programa PERFIL (Rosa, 1994). A partir desta análise, efetuou-se o estudo da interação entre os sexos (Homens e Mulheres) e entre os dias (0 e 7), bem como a interação das variáveis sexo e dia.
- A segunda etapa referiu-se às medidas obtidas a partir da primeira semana de tratamento com O_2 (D7 até 270 dias). Esta análise foi realizada

considerando-se um modelo linear de efeitos mistos para dados longitudinais (Verbeke & Molenberghs, 1997), incluindo-se os efeitos (fixos) referentes ao sexo e ao tempo (dias) e considerando-se interceptos e coeficientes de regressão individuais (aleatórios) para cada paciente. Os cálculos foram efetuados utilizando-se o procedimento MIXED do programa computacional SAS (Littell et ali., 1996). Para cada variável e sexo existe uma reação estimada baseada na seguinte equação:

$$y = a + bx, \text{ onde:}$$

y = representa uma das variáveis analisadas;

x = tempo em dias;

a e b = parâmetros do modelo estatístico (intercepto e coeficiente de regressão respectivamente)

O comportamento médio da variável resposta (y), quando explicado por regressão linear, pode ser sumarizado por dois valores: o *intercepto* e *coeficiente de regressão*.

- O *intercepto* refere-se ao valor médio da variável no D7 e a diferença entre os sexos.
- O *coeficiente de regressão* fornece o aumento, queda ou estabilidade das variáveis analisadas para cada dia que passa e se há diferenças destas variações entre os sexos, comparando-se sempre os valores médios das variáveis com o valor zero.

A partir das equações de regressão ajustadas, procedeu-se então a comparação dos interceptos, referente à comparação das médias de cada variável no D7 do estudo para os dois sexos; bem como a comparação dos coeficientes de regressão dos mesmos, estudando-se a evolução temporal de cada uma das variáveis consideradas. Em todas as análises utilizadas neste estudo, as conclusões estatísticas foram discutidas no nível de 5% de significância. Para confecção dos gráficos, foi utilizado o método de regressão linear.

RESULTADOS

Caracterização dos pacientes antes do tratamento diário com oxigênio por tempo prolongado

A Tabela I mostra algumas características dos pacientes com IResC, selecionados para participar desse estudo, antes do início do tratamento com oxigênio.

Tabela I. Características dos pacientes com IResC antes do início da ODP. EF: ex-fumante, NF: não fumante, F: fumante.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Hábito de Fumar	Tratamento com esteróide	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	VEF ₁ (%pred)
1	79	H	EF	Sim	52,6	50,6	34
2	65	M	EF	Não	56,6	49,9	-
3	56	M	EF	Não	74,8	40,4	28
4	66	H	EF	Não	54,7	49,2	28
5	70	H	EF	Sim	52,3	50,0	-
6	72	H	EF	Não	62,2	44,1	-
7	69	H	EF	Não	47,3	50,2	28
8	47	H	EF	Não	70,1	53,8	24
9	69	H	EF	Sim	50,3	32,8	28
10	79	H	EF	Sim	44,3	29,6	34
11	57	H	EF	Sim	29,8	59,9	-
12	78	M	EF	Sim	57,3	59,6	25
13	43	M	NF	Sim	56,5	50,3	25
14	50	H	EF	Não	20,9	53,1	-
15	40	M	NF	Sim	38,7	55,5	30
16	62	H	EF	Sim	53,4	42,9	24
17	67	H	EF	Não	52,3	50,2	49
18	62	M	F	Não	28,3	59,5	-
19	48	H	EF	Não	37,0	51,8	48
20	68	H	EF	Sim	43,0	54,1	15
21	55	H	F	Não	53,4	42,7	44
Média	62	-	-	-	49,2	49,0	30,9
Desvio Padrão	11,6	-	-	-	13,1	7,9	21,2

Podemos observar que 80,1% dos pacientes participantes deste estudo eram ex-fumantes. Esta evidência reforça os dados já existentes na literatura, os quais apontam o hábito de fumar como sendo a principal causa para o desenvolvimento da DPOC (Sandford et. al., 1997; MacNee, 2000). Na Tabela I podemos observar também que a PaO₂ média obtida foi de 49,2 mmHg e a FEV₁ foi de 30,9% do

predito, que varia de 90 a 100%, mostrando que estes pacientes apresentavam IResC grave e tinham indicação para ODP.

Na Tabela II, apresentamos a comparação das variáveis gasométricas entre mulheres e homens participantes do estudo.

Tabela II. Médias e desvios-padrão dos parâmetros gasométricos considerados nos grupos de mulheres (M) e homens (H), e resultados do teste estatístico.

Variável	Sexo		Resultado do teste estatístico
	M	H	
PO ₂ (mmHg)	52,41±14,91	47,82 ± 12,09	t = 0,77 (P = 0,4491)
PCO ₂ (mmHg)	52,06 ± 6,78	46,65 ± 8,80	t = 1,44 (P = 0,1671)
pH	7,40 ± 0,058	7,41 ± 0,052	t = -0,55 (P = 0,5924)
HCO ₃ ⁻ (mmol.L ⁻¹)	32,61 ± 5,76	30,24 ± 4,06	t = 1,12 (P = 0,2769)

Podemos observar que as alterações pulmonares em ambos os sexos foram praticamente as mesmas. Ou seja, não houve diferenças estatisticamente significativas nestes dois grupos antes do início da ODP, indicando que o tratamento deveria ser o mesmo para ambos, homens e mulheres.

Na Tabela III apresentamos os valores de marcadores de estresse oxidativo e parâmetros respiratórios dos pacientes com IResC antes do início da ODP, grupo de indivíduos fumantes (FC) que foram comparados com um grupo de indivíduos não fumantes (NF). Além disso, fizemos a comparação entre os grupos IResC e FC. Os grupos NF e FC foram considerados como controle. Quando comparamos o grupo IResC e FC com NF, observou-se que a SpO₂ foi significativamente mais baixa nos pacientes com IResC ($P < 0,05$). Já as concentrações sanguíneas de lactato e Hb estavam significativamente aumentadas neste grupo ($P < 0,05$). Uma diminuição significativa na atividade das enzimas CAT ($P < 0,05$) e GR ($P < 0,05$) e na concentração plasmática de GST ($P < 0,001$) foi observada nos pacientes em relação aos NF. No grupo FC, por sua vez, houve diminuição nas concentrações plasmáticas de AU ($P < 0,05$) e de GST ($P < 0,05$). Observou-se uma tendência de aumento, embora não significativa na atividade das enzimas GR e CAT. A concentração de Hb também se apresentou aumentada no grupo FC em relação ao grupo controle. Não

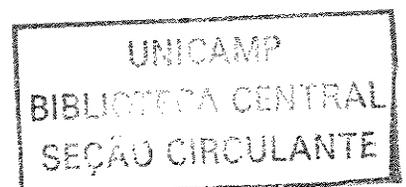
observamos alterações significativas na concentração plasmática de proteínas carboniladas para nenhum dos dois grupos, FC ou IResC em comparação com o grupo controle. Quando comparamos o grupo IResC com os FC, observou-se uma diminuição ainda maior na atividade das enzimas CAT ($P<0,05$) e GR ($P<0,05$) e na concentração plasmática de GST ($P<0,001$) no grupo IResC em relação ao FC.

Tabela III. Efeito do cigarro e hipóxia crônica sobre biomarcadores de estresse oxidativo e parâmetros respiratórios.

Biomarcadores	NF	FC	IResC
n	23	14	21
SpO ₂ (%)	97,0 (96,0 - 97,0)	95,5 (96,0 - 97,0)	80,3* ⁺ (66,0 - 86,5)
n	20	12	16
Lactato (mmol.L ⁻¹)	2,0 (1,8 - 2,5)	2,1 (2,0 - 3,2)	2,7* ⁺ (2,2 - 3,2)
n	34	11	21
Hb (g.dL ⁻¹)	15,5 (14,7 - 16,6)	16,7* (15,8 - 18,4)	17,4* (14,7 - 19,0)
n	34	20	22
AU (U.L ⁻¹)	6,41 (5,57 - 6,94)	5,41* (4,29 - 6,38)	6,24 (4,49 - 7,22)
n	25	16	23
CAT (k.gHb ⁻¹)	0,355 (0,294 - 0,393)	0,407 (0,352 - 0,466)	0,310* ⁺ (0,230 - 0,364)
n	22	12	20
GR (UI.gHb ⁻¹)	12,8 (12 - 13,6)	14,2 (12,1 - 15,5)	10,8* ⁺ (9,5 - 12,1)
n	19	9	10
GST (μmol.L ⁻¹)	488,6 (447,7 - 517,0)	421,8* (380,9 - 453,6)	305,5* ⁺⁺⁺ (283,0 - 347,0)
n	19	9	16
PC (μmol.L ⁻¹)	69 (60 - 68)	67 (52 - 63)	68 (51 - 81)

* $P<0,05$; ** $P<0,001$, refere-se à comparação dos grupos IresC e FC com NF

+ $P<0,05$; ++ $P<0,001$, refere-se à comparação do grupo IresC com FC



Análise dos marcadores nos pacientes com IResC após sete dias de tratamento diário com oxigênio por tempo prolongado

As Tabelas IV e V apresentam os valores da média e desvio padrão e os resultados obtidos a partir da análise multivariada para os diferentes parâmetros estudados antes e após a primeira semana de tratamento com O₂. Podemos observar que houve uma interação significativa entre os dias e sexos para a variável SpO₂, com um aumento significativo na primeira semana de tratamento em relação ao D0 (D7>D0), sendo que este aumento foi maior para o grupo das mulheres ($P<0,05$). Os resultados dos testes estatísticos referentes às concentrações de Hb e lactato não apresentaram significância para nenhuma das hipóteses testadas ($P>0,05$). Podemos observar também que a atividade das enzimas CAT e GR e concentração plasmática de AU aumentaram significativamente após sete dias de tratamento (D7>D0). Porém, a concentração plasmática de GST diminuiu significativamente no D7 em relação ao D0 (D0>D7). Esse curto período de tratamento com oxigênio não afetou os valores da concentração plasmática de PC para as três hipóteses analisadas ($P>0,05$).

Tabela IV. Média (\pm desvio-padrão) dos valores de SpO₂, Hb, Lactato, AU, CAT, GR, GS e PC para homens (H) e mulheres (M), avaliados antes e após a primeira semana de tratamento.

Variável	Sexo	Dia	
		0	7
SpO₂	H	77,64 \pm 2,02	85,57 \pm 1,59 *
(%)	M	86,92 \pm 2,86	91,14 \pm 2,25 *
Hb	H	17,67 \pm 0,65	16,67 \pm 0,49
(g.dL ⁻¹)	M	15,98 \pm 0,92	15,91 \pm 0,69
Lactato	H	2,61 \pm 0,18	2,80 \pm 0,23
(mmol.L ⁻¹)	M	2,45 \pm 0,26	2,47 \pm 0,33
AU	H	4,48 \pm 0,45	6,12 \pm 0,49 *
(U.L ⁻¹)	M	4,65 \pm 0,64	5,61 \pm 0,70 *
CAT	H	0,35 \pm 0,03	0,42 \pm 0,04 *
(k.gHb ⁻¹)	M	0,31 \pm 0,04	0,39 \pm 0,05 *
GR	H	10,84 \pm 0,93	15,23 \pm 1,22 *
(UI.gHb ⁻¹)	M	12,71 \pm 1,32	14,12 \pm 1,73 *
GST	H	388,14 \pm 23,39	261,70 \pm 30,76 *
(μ mol.L ⁻¹)	M	374,11 \pm 33,08	305,67 \pm 43,51 *
PC	H	82,86 \pm 5,68	71,76 \pm 9,71
(μ mol.L ⁻¹)	M	87,08 \pm 8,04	70,3 \pm 13,74

* $P < 0,05$

Tabela V. Resultados da análise multivariada de perfis para as variáveis SpO₂, Hb, Lactato, AU, CAT, GR, GS e PC em homens (H) e mulheres (M) avaliados antes (D0) e na após a primeira semana de tratamento (D7).

Variável	Hipótese	Resultado do	
		Teste Estatístico	Conclusão
SpO ₂ (%)	Interação entre sexo e dia	F = 1,16 (P = 0,2954)	NS
	Diferença entre os sexos	F = 7,92 (P = 0,0111)*	M > H
	Diferença entre os dias	F = 12,37 (P = 0,0023)*	D7 > D0
Hb (g.dL ⁻¹)	Interação entre sexo e dia	F = 1,93 (P = 0,1811)	NS
	Diferença entre os sexos	F = 1,67 (P = 0,2123)	NS
	Diferença entre os dias	F = 2,57 (P = 0,1253)	NS
Lactato (mmol.L ⁻¹)	Interação entre sexo e dia	F = 0,32 (P = 0,5801)	NS
	Diferença entre os sexos	F = 0,52 (P = 0,4786)	NS
	Diferença entre os dias	F = 0,43 (P = 0,5193)	NS
AU (U.L ⁻¹)	Interação entre sexo e dia	F = 1,92 (P = 0,1816)	NS
	Diferença entre os sexos	F = 0,05 (P = 0,8340)	NS
	Diferença entre os dias	F = 28,08 (P = 0,0001)*	D7 > D0
CAT (k.gHb ⁻¹)	Interação entre sexo e dia	F = 0,04 (P = 0,8344)	NS
	Diferença entre os sexos	F = 0,37 (P = 0,5486)	NS
	Diferença entre os dias	F = 4,67 (P = 0,0436)*	D7 > D0
GR (UI.gHb ⁻¹)	Interação entre sexo e dia	F = 3,26 (P = 0,0870)	NS
	Diferença entre os sexos	F = 0,05 (P = 0,8246)	NS
	Diferença entre os dias	F = 12,38 (P = 0,0023)*	D7 > D0
GST (μmol.L ⁻¹)	Interação entre sexo e dia	F = 1,43 (P = 0,2468)	NS
	Diferença entre os sexos	F = 0,14 (P = 0,7167)	NS
	Diferença entre os dias	F = 16,13 (P = 0,0007)*	D7 < D0
PC (μmol.L ⁻¹)	Interação entre sexo e dia	F = 0,09 (P = 0,7675)	NS
	Diferença entre os sexos	F = 0,02 (P = 0,8904)	NS
	Diferença entre os dias	F = 2,21 (P = 0,1537)	NS

* P < 0,05; NS: Não Significativo.

Análise dos marcadores nos pacientes com IResC entre sete e duzentos e setenta dias de tratamento diário com oxigênio por tempo prolongado

Na Tabela VI encontram-se as diferentes equações ajustadas para cada variável e sexo. Não foram observadas diferenças entre os sexos com relação aos interceptos (P > 0,05), denotando valores médios semelhantes para os dois grupos no D7. Com relação ao coeficiente de regressão observou-se que tanto homens

quanto mulheres apresentaram valores médios estatisticamente estáveis após a primeira semana de tratamento (interceptos estatisticamente iguais a zero) para as variáveis SpO₂, concentrações de Hb, AU e PC e atividade da enzima CAT. Somente a atividade da enzima GR apresentou queda significativa dos valores médios após a primeira semana de oxigenoterapia ($P < 0,05$), sendo que esta queda ocorreu de maneira similar para H e M. A concentração plasmática de GST se manteve inalterada ao longo desse período de observação, com os mesmos níveis baixos encontrados após sete dias de tratamento.

Tabela VI. Equações de regressão estimadas para cada variável em função do tempo (dias após a primeira semana de tratamento) e comparação entre homens (H) e mulheres (M).

Variável	Equação de Regressão	Resultado do teste estatístico ($\alpha=0,05$)	
		Intercepto	Coefficiente de Regressão
SpO₂ (%)	H: $\hat{y} = 83,90 + 0,02656x$ M: $\hat{y} = 89,10 - 0,00549x$	(M = H)	M = H = 0
Hb (g.dL ⁻¹)	H: $\hat{y} = 16,12 + 0,01194x$ M: $\hat{y} = 15,11 + 0,00274x$	(H = M)	(M < H) = 0
Lactato (mmol.L ⁻¹)	H: $\hat{y} = 2,790 - 0,00232x$ M: $\hat{y} = 2,527 - 0,00278x$	(H = M)	M = H = 0
AU (U.L ⁻¹)	H: $\hat{y} = 6,216 - 0,00184x$ M: $\hat{y} = 5,673 + 0,00121x$	(H = M)	M = H = 0
CAT (k.gHb ⁻¹)	H: $\hat{y} = 0,3921 + 0,000237x$ M: $\hat{y} = 0,3634 + 0,000870x$	(H = M)	M = H = 0
GR (UI.gHb ⁻¹)	H: $\hat{y} = 14,876 - 0,04037x$ M: $\hat{y} = 12,838 - 0,02131x$	(H = M)	(M = H) < 0
GST (μ mol.L ⁻¹)	H: $\hat{y} = 284,9 + 0,4037x$ M: $\hat{y} = 308,1 + 0,3906x$	(M = H)	(M = H) = 0
PC (μ mol.L ⁻¹)	H: $\hat{y} = 84,65 + 0,05483x$ M: $\hat{y} = 83,50 + 0,10294x$	(H = M)	M = H = 0

Os valores descritivos associados às comparações discutidas na Tabela 6 estão apresentados na Tabela VII. Para cada variável, o primeiro valor (primeira linha) refere-se à comparação do intercepto ou coeficiente de regressão com o valor

zero; e o segundo valor (segunda linha) refere-se à comparação entre os sexos, tanto para intercepto quanto para coeficiente de regressão.

Tabela 7. Valores descritivos para os testes estatísticos efetuados para interceptos e coeficientes de regressão, para cada variável considerada.

Variável	Valores de P *	
	Intercepto	Coefficiente de Regressão
SpO₂	0,0001	0,3146
(%)	0,1125	0,1404
Hb	0,0001	0,1389
(g.dL ⁻¹)	0,2701	0,0221
Lactato	0,0001	0,1303
(mmol.L ⁻¹)	0,3581	0,7980
AU	0,0001	0,8994
(U.L ⁻¹)	0,5549	0,5391
CAT	0,0001	0,1987
(k.gHb ⁻¹)	0,6585	0,4342
GR	0,0001	0,0005
(UI.gHb ⁻¹)	0,3391	0,1417
GST	0,0001	0,1590
(μ mol.L ⁻¹)	0,6284	0,9659
PC	0,0001	0,1610
(μ mol.L ⁻¹)	0,9421	0,6396

Os valores de P representados na primeira e segunda linha se referem à comparação com o valor zero e entre os sexos respectivamente.

Para uma melhor visualização dos dados apresentados nas Tabelas anteriores, mostramos a seguir a evolução temporal das variáveis estudadas antes e após o período de tratamento com oxigênio através de gráficos.

APRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS RESULTADOS

Evolução temporal das variáveis estudadas antes e após o período de tratamento com oxigênio

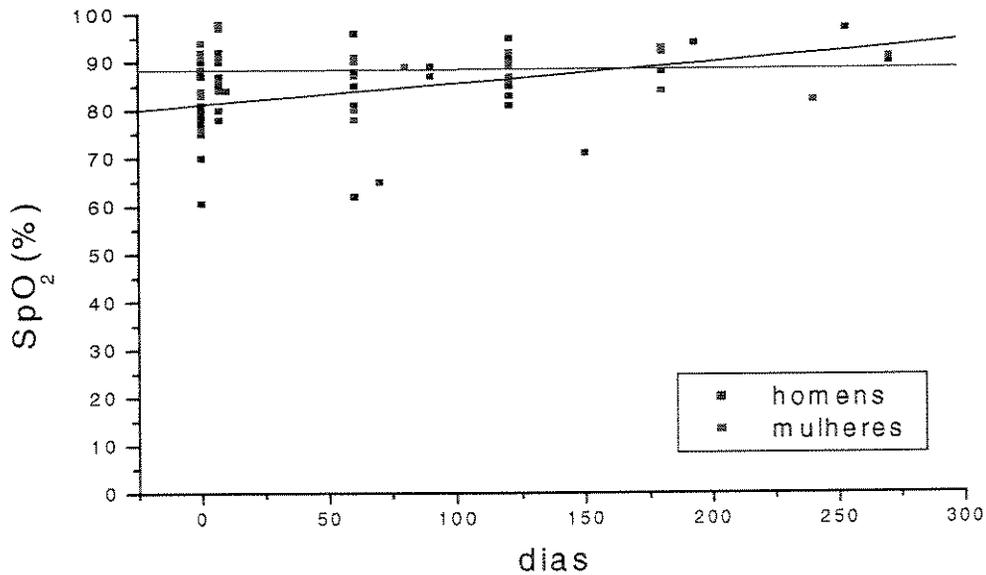


Gráfico 1. Comportamento médio da variável SpO_2 , analisada antes e após o tratamento com oxigênio. O níveis estatísticos de significância estão especificados nas Tabelas IV, V, VI e VII.

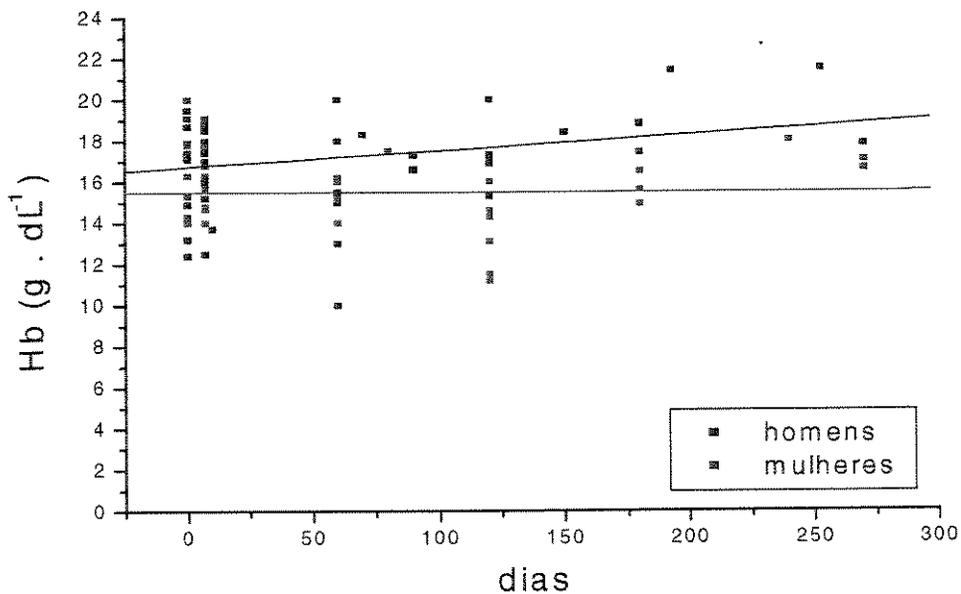


Gráfico 2. Comportamento médio da variável concentração de Hb, analisada antes e após o tratamento com oxigênio. O níveis estatísticos de significância estão especificados nas Tabelas IV, V, VI e VII.

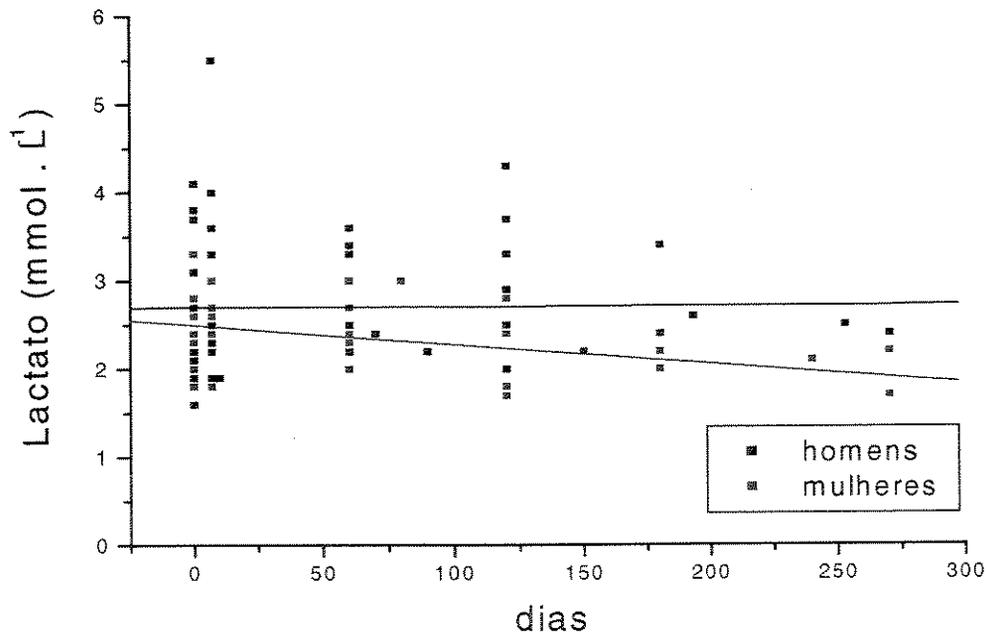


Gráfico 3. Comportamento médio da variável lactato analisada antes e após o tratamento com oxigênio. O níveis estatísticos de significância estão especificados nas Tabelas IV, V, VI e VII.

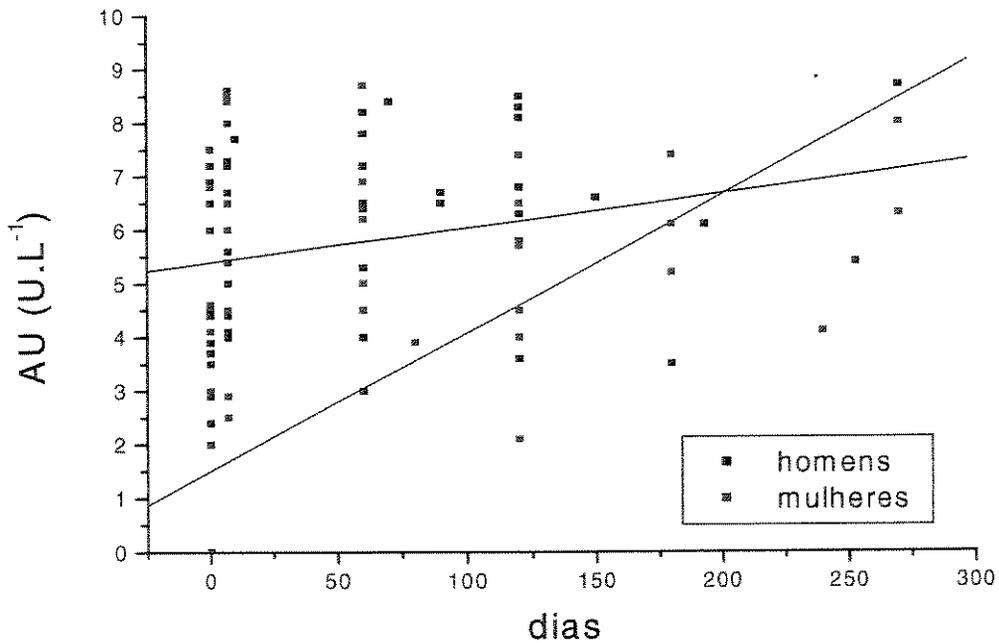


Gráfico 4. Comportamento médio da variável AU analisada antes e após o tratamento com oxigênio. O níveis estatísticos de significância estão especificados nas Tabelas IV, V, VI e VII.

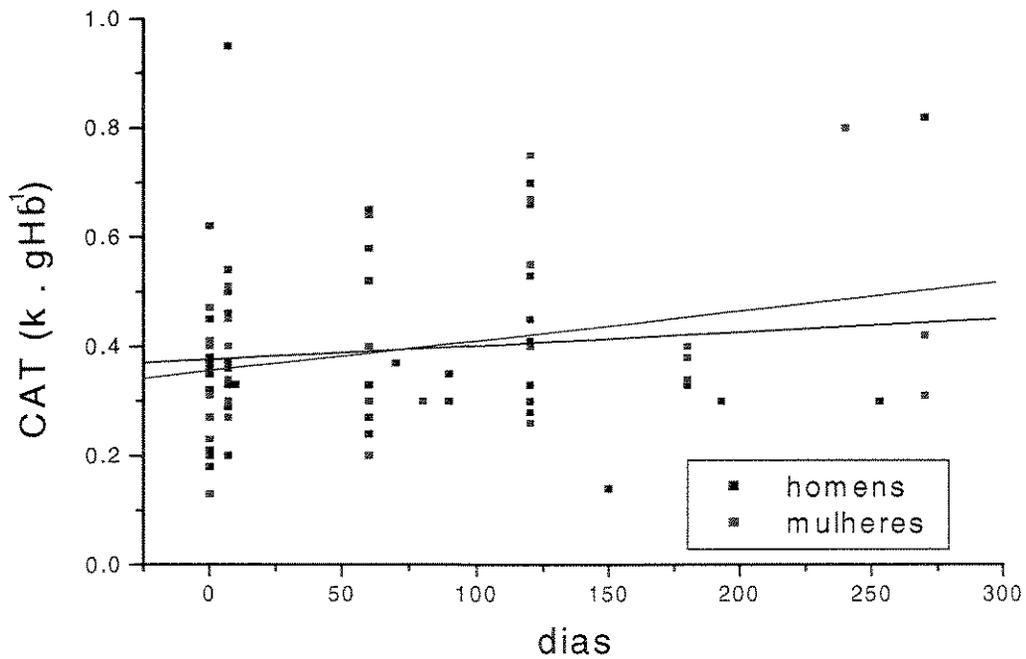


Gráfico 5. Comportamento médio da variável CAT analisada antes e após o tratamento com oxigênio. O níveis estatísticos de significância estão especificados nas Tabelas IV, V, VI e VII.

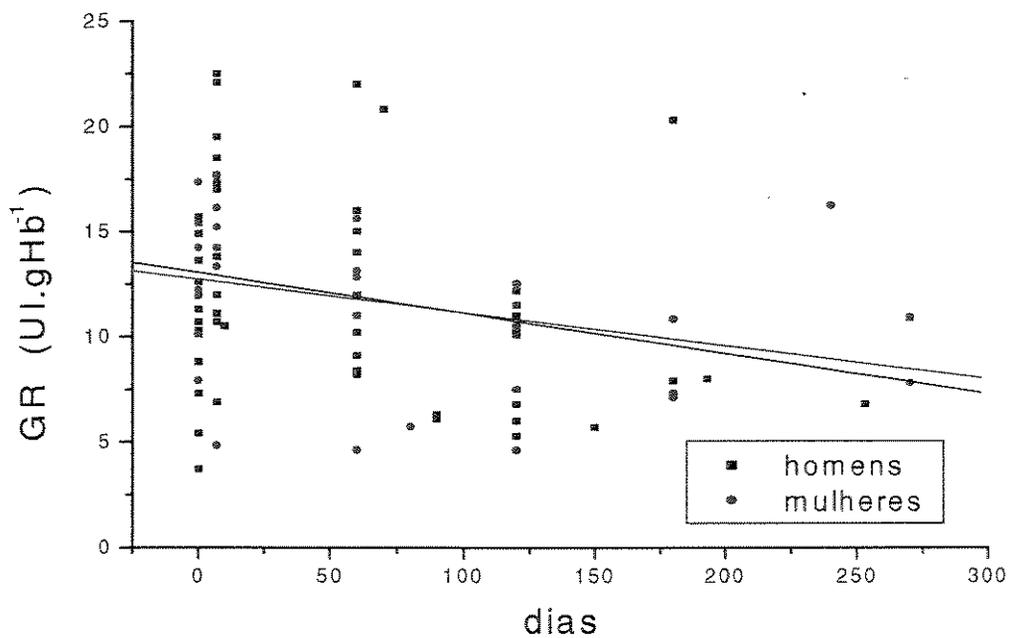


Gráfico 6. Comportamento médio da variável GR analisada antes e após o tratamento com oxigênio. O níveis estatísticos de significância estão especificados nas Tabelas IV, V, VI e VII.

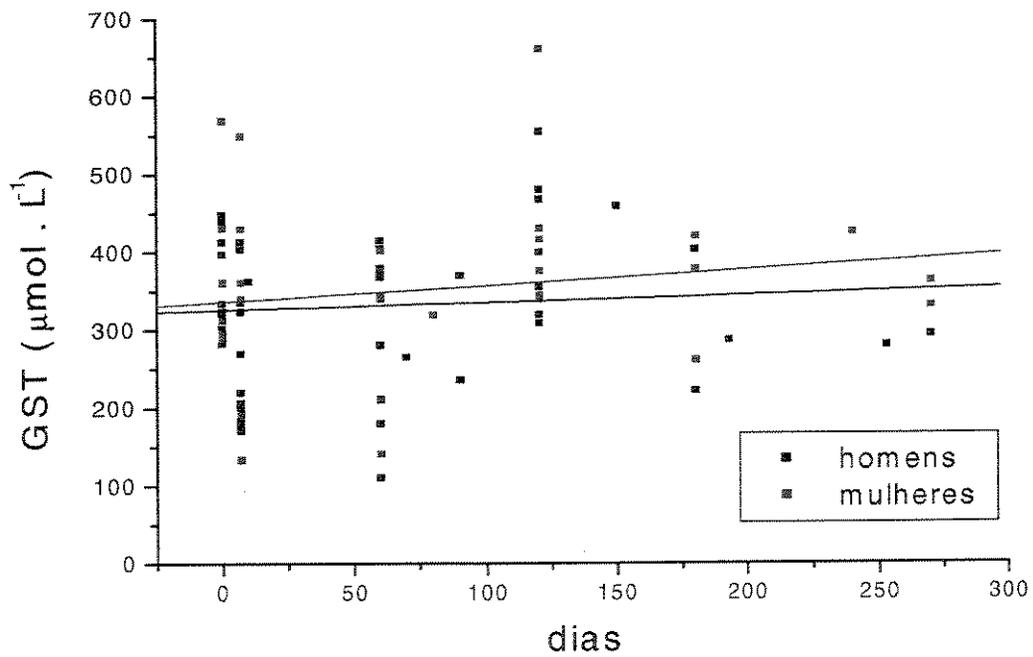


Gráfico 7. Comportamento médio da variável GST analisada antes e após o tratamento com oxigênio. O níveis estatísticos de significância estão especificados nas Tabelas IV, V, VI e VII.

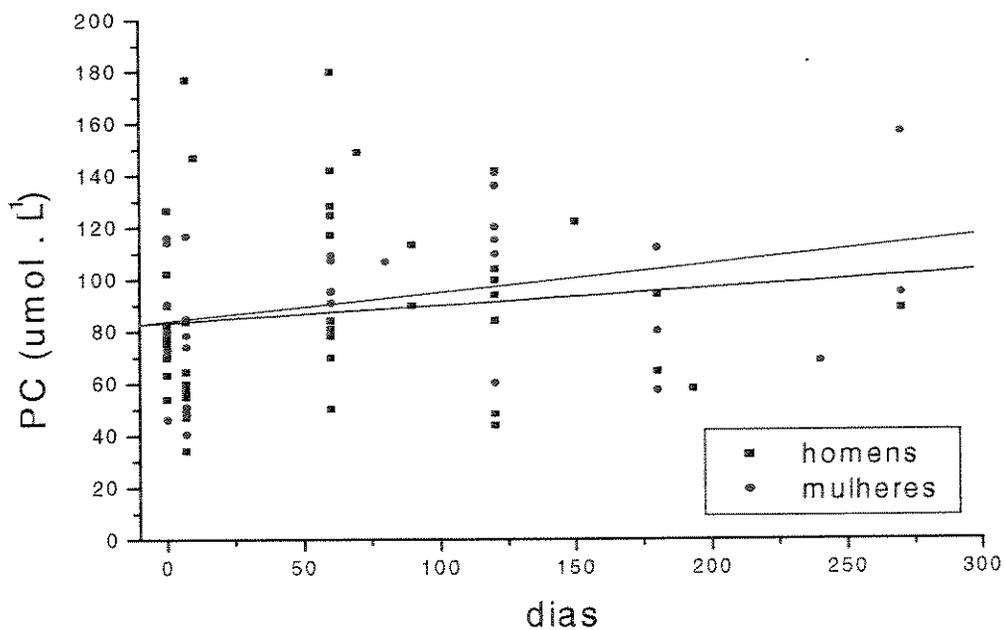


Gráfico 8. Comportamento médio da variável PC analisada antes e após o tratamento com oxigênio. O níveis estatísticos de significância estão especificados nas Tabelas IV, V, VI e VII.

DISCUSSÃO

Biomarcadores de estresse oxidativo e outros associados a IResC antes e após sete dias de ODP

Como vimos anteriormente, a principal causa de IResC é a DPOC. Segundo Stephen (2002), a DPOC é uma das doenças que mais cresce no mundo, sendo hoje a 6ª causa – morte e a 12ª causa de morbidade. Em 2020, estima-se que esta doença passe a ser a 3ª causa – morte, constituindo-se em um grande desafio para a medicina, indústria farmacêutica e sociedade. Atualmente, vários autores têm se preocupado em estudar os genes envolvidos com o desenvolvimento da DPOC, reforçando a idéia de que a predisposição genética contribui para que aproximadamente 20% dos fumantes crônicos desenvolvam esta doença (Sandford et ali, 1997; Rahman et ali, 2002). Embora estes estudos sejam relativamente recentes, existe a proposta na literatura de que a terapia gênica poderia contribuir para a cura da DPOC, porém há muito que ser feito ainda para efetivar este tipo de tratamento (Petty, 2002).

Por outro lado, desde a década de 80 têm sido proposto que um desbalanço entre oxidantes e antioxidantes estaria envolvido na fisiopatogenia da DPOC (Taylor et ali.,1986; Doelman and Bast, 1990; MacNee, 2000). A maioria dos trabalhos publicados nesta área de pesquisa envolve fumantes crônicos e portadores de DPOC antes de serem submetidos a ODP, existindo poucos trabalhos com humanos mostrando alterações em biomarcadores de estresse oxidativo durante a ODP. Dessa forma, procuramos inicialmente avaliar biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes com IResC, em fumantes crônicos (FC) e em indivíduos não fumantes (NF), com o intuito de caracterizar, através desses marcadores, as adaptações induzidas pelo hábito de fumar e pela evolução da IResC. Utilizamos os mesmos biomarcadores na segunda fase do trabalho, objetivando avaliar a evolução adaptativa da IResC durante a ODP.

A oxigenioterapia ainda é o tratamento mais indicado para pacientes portadores de IResC grave, com o intuito de restabelecer a PaO_2 e melhorar a hipertensão pulmonar, que geralmente acompanha estes indivíduos (Medical Research Council Working Party, 1981; Stuart-Harris et alii, 1981; Janssens et alii, 1997; Zielinski, 1999). É importante acrescentar, que a maioria dos trabalhos que correlacionaram estresse oxidativo e hiperóxia ou reperfusão foram feitos *in vitro* (Baker et alii, 1999) ou em cobaias (Vinã et alii, 1996; Tuncay and Wadsworth, 1999). Vinã e colaboradores em 1996 mostraram que a oxigenoterapia poderia evitar um possível aumento na oxidação da GSH durante o exercício em pacientes com DPOC. Pablos e colegas (1997) realizaram estudo em pulmão e cérebro de ratos onde perfundiram estes órgãos com 100% de O_2 por 90 min. Observaram que houve aumento nos níveis de peroxidação lipídica e diminuição nas atividades das enzimas GR e GPX. Outros autores mostraram que a inalação de altas concentrações de O_2 (95%) foi capaz de induzir toxicidade pulmonar em ratos, contribuindo para o desenvolvimento de displasia broncopulmonar. Esses autores sugeriram que esta toxicidade estava vinculada a formação de EROS como $O^{\cdot-}_2$, H_2O_2 , OH^{\cdot} e peróxidos lipídicos (Luo et alii, 1999).

Os resultados apresentados na primeira fase do presente estudo mostraram que os biomarcadores sanguíneos utilizados foram eficientes para diferenciar os pacientes com IResC com indicação para o tratamento com oxigênio, de indivíduos fumantes e não fumantes. As concentrações de hemoglobina e lactato sanguíneos se apresentaram significativamente aumentadas, refletindo a condição de hipóxia crônica a que esses pacientes estavam submetidos. As diferenças mais importantes observadas nas análises do grupo IResC em relação aos outros dois grupos, foram a diminuição na concentração plasmática de GST e na atividade das enzimas GR e CAT no hemolisado, indicando que a hipóxia crônica levou a um aumento nos níveis de estresse oxidativo nesses pacientes, mesmo quando comparados com o grupo FC. Essa diminuição no *status* antioxidante plasmático e enzimático do hemolisado poderia ser a responsável pelas freqüentes exacerbações da

doença, como mostrado por vários autores (Luo et alii, 1999; MacNee, 2000; Rahman et alii, 2002).

Em concordância com nossos dados, vários autores observaram diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e outros compostos que exercem esta função em pacientes com doenças pulmonares como DPOC, asma e fibrose cística (Taylor et alii, 1986; Brown et alii, 1996; Smit et alii, 1999). Estudos *in vitro* mostraram uma depleção significativa na concentração de GST no plasma exposto a oxidantes presentes na fumaça do cigarro (Cross et alii, 1993). Esta diminuição na concentração ou atividade de antioxidantes provavelmente está relacionada à quantidade excessiva de oxidantes presentes na fase gasosa do cigarro ou aqueles formados por outros eventos como processo inflamatório e sistema hipóxia/reperfusão, uma vez que os oxidantes são responsáveis pela oxidação de várias biomoléculas, inclusive dos próprios antioxidantes. Nesse sentido, Sjödin e colegas (1990) mostraram que a enzima CAT pode ser inativada por O_2^- e ácido hipocloroso. Além disso, Rahman e colaboradores (1997) mostraram que a diminuição na capacidade antioxidante do plasma equivalente ao trolox (TEAC) em pacientes com DPOC descompensada era acompanhada pela diminuição da concentração plasmática de GST. Foi sugerido que a diminuição na concentração ou atividade dos biomarcadores de defesa antioxidante em fumantes pode tanto estar envolvida com a suscetibilidade genética e dieta pobre em antioxidantes, como também explicar o porque somente uma pequena parcela dos indivíduos fumantes (15–20%) desenvolvem DPOC. Os dados apresentados nesse e em outros trabalhos sugerem que a concentração plasmática de GST é um biomarcador fidedigno para se estimar os diferentes níveis de estresse oxidativo aos quais os fumantes e pacientes com DPOC estão submetidos.

Nossos resultados mostraram também que, de fato, após sete dias de ODP os pacientes exibiam um aumento na saturação de O_2 na hemoglobina, sendo que os valores da SpO_2 foram maiores nas mulheres que nos homens (Tabela V e gráfico 1). Muitos estudos mostraram que o tratamento com O_2 melhorou a qualidade de vida de pacientes com DPOC grave, apresentando $PaO_2 < 55$ mmHg, mas não foi capaz de aumentar a sobrevivência de

pacientes portadores de DPOC com hipoxemia moderada ($\text{PaO}_2 > 55 \text{ mmHg}$) (Nocturnal Oxygen Therapy Group, 1980; Medical Research Council Working Party, 1981; Janssens et al, 1997; Cooper, 1994; Górecka et al; 1997; Zièlinski, 1999).

Por outro lado, sete dias de oxigênio não foram suficientes para alterar o quadro de policitemia secundária desenvolvida em razão da hipoxemia crônica antes do início do tratamento, uma vez que não detectamos alterações significativas nas concentrações de Hb, com apenas uma tendência à diminuição nesta fase, principalmente em homens. Os valores significativamente aumentados na concentração de lactato encontrados antes do tratamento também não foram revertidos após sete dias de ODP, sugerindo que o metabolismo anaeróbico continuou sendo altamente recrutado nestes indivíduos, mesmo após o início do tratamento. Em relação aos marcadores do *status* antioxidante plasmático, nossos dados mostraram que esse curto período de administração de O_2 aumentou os níveis de estresse oxidativo, que foi refletido nos marcadores avaliados, caracterizado pelo aumento na concentração de AU e diminuição na concentração de GST no plasma.

Após sete dias de oxigênio na concentração adequada, provavelmente o aumento na quantidade de oxidantes se deva principalmente ao aumento na atividade da enzima XO, a qual é responsável pelo aumento da produção do O^{\cdot}_2 durante o processo hipóxia/reperfusão, ao qual os pacientes foram necessariamente submetidos com o tratamento. Vários estudos *in vitro* e *ex vivo* sugerem a enzima XO como sendo fonte importante de produção de EROS em situações de isquemia/reperfusão (Roy and Mac Cord, 1983, Sjödin et al, 1990; Repine et al, 1997; Pinamonti et al, 1998; MacNee, 2000) (ver Figura 4 no item introdução). Repine e colaboradores (1997) mostraram que a atividade da enzima XO estava aumentada em células pulmonares de pacientes com DPOC quando comparada com células pulmonares de não fumantes. Além disso, Dekhuijzen e colegas (1996) observaram que o aumento na atividade desta enzima contribuiu para o aumento de O^{\cdot}_2 , H_2O_2 e produção de AU. Em outra publicação mais recente, Pinamonti e colaboradores mostraram também um aumento na atividade da XO com conseqüente

formação de $O^{\cdot-}_2$ e AU em lavado broncoalveolar (Pinamonti et al, 1998). Além disso, a XO pode ser responsável pelo aumento da peroxidação lipídica e oxidação da GSH sistemicamente em pacientes com DPOC submetidos ao exercício extenuante (Heunks et al, 1999). As variações na concentração de AU mostradas nesse estudo entre fumantes e pacientes com IResC após sete dias de ODP reforçam a proposta, feita por outros autores, de que este biomarcador pode ser caracterizado como de defesa ou de ataque, dependendo da sua concentração plasmática. O AU no plasma abaixo de $300 \mu\text{mol.L}^{-1}$ atua como antioxidante e acima desta concentração, pode indicar aumento de EROS no sangue como consequência da ativação da enzima XO (Freeman and Crapo, 1982).

É importante salientar que a concentração de PC, usada como biomarcador de ataque oxidativo a proteínas não se alterou com a doença, nem após sete dias de ODP. Em concordância com nossos dados, Brown e colaboradores (1996) também não mostraram alterações nas concentrações plasmáticas de PC, embora tenham correlacionado a redução da função pulmonar, caracterizada por uma diminuição em FEV_1 com aumento da concentração de malondialdeído no plasma de pacientes com fibrose cística. Esses dados sugerem que a concentração plasmática de PC não é um biomarcador adequado para avaliar a evolução clínica da IResC.

Por outro lado, o aumento nos níveis de estresse oxidativo nesses sete dias levou a uma adaptação das enzimas do sistema de defesa analisadas, que tiveram suas atividades significativamente aumentadas. Esses resultados estão em concordância com os de Rahman e colaboradores (1997), que mostraram que pacientes com DPOC submetidos a ODP apresentaram valores de TEAC no plasma significativamente mais altos (em relação aos sujeitos que não receberam ODP) após 5 a 10 dias de tratamento, embora esses autores também tivessem mostrado aumento nos níveis de estresse oxidativo sistêmico através do aumento nos níveis de peroxidação lipídica.

Vários trabalhos recentes apontam que o aumento na atividade da enzima GR ou da concentração de GSH depende da ativação da enzima γ gama glutamil cisteína sintase (γ -GCS), presente no citosol celular. Em condições

onde há depleção de GSH ocorre aumento na atividade da enzima γ GCS, através do aumento na regulação do gene envolvido com sua síntese como mecanismo adaptativo – protetor (Rahman and MacNee, 1999; Rahman et al, 2000). A queda ainda maior na concentração plasmática dos grupamentos sulfidrila totais pode também estar relacionada com a utilização de cisteína para ressíntese de GSH, uma vez que observamos um aumento na atividade da enzima GR nessas condições. Rahman e MacNee (1999) mostraram que a síntese de GSH depende da concentração de γ GCS presente no citosol, da disponibilidade de L-cisteína e da retroinibição exercida pela GSH sobre γ GCS.

Os níveis de GSH e atividade da enzima γ GCS podem ser modulados por oxidantes, antioxidantes, agentes do processo inflamatório como citocinas, XO, hiperóxia entre outros. Portanto, em situações em que ocorre efetivamente a depleção de antioxidantes, seria racional a utilização de uma terapia antioxidante eficaz. A NAC, por conter cisteína, pode contribuir para aumentar a atividade da enzima γ GCS, elevando os níveis de GSH. Vários trabalhos apontam a NAC (600 mg/dia) como um antioxidante eficaz em melhorar a função pulmonar, uma vez que a cisteína é transportada eficientemente através das membranas celulares e pode ser utilizada como substrato para síntese de GSH (Simon and Suttorp, 1985; Brown, 1994; Iuliano et al, 1994, Rahman and MacNee, 1999). É importante acrescentar que os pacientes participantes deste estudo não faziam uso de antioxidantes e, além disso, consumiam uma dieta pobre em vegetais (ver item materiais e métodos). Marangon e colaboradores (1998) mostraram que fumantes comiam menos frutas e vegetais que não fumantes e que apresentavam uma deficiência de vitamina C, E e β -caroteno (Marangon et.al., 1998). Nesse sentido, Smit e colaboradores (1999) mostraram que a ingestão de 100 mg/dia de vitamina C melhorou os sintomas de asma e DPOC, refletindo em aumento dos valores do FEV₁. Já a ingestão de α -tocoferol (50 mg/dia) e β -caroteno (20 mg/dia) não melhoraram os sintomas da DPOC.

Como observado na Tabela I, aproximadamente 50% dos pacientes faziam uso de corticosteróides. Luo e colegas (1999) mostraram que a dexametasona foi capaz de diminuir a expressão do gene responsável pela

síntese da γ GCS-HS no epitélio alveolar, e que a hidrocortisona produziu um aumento significativo na atividade da enzima γ GCS-HS em cultura de hepatócitos. Rahman e colaboradores (1999) apontaram que os valores de TEAC e GST no plasma de pacientes com DPOC não se alteraram com o uso de corticosteróides.

Biomarcadores de estresse oxidativo e outros associados a IResC após 270 dias de ODP

Um dos méritos desse trabalho foi acompanhar os mesmos pacientes por um período longo de tempo de tratamento domiciliar com oxigênio, pois não há trabalhos publicados na literatura apontando alterações nos biomarcadores de estresse oxidativo durante um período tão longo de tratamento com O_2 . Os trabalhos existentes na literatura objetivam apenas avaliar qualitativamente estes indivíduos (Janssens, et alii, 1997; Pilling and Cutáia, 1999). A SpO_2 não sofreu variação significativa em relação à etapa anterior do estudo, embora tenha apresentado uma tendência de queda. Estes dados reafirmam que a ODP realmente é eficaz em melhorar o quadro de hipoxemia crônica por aumentar o aporte de O_2 . Entretanto, ao longo deste período, os pacientes estavam bem debilitados, e na maioria dos retornos ao ambulatório, apresentavam complicações e acabavam sendo internados. Muitos dados foram perdidos nesta etapa, devido à dificuldade que estes pacientes tinham de se locomover até ao Hospital de Clínicas da Unicamp e também porque aproximadamente 30% dos participantes do estudo foram a óbito durante os 270 dias de observação. Estes dados reforçam a proposta de Górecka e colaboradores (1997), de que a melhora na qualidade de vida só ocorre no início do tratamento com O_2 , sendo que a porcentagem de sobrevivência diminui com o aumento do período de tratamento.

No gráfico 2 podemos observar que a concentração de Hb continuou apresentando uma tendência de queda, mais acentuada nas mulheres que nos homens. A diminuição da Hb, embora não seja significativa, era esperada, uma vez que a ODP aumenta o aporte de O_2 , compensando a hipóxia. Os dados

apresentados nesse estudo, mostraram que os biomarcadores utilizados foram eficientes em mostrar a evolução da doença e o efeito deletério da administração de oxigênio por um tempo bastante prolongado. Há trabalhos que mostram que o O₂ em altas concentrações provoca dano tecidual e diminuição na atividade de enzimas antioxidantes provocado pelo aumento excessivo de oxidantes (Pablos et ali, 1997; Tuncay, 1999). Nesse estudo, mostramos que após a primeira semana de tratamento e em 5 momentos ao longo de 270 dias de ODP houve diminuição significativa na atividade da enzima GR do hemolisado e a concentração plasmática de GST permaneceu em níveis muito baixos. A concentração plasmática de AU não sofreu alterações significativas em relação ao período anterior, se mantendo aumentada ao longo do tempo de ODP, devido provavelmente a um aumento na atividade da enzima XO. Por outro lado, a enzima antioxidante CAT não se alterou neste período de tratamento, ou seja, sua atividade se manteve aumentada em relação à fase anterior ao tratamento, corroborando com dados da literatura, que a enzima CAT pode ser mais resistente à ação dos radicais oxidantes do que a enzima GPX e GR (Powers et ali., 1999). Podemos também especular, que a diminuição da atividade da GR pode ser devido a uma ação alostérica negativa dos oxidantes na enzima (Rahman and MacNee, 1999).

Resumindo, todos os dados apresentados nesse trabalho, sugerem que a condição de hipóxia crônica a que esses pacientes são submetidos com a evolução da doença, exerce um efeito devastador sobre o organismo, de forma que o tratamento com oxigênio não corrige esse quadro (caracterizado pelo aumento na lactatemia, observado desde a primeira fase do estudo – Tabela III), embora altere parâmetros da defesa antioxidante importantes nesses pacientes, como o aumento nas atividades enzimáticas do hemolisado, visualizadas após um curto período de tempo de tratamento. Entretanto, com o aumento no tempo de tratamento os níveis de estresse oxidativo aumentam novamente, com a evolução clínica da doença.

CONCLUSÕES:

- A condição de hipoxemia crônica a que os pacientes são submetidos antes da ODP induz uma diminuição importante no sistema de defesa antioxidante analisado, refletido tanto pela queda na concentração plasmática de GST quanto pela diminuição na atividade das enzimas CAT e GR no hemolisado.
- A administração de oxigênio por um curto período de tempo, embora seja acompanhada por um aumento na produção de EROS induz um efeito adaptativo benéfico, representado pelo aumento na atividade das enzimas CAT e GR, provavelmente através da ocorrência de uma modulação alostérica positiva nestas enzimas. A melhora na saturação de oxigênio na Hb diminui o quadro de policitemia secundária, mas não se traduz em diminuição do recrutamento do metabolismo anaeróbico.
- A administração de oxigênio por tempo prolongado não acrescenta melhoras no sistema de defesa antioxidante, que sofre sinais de queda ao longo dos 270 dias de tratamento, não sendo suficiente, portanto, para impedir a evolução clínica da doença.

BIBLIOGRAFIA

ADLER, K.B., HOLDEN-STAUFFER, W.J. AND J.E, REPINE. Oxygen metabolites stimulate release of high molecular weight glycoconjugates by cell and organ cultures of rodent respiratory epithelium via na arachidonic acid-dependent mechanism. **J. Clin.Invest.** v.85: p.75-85, 1990.

AEBI, H. Catalase. **Meth. Enzymol.** v.105: p.121-126, 1984.

American College of Chest Physicians, American Thoracic Society: Pulmonary terms and symbols. A report of the ACCP-ATS joint Committee on Pulmonare Nomenclature. **Chest**, v. 67, p.583, 1975.

ANTHONISEN, N.R., CONNETT, J.E., KILEY, J. P., ALTOSE, M.D., BAILEY, W.C., BUIST, A. S., CONWAY, W.A. J., ERIGHT, P.L., KANNER, R. E. AND O'HARA, P. Effects of smoking intervention and the use of na inhaled anticholinergic bronchodilatador on the rate of decline of FEV1: The lung health study. **J.A.M.A.** v.272: p.1497 - 1505, 1994.

ANTWERPEN, L. V., THERON, A. J., MYER, M.S., RICHARDS, G.A., WOLMARANS, L., BOOYSEN, U. Cigarette smoke-mediated oxidant stress, phagocytes, vitamin C, vitamin E and tissue injury. **Ann. NY. Acad. Sci.** v. 686, p. 53 - 65, 1993.

BAKER, C.J., LONGORIA, J. , GADE, P.V., STARNES, V.A., AND BARR, M.L. Addition of a water-soluble α -tocopherol analogue to university of wisconsin solution improves endothelial viability and decreases lung reperfusion injury. **J. Surg. Res.** v. 86: p. 145 - 149, 1999.

BAST, A., HAENEN, G.R.M., DOELMAN, C.J.A. Oxidants and antioxidantes: stade of the art. **Am. J. Med.** V. 91 (suppl.), 2S- 22S, 1991.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism in: A manual of biochemical methods, 2° ed., Grune & Stratton publishers, London, 1975.

BOVERIS, A. and CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem. J.** v. 134:707-716, 1972.

BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scand J.Clin.Lab. Invest.** v. 21(suppl 97): p.77, 1968.

BRAUN, H.P., DENEKE, U., RITTERSDORF, W. Analytical performance of reflatron-R creatine kinase reagent carriers compared with the CK-NAC-method. **Clin. Chem.** v. 33:p. 988, 1987.

BRIDGES, A. B., SCOTT, N. A., PARRY, G. J. AND BELCH, J. J. F. Age, Sex, cigarette smoking and indices of free radical activity in healthy humans. **Eur. J. Med.** v.2: p.205 – 208, 1993.

BROWN, D.; BROWN, G.; WILLIAMS, J.H. AND MACNEE, W. Priming of neutrophils sequestered in the pulmonary vasculature in acute alveolitis. **Am. Rev. Respir. Dis.** v.144: p.668, 1993.

BROWN, K. M., MORRICE, P. C. AND DUTHIE, G. G. Vitamin E supplementation suppresses index of lipid peroxidation and platelet counts in blood of smokers and nonsmokers but plasma lipoprotein concentrations remain unchanged. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 60 : p.383 – 387, 1994.

BROWN, R.K., WYATT, H., PRICE, J.F. AND KELLY, F.J. Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. **Eur. Respir. J.** v.9:p.334-339, 1996.

CARAFOLI, I.E. AND CROMPTON, M. The regulation of intracellular calcium. **Am.Rev.Biochem.** v. 56, p.395- 433, 1987.

CAÑAS, P.E. The role of xanthine oxidase and the effects of antioxidants in ischemia reperfusion cell injury. **Acta. Physiol.Pharmacol.** v.49, n 1, p.13-20, 1999.

CHAUDIÈRE, J. AND FERRARI-ILIOU. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical Mechanisms. **Food. Chem. Toxicol.** v. 37: p. 949 – 962, 1999.

CHOW, C.K. Cigarette smoking and oxidative damage in lung. **Ann NY Acad Sci USA.** v. 686, p.289-298, 1993.

COOPER, C. B., WATERHOUSE, J., HOWARD, P. Twelvw-year clinical study of patients with hypoxic cor pulmonale given long-term domiciliary oxygen therapy. **Thorax.** v.42: p.105-110, 1987.

COOPER, C.B. Life expectancy in severe COPD. **Chest.** v.105: p.335- 336, 1994.

COTGREAVE, I.A., GRAFSTROM, R.C., MOLDEUS, D. Modulation of pneumotoxicity by cellular glutathione and precursors. **Bull. Eur. Physiopathol. Respir.** V. 22, p. 263S – 266S, 1986.

COURSIN, D.B. AND CIHLA, H.P. Pulmonary effects of short term selenium deficiency. **Thorax.** V.51, p. 479 – 483, 1996.

CROSS, C.E., O'NEILL, A.O., REZNICK, A.Z., HU, M.L., MARCOCCI, L., PACKER, L. AND FREI, B. Cigarette smoke oxidation of human plasma constituents. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.686: p.72 – 89, 1993.

CRYSTAL, R.G., WEST, J.B., BARNES, P.J., CHERNIAK, N.S., WEIBEL,E.R. **The Lung: Scientific Foundations.** Raven Press, New York, 1991.

CUELLO, A.F., ARCODACI, C.S. **Bronco Obstrução.** Panamericana, São Paulo, 1987.

DEMIRYÜREK, A.T., WADSWORTH, R.M. Superoxide in pulmonary circulation. **Pharmacol.Ther.** v.84, n 3, p. 355-365, 1999.

DEKHUIJZEN, P.N.R., ABEN, K.K.H.,DEKKER, I., AARTS, L.P.H.J., WIELDERS, L.M.L.,HERWAARDEN, C.L.A.V. AND BAST, A. Increased Exhalation of hidrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease.**Am. J. Respir. Crit. Care. Med.** v. 154: p.813-816, 1996.

DOELMAN, C.J.A. AND BAST, A. Oxygen radicals in lung pathology. **Free.Rad.Biol.Med.** v. 9; p. 381 – 400, 1990.

DRABKIN, D. L. Spectrophotometric studies - XIV. The crystallographic and optical properties of the hemoglobin in man in comparison with those in other species. *J. Biol. Chem.*, v.164: p.703, 1946.

DUTHIE, G.G., ARTHUR, J.R. AND JAMES, W.P.T. Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status. **Am. J. Clin.Nutr.** v.53: p. 1061S – 1063S, 1991.

EISERICH, J.P., VAN DER VLIET, A., HANDELMAN, G.J., HALLIWELL, B. AND CROSS,C.E. Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage:a complex interaction. **Am. J. Clin. Nutr.** v.62: p.1490S-1500S,1995.

ELSNER, R., B.GOODEN. Diving and asphyxia: a comparative study of animals and man. Cambridge University Press, 1983.

EPSTEIN, H.E. Mechanisms of disease. **New. England. J. med.** v.312, p.159- 163, 1985.

FELDMAN, C.R., ANDERSON, K.K., VARGAS,A., COLE, P.J. AND WILSON, R. Oxidant-mediated ciliary dysfunction. **Free.Rad.Biol.Med.** v.17: p.1-10, 1994.

FLETCHER, C. AND N.B. PRIDE. Definitions of emphysema, chronic bronchitis, asthma and airflow obstruction: 25 years on from the Ciba Symposium. **Thorax.** 39: 81-85, 1984.

FREEMAN, B. A. AND CRAPO, J. D. Biology of disease. Free Radicals and tissue injury. **Lab. Invest.** v. 47, p. 412 – 426, 1982.

GÓRECKA, D.,GORZELAK, K., SLIWINSKI, P., TOBIASZ, M. AND ZIELINSKI, J. Effect of long term oxygen therapy on survival in patients with chronic obstructive pulmonary disease with moderate hypoxaemia. **Thorax.** v. 52: p. 674 – 679, 1997.

GUTIERREZ, G., POHIL, R. J., ANDRY, J. M., STRONG, R. AND NARAYANA, P. Bioenergetics of rabbit skeletal muscle during hypoxemia and ischemia. **J.Appl.Physiol.**v.65, n 2, p.608-616, 1988.

GREEN, H.J., SUTTON, J. R., CYMERMEN, A., YOUNG, P. M. AND HOUSTON, C. S. Operation Everest II: Adaptations in Human Skeletal Muscle. **J. Appl. Physiol.** v.66, n.5, p.2454-2461, 1989.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. **Free. Radic.Biol.Med.** (B. Halliwell and J. M. C.Gutteridge eds.) p. 188-1266, Oxford UK, 1989.

HALLIWELL, B. AND CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 57: p. 715S – 724S, 1993.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C.In: **Free. Radic.Biol.Med.** 3^a ed. Oxford University Press, 1998.

HEUNKS, L.M.A., VINÃ, J. , VAN HERWAARDEN, C.L.A., FOLGERING, H.T.M., GIMENO, A., AND RICHARD DEKHUIJZEN, P.N. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Physiol.** V.277: p. R1697 - R1704, 1999.

HOCHACHKA, P. W., C. STANLEY AND J. SUMAR-KALNUWSKI. Metabolic meaning of elevated levels of oxidative enzymes in high altitude adaptative animals: na interpretative hypotesis. **Respir.Physiol.** v. 52, p. 303-313, 1982.

HU, M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. **Meth.Enzymol.** v.233: p.381-383.

IULIANO, L.; PEDERSEN, J. Z.; PRATICÒ, D.; ROTILIO, G.; VIOLI, F. Role of hydroxyl radicals in the activation of human platelets. **Eur. J. Biochem** v. 221: p.695-704, 1994.

JAKOBSSON, JORFELDT, L. AND HENRIKSSON, J. Metabolic Enzyme Activity in the Quadriceps Femoris Muscle in Patientes With Severe Chronic Obstructive Disease. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 151, p.374- 377, 1995.

JANOFF, A. Biochemical links between cigarette smoking and pulmonary emphysema. **J. Appl. Physiol.** v.55: p.285-293, 1983.

JONES, J.G, LAWER, P., CRAWLER, J.C.W., MINTZ, B.D., HULANDS, G. AND N.VEALL.
Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers. **Lancet.** v.1: p.66-68, 1980.

JANSSENS, J.P., ROCHAT, T., FREY, J.G., DOUSSE, N., PICHARD, C. AND TSCHOPP, J.M.
Health-related quality of life in patients under long-term oxygen therapy: a home-based descriptive study. **Respir. Med.** v.91: p. 592 – 602, 1997.

JORDAN, J. S. W.; GAIROLA, C. AND St. CLAIR, D. Protective role of manganese superoxide dismutase in cigarette smoke-induced cytotoxicity (abstract). **Proceed. Ann. Meet. Am.Assoc. Cancer Res.** v.34: p.A97, 1993.

KILBURN, K. H. AND W. MCKENZIE. Leucocyte recruitment to airways by cigarette smoke and particle phase in contrast to cytotoxicity of vapor. **Science.** v.189: p.634 – 637, 1975.

LEVINE, R.L., GARLAND, D., OLIVER, C.N., AMICI, A., CLIMENT, I., ANKE-G, BONG-WHAN AHN, L., SHALTIEL, S. AND STADTMAN, R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Meth. Enzymol.** v.49: p.465-479.

LITTELL, R. C., MILLIKEN, G. A., STROUP, W. W., WOLFINGER, R. D. *SAS® System for Mixed Models.* Cary, NC: **SAS Institute Inc.**, 1996. 633p.

LUO, X., SEDLACKOVA, L., BELCASTRO, R., CABACUNGAN, J., STEPHEN, J.L AND TRANSWELL, A.K. Effect of the 21-Aminosteroid U74389G on oxygen-induced free radical production, lipid peroxidation and inhibition of lung growth in neonatal rats. **Pediatr. Res.** V. 46: p. 215 – 223, 1999.

MALTAIS,F., SIMARD,A., SIMARD,C., JOBIN,F., DESGAGNÉS, P. AND LE BLANC,P. Oxidative Capacity of the Skeletal Muscle and Lactic Acid Kinetics During Exercise in Normal Subjects and in Patients With COPD. **Am J Respir Crit Care Med.** v.153 p.288-293, 1996.

MARANGON, K., HERBETH, B., LCONTE, E., PAUL-DAUPHIN, A., GROLIER, P., CHANCERELLE, Y., ARTUR, Y AND SIEST,G. Diet, antioxidant status, and smoking habits in french men. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 67: p. 231 – 239, 1998.

MAZZETTI, A. , LAPENNA, D., PIERDOMENICO, S. D., CALAFIORI, A. M., COSTANTINI, F., RIARIO-SFORZA, G., IMBASTARO, T., NERI, M. AND CUCCURULLO, F. Vitamins e, c and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. **Artherosclerosis**. v.112: p.91 – 99, 1995.

MEAD, J. Mechanics of lung and chest wall. *Respiratory Physiology: peoples e ideas*. Oxford, p. 173 – 207, 1996.

Medical Research Council Working Party. Report of long-term domiciliary oxygen therapy in chronic hypoxic cor pulmonale complicating chronic bronchitis and emphysema. **Lancet**. V.1, p. 681 –685, 1981.

McCUSKER, K. AND HOIDAL, J. Selective increase of antioxidant enzyme activity in the alveolar macrophage from cigarette smokers and smoke- exposed hamsters. **Am.Rev.Respir.Dis**. v.141: p.678 – 682, 1990.

MILLER, N. J., C. RICE-EVANS, M.J.DAVIES, V. GOPINATHAN AND MILNER. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature babies. **Clin. Sci**. v. 84: p. 407 –412, 1993.

MORRISON, D. F. *Multivariate Statistical Methods*. NY: McGraw-Hill. P.415,1967.

MORRISON, D., I. RAHMAN, S. LANNAN AND W. MACNEE. Epithelial permeability, inflammation, and antioxidant status in the air spaces of chronic smokers. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**. v. 159: p. 473-479, 1999.

MORROW., J. D., FREI, B., LOGMIRE, A. W., GAZIANO, J.M., LYNCH, S.M., YU, S. STRAUSS, W., OATES, J. A. AND ROBERTS, L.J. Increased in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprotanes) in smokers: smoking as a cause of oxidative damage. **N.Engl. J.Med**. v.332: p. 1198 – 1203, 1995.

MURATA, A.; SHIRASKI, L.; FUKAZAKI, K.; KITTARA, T. AND ARADA, Y. Lower levels of vitamin C in plasma and urine of japanese male smokers. **Int. J.Vitam. Nutr. Res**. v.59: p.184-189, 1989.

Nocturnal Oxygen Therapy Trial Group: continuous or nocturnal oxygen therapy in hypoxemic chronic obstructive lung disease, a clinical trial. **Ann Intern Med.** v.93,p.391-398, 1980.

PABLOS, M.I., REITER, R.J., CHUANG, J., ORTIZ, G.G., GUERRERO, J.M., SEWERYNEK, E., AGAPITO, M.T., MELCHIORRI, D., LAWRENCE, R. AND DENEKE, S.M. Acutely administered melatonin reduces oxidative damage in lung and brain induced by hyperbaric oxygen. **J. Appl. Physiol.** v. 83 (2): p. 354-358, 1997.

PETTY, T.L. COPD in perspective. **Chest.** v.121: p.116S-120S, 2002.

PIQUETTE, C. A., AND RENNARD, S.I. Chronic bronchitis: focus on maintaining pulmonary function. **Intern.Med.** p. 82 - 91, 1996.

PILLING, J. AND CUTAIA, M. Ambulatory oxymetry monitoring in patients with severe COPD. **Chest.** v. 116: p. 314 -321, 1999.

PINAMONTI, S., LEIS, M., BARBIERI, A., LEONI, D., MUZZOLI, M., SOSTERO, S., CHICCA, M.C., CARRIERI, A. RAVENNA, F., FABBRI, L.M. AND CIACCIA, A. Detection of xanthine oxidase activity products by EPR and HPLC in bronchoalveolar lavage fluid from patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Free.Radic.Biol.Med.** v. 25: p. 771 -779, 1998.

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

POWERS, S. K., JI, L. L., LEEUWENBURG, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Med. Sci. Sports Exercise** v.31:p.987-997,1999.

PRYOR, W.A, DOOLEY, M.D. AND D.F.CHURCH. The mechanisms of inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by gas phase cigarette smoke. **Free. Radic. Biol. Med.** v.2, p. 161-168, 1986.

RAHMAN, I., MORRISON, D., DONALDSON, K. AND MACNEE, W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v. 154: p.1055-1060, 1996.

RAHMAN, I AND MACNEE, W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. **Free Radic.Biol.Med.** v.21:p. 669-681, 1996.

RAHMAN, I., SKWARSKA, E. AND MacNEE, W. Attenuation of oxidant/antioxidant imbalance during treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax.** v. 52: p. 565 - 568, 1997.

RAHMAN, I. AND MacNEE, W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. **Am. Physiol. Soc.** v. 277: p. L1067 - L1088, 1999.

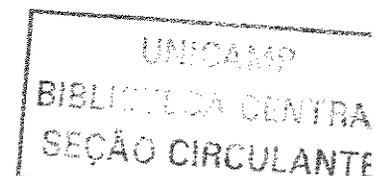
RAHMAN, I., VAN SCHADEWIJK, A.A., CROWTHER, A.J. HIEMSTRA, P.S., STOLK, J., MacNEE, W. AND BOER, W.I. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lung of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v.166(4): p. 490 - 495, 2002.

REPINE, J. E., BAST, A., LANKHORST, I. AND THE OXIDATIVE STRESS STUDY GROUP. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v.156, p. 341-357, 1997.

ROSA, G. J. R. Desenvolvimento de aplicativo para a análise de perfil na experimentação zootécnica. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Botucatu. 1994.

ROY, R.S., McCORD, J.M. Superoxide and ischemia: conversion of xanthine dehydrogenase to xantine oxidase. **Cell. Mol. Aspects.** Elsevier Science, New York. v.2, p. 145-153, 1983.

SAETTA, M.; STEFANO, A.; MAESTRELLI, A. F.; DRIGO, R., POTENA, A.; CIACCIA, A. AND FABBRIO. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. **Am. Rev.Respir Dis.** v.147. p. 301 - 306, 1993.



SALVATO, G. Some histological changes in chronic bronchitis and asthma. **Thorax**. p.23: p.168-172, 1968.

SANDFORD, A.J. WEIR, T.D. AND PARÉ, P.D. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. **Eur.Respir.J.** v.10: p.1380-1391,1997.

SILVERMAN, E.K. Genetic Epidemiology of COPD. **Chest**. v. 121: p. 1S – 6S, 2002.

SIMON, L.M. AND SUTTORP, N. Lung cell oxidant injury: decrease in oxidant mediated cytotoxicity by N-acetylcysteine. **Eur. J. Respir. Dis.** v. 66 (suppl.), p. 132 – 135, 1985.

SJÖDIN, B., WESTING, Y. H. AND APPLE, F.S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Medicine**. v. 10 (4), p. 236 – 254, 1990.

SMIT, H.A., GRIEVINK, L. AND TABAK, C. Dietary influences on chronic obstructive lung disease and asthma: a review of the epidemiological evidence. **Proc. Nutr. Soc.** v. 58: p. 309 – 319, 1999.

SMITH, I.K., VIERHELLER, T.L. AND THORNE, C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5 dithiobis (2-nitrobenzoic acid). **Anal.Biochem.**v.175: p.408-413,1988.

STEPHEN, I. RENNARD AND STEPHEN, G. FARMER. A Major Challenge for Medicine, Pharmaceutical Industry, and Society. **Chest**. v. 121(Suppl); 113S-115S, 2002.

STS Statement. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am.J.Respir.Crit.Care.Med.** v.152 (Suppl.): p. S77-S121,1995.

STUART-HARRIS, C., FLENLEY, D.C., BISHOP, J.M. Long-term domiciliary oxygen Therapy in chronic hypoxic *cor pulmonale* complicating bronchitis and emphysema. **Lancet**. v.1, p.681-686,1981.

SUSSMAN, M.S. AND BULKLEY, G.B. Oxygen-derived free radicals in reperfusion Injury. **Meth. Enzimol.** v. 186, p.711-723, 1990.

SUZUKI, J. Y.; FORMAN, H. J.; SEVANI, A. Oxidants as stimulators of signal transduction. **Free Radic. Biol. Med.** v.22, p. 269-285., 1997.

TAYLOR, J.C., MADISON, R. A., KOSINSKA, D. Is antioxidant deficiency related to chronic obstructive pulmonary disease? *Am. Rev. Respir. Dis.* v. 134, p. 285 – 289, 1986.

THERON, A. J., RICHARDS, G.A., RESBURG, A. J., VAN der MERVE, C.A., ANDERSON, R. Investigation of the role of phagocytes and antioxidant nutrients in oxidant stress mediated by cigarette smoke. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.** v. 60, p. 261 – 266, 1990.

THOMPSON, A.B. T. B.; HEIRES, A.; LINDER, J. AND RENNARD, S.I. Lower respiratory tract iron burden is increased in association with cigarette smoking. **J. Lab. Clin. Med.** v.117, p. 494 – 499, 1991.

TUNCAY DEMIRYÜREK, A. AND WADSWORTH, R.M. Superoxide in the pulmonary circulation. **Pharmacol.Ther.** . v. 84: p. 355 – 365, 1999.

WEIBEL, E. R. The structural basis of lung function. *Respiratory Physiology: peoples and ideas.* Oxford, p. 3 – 6, 1996.

WEITZENBLUM, E., SAUTEGEAU, A ., EHRHART, M., MAMOSSER, M., HIRTH,C., ROEGEL, E. Long-term course of pulmonary arterial pressure in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am. Rev.Respir. Dis.** v.130, p. 993-8, 1984.

WEST, J.B. Pulmonary blood flow and gas exchange. In West J B (ed). *Respiratory Physiology: people and ideas.* Oxford: Oxford University Press, 1996.

WILKINSON, M., LANGHORNE, C.A., HEATH, D., BARER, G.R., HOWARD, P.A pthatophysiological study of 10 cases of hipoxic cor pulmonale. **Q. J. Med.** v.249, p.65-85, 1988.

WILLIAM MACNEE. Oxidants/Antioxidants and COPD. **Chest.** v. 117; p.303S-317S. Supplement, 2000.

WILLIAM MACNEE AND IRFAN RAHMAN. Lung glutathione and oxidative stress: implication in cigarette smoke-induced airway disease. **Am. Physiol. Soc.** p. L1067-L1088, 1999.

WILLIAM MACNEE. Oxidants/Antioxidants and COPD. **Chest.** v.117 (Suppl.): p.303S-317S, 2000.

WINTERBOURN, C. C. Oxidative reactions of hemoglobin. **Methods enzymol.** p. 186: 265 - 271, 1990.

VERBEKE, G., MOLENBERGHS, G. (eds) *Linear Mixed Models in Practice: a SAS-Oriented Approach.* NY: **Springer.** p. 306, 1997.

VINÃ, J., SERVERA, E., ASENSI, M., SASTRE, J., PALLARDÓ, F.V., FERRERO, J.A., GARCÍA-DE-LA-ASSUNCIÓN, J., ANTÓN, V. AND MARÍN, J. Exercise causes blood glutathione oxidation in chronic obstructive pulmonary disease: prevention by O₂ therapy. **J. Appl. Physiol.** v. 81 (5): p. 2199 - 2202, 1996.

ZIÈLINSKI, J. Indications for long term oxygen therapy: a reappraisal. **Monaldi. Arch. Chest. Dis.** v. 54 (2): p. 178 - 182, 1999.

YAGI, K. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochem. Med.** v.15, p. 212-216, 1976.

ZIN, W. A. AND ROCCO, P.R.M. *Mecânica Respiratória Normal.* Atheneu, São Paulo, 1995.

ZORATTI, E. M.; SEDGWICK, R.F.V. AND BUSSE, W.W. The effect of platelet-activating factor on the generation of superoxide anion in human eosinophils and neutrophils. **J. Allergy. Clin. Immunol.** v.88, p. 749- 758, 1991.

ANEXO I

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA

CONSULTA No. 435/97-C.Ética

DATA: 27.10.97

ASSUNTO: "Estrutura e função da fibra muscular estriada esquelética em condições de hipoxemia severa e a resposta adaptativa à anaerobiase: estudo pré e pós-oxigenioterapia prolongada domiciliar"

INTERESSADO: Dra. Ilma Aparecida Paschoal

RELATOR: Dr. Plínio Trabasso

PARECER

Consideramos que o protocolo referido acima, bem como seu Termo de Consentimento Pós-Informação obedecem os requisitos necessários para pesquisa. No entanto, deverão ser acrescentados os números de telefone de todos os pesquisadores e da Comissão de Ética Médica (7888004), caso o paciente necessite entrar em contato.

Esta Comissão manifesta-se favorável à realização do estudo.



Dr. Plínio Trabasso
MEMBRO RELATOR



Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRÉSIDENTE DA COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA
HC/UNICAMP

ANEXO II



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☒ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas-S.P.
☎ (019) 289.3749 ou 7232
(019) 289.3114 fax
☒ cep@heada.fcm.unicamp.br

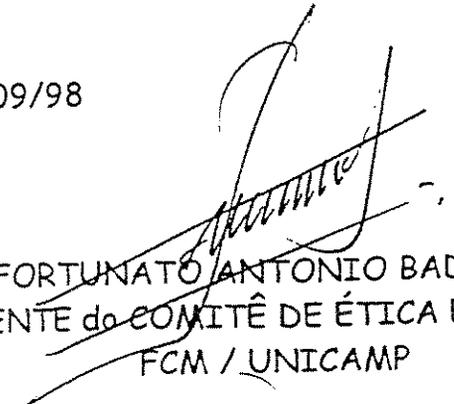
PARECER: Nº 120/98

PESQUISA: ESTRUTURA E FUNÇÃO DA FIBRA MUSCULAR ESTRIADA ESQUELÉTICA SOB CONDIÇÕES DE HIPOXEMIA SEVERA E A RESPOSTA ADAPTATIVA À ANAEROBIOSE: ESTUDO PRÉ E PÓS OXIGENIOTERAPIA PROLONGADA DOMICILIAR (coleta de sangue da veia antecubital)

PESQUISADORA: Soraya El-Khatib

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após aprovação da Comissão de Ética Médica do HC da UNICAMP em 22/Abril/1996, referenda a pesquisa supracitada bem como o Consentimento Pós- Informação por estarem contempladas as Resoluções 196/96 e 251/97.

CEP/FCM, 21/09/98


Prof. Dr. FORTUNATO ANTONIO BADAN PALHARES
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO

Concordo em participar da pesquisa denominada “Estrutura e função da fibra muscular estriada esquelética em condições de hipoxemia severa e a resposta adaptativa à anaerobiose: estudo antes e após uso de oxigenoterapia prolongada domiciliar”.

Serei submetido à coletas sanguíneas antes e depois do início do uso da suplementação de oxigênio. **Este procedimento será feito com todos os cuidados de assepsia necessários e por profissional capacitado e habilitado. Será coletado 5 mL de sangue da veia antecubital com seringas e agulhas descartáveis.**

Esta pesquisa não interferirá no meu tratamento habitual. Continuarei realizando exames periódicos e fazendo uso das medicações costumeiras.

Em caso de qualquer dúvida devo reportar-me ao Farmacêutico responsável ou Médico assistente através de um dos telefones fornecidos abaixo ou ao Serviço de Pneumologia do HC-Unicamp.

Nome:

HC: RG: Idade:anos

Endereço:

..... Telefone para contato:

Campinas,/...../.....

Assinatura do paciente:

Assinatura do Farmacêutico responsável:

Telefones para contato com a equipe médica: 7887753 ou 2891217 ou 2875655 ou 7887886

ANEXO IV

Questionário para obtenção de dados relacionados aos pacientes portadores de IResC

1. Quais são os medicamentos consumidos atualmente? Incluir suplementos vitamínicos.

2. Quais os principais tipos de alimentos que o paciente consome predominantemente?

a. carnes b. massas e pães c. peixes d. legumes

e. verduras f. frutas

3. É fumante ou ex fumante? Se ex fumante, por quanto tempo (anos) consumiu cigarros?

4. O paciente apresenta outras doenças associadas a DPOC? Se sim, quais?

ANEXO V

Nome:									
Data nascimento:					Data 1ª consulta:				
Quadro clínico:									
Parâmetros	valor	data	valor	data	valor	data	valor	data	V Ref.
% sat O ₂									95 – 98 %
PO ₂									83 – 108 mmHg
PCO ₂									35 – 45 mmHg
pH									7,35 – 7,45
HCO ₃ ⁻									18 – 23 mmol.L ⁻¹
Hb									H: 14-17 g.dl ⁻¹ M: 12-15 g.dl ⁻¹
total									g.dl ⁻¹
Hb hemolisado									
Lactato									mmolL ⁻¹
CK									H: 24-195U.L ⁻¹ M:24-170U.L ⁻¹
Ácido úrico									H: até 7,0U.L ⁻¹ M:até 5,7 U.L ⁻¹
Catalase									k.gHb ⁻¹
Glutaciona redutase									7,0 – 9,0 ULgHb ⁻¹
Grupamento sulfidril									400 – 600 μmolL ⁻¹
metaHb									Até 10%
TBARS									Até ~ 2,0 mmolTBARS/m L plasma
Proteína carbonilada									Até ~ 50 μmolL ⁻¹

APÊNDICE

1. Participações em Congressos Nacionais

Carmona A F. M; El-Khatib, S; L.; Paschoal I. A; Pereira da Silva, L & Macedo D.V. (1999). Adaptações em biomarcadores de estresse oxidativo por tabagismo e em portadores de insuficiência respiratória crônica. XIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental- FESBE, Caxambu-MG,. (Resumo 06.026)

El- Khatib, S, Carmona, A.M.F., Pereira, M.C, Pereira-da-Silva, L, Macedo, D.V. e Paschoal, I.A. (2000). Biomarcadores de estresse oxidativo em fumantes crônicos e doença pulmonar obstrutiva crônica. XXX Congresso Brasileiro de Pneumologia e Tisiologia, Gramado, RS. (Resumo P009C)

El- Khatib, S, Pereira, M.C, Pereira-da-Silva, Rosa, G.J.M., L, Macedo, D.V. e Paschoal, I.A. (2000). Resposta adaptativa a oxigênio terapia Domiciliar Prolongada (ODP). XXX Congresso Brasileiro de Pneumologia e Tisiologia, Gramado, RS. (Resumo P-187D)

2. Participações em Congressos Internacionais

El- Khatib, S, Pereira, M.C, Pereira-da-Silva, Rosa, G.J.M., L, Macedo, D.V. e Paschoal, I.A. (2000). Evaluation of Biomarkers of oxidative stress in three distinct groups: Healty Chronic Smokers, Nonsmokers and Patients with Chronic Hypoxaemia. *Chest*. (supl 4) Resumo 118.

El- Khatib, S, Pereira, M.C, Pereira-da-Silva, Rosa, G.J.M., L, Macedo, D.V. e Paschoal, I.A. (2001). Adaptative Response to Long-Term Oxygen Therapy in Severe Chronic Hypoxaemia. 97th *American Throracic Society*. San Francisco, California, EUA. (Resumo p. 163 (5)A727).

El- Khatib, S, Pereira, M.C, Pereira-da-Silva, Rosa, G.J.M., L, Macedo, D.V. e Paschoal, I.A. (2001). Oxidative Stress in patients with Severe Chronic Hypoxaemia Submitted to Long-Term Oxygen Therapy. *97th American Thoracic Society* . San Francisco, California, EUA. (Resumo p. 163(5)A727).

3. Publicações em Revistas Científicas

El- Khatib, S, Carmona, A.M.F., Pereira, M.C, Pereira-da-Silva, L, Macedo, D.V. e Paschoal, I.A. (2000). Biomarcadores de estresse oxidativo em fumantes crônicos e doença pulmonar obstrutiva crônica. *J. Pneumol.* 26 (supl 3) (Resumo S83).

El- Khatib, S, Pereira, M.C, Pereira-da-Silva, Rosa, G.J.M., L, Macedo, D.V. e Paschoal, I.A. (2000). Evaluation of Biomarkers of oxidative stress in three distinct groups: Healty Chronic Smokers, Nonsmokers and Patients with Chronic Hypoxaemia. *Chest.* (supl 4) (Resumo 118).

El- Khatib, S, Pereira, M.C, Pereira-da-Silva, Rosa, G.J.M., L, Macedo, D.V. e Paschoal, I.A. (2000). Resposta adaptativa a oxigênio terapia Domiciliar Prolongada (ODP). *J. Pneumol.* 26 (supl 3) (Resumo S147).

El- Khatib, S, Pereira, M.C, Pereira-da-Silva, Rosa, G.J.M., L, Macedo, D.V. e Paschoal, I.A. (2001). Adaptative Response to Long-Term Oxygen Therapy in Severe Chronic Hypoxaemia. *Am.J.Resp.Crit.Care.Med.* 163 (5) (Resumo A727).

El- Khatib, S, Pereira, M.C, Pereira-da-Silva, Rosa, G.J.M., L, Macedo, D.V. e Paschoal, I.A. (2001). Oxidative Stress in patients with Severe Chronic Hypoxaemia Submitted to Long-Term Oxygen Therapy. *Am.J.Resp.Crit.Care.Med.* 163 (5) (Resumo A727).

