

PRÉMIO THOMÉ VILLAR/BOEHRINGER INGELHEIM 2001 (SECÇÃO A)
THOMÉ VILLAR/BOEHRINGER INGELHEIM AWARD 2001 (SECTION A)

Associação entre a reversibilidade brônquica e a inflamação das vias aéreas em doentes com doença pulmonar obstrutiva crónica

Association between bronchial reversibility and airway inflammation in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

ANTÓNIO BUGALHO*, NUNO NEUPARTH**

Trabalho desenvolvido no:

Departamento Universitário de Fisiopatologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Nova de Lisboa (UNL) (Director: Professor Doutor A. Bensabat Rendas);

Departamento Universitário de Imunologia da FCM - UNL (Director: Professor Doutor Machado Caetano);

Departamento de Pneumologia da FCM - UNL (Director: Professor Doutor Ramiro Ávila);

Departamento de Pneumologia da Hospital de Pulido Valente (Directora: Professora Doutora M. J. Marques Gomes).

* Interno do Internato Complementar de Pneumologia do Hospital de Pulido Valente

** Professor Auxiliar de Fisiopatologia da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

Recebido para publicação: 02.11.14

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Função respiratória

Foram adoptadas as normas propostas pela *European Respiratory Society (Eur Respir J 1993; 6 (suppl. 16): 5-40)* sobre padronização da avaliação funcional respiratória. De acordo com este consenso, os países da Comunidade Europeia comprometeram-se a utilizar as abreviaturas em inglês, presentes no documento, e a designação por extenso, na língua nacional.

FEF_{25%} - débito expiratório forçado quando 25 % da capacidade vital foi expirada

FEF_{50%} - débito expiratório forçado quando 50 % da capacidade vital foi expirada

FEF_{75%} - débito expiratório forçado quando 75% da capacidade vital foi expirada

FEV₁ - volume expiratório forçado em 1 segundo

FEV₁/FVC - FEV₁ - FEV, em percentagem da capacidade vital forçada

FVC - capacidade vital forçada

TLC - capacidade pulmonar total

Genéricas

CD - *cluster designation*

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

DTT - dithiothreitol

ECP - proteína cationica do eosinófilo

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular 1

Ig - imunoglobulina

IL - interleucina

IMC - índice de massa corporal

LBA - lavado broncoalveolar

NANC - não adrenérgico não colinérgico

NO - óxido nítrico

NOS - sintetase do óxido nítrico,

Tc - linfócito T citotóxico

TNF- α - factor de necrose tumoral alfa

Δ - delta, variação de um parâmetro

RESUMO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC) é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade a nível mundial. É caracterizada por obstrução das vias aéreas e inflamação pulmonar crónica, factores que variam significativamente entre doentes. Este estudo tem como objectivo avaliar os mecanismos fisiopatológicos e de inflamação num grupo de doentes com reversibilidade brônquica comparativamente a um grupo sem variabilidade do FEV₁. Para tal, foram seleccionados 24 doentes com DPOC estável, moderada a grave, ex-fumadores, 12 com reversibilidade e 12 sem reversibilidade ao broncodilatador. Todos efectuaram provas de função respiratória, determinação de óxido nítrico (NO) no ar expirado e estudo de células e mediadores solúveis (interleucina-8, 5 e proteína cationica do eosinófilo) na expectoração induzida e no sangue periférico.

ABSTRACT

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a major cause of morbidity and mortality worldwide. It is characterized by airflow limitation and chronic inflammation of the lungs that varies significantly among patients. The aim of this study was to evaluate the pathophysiologic and inflammatory mechanisms in a group of patients with and without FEV₁ reversibility. We selected 24 moderate to severe, stable COPD patients, all ex-smokers, 12 with no reversibility and 12 with reversibility of airflow limitation to bronchodilator therapy. Lung function tests, exhaled nitric oxide (NO) concentrations, induced sputum and peripheral blood samples to determine cells and soluble mediators (interleukin-8, 5 and eosinophil cationic protein), were obtained from all subjects.

This study confirmed the presence of chronic and

O estudo confirmou a existência de uma inflamação crónica persistente nas vias aéreas em doentes com DPOC, que se traduziu pela presença aumentada de neutrófilos e de factores quimiotáticos, como a IL-8, na expectoração. O subgrupo de doentes com reversibilidade à medicação broncodilatadora apresentou características significativamente diferentes da restante população, verificando-se uma elevação dos valores de NO no ar expirado, e aumento dos eosinófilos e de ECP na expectoração, não explicados pela libertação de IL-5, por uma população de linfócitos T citotóxicos. Estes dados sugerem a existência de um mecanismo inflamatório, diferente da asma, na génese da reversibilidade. O NO no ar expirado e a expectoração induzida permitem, de forma não invasiva, determinar quais os doentes com DPOC com inflamação eosinofílica das vias aéreas. Podem constituir um factor importante na avaliação inicial da doença e mesmo prever e monitorizar a resposta ao tratamento com corticosteróides, nestes doentes. A diminuição do índice de massa corporal associada ao aumento de mediadores inflamatórios, nomeadamente de IL-8, confirma a presença de um componente inflamatório sistémico na DPOC.

REV PORT PNEUMOL VIII (6): 547-580

Palavras-chave: DPOC, inflamação, reversibilidade brônquica óxido nítrico, expectoração induzida, eosinófilos, ECP, IL-5, IL-8.

persistent inflammation of the airways of COPD patients, with an increased number of neutrophils and IL-8 concentrations in sputum. Exhaled NO levels, sputum eosinophils and ECP were higher in COPD patients with bronchodilator reversibility, and this data could not be explained by a production of IL-5 by a subpopulation of T cytotoxic cells. An inflammatory mechanism, different from asthma, seems to be responsible for the airflow reversibility. Exhaled NO and induced sputum are noninvasive methods that can identify COPD patients with eosinophilic airway inflammation. These methods can be useful in the early assessment of the disease and to predict and monitor the response to glucocorticosteroid treatment. Low body mass index was related to an increase in inflammatory mediators, namely IL-8, confirming the presence of systemic inflammation in COPD.

REV PORT PNEUMOL VIII (6): 547-580

Key-words: COPD, inflammation, bronchial reversibility, nitric oxide, induced sputum, eosinophils, ECP, IL-5, IL-8.

RÉSUMÉ

La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une cause majeure de morbidité et mortalité mondiale. Elle est caractérisée par une obstruction des voies aériennes et une inflammation chronique pulmonaire qui varie significativement entre malades. L'objectif de cette étude est d'évaluer les mécanismes physiopathologiques et de l'inflammation dans un groupe de malades avec et sans réversibilité du volume expiratoire maximal dans la première, seconde (FEV₁) aux bronchodilatateurs. Nous avons choisi 24 malades porteurs de

BPCO stabilisée, modérée et sévère, ex-fumeurs, 12 sans réversibilité et 12 avec réversibilité des voies aériennes. Tous les malades ont subi des études fonctionnelles respiratoires, des concentrations exhalées de l'oxyde nitrique (NO) et des déterminations de cellules et de médiateurs solubles (interleukine-8, 5 et protéine cationique dérivée des éosinophiles) dans la expectoration induite et le sang périphérique.

Cette étude a confirmé la présence d'inflammation chronique et persistante des voies aériennes de malades avec BPCO, traduit par une augmentation de neutrophiles et IL-8 dans la expectoration. Le groupe de malades avec réversibilité présentait des niveaux

élevés de NO, et des éosinophiles et de l'ECP dans la expectoration qui ne peut être expliqués par une production de IL-5, par une population de cellules T cytotoxiques. Un mécanisme inflammatoire, différent de l'asthme, semble être responsable par la réversibilité des voies aériennes. Ces méthodes peuvent être utiles dans la première évaluation de la maladie et prédire et contrôler la réponse au traitement avec corticostéroïdes. La baisse de l'index de masse corporel associée à l'augmentation de médiateurs

d'inflammation, principalement IL-8, confirme la présence d'inflammation systémique dans la BPOC.

REV PORT PNEUMOL VIII (6): 547-580

Mots-clé: BPCO; inflammation; réversibilité des voies aériennes; oxide nítrique; expectoração induzida; éosinófilos; ECP; IL-5; IL-8

1 - INTRODUÇÃO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC) é uma patologia que envolve um grande número de doentes e constitui uma das principais causas de morbilidade e mortalidade a nível mundial. Em Portugal, é a segunda causa de internamento por doenças respiratórias, verificando-se, desde 1993, um número crescente de internamentos hospitalares, dias de internamento, mortes e custos motivados pela doença¹.

A última definição de DPOC apresenta esta entidade como um «estado patológico caracterizado por uma limitação do débito aéreo que não é totalmente reversível, sendo esta limitação, geralmente, progressiva e associada a uma resposta inflamatória anómala dos pulmões a partículas ou gases nocivos»².

Apesar da obstrução das vias aéreas ser susceptível de melhorar significativamente após a instituição de terapêutica apropriada, a função respiratória nunca atinge valores considerados normais, na maioria dos doentes com DPOC. Este facto determina que uma importante percentagem de doentes esteja medicada regularmente com broncodilatadores, na tentativa de otimizar o calibre das vias aéreas e diminuir a sintomatologia.

O grau de limitação dos débitos expiratórios, de reversibilidade aos broncodilatadores e as caracterís-

ticas e intensidade da inflamação não são uniformes, variando claramente entre doentes³. Esta grande amplitude de resposta não está completamente compreendida, admitindo-se múltiplos fenótipos de uma mesma patologia.

Aparentemente, os doentes com DPOC que respondem significativamente aos broncodilatadores demonstram uma boa resposta aos corticosteróides inalados e possuem alterações inflamatórias semelhantes às da asma brônquica⁴⁻⁸.

Esta reversibilidade brônquica é definida pelas normas internacionais da *American Thoracic Society* (ATS)⁹ e da *European Respiratory Society* (ERS)¹⁰ como um aumento do FEV₁ maior ou igual a 12 % do valor teórico e maior que 200 ml após a administração de salbutamol, em relação ao valor basal. Ambas as sociedades reconhecem a sua existência na maioria dos doentes com asma brônquica e em muitos com DPOC. Múltiplos trabalhos comprovam, igualmente, a presença de reversibilidade neste último grupo de doentes¹¹⁻¹³. Nos casos em que a obstrução das vias aéreas é moderada ou grave, um pequeno aumento do FEV₁, após o broncodilatador, condiciona frequentemente uma variação superior a 12 %. Quando a variabilidade deste parâmetro é maior do que 200 ml, a prova torna-se então mais significativa e fiável, sobretudo se verificada em avaliações sucessivas.

A fisiopatologia da DPOC é condicionada por inúmeros factores, não se encontrando todos identificados. Para além da obstrução anteriormente referida, a definição da doença salienta a presença de uma inflamação crónica. Esta abrange as grandes e pequenas vias aéreas e o parênquima pulmonar, com múltiplas células e mediadores envolvidos. Várias condições podem contribuir para o aumento desta inflamação, como a manutenção dos hábitos tabágicos, a presença concomitante de bronquiectasias, a colonização bacteriana das vias aéreas e as exacerbações bacterianas ou virais frequentes¹⁴.

A referida inflamação tem sido estudada com recurso a técnicas invasivas e não invasivas.

Entre as técnicas consideradas não invasivas, conta-se a expectoração induzida, que é segura e bem tolerada, e permite analisar células e mediadores¹⁵ solúveis.

O aumento de neutrófilos nas vias aéreas de fumadores e na DPOC é conhecido há longa data¹⁶⁻¹⁹, desempenhando estas células um papel fulcral na patogenia da doença. Vários trabalhos demonstram a alteração das concentrações de citocinas inflamatórias na expectoração destes doentes, com especial relevo para o aumento da interleucina-8 (IL-8), um potente factor activador e quimiotático dos neutrófilos, que inclusivamente se relaciona com a deterioração dos parâmetros funcionais na DPOC²⁰⁻²².

Recentemente, outras células têm vindo a ser implicadas nesta inflamação crónica, como os macrófagos, as células epiteliais, os linfócitos T e os eosinófilos. Alguns autores relatam a presença de um número aumentado de eosinófilos e ECP (*eosinophil cationic protein*) na expectoração e biopsias brônquicas de doentes com DPOC, quer em situações de estabilidade, quer de exacerbação^{6-8,23-25}. O aumento destes eosinófilos não está completamente explicado. Segundo os conhecimentos actuais teríamos de considerar, em alguns doentes com DPOC, uma população de linfócitos T secretores de IL-4 e IL-5. Os linfócitos T citotóxicos (Tc) CD8+ têm sido encontrados em valores superiores ao normal em biopsias brônquicas e no sangue periférico de doentes com

DPOC²⁶⁻²⁸. Um estudo de De Jong e colaboradores²⁹ demonstra que a razão CD4/CD8 está invertida nos doentes fumadores com DPOC e que o aumento dos CD8+ se relaciona negativamente com a função pulmonar, mas positivamente com os níveis séricos de IgE. Admite-se a hipótese que os linfócitos T CD8+ possuam subpopulações Tc₁ e TC₂³⁰ e que esta última seja capaz de produzir IL-5, importante no recrutamento eosinofílico.

Outro marcador não invasivo da inflamação das vias aéreas é o óxido nítrico (NO), sintetizado pela óxido nítrico sintetase (NOS), uma enzima presente em muitas das células anteriormente referidas, nas suas formas constitutiva e indutível. O NO está aumentado em doenças do foro respiratório como a asma brônquica e as bronquiectasias, o que sugere um papel importante na fisiopatologia de doenças inflamatórias das vias aéreas. Os resultados publicados na literatura sobre o NO no ar expirado de doentes com DPOC não são consensuais. Há autores que afirmam a existência de valores semelhantes a indivíduos saudáveis^{31,32}, outros que o NO se encontra aumentado apenas durante as exacerbações^{33,34} e, ainda outros, que referem a elevação deste gás na doença estável³⁵⁻³⁸. O estudo de Papi e colaboradores⁶ esclarece parcialmente a heterogeneidade dos resultados ao identificar uma subpopulação de doentes com DPOC estável, com valores de NO elevados, associados ao aumento de eosinófilos na expectoração.

Apesar de muitos trabalhos incidirem nas alterações pulmonares da DPOC, admite-se hoje estarmos perante uma síndrome, com um componente extra-pulmonar importante, que engloba uma inflamação sistémica, disfunção endotelial e alteração dos músculos esqueléticos³⁹. A inflamação sistémica tem sido implicada nas alterações metabólicas que originam perda de peso e, inclusivamente, caquexia em doentes com DPOC. O TNF- α (*tumor necrosis factor alfa*) é sem dúvida o factor mais consistentemente envolvido⁴⁰, embora o papel de outras citocinas não possa ser excluído⁴¹.

Colocamos subseqüentemente um conjunto de

perguntas que ainda carecem de respostas concretas:

- Confirma-se a presença de inflamação nas vias aéreas e parênquima pulmonar em doentes com DPOC?
- Os doentes com DPOC e reversibilidade aos broncodilatadores têm uma inflamação das vias aéreas diferente dos doentes com obstrução «fixa»?
- Se a questão anterior for verdadeira, serão os eosinófilos responsáveis pela presença de reversibilidade?
- O recrutamento de eosinófilos em doentes com DPOC ocorre devido à produção de IL-5 pelos linfócitos T citotóxicos?
- Será que os doentes com DPOC e com reversibilidade brônquica ao possuírem uma inflamação eosinofílica constituem o subgrupo de doentes que beneficia com a utilização de corticosteróides inalados?
- Podemos prever quais os doentes que pertencem a este subgrupo por métodos rápidos e não invasivos?
- A inflamação crónica em doentes com DPOC verifica-se apenas a nível pulmonar ou possui um componente sistémico importante?

De forma a responder a estas questões na presente tese, foram operacionalizados os seguintes objectivos:

- Investigar numa população de doentes com DPOC moderada a grave, estável, ex-fumadores, com e sem variabilidade de resposta aos broncodilatadores, as diferenças na fisiopatologia da doença, nomeadamente na inflamação das vias aéreas.
- Investigar se estas diferenças podem ser monitorizadas por métodos não invasivos, como a medição do NO no ar expirado e a análise de células e mediadores presentes na expectoração induzida.
- Investigar a viabilidade da determinação das po-

pulações linfocitárias T na expectoração induzida de doentes com DPOC.

- Investigar se a inflamação ocorre apenas a nível pulmonar ou, pelo contrário, é sistémica, doseando para o efeito mediadores inflamatórios no sangue periférico.

II - MATERIAL E MÉTODOS

1. População

Seleccionaram-se, com origem na Consulta de Pneumologia e na Unidade de Estudo de Função Respiratória (UEFR) do Hospital de Pulido Valente (HPV), 24 doentes, com o diagnóstico de DPOC segundo os critérios do *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)*². Os doentes inseriram-se, de acordo com factores clínicos e funcionais, nos graus II B e III de gravidade, segundo a classificação proposta por esta entidade (Quadro I).

Todos referiam, com diferente quantificação, sintomas crónicos de dispneia, tosse ou expectoração mucosa, exposição a factor de risco (ex-fumadores em cessação há mais de 1 ano) e exacerbações frequentes no último ano (2 ou mais). Foram excluídos doentes que possuíam história de doença sistémica grave e instável ou patologia pneumológica concomitante (nomeadamente bronquiectasias, sequelas de tuberculose pulmonar, neoplasia do pulmão ou asma).

A obstrução das vias aéreas obteve-se através da realização de espirometria, sendo definida por um $FEV_1/FVC < 70\%$ e um $FEV_1 < 80\%$ do valor teórico após broncodilatação.

Os doentes encontravam-se estabilizados sob terapêutica farmacológica, sem exacerbações agudas há mais de 2 meses (e sem recurso a corticoterapia inalada e/ou oral, pelo menos, 6 semanas antes do início da avaliação. Naqueles que a realizavam diariamente, foi suspensa durante igual período de tempo (nas 6 semanas prévias à realização do estudo).

QUADRO I

Graus de gravidade da DPOC adoptados pelo GOLD.

Adaptado de². IR - insuficiência respiratória; IC - insuficiência cardíaca.

Classificação da gravidade da DPOC

Grau 0 - Em risco	<ul style="list-style-type: none">• Espirometria normal• Com: tosse, expectoração
Grau 1 - Ligeira	<ul style="list-style-type: none">• $FEV_1/FVC < 70\%$• $FEV_1 \geq 80\%$ do teórico• Com ou sem: tosse, expectoração
Grau II - Moderada	<ul style="list-style-type: none">• $FEV_1/FVC < 70\%$• IIA - $50\% \leq FEV_1 < 80\%$ do teórico• IIB - $30\% \leq FEV_1 < 50\%$ do teórico• Com ou sem tosse: expectoração, dispneia
Grau III - Grave	<ul style="list-style-type: none">• $OFEV_1/FVC < 70\%$• $FEV_1 < 30\%$ do teórico ou $FEV_1 < 50\%$ do teórico com IR ou sinais clínicos de IC

Negavam clínica de asma, rinite, conjuntivite ou eczema. Os testes de sensibilidade cutânea (PRICK) e Phadiatop® foram negativos e a IgE total < 80 UI/ml, demonstrando a inexistência de atopia na população estudada.

O exame directo e cultural da expectoração foi igualmente negativo na identificação de bactérias patogénicas, em todos os doentes.

Cada doente foi caracterizado por história clínica, frequência de sintomas, exame objectivo, exames imagiológicos recentes, testes de sensibilidade cutânea, espirometria, valor de NO no ar expirado, expectoração induzida e avaliação analítica do sangue periférico.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de Pulido Valente, tendo cada doente dado o seu consentimento por escrito, após ser informado dos objectivos do mesmo.

2. Desenho do estudo

O protocolo constou de um estudo prospectivo, incidindo sobre uma população de doentes com

DPOC, subdividida em dois grupos com características funcionais distintas (com e sem reversibilidade aos broncodilatadores). As avaliações iniciais decorreram no HPV, na UEFR, e posteriormente no Laboratório do Departamento Universitário de Fisiopatologia e Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Nova de Lisboa (UNL).

No HPV os doentes realizaram uma primeira avaliação funcional respiratória na UEFR, solicitada pelo seu médico assistente em Consulta de Pneumologia. Aqueles que possuíam o diagnóstico de DPOC foram posteriormente contactados e incluídos no estudo, após efectuarem novas provas de função respiratória, história clínica e exame objectivo, avaliação de exames radiológicos recentes, realização de testes de sensibilidade cutânea PRICK, colheita de sangue venoso (para determinação de IgE total e Phadiatop®) e amostra de expectoração para identificação de bactérias com significado patogénico. Quando verificados todos os critérios de inclusão, foram enviados à FCM onde realizaram determinação do NO no ar expirado, espirometria com prova de broncodilatação, expectoração induzida e colheita de sangue venoso.

3. Métodos

3.1 Espirometria

Os testes de função pulmonar foram efectuados de acordo com as recomendações da ATS⁹ e ERS publicadas em 1993¹⁰ e com recurso a um espirómetro portátil (*Vitalograph Compact II, Buckingham, UK*) que permitiu avaliar os débitos expiratórios, utilizando para o efeito um pneumotacógrafo do tipo *Fleisch*.

Foram medidos, o FEV_1 , FVC, FEV_1/FVC , $FEF_{25\%}$, $FEF_{50\%}$, $FEF_{75\%}$ e realizada prova de broncodilatação com inalação oral de 200 microgramas (μ g) de salbutamol (Ventilan®), em três avaliações funcionais (PFR) diferentes, separadas no tempo por

QUADRO II

Critérios de selecção de doentes.

Critérios de selecção	
Inclusão	Exclusão
<ul style="list-style-type: none"> • DPOC confirmada (moderada a grave - graus II B - III do GOLD) • Ex-fumadores (> 1 ano) • Estabilizados sob terapêutica farmacológica • Sem exacerbações agudas > 8 semanas • Sem recurso a corticosteróides orais ou inalados > 6 semanas 	<ul style="list-style-type: none"> • Asma brônquica • Outras doenças do foro respiratório ou alérgico • Doença sistémica grave • Atopia • Colonização bacteriana crónica das vias aéreas • Incapacidade em realizar as manobras exigidas

30 dias, garantindo a manutenção da positividade ou negatividade da prova durante o período em que decorreu o estudo.



A partir do grupo inicial de 24 doentes com DPOC, estabeleceram-se, posteriormente, dois subgrupos com base nas PFR:

- *Grupo A*, constituído por 12 doentes e caracterizado por apresentar uma resposta significativa ao broncodilatador, definida como aumento do $FEV_1 \geq 12\%$ do valor teórico e aumento superior a 200 ml após inalação do fármaco;
- *Grupo B*, igualmente formado por 12 doentes, que não manifestava resposta significativa à prova de broncodilatação.

3.2 Determinação de Óxido Nítrico no ar expirado

A determinação de NO no ar expirado foi efectuada com um analisador de quemiluminescência de alta sensibilidade (*Sievers NOA 280 Analyzer, Sievers Instruments, Boulder, CO, USA*) segundo as recomendações da *ERS Task Force*⁴².

Com o doente sentado, em repouso, e sem mola nasal, pediu-se para efectuar uma inspiração rápida até TLC, seguida de uma expiração única, lenta (6 a 20 segundos), contra uma resistência baixa e fixa, originando uma pressão de cerca de 20 cmH₂O de forma a manter um débito expiratório constante e



Fig. 1 — Localização e realização das diferentes fases do protocolo experimental.

encerrar o palato mole, evitando contaminação da amostra obtida, por NO nasal⁴³.

Um sistema de *bio feedback on-line* proporcionou uma orientação visual e permitiu ao doente controlar a pressão entre os valores pretendidos, melhorando a reprodutibilidade e cooperação ao exame.

Efectuou-se, utilizando o método de *single-breath*, um mínimo de 5 medições com um *plateau* de NO superior a 3 segundos e com inclinação inferior a 10°, aceitando-se uma variabilidade inferior a 5%.

3.3 Indução da expectoração

A expectoração foi induzida segundo protocolo adaptado a partir do método descrito previamente por Pin e colaboradores⁴⁴.

Após realização de uma espirometria e determinação da saturação de O₂, por oxímetro de pulso, foi efectuada uma prova de broncodilatação com administração de 200 µg de salbutamol em câmara expansora, de forma a determinar os valores espirométricos basais e prevenir atempadamente fenómenos de broncoconstrição causados pela inalação de soro fisiológico (NaCl) a diferentes concentrações.

A indução da expectoração proveniente das vias aéreas inferiores, foi efectuada através da inalação de 5 ml de NaCl isotónico (0,9%) durante 5 minutos em nebulizador ultra-sónico (*DeVilbiss Ultra-neb 2000, DeVilbiss Corporation, Somerset, PA*). Quando não se obteve uma primeira amostra viável, por critérios macroscópicos, o doente realizou nova inalação com 5 ml de NaCl a 3%, e caso a colheita não fosse possível uma terceira inalação com NaCl a 4,5%, perfazendo um total máximo de 15 minutos.

Antes da colheita da expectoração, em placa de *petri* estéril, cada doente efectuou a limpeza das fossas nasais e da cavidade oral, solicitando-se, para o efeito, que bochechasse com água e a deglutisse.

O FEV₁ e a saturação de O₂ foram monitorizados após cada inalação. Nos casos em que, durante a fase de indução, ocorreu diminuição do FEV₁ en-

tre 10-19% do valor teórico as inalações posteriores foram administradas com precaução e sob vigilância clínica apertada. Quando este decréscimo foi maior do que 20% do teórico e/ou se verificou uma queda maior que 10% da saturação de O₂ basal, cessaram-se as inalações e foi administrado um broncodilatador.

Obtiveram-se, em média, 3 amostras de expectoração.

3.4 Processamento da expectoração

O tratamento da primeira amostra de expectoração ocorreu sempre nas duas horas subsequentes à colheita.

Com auxílio de uma pinça descartável separou-se, macroscopicamente, a saliva da expectoração. Determinou-se o volume e peso da amostra e adicionou-se *dithiothreitol* (DTT) diluído em água destilada a 0,1%, 4 vezes o volume da amostra inicial, seguido de homogeneização em *vórtex* durante 15 segundos e agitação em banco oscilatório durante 15 minutos. A suspensão foi então diluída em *phosphate buffered saline* (PBS), em igual proporção ao DTT, e novamente colocada no banco oscilatório durante 5 minutos.

Para remoção do muco e fibrina utilizou-se um filtro de 70 µm (*Falcon Becton Dickinson, Bio Sciences, CA, USA*). O produto obtido foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos.

O sobrenadante foi armazenado em 2 tubos *ependorf* de 1 ml e congelado a -80°C.

O botão celular ressuspendeu-se em 500 µl de PBS, dos quais 20 µl foram corados com *azul trypan* e as células contadas em câmara de *Neubauer* para determinar a viabilidade celular. Por fim, acertou-se a concentração para 1x10⁶ células/ml e 75 µl da amostra foram centrifugados (*Cytofuge 2, StatSpin Inc, MA, USA*) a 600 rpm durante 10 minutos, obtendo-se 2 lâminas por doente. Cada uma das lâminas foi posteriormente corada pelo método de *May Grunwald Giemsa* para contagem diferencial de 500

células. As amostras consideradas válidas apresentaram uma viabilidade celular > 50 % e < 20 % de contaminação por células epiteliais. O número absoluto de células por mililitro de expectoração foi calculado através da multiplicação da percentagem de células, pelo número total de células não epiteliais na expectoração, e dividido pelo volume da amostra em mililitros.

3.5 Estudo das populações linfocitárias T

Foi realizado o estudo das populações de linfócitos T na segunda amostra de expectoração induzida e no sangue periférico.

Esta expectoração foi tratada com DTT diluído em PBS a 0,1 %, em igual volume ao da amostra, seguido de agitação em banco oscilatório durante 5 minutos, dado ter-se verificado que com o procedimento descrito anteriormente ocorria alteração dos receptores de membrana linfocitários.

Realizou-se filtração do produto obtido (70 µm *Falcon Becton Dickinson, Bio Sciences, CA, USA*) e centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos. Lavou-se o botão celular com 6 ml de PBS e efectuou-se uma segunda filtração com filtro de 40 µm (*Falcon Becton Dickinson Bio Sciences, CA, USA*), de forma a diminuir a presença de algum muco e fibrina residuais, que podiam interferir com a aquisição da amostra pelo citómetro de fluxo. Fez-se nova centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos e ressuspenderam-se as células em 200 µl de PBS.

A amostra de 2 cc de sangue venoso foi colhida para tubo com EDTA.

A marcação de superfície da suspensão celular da expectoração e da amostra de sangue foi efectuada através da colocação, em tubos *Falcon* (ref. 2052), de 10 µl de *Tritest* (CD4 FITC/CD8 PE/ CD3 PERCP) e de 10 µl de CD45 APC (*Becton Dickinson, Bio Sciences, CA, USA*) e incubado, no escuro, à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Posteriormente associou-se 2 ml de solução de lise (*FACs Lysing solution*), sendo as amostras submeti-

das a nova incubação durante 10 minutos. Centrifugou-se a 2000 rpm durante 5 minutos, lavou-se com 2 ml de PBS e ressuspendeu-se o botão celular com 200 µl de PBS.

A aquisição no citómetro de fluxo foi feita no *gate* de células CD45+, no mínimo de 10 000 eventos. Utilizou-se o sistema de análise «*Paint-a-gate*». A análise das subpopulações linfocitárias T foi realizada no *gate* de células T totais CD3+ e calculadas as subpopulações T auxiliadora CD4+ e T citotóxica CD8+ relativamente aos 100 % de CD3+, dada a difícil análise das células da expectoração, resultando este critério em quase todas as amostras.

3.6 Doseamento de IL-8, IL-5 e ECP

Efectuou-se colheita de 12 cc de sangue venoso, sendo esta amostra colocada em tubo seco e, após formação de coágulo, centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e armazenado em tubos *ependorff* de 1 ml a -80°C até ser analisado.

No soro e sobrenadante da expectoração induzida de cada doente foram realizados os doseamentos de ECP por imunoensaio fluoroenzimático (*Pharmacia & Upjohn, Uppsala, Sweden*), e de IL-5 e 8 utilizando para o efeito um *kit* comercial ELISA (*Quantikine Human, R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK*).

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa informático SPSS (*versão 10.0, Chicago, USA*).

Os dados demográficos e a análise das características do grupo de doentes (variáveis contínuas) foram expressos em média e desvio padrão. Foram analisados os seguintes parâmetros: idade; índice de massa corporal (IMC); anos de tabagismo; número de unidades maço ano fumadas (UMA); número de

anos de início de sintomas; FEV₁ (% do valor teórico); FVC (% do valor teórico); FEV₁/FVC (percentagem); variação do FEV₁, após prova de broncodilatação (ml e percentagem); NO no ar expirado (ppb); contagem total de células na expectoração; eosinófilos (% do total de células); linfócitos (% do total de células); macrófagos (% do total de células); neutrófilos (% do total de células); populações linfocitárias T CD4 e CD8; IL-5, IL-8 e ECP na expectoração e no sangue periférico. As contagens de células foram analisadas de acordo com a frequência de distribuição, e expressas em percentagem do total de células.

A diferença entre as médias dos dois grupos foi comparada recorrendo aos testes de *T-student* ou *U de Mann-Whitney* para duas populações não emparelhadas, quando apropriado. As correlações foram determinadas através do coeficiente de correlação de *Spearman*. As diferenças de probabilidade (p) foram consideradas significativas quando inferiores a 0,05.

III - RESULTADOS

1. Factores demográficos, clínicos e funcionais

As características da população estudada encontram-se expressas no Quadro III. Dos vinte e quatro doentes estudados, sete foram excluídos. Quatro por exacerbação infecciosa aguda durante o período de estudo, e três por incapacidade de produzir expectoração viável.

O grupo de doentes com reversibilidade ao broncodilatador (Grupo A) possuía uma idade média de 73,0 ± 5,5 anos (65-80 anos), significativamente superior ao grupo sem reversibilidade (Grupo B), com 66,8 ± 4,7 anos (62-76 anos) (p = 0,024).

O IMC, o início dos sintomas, as UMA fumadas e a duração dos hábitos tabágicos foram sobreponíveis nos dois grupos.

No total dos doentes avaliados, 94 % encontravam-se medicados com corticosteróides inalados

antes do início do estudo. Em todos foi suspensa a medicação com estes fármacos de acordo com os critérios de inclusão. Apesar de não ter ocorrido deterioração significativa do FEV₁ e/ou FVC durante o período de estudo, todos os doentes do Grupo A referiram agravamento subjectivo da sintomatologia, particularmente da dispneia, enquanto no Grupo B tal apenas se verificou num caso (p < 0,001).

Os 17 doentes realizaram as manobras exigidas sem complicações e com boa reprodutibilidade das mesmas.

A taxa de sucesso na obtenção das amostras de expectoração foi de 85 %. Naqueles em que se conseguiu colher expectoração viável, as amostras foram adquiridas após a primeira inalação de NaCl a 0,9 % em 88 % dos casos. Durante a indução da expectoração houve uma diminuição média do FEV₁ de 12,12 ± 8,7 % do valor teórico (0-47 %) e uma diminuição da saturação de O₂ de 5,2 ± 2,3 %.

Num doente, as provas de broncodilatação foram efectuadas com recurso a brometo de ipratrópio, dado ter ocorrido obstrução marcada das vias aéreas após a inalação de salbutamol em aerossol pressurizado (diminuição de 57 % do valor teórico de FEV₁).

O valor do FEV₁ (em percentagem do valor teórico e em valor absoluto) após à realização de prova de broncodilatação foi estatisticamente maior no Grupo A (p = 0,022).

Também a variação deste parâmetro, após a referida prova, quer em termos percentuais quer em mililitros, foi estatisticamente superior no Grupo A (p < 0,001), tal como seria de esperar, dado ser o factor que permitiu a discriminação dos doentes em dois grupos.

O FEV₁/FVC foi menor no Grupo B, embora tal diferença não fosse significativa.

As três avaliações funcionais respiratórias a que cada doente foi submetido não sofreram variações superiores a 5 % durante o período de estudo. As características funcionais de cada grupo encontram-se expressas no Quadro IV. O grupo total de doentes possuía um FEV₁ médio pós-broncodilatação de 37,2 ± 14,9 % do valor teórico (máximo 50 % e mínimo 15 %).

QUADRO III

Características demográficas e clínicas dos grupos de doentes estudados, com e sem reversibilidade ao broncodilatador (Grupo A e B, respectivamente). CI - corticosteróide inalado. * $p < 0,05$.

Características	Grupo A (reversibilidade)	Grupo B (sem reversibilidade)
Doentes incluídos (n.º)	9	8
Idade (anos)	73,0 ± 5,5*	66,8 ± 4,7*
Sexo masculino	9	8
Índice massa corporal (Kg/m ²)	28,1 ± 4,9	24,9 ± 5,8
Início dos sintomas (anos)	16,8 ± 2,5	18,9 ± 2,4
IgE total (U/ml)	31,4 ± 15,8	41,2 ± 33,0
CI antes do início estudo (n.º)	9	7
Agravamento dos sintomas (n.º)	9*	1*
Ex-fumadores (n.º)	9	8
Anos de tabagismo	42,4 ± 16,5	46,6 ± 4,3
Unidades maço ano	66,2 ± 26,5	64,3 ± 31,3
Anos de cessação tabágica	5,2 ± 5,8	8,7 ± 7,3
Exacerbações no último ano (n.º)	2,2 ± 0,2	2,3 ± 0,4

QUADRO IV

Características funcionais dos grupos de doentes estudados, com e sem reversibilidade ao broncodilatador. BD - broncodilatador; Δ- variação. * $p < 0,05$.

Características	Grupo A (reversibilidade)	Grupo B (sem reversibilidade)
Número de doentes	9	8
FEV ₁ pós BD (% teórico)	45,3 ± 15,8 *	29,4 ± 8,4 *
FEV ₁ pós BD (ml)	1372 ± 205 *	827 ± 115 *
Δ FEV ₁ (% teórico)	20,7 ± 9,8 *	5,5 ± 5,7 *
Δ FEV ₁ (ml)	216,7 ± 55,0 *	51,3 ± 48,8 *
FEV ₁ /FVC (%)	46,2 ± 13,3	36,6 ± 11,2

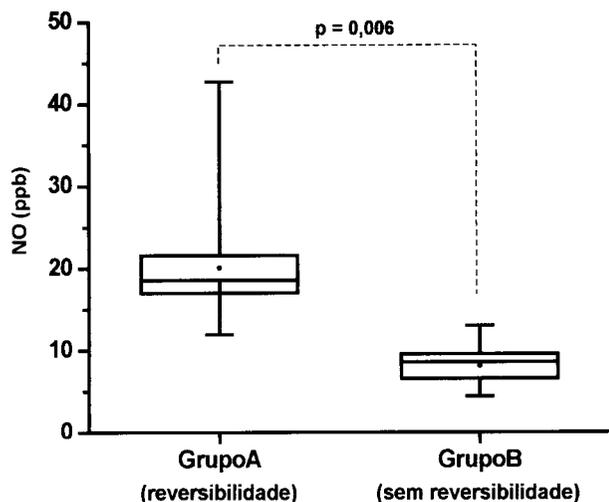


Fig. — Valores de NO expressos em ppb (partes por bilião) nos dois grupos de doentes com DPOC: Grupo A que engloba doentes com reversibilidade e o Grupo B, com doentes sem reversibilidade ao broncodilatador. Estão representados os valores máximo, mínimo, percentil 25-75, médias e medianas para cada grupo.

2. Óxido nítrico no ar expirado

Os valores médios de NO no ar expirado para o grupo A, com reversibilidade, foram de $20,03 \pm 10,25$ ppb (10,3 - 42,7 ppb) e para o grupo B, sem reversibilidade, de $8,06 \pm 2,85$ ppb (4,7 - 10,4 ppb) (Fig. 2).

A diferença entre os dois grupos, no que se refere a este mediador de inflamação, foi estatisticamente significativa ($p = 0,006$).

3. Concentrações de IL-8, IL-5 e ECP

As concentrações médias de IL-8 na expectoração induzida dos doentes com DPOC encontram-se aumentadas, não possuindo a diferença entre grupos relevância estatística (Fig. 3).

Na determinação das concentrações séricas de IL-8 obtiveram-se valores normais ($< 31,2$ pg/ml), sendo estes inferiores no Grupo A comparativamente ao B (Quadro V). Esta diferença não foi estatística-

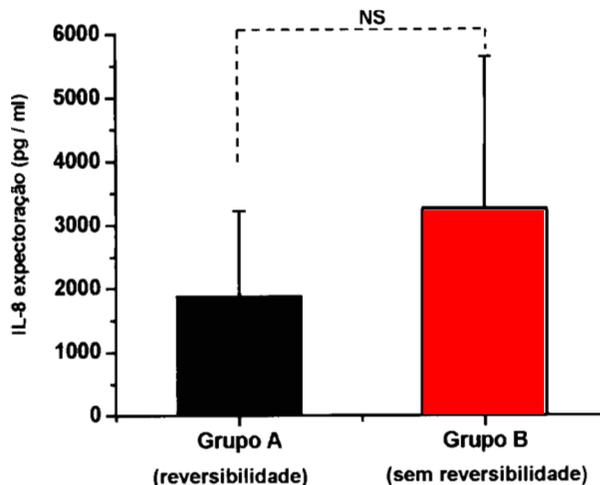


Fig. 3 — Concentrações de IL-8 na expectoração induzida dos 2 grupos de doentes com DPOC. NS - não significativo $p \geq 0,05$.

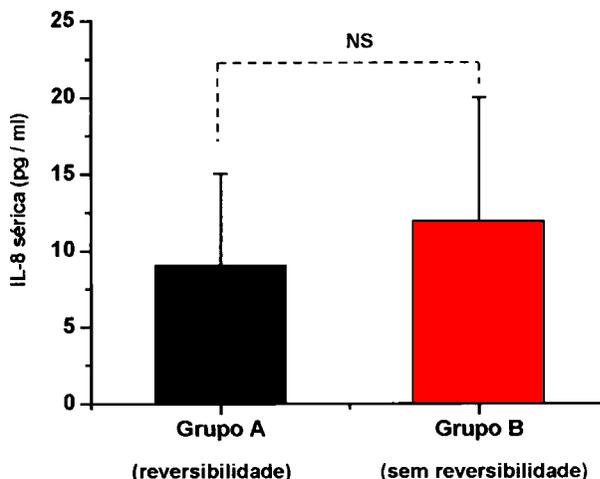


Fig. 4 — Concentrações séricas de IL-8 nos Grupos A e B de doentes com DPOC. NS - não significativo $p \geq 0,05$.

mente significativa entre os dois grupos de doentes (Fig. 4).

Como se pode constatar, as concentrações de IL-8 foram francamente superiores no sobrenadante da expectoração quando comparadas aos níveis séricos.

QUADRO V

Determinações da IL-8, IL-5 e ECP no sobrenadante da expectoração. * $p < 0,05$.

	Grupo A (reversibilidade)	Grupo B (sem reversibilidade)
Expectoração		
IL-8 (pg/ml)	1875,8 ± 1352,2	3240,2 ± 2388,5
IL-5 (pg/ml)	12,3 ± 6,3	10,7 ± 5,3
ECP (µg/l)	144,3 ± 73,2 *	57,5 ± 51,0 *
Sangue periférico		
IL-8 (pg/ml)	9,6 ± 7,1	11,8 ± 7,6
IL-5 (pg/ml)	2,3 ± 1,8	2,0 ± 2,7
ECP (µg/l)	14,2 ± 4,7	9,4 ± 5,8

As concentrações de IL-5 (Figs. 5 e 6) foram superiores no Grupo A, quer no sobrenadante da expectoração, quer no soro. Obtiveram-se em todos os doentes determinações séricas normais de IL-5 (< 7,8 pg/ml).

Os valores de ECP na expectoração (Fig. 7 e Quadro V) foram significativamente diferentes entre os dois grupos ($p = 0,018$), não se identificando diferenças estatísticas em relação ao ECP sérico

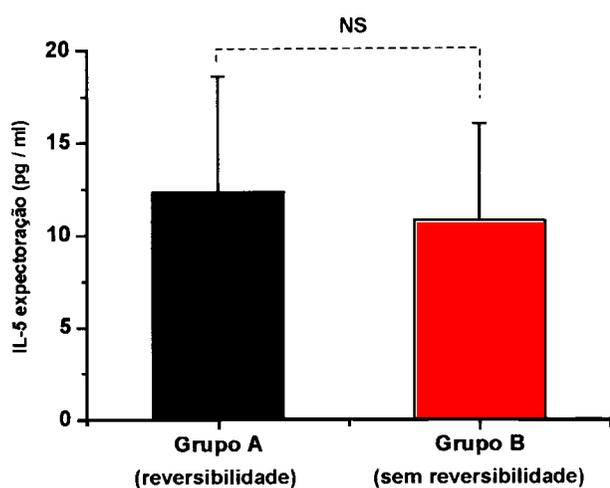


Fig. 5 — Determinações da IL-5 no sobrenadante da expectoração nos dois grupos estudados. NS - não significativo $p \geq 0,05$.

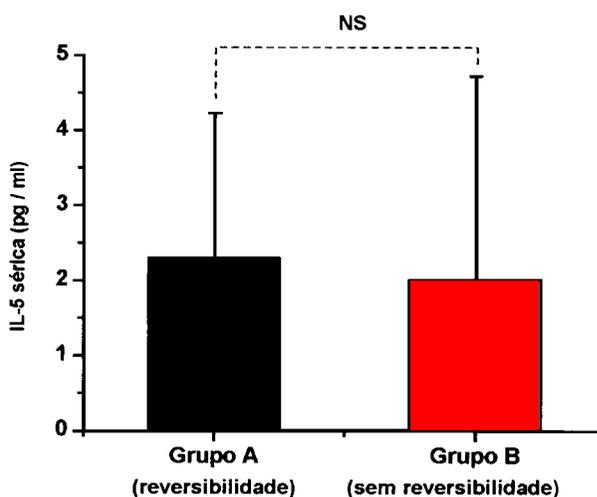


Fig. 6 — Valores médios de IL-5 sérica. NS - não significativo $p \geq 0,05$.

ASSOCIAÇÃO ENTRE A REVERSIBILIDADE BRÔNQUICA E A INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS EM DOENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA/ANTÓNIO BUGALHO, NUNO NEUPARTH

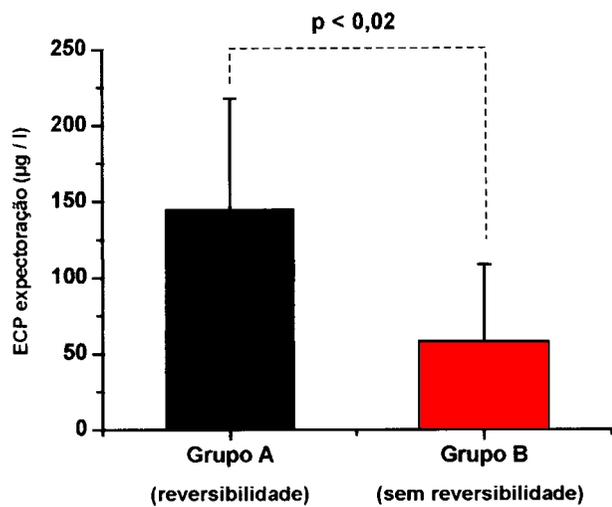


Fig. 7 — Determinação da ECP média nos dois grupos de doentes estudados.

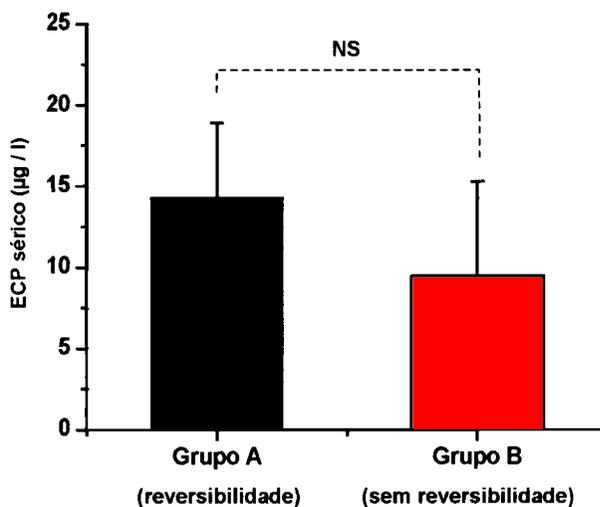


Fig. 8 — Valores séricos de ECP. NS - não significativo $p \geq 0,05$.

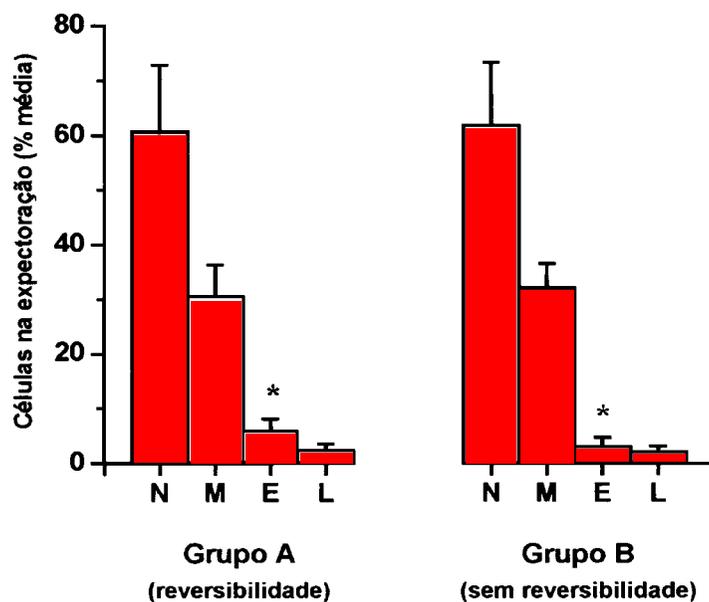


Fig. 9 — Percentagem média de células na expectoração induzida nos 2 grupos de doentes com DPOC. N - neutrófilos; M - macrófagos; E - eosinófilos; L - linfócitos. * $p = 0,01$.

QUADRO VI

Subpopulações de linfócitos T no sangue periférico e expectoração induzida dos 2 grupos de doentes.

Linfócitos T	Grupo A (reversibilidade)	Grupo B (sem reversibilidade)
Número de doentes	7	7
Expectoração		
CD4+ (%)	54,6 ± 23,1	60,0 ± 21,0
CD8+ (%)	49,9 ± 22,7	40,0 ± 21,0
CD4/CD8	1,1	1,5
Sangue periférico		
CD4+ (%)	55,9 ± 19,6	66,8 ± 12,0
CD8+ (%)	43,8 ± 18,9	33,2 ± 12,0
CD4/CD8	1,3	2,0

QUADRO VII

Células presentes no sangue periférico dos dois grupos de doentes

	Grupo A (reversibilidade)	Grupo B (sem reversibilidade)
Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	4,91 ± 0,5	4,88 ± 0,4
Hemoglobina (g/dl)	14,7 ± 1,2	15,3 ± 1,1
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	8,9 ± 1,6	8,8 ± 2,2
Neutrófilos	5,5 ± 1,3	6,2 ± 2,4
Linfócitos	2,3 ± 0,9	1,8 ± 0,6
Eosinófilos	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1
Monócitos	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,1

(Fig. 8 e Quadro V), em que se observaram valores normais (< 15 µg/l) em todos os doentes.

4. Células na expectoração e sangue periférico

Os resultados demonstraram uma boa viabilidade celular nas 17 amostras de expectoração considera-

das válidas. A média de contaminação das amostras foi de 12,7 ± 6,8 % de células epiteliais escamosas.

Os resultados das contagens diferenciais de células, na expectoração induzida, em ambos os grupos, encontram-se representados na Fig. 9. No Grupo A o total de células foi de 3,21 x 10⁶/ ml e no B de 3,52 x 10⁶/ml.

Verificou-se um predomínio de neutrófilos e

macrófagos em todos os doentes. A diferença entre os Grupos A e B não foi significativa para nenhuma das células estudadas, à excepção dos eosinófilos que se encontravam significativamente aumentados no grupo com reversibilidade ($5,8 \pm 1,0\%$ do total de células) comparativamente ao sem reversibilidade ($3,0 \pm 0,8\%$ do total de células) ($p = 0,01$).

As determinações dos subgrupos de linfócitos T CD4+ e CD8+ na expectoração induzida por citometria de fluxo enfrentaram algumas dificuldades de ordem técnica, tendo-se obtido resultados considerados fiáveis apenas em 14 doentes (sete do Grupo A e sete do Grupo B).

A caracterização das populações linfocitárias T no sangue periférico e expectoração encontra-se representada no Quadro VI e exemplificada na Fig. 10. Verificou-se um predomínio de linfócitos CD4+ na expectoração e no sangue venoso, sem diferenças significativas entre os dois grupos. Os doentes do Grupo A possuíam uma razão CD4/CD8 diminuída.

Também ao nível do sangue venoso periférico a análise das células confirmou o predomínio de neutrófilos nos dois grupos. A diferença entre os doentes com e sem reversibilidade (Grupos A e B) não foi significativa para nenhuma das linhagens celulares estudadas (Quadro VII).

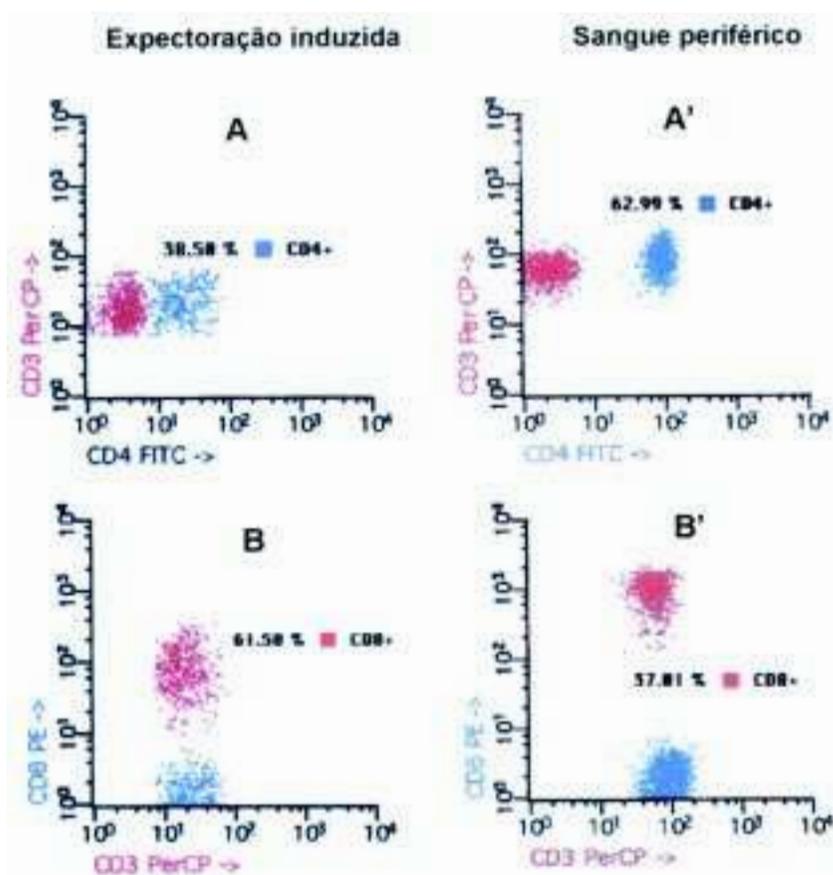


Fig. 10 — Exemplo de caracterização e quantificação das subpopulações linfocitárias T na expectoração induzida e sangue periférico de um doente com DPOC. A e A' janela de células T CD4+. B e B' janela de células T CD8+.

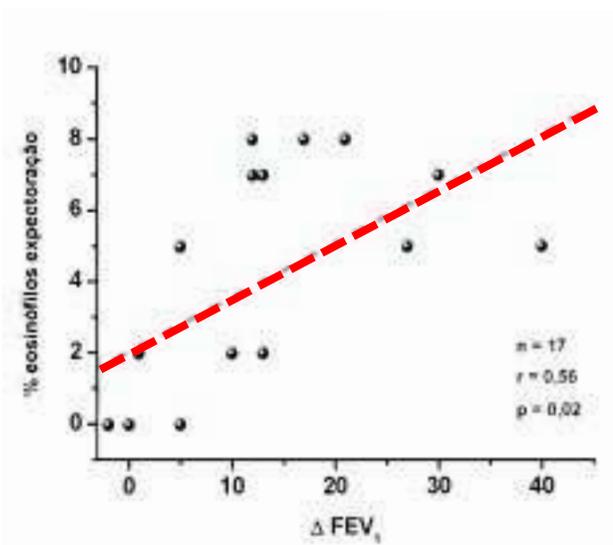


Fig. 11 — Relação entre percentagem de eosinófilos na expectoração induzida e variação percentual do FEV_1 após prova de broncodilatação.

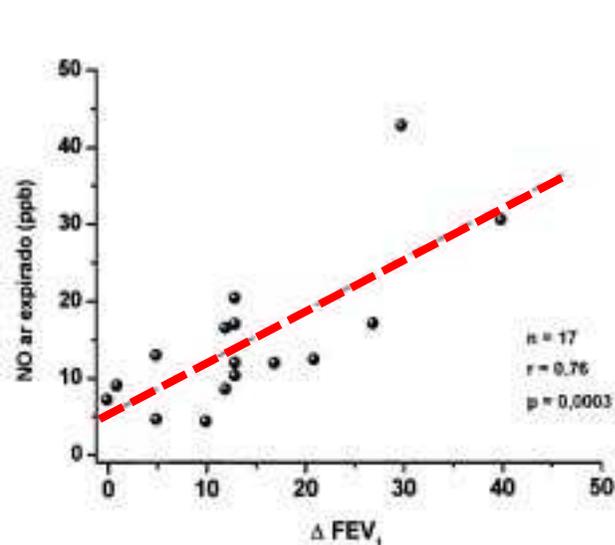


Fig. 12 — Relação entre o NO no ar expirado e a variação percentual do FEV_1 após prova de broncodilatação.

5. Relação entre parâmetros inflamatórios e funcionais

Nos 17 doentes com DPOC a variação percentual do valor teórico do FEV_1 , após prova de broncodilatação (ΔFEV_1), teve uma relação positiva com a percentagem de eosinófilos na expectoração induzida ($r = 0,56$, $p = 0,02$) (Fig. 11) e com o NO no ar expirado ($r = 0,76$, $p = 0,0003$) (Fig. 12), ou seja, quanto maior a variabilidade deste parâmetro funcional, maior a percentagem de eosinófilos presentes e maiores os valores de NO medidos.

Verificou-se uma relação negativa entre a variação percentual do FEV_1 e os valores de IL-8 na expectoração induzida ($r = 0,55$, $p = 0,025$) (Fig. 13), sendo os doentes com menor variabilidade do FEV_1 aqueles que apresentavam concentrações mais elevadas desta interleucina.

Os valores de NO no ar expirado, para além da relação anteriormente referida com a percentagem de variação do FEV_1 , tiveram igualmente uma relação significativa com a ECP na expectoração induzida ($r = 0,64$, $p = 0,01$) (Fig. 14) o que não ocorreu com os eosinófilos da expectoração ($p = 0,05$).

No entanto, obteve-se uma relação significativa

entre a ECP e o número de eosinófilos ($r = 0,53$, $p = 0,03$) na expectoração induzida. Não houve relação entre o número ou percentagem de eosinófilos na expectoração e os doseamentos de IL-5 no soro ou expectoração.

A relação entre a IL-8 e os neutrófilos na expectoração foi francamente positiva ($r = 0,94$, $p = 0,0001$) (Fig. 15) em que concentrações mais elevadas desta interleucina correspondiam a amostras com maior número de neutrófilos na expectoração.

Não se detectou relação entre a IL-5 sérica e a IL-5 na expectoração induzida, número de eosinófilos no sangue periférico ou a percentagem de eosinófilos da expectoração. A mesma ausência de relação ocorreu entre a IL-8 no soro e a IL-8 do sobrenadante da expectoração, o número de neutrófilos na expectoração induzida e no sangue periférico.

As subpopulações linfocitárias T CD4+ e CD8+ não demonstraram relações com outros parâmetros inflamatórios, funcionais ou demográficos, à excepção de uma relação entre o número de anos de cessação e a razão CD4/CD8 ($r = 0,52$, $p = 0,04$), na qual doentes com menor tempo de cessação possuíam menor valor desta razão.

Em relação às características funcionais e de-

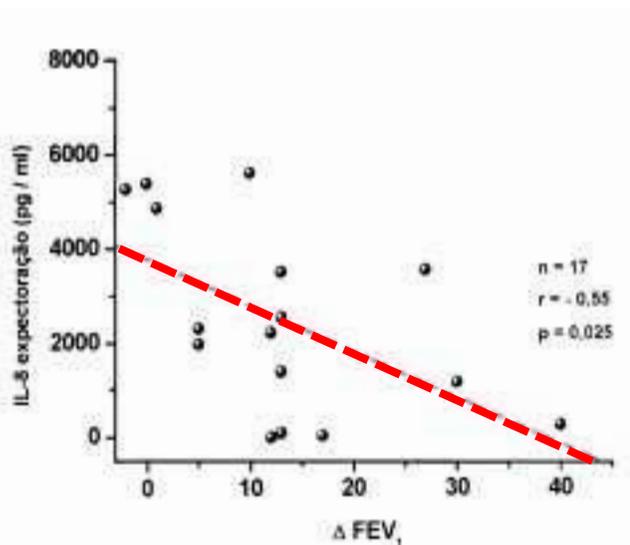


Fig. 13 — Relação entre os valores de IL-8 na expectoração induzida e a variação percentual do FEV₁ após inalação de broncodilatador.

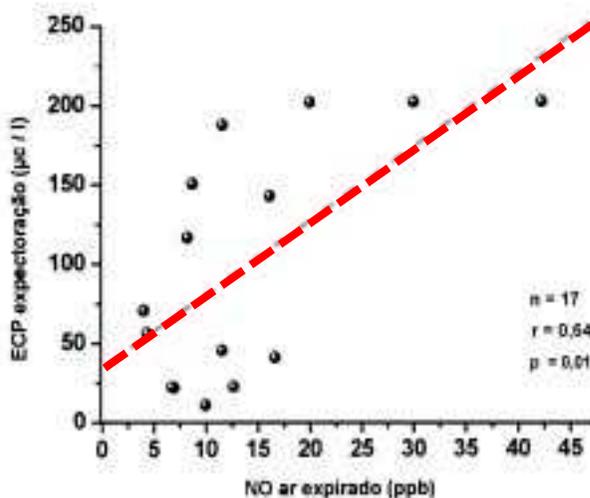


Fig. 14 — Relação entre o ECP no sobrenadante da expectoração induzida e NO no ar expirado.

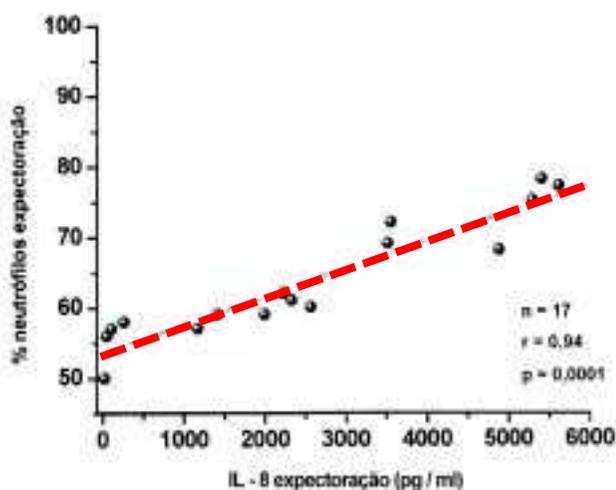


Fig. 15 — Relação entre a percentagem de neutrófilos e os valores de IL-8 na expectoração induzida.

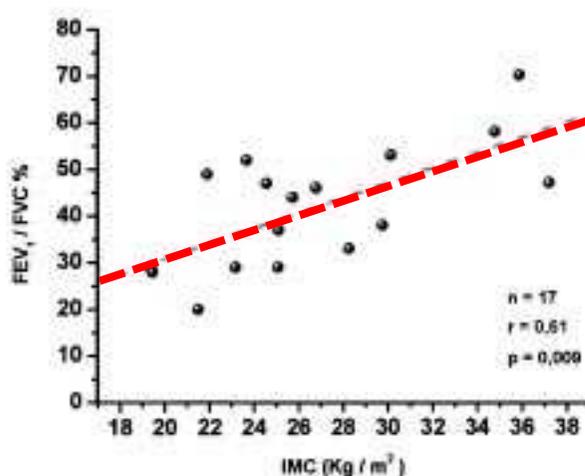


Fig. 16 — Relação entre o FEV₁/FVC e o IMC em todos os doentes com DPOC.

mográficas da população identificou-se uma relação francamente positiva entre os valores de FEV₁ e FEV₁/FVC e o IMC ($r=0,61$, $p=0,009$) (Fig. 16). Este último parâmetro verificou-se ainda estar relacionado negativamente com os valores de IL-8 na

expectoração induzida ($r=-0,57$, $p<0,02$). Doentes com menor IMC possuíam concentrações mais altas de IL-8.

Não se encontrou nenhuma relação entre o FEV₁ e a carga tabágica, os anos de tabagismo, os sinto-

mas ou os parâmetros de inflamação, nomeadamente a IL-8 ou as percentagens de neutrófilos e eosinófilos na expectoração induzida.

IV - DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram, inequivocamente, a presença de inflamação na DPOC estável.

De facto, em doentes ex-fumadores, evidenciou-se a inflamação das vias aéreas e do parênquima pulmonar, traduzida pelo elevado número de células inflamatórias, com particular relevância para os neutrófilos e aumento das concentrações de IL-8 na expectoração induzida.

Provou-se também que o grupo com reversibilidade aos broncodilatadores possuía uma inflamação eosinofílica e valores de NO no ar expirado mais elevados que os do grupo sem reversibilidade, relacionando-se ambos positivamente com a variabilidade do FEV₁. Estas diferenças não puderam ser explicadas pela presença de linfócitos T citotóxicos produtores de factores quimiotáticos eosinofílicos, nomeadamente IL-5.

A utilização de métodos não invasivos permitiu detectar diferenças na caracterização da inflamação pulmonar dos dois subgrupos de doentes com o diagnóstico de DPOC e, no caso da expectoração induzida, determinar, pela primeira vez, as diferentes populações de linfócitos T.

Demonstrou-se ainda, na população estudada, que a presença desta inflamação não se circunscreve ao pulmão, existindo um componente sistémico com repercussões no IMC.

1. População

A população de doentes com DPOC foi seleccionada de acordo com o critério prioritário de exclusão de asma brônquica. Para tal, foram incluídos doentes com DPOC moderada a grave, tentando privi-

legiar-se os com predomínio de bronquite crónica em detrimento dos que apresentavam alterações imagiológicas eminentemente enfisematosas. Todos possuíam história importante de exposição a factor de risco (fumo de tabaco), presença de sintomas compatíveis (tosse, expectoração e dispneia), início da sintomatologia após os 45 anos e obstrução brônquica marcada (FEV₁/FVC < 70 % e FEV₁ < 50 % do valor teórico) que não foi completamente reversível após prova de broncodilatação (FEV₁ < 80 % do valor teórico após broncodilatação). Ainda que a asma brônquica e a DPOC possam eventualmente estar associadas, os critérios utilizados permitem admitir que os doentes avaliados não eram asmáticos. A presença de valores de NO, IL-5, IL-8, ECP e células, muito diferentes dos obtidos em doentes com asma brônquica, reforçam este facto.

A exclusão de outras patologias do foro respiratório, alérgico ou doença sistémica grave, nomeadamente inflamatória ou cardíaca, foi de extrema importância, dado aquelas poderem falsear os resultados.

Uma parte do estudo decorreu nos meses de Inverno, tendo-se observado exacerbações agudas de causa infecciosa (bacterianas e virais) que motivaram, também, a exclusão de um número considerável de doentes. A presença de bactérias patogénicas na expectoração e/ou leucocitose com neutrofilia no sangue periférico auxiliaram na discriminação de exclusão.

A manutenção dos hábitos tabágicos e a terapêutica com corticosteróides orais e/ou inalados que poderiam diminuir os valores de NO no ar expirado foi obrigatoriamente outro dos critérios de exclusão.

A subdivisão de doentes nos grupos com e sem reversibilidade conduziu a uma maior gravidade funcional dos englobados no segundo grupo, apesar de uma carga tabágica semelhante e menor média de idades comparativamente ao grupo com reversibilidade, pondo em evidência as diferentes susceptibilidades individuais ao fumo do tabaco.

A ausência de uma população de controlo justifica-se pela existência de valores de referência na li-

teratura quer para as contagens de células e mediadores solúveis na expectoração induzida⁴⁵ quer para os valores de células, interleucinas e ECP no sangue periférico. Spanevello e colaboradores⁴⁶ demonstraram, na expectoração induzida de indivíduos saudáveis, a prevalência dos macrófagos ($69,2 \pm 13$ %) sobre neutrófilos ($27,3 \pm 13$ %), eosinófilos ($0,6 \pm 0,8$ %) e linfócitos ($1,0 \pm 1,2$ %). Também para o NO no ar expirado, para além de valores de referência em indivíduos saudáveis, não fumadores⁴⁷, existem múltiplos trabalhos com concentrações no grupo de controlos saudáveis entre 6,5 a 14,1 ppb, consistentes e reprodutíveis^{6,32-36}.

2. NO no ar expirado

O NO é originado através da conversão da L-arginina em L-citrulina pela enzima NOS, da qual existem 3 isoformas. A isoforma neuronal e endotelial são constitutivas (cNOS) e produzem pequenas quantidades de NO, enquanto a forma indutível (iNOS) gera grandes quantidades deste gás após activação celular por estímulos inflamatórios ou imunológicos. O NO tem um papel fundamental na regulação de funções fisiológicas, mas encontra-se igualmente implicado na fisiopatologia de várias doenças pulmonares, reflectindo, na DPOC, as alterações inflamatórias e o aumento do *stress* oxidativo.

Neste estudo verificamos a existência de valores significativamente aumentados de NO no ar expirado de doentes com DPOC estável e com reversibilidade aos broncodilatadores, comparativamente aos descritos nas séries publicadas com valores em indivíduos saudáveis^{6,32,36}. O grupo sem reversibilidade possuía concentrações deste gás sobreponíveis aos descritos em indivíduos saudáveis.

A maioria dos autores é consensual quanto à existência de valores aumentados desta molécula durante as exacerbações infecciosas, motivados pelo afluxo de células inflamatórias ao pulmão. O mesmo não se verifica no que concerne ao período de estabilidade. De facto, Agusti³⁴ conclui que na fase de exacer-

bação da doença os valores de NO foram mais elevados e que a normalização dos mesmos não foi imediata, o que leva a aceitar uma melhoria lenta do estado inflamatório. Maziak e colaboradores³³ demonstraram, igualmente, um aumento das concentrações de NO em doentes com DPOC grave ou em fase de exacerbação e a relação inversa deste mediador com o FEV₁. No entanto, o estudo de Clini³¹ relata resultados opostos, ou seja, os doentes com DPOC grave e estável possuem valores de NO inferiores aos indivíduos saudáveis que se relacionam positivamente com a gravidade da obstrução das vias aéreas. Estudos mais recentes referem concentrações na DPOC estável superiores aos controlos, que se relacionam positiva³⁶ ou negativamente^{37,38} com o FEV₁. A análise destes trabalhos, com resultados contraditórios, revela factores de viés como: amostras pequenas, populações heterogéneas, inclusão de fumadores e de doentes em exacerbação, técnicas de medição não padronizadas nas primeiras publicações e a possibilidade de colonização das vias aéreas inferiores, entre outros. Por este motivo, foi nossa preocupação controlar estes factores de enviesamento.

No nosso estudo, as concentrações de NO relacionaram-se com a variabilidade do FEV₁, demonstrando que os doentes com maior reversibilidade possuíam valores mais elevados deste mediador no ar expirado. A existência de uma função pulmonar menos deteriorada neste grupo de doentes é concordante com os resultados de estudos mais actuais, e permite-nos especular sobre a possível contribuição deste gás não só na manutenção do calibre das vias aéreas, constituindo um mecanismo de defesa contra a obstrução, mas também na génese de uma inflamação passível de reversibilidade.

Os dados por nós obtidos separam um subgrupo de doentes com DPOC com características funcionais distintas e explicam, parcialmente, a heterogeneidade dos resultados da literatura, uma vez que confirmam a existência de concentrações aumentadas de NO num subgrupo de doentes com DPOC estável, moderada a grave, ex-fumadores. Este fac-

tor não tinha sido correctamente averiguado até ao estudo de Papi e colaboradores⁶.

Constatou-se também, nesta população de doentes com DPOC, a associação do NO com a concentração de ECP e, indirectamente, com a inflamação eosinofílica, demonstrada anteriormente na asma brônquica⁴⁸. Esta inflamação relacionou-se positivamente com a variabilidade do FEV₁, reforçando as diferenças fisiopatológicas comparativamente à restante população de doentes com DPOC. Rutgers e colaboradores³² confirmaram a relação entre os níveis de NO e a percentagem de eosinófilos na expectoração, considerando o aumento destas células como resultado de um estímulo inflamatório inespecífico. Papi⁶, tal como no presente estudo, comparou dois grupos de doentes com DPOC estável, com e sem variabilidade do FEV₁ ao broncodilatador. Os seus resultados demonstraram que apenas os doentes com reversibilidade possuíam níveis aumentados de NO e eosinofilia na expectoração, relacionando-se exclusivamente o NO com o grau de reversibilidade, contrastando de alguma forma com os nossos resultados, em que também a eosinofilia na expectoração se relacionou com a variabilidade do FEV₁.

Existem várias diferenças metodológicas entre o estudo de Papi e o nosso, que podem explicar alguma discordância nos resultados. Entre estas o facto de ter estudado um grupo de doentes com menor gravidade (DPOC ligeira a moderada). Por outro lado, a reversibilidade aos broncodilatadores não foi definida com critérios padronizados pelas normas da ATS ou ERS (aumento do FEV₁ após broncodilatação maior ou igual a 12 % do valor teórico e superior a 200 ml). Outra limitação foi a não verificação da validade das células na expectoração com recurso ao doseamento de mediadores solúveis que poderiam confirmar os resultados e, ainda, a existência de doentes submetidos a outros estímulos desencadeantes na população estudada, o que pode constituir um factor de erro, dada a possibilidade de diferentes mecanismos fisiopatológicos comparativamente aos ex-fumadores.

A inclusão de doentes medicados com corti-

costeróides inalados pode, igualmente, deturpar os resultados, uma vez que o NO e a percentagem de eosinófilos na expectoração da população de doentes com variabilidade são alterados por estes fármacos^{5,7}.

À luz dos conhecimentos actuais existem vários mecanismos que permitem explicar o aumento do NO no ar expirado no subgrupo de doentes com reversibilidade após broncodilatação.

Atendendo a que a iNOS está presente nas células epiteliais, macrófagos, neutrófilos, células do músculo liso, fibroblastos, mastócitos e eosinófilos, e a que os doentes com reversibilidade se distinguem dos sem reversibilidade eminentemente pelo maior número de eosinófilos, é plausível considerar estas células como a fonte de produção de NO. A presença de valores mais elevados deste gás durante as exacerbações, altura em que os eosinófilos na expectoração aumentam, corrobora esta hipótese. Por sua vez, hoje sabe-se que o próprio NO produzido pelos eosinófilos é em si mesmo um estímulo de *feedback* positivo para esses mesmos eosinófilos, perpetuando assim um ciclo vicioso de inflamação, contribuindo para fenómenos de migração e/ou efeitos líticos nos tecidos⁴⁹. É igualmente possível que outras células, nomeadamente as epiteliais ou os macrófagos, após a presença de um estímulo lesivo inicial, induzido pelo fumo do tabaco, produzam NO que irá contribuir para a quimiotaxia ou diminuição da apoptose dos eosinófilos nas vias aéreas⁵⁰. O trabalho de Feder e colaboradores⁵¹ em ratos alérgicos sugere que o NO libertado pelas células do endotélio vascular do pulmão está implicado na quimiotaxia dos eosinófilos, promovendo a migração a partir da circulação sanguínea para o parênquima pulmonar e vias aéreas. A presença de um ciclo perpetuador em que o NO pode ser causa e/ou consequência da eosinofilia não fica explicada, sendo necessários mais estudos para o seu esclarecimento.

Outra possível explicação para o aumento do NO no ar expirado dos doentes com DPOC e com reversibilidade poderá relacionar-se com a resposta compensatória à broncoconstrição induzida pela inflamação. Esta resposta assenta na estimulação dos

nervos broncodilatadores NANC (*non adrenergic non colinergic*) com aumento da expressão da cNOS neuronal e conseqüente aumento de NO. No entanto, esta hipótese parece-nos menos provável, dado que a produção deste gás por esta enzima é menor comparativamente à sua isoforma indutível.

A presença de inflamação crónica grave com envolvimento de múltiplas células levar-nos-ia a pressupor valores aumentados de NO em todos os doentes com DPOC. Um trabalho recente⁵² demonstrou a importância dos neutrófilos como fonte produtora de NO em doentes com asma brônquica, o que poderia conduzir à ideia de que, dado o predomínio destas células na DPOC, os valores de NO estariam aumentados. Contudo, este pressuposto não se verifica no nosso estudo. Efectivamente, o grupo sem reversibilidade possuía concentrações deste gás sobreponíveis às descritas em indivíduos saudáveis e coincidentes com os valores relatados na literatura para populações semelhantes^{32,35,38}, demonstrando que a padronização dos métodos de avaliação no ar expirado começa a produzir resultados comparáveis entre grupos de investigação.

Podemos avançar hipóteses explicáveis da ausência de concentrações elevadas de NO no grupo sem reversibilidade.

A presença aumentada de neutrófilos, com produção de grandes quantidades de radicais livres, entre os quais o anião superóxido, ao reagir com o NO origina um potente oxidante, a peroxinitrite, diminuindo os níveis doseados deste gás no ar expirado⁵³. Por este motivo Kanazawa e colaboradores³⁵ relataram que os derivados do NO na expectoração são mais fidedignos do que os valores no ar expirado, na avaliação da inflamação em doentes com DPOC.

Também a hipertrofia das glândulas mucosas com hiperprodução de muco associada a metaplasia celular e diminuição do epitélio ciliado (que se sabe produzir NO para manutenção dos movimentos ciliares) podem contribuir para a diminuição da produção ou mesmo constituir uma barreira à sua libertação, com diminuição da difusão do gás e redução dos seus valores no ar expirado. Um estu-

do, de extrema importância, de Hogman⁵⁴, avaliou os diferentes locais de produção do NO na DPOC, de forma a distinguir o gerado na região alveolar do originado nas vias condutoras. Em doentes ex-fumadores constatou que a fracção alveolar de NO estava aumentada, comparativamente com os indivíduos saudáveis e com asma brônquica, possivelmente por aumento da iNOS a este nível ou alteração da relação ventilação-perfusão (a existência de áreas do pulmão bem ventiladas e não perfundidas aumenta os valores de NO no ar expirado). Verificou-se ainda uma heterogeneidade de resultados em doentes com DPOC no que concerne à taxa de transferência do NO do epitélio para o ar expirado, uma vez que se constatou poder estar aumentada nuns doentes e diminuída noutros. A alta taxa de transferência pode explicar parcialmente o aumento do NO no grupo de doentes com reversibilidade e, por sua vez, a baixa taxa de transferência decorrente do espessamento da membrana basal, de alterações epiteliais ou de aumento do muco, explicaria os baixos valores encontrados no grupo sem reversibilidade.

Outro factor a considerar é a presença de uma inflamação eosinofílica menos intensa neste último grupo de doentes, e, dado que o NO no ar expirado depende do grau de obstrução, pode acontecer que os doentes mais obstruídos libertem para o ar expirado menor quantidade deste gás.

Em conclusão, estes factos sugerem que a variabilidade do FEV₁, traduzida pela resposta ao broncodilatador, tal como a presença de uma inflamação eosinofílica, podem ser monitorizados indirectamente pela determinação de NO no ar expirado.

Ao verificarmos na literatura que os doentes com inflamação eosinofílica são aqueles que respondem aos corticosteróides orais e inalados^{4,7}, consideramos a hipótese de se poderem identificar estes doentes, a fim de os submeter a uma prova terapêutica com corticosteróides, mediante o recurso a um método rápido, simples, eficaz e não invasivo, que possivelmente terá maiores probabilidades de sucesso do que a selecção ao acaso.

3. *Expectoração induzida*

A expectoração induzida constitui uma alternativa não invasiva ao lavado broncoalveolar (LBA) e à biopsia brônquica ou pulmonar no estudo da inflamação.

A investigação da fisiopatologia da DPOC foi adiada até há cerca de 6 anos, altura em que a maioria dos grupos científicos centraram os seus esforços, de forma a determinar a sequência de acontecimentos que originam o aparecimento de inflamação e, posteriormente, de obstrução, num indivíduo fumador. O elevado número de doentes, muitos com um diagnóstico tardio, a noção de que é parcialmente auto-infligida, sendo o principal agente etiológico o fumo do tabaco, e a ineficácia das terapêuticas disponíveis, que não impedem a progressão do processo inflamatório, de destruição e de remodelação, contribuíram para o reforço da actividade científica nesta área. O estudo e monitorização da cinética inflamatória foi efectuado, nos primeiros trabalhos, com recurso a técnicas invasivas, difíceis de realizar, desconfortáveis para o doente, dispendiosas e com alguns riscos quando comparadas com os métodos não invasivos.

A expectoração induzida adquire um papel de extrema importância, uma vez que permite obter secreções das vias aéreas, com consequente análise de células e mediadores, de forma segura, eficaz e reprodutível, como comprovado por Bhowmik¹⁵ e mais recentemente por Brightling e colaboradores numa população com DPOC moderada a grave⁵⁵.

O presente estudo corrobora estes resultados. Houve uma alta taxa de sucesso na obtenção das amostras, sendo o procedimento facilmente executado e bem tolerado, apesar da gravidade da obstrução brônquica, o que atesta a segurança do método em doentes com DPOC moderada a grave. Os factores de segurança devem ser respeitados escrupulosamente e instituídas as devidas precauções para correcção de possíveis complicações, dado que a inalação de soro iso ou hipertónico pode originar broncoconstrição e consequente diminuição da satu-

ração arterial de O₂, o que se verificou apenas num doente, após terminar a fase de indução e terem sido obtidas amostras viáveis (diminuição de 47 % do valor teórico do FEV₁ com inalação de soro isotónico).

Entre os problemas identificados, que tornam difícil a implementação da indução e processamento da expectoração na prática clínica, referem-se a morosidade do processo, a necessidade de pessoal treinado na sua execução e a obrigatoriedade do tratamento da amostra nas horas subsequentes à colheita. Atendendo às condicionantes referidas, a metodologia que utilizamos no processamento da expectoração induzida obedeceu escrupulosamente às mesmas. No entanto, as suas vantagens não são de menosprezar, uma vez que pode permitir uma decisão terapêutica inicial, monitorizar a inflamação das vias aéreas, avaliar a eficácia da terapêutica instituída e eventualmente determinar factores de prognóstico da doença.

De forma a garantir a fiabilidade dos resultados das células obtidas na expectoração induzida determinou-se a IL-8, um factor quimiotático e activador dos neutrófilos, e a ECP, dado ser um marcador indirecto da actividade eosinofílica.

4. *Neutrófilos e concentrações de IL-8*

Identificámos concentrações elevadas de IL-8 e de neutrófilos na expectoração induzida, semelhantes às relatadas por outros autores em doentes ex-fumadores com DPOC^{21,22,56,57}, encontrando-se aumentadas quando comparadas com os valores de referência em indivíduos saudáveis. Os valores de neutrófilos e as concentrações de IL-8 possuíam uma excelente relação linear.

Entre os factores quimiotáticos neutrofílicos mais importantes inclui-se a IL-8, sintetizada pelo epitélio brônquico, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos. A activação dos neutrófilos liberta IL-8 conduzindo a um ciclo de perpetuação⁵⁸ o que, apoiado pelos resultados obtidos, permitem considerá-los os principais responsáveis na produção desta interleucina na DPOC. Os macrófagos e as células epiteliais não

podem, no entanto, ser excluídos como fontes secundárias da sua produção e libertação. De realçar, ainda, o aumento da expressão da selectina E e ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) que, para além da IL-8, parecem contribuir para a activação e recrutamento dos neutrófilos na DPOC⁵⁹. O predomínio de uma inflamação neutrofílica possibilita, igualmente, explicar a ausência de efeito dos corticosteróides na maioria dos doentes com DPOC.

A IL-8 encontra-se aumentada mesmo nos fumadores sem obstrução, o que indica um papel precoce na doença^{16,21}. Hulbert e colaboradores⁶⁰ demonstraram de forma inequívoca, em modelo animal, que a exposição ao fumo de tabaco durante 6 horas condiciona um aumento de cinco vezes do número de neutrófilos no epitélio das vias aéreas comprovando a potência deste mediador. Um estudo de Rutgers⁶¹ demonstra que existe uma boa correlação entre o doseamento da IL-8 na expectoração induzida, nas biopsias brônquicas e no LBA, o que sugere que este mediador adquire um carácter abrangente em todos os compartimentos traduzindo mais informação do que a análise das células inflamatórias, já que a comparação de neutrófilos entre os diferentes compartimentos pulmonares revelou diferenças significativas.

O aumento de neutrófilos e a alteração do balanço proteases-antiproteases em fumadores é conhecida desde longa data na DPOC. As alterações fisiopatológicas induzidas por estas células ocorrem quer por síntese e libertação de enzimas destrutivas quer pelo aumento da migração, recrutamento e persistência destas células nas vias aéreas e parênquima pulmonar de fumadores com e sem obstrução. Keatings⁶² confirma um aumento de neutrófilos nos doentes com DPOC acompanhado de libertação de enzimas destrutivas, como a mieloperoxidase e a lipocalina neutrofílica.

Existe evidência, na literatura, de que a inflamação neutrofílica epitelial, subepitelial, das glândulas brônquicas e do lúmen das vias aéreas (esta última avaliada na expectoração induzida) se relaciona directamente com o declínio do FEV₁^{19,21-23},

^{62,63}. No importante estudo de Stanescu⁶⁴ foram avaliados 46 doentes fumadores e ex-fumadores durante 15 anos ficando demonstrado que a percentagem de neutrófilos na expectoração induzida de fumadores com obstrução das vias aéreas é maior do que nos sem obstrução e se relaciona com o declínio do FEV₁.

Ao contrário destes estudos, não identificamos uma associação segura entre os valores de IL-8 ou contagens de neutrófilos com a obstrução das vias aéreas ou factores agressores, nomeadamente o número de unidades maço ano fumadas. Tal facto poderá ser justificado pelos diferentes critérios de selecção ou pela dimensão das populações estudadas.

As diferenças entre o grupo com e sem reversibilidade não foram significativas no que concerne à IL-8 ou número de neutrófilos na expectoração. No entanto, verificou-se uma tendência para o aumento dos valores da IL-8 no grupo de doentes sem reversibilidade e com função respiratória mais deteriorada. Constatou-se, ainda, uma relação negativa entre as concentrações desta interleucina na expectoração e a variabilidade do FEV₁ ou seja, os doentes com menor variabilidade após a prova de broncodilatação e com uma obstrução marcada das vias aéreas possuíam concentrações mais elevadas deste mediador, o que aponta para uma ligação entre a presença de inflamação neutrofílica das vias aéreas e o grau de variabilidade da obstrução das vias aéreas em ex-fumadores com DPOC estabilizada. Estes resultados sugerem que à medida que a gravidade da obstrução aumenta os números de neutrófilos nas vias aéreas também aumentam, o que poderá indicar um papel destas células na progressão da doença. Dada a íntima relação entre a IL-8 e as percentagens de neutrófilos na expectoração, é possível especular que os doentes com menor variabilidade do FEV₁ após o broncodilatador, e com maior deterioração da sua função pulmonar, terão uma inflamação neutrofílica mais marcada das vias aéreas, onde os neutrófilos desempenham um papel crucial, podendo originar o espessamento das paredes e estreitamento do lúmen conduzindo a uma obstrução

fixa com posterior destruição e/ou remodelação das vias aéreas.

Estes dados permitem explicar parcialmente o pior prognóstico observado em doentes com obstrução irreversível⁶⁵. Também um estudo multicêntrico sugere que o grau de resposta à terapêutica broncodilatadora está inversamente relacionado com a diminuição anual do FEV₁ em doentes com DPOC⁶⁶. Estabelece-se então uma causalidade entre a inflamação neutrofílica e a deterioração funcional na DPOC, podendo a determinação destas células ter utilidade como medida de avaliação da gravidade e prognóstico da doença.

Todos os doentes incluídos no estudo eram ex-fumadores, não se tendo identificado factores de risco actuais, pelo que se conclui a persistência de uma inflamação crónica, possivelmente progressiva, tendo em conta o número de neutrófilos e as concentrações de IL-8 na expectoração de doentes com provas de função mais deterioradas, e que se verifica mesmo após cessação de um factor de risco como o fumo do tabaco. Estes resultados foram igualmente confirmados noutros trabalhos⁵⁷.

Bhowmik e colaboradores²² demonstraram que, para além das agressões motivadas pelo fumo do tabaco, as exacerbações frequentes nos doentes com DPOC condicionam o aumento de IL-8 e maior afluxo de neutrófilos na expectoração, quando comparadas com doentes com menor número de exacerbações por ano. Nos doentes do nosso estudo, a presença de inflamação foi certamente motivada pelos anos de tabagismo, número de unidades maço ano fumadas e exacerbações no ano anterior. Ao compararmos as características dos dois grupos, verificamos que os doentes com reversibilidade, apesar de um grupo etário mais elevado, possuíam uma menor gravidade de doença, avaliada pelo FEV₁. Deverão, certamente, ser consideradas susceptibilidades diferentes, que passarão, sem dúvida, pelas características genéticas de resposta individual aos agentes agressores.

As concentrações de IL-8 e o número de neutrófilos no sangue periférico apresentaram-se dentro da

faixa de normalidade, em todos os doentes. Estes resultados, que à primeira vista não parecem consistentes com o aumento da inflamação sistémica em doentes com DPOC, merecem alguma reflexão.

Podemos apenas afirmar que as características inflamatórias a nível local não são semelhantes às sistémicas. Tal não exclui a possível expressão de outros mediadores não doseados neste estudo, entre os quais o TNF- α e IL-6.

Apesar de não termos evidência, no nosso estudo, de inflamação sistémica mediante os parâmetros inflamatórios avaliados, constatou-se um indicador indirecto da referida inflamação mediante a existência de correlação entre os níveis de IL-8 na expectoração e o IMC. Na verdade, o facto dos doentes com maior inflamação pulmonar apresentarem menores valores de IMC, leva-nos a especular quanto à existência de umnexo de causalidade entre a inflamação das vias aéreas e uma eventual inflamação sistémica.

5. Eosinófilos e concentrações de IL-5 e ECP

Neste estudo foi demonstrada a existência de percentagens de eosinófilos aumentadas na expectoração induzida de doentes com DPOC, quando comparadas com os valores de referência em indivíduos saudáveis.

O aumento de eosinófilos tem sido referido em vários trabalhos em doentes com DPOC estável^{14-8,18,23,62} ou durante as exacerbações^{24,67} na expectoração induzida, LBA e biopsias brônquicas. Keatings e colaboradores⁶² foram um dos primeiros grupos a detectar o aumento de eosinófilos e de concentrações de ECP e EPO (endoperoxidase eosinofílica) na expectoração induzida de fumadores com obstrução, em condições de estabilidade. Estas células parecem, inclusivamente, estar implicadas numa fase precoce da doença, dado que se encontram aumentadas na expectoração induzida de fumadores sem obstrução⁶⁸.

A existência de concentrações normais de IL-5

na expectoração induzida e sangue periférico indica diferenças claras em relação à asma brônquica. Esta citocina não parece ser a responsável pela diferenciação e libertação dos eosinófilos nos doentes com DPOC, uma vez que obtivemos valores semelhantes nos dois grupos de doentes e não se verificou relação com o aumento dos eosinófilos na expectoração. Outros autores obtiveram conclusões semelhantes^{5,69}, não conseguindo demonstrar, na mucosa brônquica de doentes com DPOC estável ou em fase de exacerbação e com valores aumentados de eosinófilos, um aumento da expressão de IL-5.

A hipótese da existência de uma subpopulação de linfócitos Tc2 produtores desta interleucina é assim pouco viável. Outras moléculas podem estar implicadas no recrutamento eosinofílico. A IL-8, sintetizada em grandes quantidades nas vias aéreas pelos neutrófilos e células epiteliais, é, para além dos neutrófilos, um factor activador e quimiotático dos linfócitos T e eosinófilos⁷⁰, o que poderia explicar, parcialmente, o aumento destas últimas células na expectoração induzida na DPOC. No entanto, este mecanismo não nos parece ser o mais importante, dado que, no grupo de doentes com reversibilidade e número mais elevado de eosinófilos, os valores de IL-8 foram inferiores aos do grupo sem reversibilidade. Uma outra possível explicação pode ser a elevação do TNF- α que conduz directa ou indirectamente, através da expressão aumentada de moléculas de adesão endoteliais, ao fluxo de eosinófilos aos locais de inflamação nos doentes com DPOC⁷¹. Também o aumento de quemocinas ou citocinas com especial relevância para a eotaxina e RANTES (*released on activation normal T-cell expressed and secreted*) produzidas pelo epitélio brônquico contribui para a inflamação crónica persistente, aumentando os eosinófilos nos tecidos e lúmen das vias aéreas. Os mecanismos, anteriormente referidos, dependentes do NO, podem ter um contributo no recrutamento eosinofílico, que será tanto mais elevado quanto maiores os níveis de NO no ar expirado. Rutgers³² refere uma relação positiva entre os valores de NO no ar expirado e a percentagem

de eosinófilos na expectoração. No estudo de referência de Saetta e colaboradores²⁴ foi demonstrado, na expectoração e biopsias, que o aumento destas células tende a ocorrer durante as exacerbações em doentes com DPOC o que pode explicar o conseqüente aumento de NO verificado nestas situações³⁴. Outros factores agressores podem estar na origem desta eosinofilia. A relação entre a presença de inflamação eosinofílica e o fumo de tabaco foi evidenciada em estudo animais⁷².

No grupo de doentes com reversibilidade do FEV₁ ao broncodilatador encontraram-se valores aumentados destas células, estatisticamente significativos, quando comparados com os do grupo sem reversibilidade. A diferença entre os dois grupos foi ainda comprovada pela presença de valores estatisticamente mais elevados de ECP no grupo com variabilidade de FEV₁ após broncodilatação.

A relação entre o número de eosinófilos e o ECP demonstra que estas células são a sua principal fonte, sendo provável que este marcador eosinofílico contribua para a inflamação verificada nesta população de doentes com DPOC.

No estudo de Rutgers⁶¹ foram encontrados valores de ECP aumentados na expectoração induzida e LBA de doentes com DPOC, com boa relação entre os dois métodos e boa relação entre este marcador e a presença de eosinófilos activados na submucosa de biopsias brônquicas. A expectoração induzida pode, assim, ser útil no estudo de células das vias aéreas centrais e de marcadores solúveis que parecem representar quer as grandes vias aéreas quer o espaço broncoalveolar.

Outros autores relataram aumento do ECP por eosinófilo na expectoração induzida^{5,7,23,62} ou LBA^{4,18} de doentes com DPOC sugerindo activação e desgranulação destas células nas vias aéreas. No presente trabalho os eosinófilos não parecem estar activados, uma vez que as concentrações de ECP não estão aumentadas, sendo estes resultados coincidentes com os de vários estudos^{8,57}.

Apesar da existência de uma relação não implicar causa-efeito, no nosso estudo, a percentagem de

eosinófilos e a variabilidade do FEV₁ estão intimamente ligados. Os dados obtidos sugerem um papel da inflamação eosinofílica na fisiopatologia da obstrução e reversibilidade brônquica na DPOC. Fujimoto e colaboradores⁵ comprovaram que os números de eosinófilos prévios à administração de corticosteróides se relacionam com a variabilidade do FEV₁ após o tratamento com prednisolona durante duas semanas.

A existência de inflamação com um componente eosinofílico na expectoração pode prever benefícios terapêuticos com corticoterapia. Na asma brônquica, o tratamento com corticosteróides orais e/ou inalados é uma das terapêuticas mais eficazes, diminuindo os sintomas, revertendo a obstrução das vias aéreas e reduzindo os números de eosinófilos que infiltram a submucosa das vias aéreas. As normas internacionais² admitem que nalguns doentes com DPOC estável pode ocorrer melhoria da função respiratória após um pulso de corticoterapia oral ou inalada, embora tal não se consiga prever e a distinção ocorra por intermédio de uma prova terapêutica com estes fármacos. No trabalho de Pizzichini⁷, efectuado em doentes com DPOC grave com hábitos tabágicos e eosinofilia na expectoração induzida, ocorreu diminuição da sintomatologia, melhoria do FEV₁ e diminuição do número de eosinófilos e concentrações de ECP após terapêutica com prednisolona oral, sem no entanto ter ocorrido alteração nos números de neutrófilos ou proteases neutrofílicas. Chanez e colaboradores⁴ referem um aumento de eosinófilos no LBA e biopsias brônquicas e ECP no LBA de doentes com DPOC, fumadores e ex-fumadores, que responderam a um pulso curto de corticosteróides orais. Dado que estes doentes respondem significativamente ao broncodilatador e existe uma resposta clínica e funcional à terapêutica, propõem, estes últimos, que exista um subgrupo distinto de doentes com DPOC, com características semelhantes às da asma brônquica. A ausência de eosinofilia ou aumento de IL-5 no sangue periférico consubstanciam esta ideia.

Todos os doentes com reversibilidade e valores

aumentados de eosinófilos referiram agravamento subjectivo da sua sintomatologia após suspensão da corticoterapia inalada, particularmente da dispneia, apesar de não se ter verificado repercussão funcional. Tal facto sugere um efeito sintomático benéfico dos corticosteróides inalados, podendo os dados encontrados serem interpretados como uma consequência da suspensão da medicação. Embora o mesmo não se tenha verificado nos doentes do grupo sem reversibilidade, dado o tamanho da amostra, não podemos excluir completamente a presença de efeito placebo.

A eosinofilia na expectoração induzida pode prever benefícios desta medicação neste subgrupo de doentes. Assim, este método é uma boa forma de prever quais os doentes que irão beneficiar de terapêutica com corticoterapia oral ou inalada. Permite ainda avaliar e monitorizar a eficácia deste tratamento na DPOC.

Em termos clínicos e dado que o procedimento da expectoração induzida é moroso, a determinação do NO no ar expirado poderá ser o método de primeira linha para a avaliação indirecta da inflamação eosinofílica, apenas se avançando para a expectoração induzida se os valores de NO estiverem normais ou nos casos em que exista uma discrepância entre a história clínica, o exame objectivo e os valores deste gás.

6. *Linfócitos T*

Este estudo procurou caracterizar as populações de linfócitos T por métodos não invasivos, nas vias aéreas de doentes com DPOC. Na literatura, a maioria dos trabalhos prévios foram efectuados com recurso a biopsias brônquicas ou cirúrgicas. O estudo dos linfócitos T na expectoração induzida foi efectuado com sucesso sobretudo em doentes com asma brônquica, onde se documentou um aumento da subpopulação T CD4+ e um aumento da razão CD4/CD8, comparativamente ao sangue periférico^{73,74}, mas também em doentes com DPOC⁷⁵.

Na fase que antecedeu a realização deste estudo verificou-se que o tratamento da expectoração com DTT conduzia a destruição dos receptores de superfície dos linfócitos T, pelo que foi necessário adaptar o procedimento de tratamento da amostra. Resultados semelhantes foram obtidos⁷⁶ em leucócitos da circulação periférica com diminuição de alguns marcadores de superfície (por destruição dos epitopos) e aumento da expressão de outros, com melhor acesso dos anticorpos aos antígenos. Outras dificuldades, para além da técnica, prendem-se com o reduzido número de linfócitos na expectoração, motivo que os torna difíceis de caracterizar. Nos doentes fumadores estas células localizam-se histologicamente no interior e à periferia das glândulas brônquicas e submucosa⁶³. Existe uma infiltração da mucosa por células inflamatórias que é o resultado da expressão aumentada de moléculas de adesão na DPOC, como referido anteriormente. Assim, é possível que os linfócitos encontrados na expectoração induzida provenham da superfície epitelial. Os resultados encontrados são promissores, embora sejam necessários outros estudos para confirmação da validade do actual.

Segundo alguns trabalhos, os linfócitos T CD8+ predominam na mucosa e submucosa de doentes que mantêm hábitos tabágicos. Saetta²⁸, ao tentar diferenciar as características dos fumadores com e sem obstrução das vias aéreas com recurso a biopsias cirúrgicas, demonstra, em fumadores com DPOC, o aumento do número de linfócitos T CD8+ nas vias aéreas periféricas, conduzindo a obstrução e podendo estar implicados nos processos de remodelação com aumento do músculo liso. Também o estudo de O'Shaughnessy²⁷ reforça estas conclusões nas vias aéreas centrais, utilizando biopsias brônquicas. Os trabalhos referidos comprovam a relação negativa entre os valores de linfócitos CD8+ e o FEV₁.

Ainda que os números de células T CD4+ fossem mais elevados, a razão CD4/CD8 foi relativamente baixa, podendo traduzir alterações locais. Não confirmámos o aumento dos linfócitos T CD8+ nos valores anteriormente referidos em doentes com DPOC,

em biopsias e LBA. Estas diferenças podem explicar-se quer pela metodologia aplicada (a expectoração induzida parece investigar um compartimento pulmonar distinto das biopsias) quer pela ausência de fumadores activos na população estudada.

Sabe-se que em indivíduos saudáveis fumadores o fumo de tabaco altera as populações de células T com aumento dos CD8+ no sangue periférico, voltando os valores ao normal após cessação tabágica⁷⁷. Existe tal interesse nos linfócitos T de doentes com DPOC que alguns investigadores consideram que as diferentes susceptibilidades aos efeitos do fumo do tabaco, ocorrem em indivíduos com condicionantes genéticas que determinam, à partida, uma diminuição da razão CD4/CD8⁷⁸.

É possível que a actividade destes linfócitos T CD8+ seja menor nos ex-fumadores e seja máxima durante a manutenção do estímulo agressor (fumo de tabaco). Os dados obtidos sugerem um possível papel dos linfócitos T CD4+ na fisiopatologia do desenvolvimento de obstrução. As células T CD4+, após a cessação do factor agressor, podem estar implicadas na manutenção de uma inflamação crónica na DPOC com destruição directa do parênquima pulmonar, através da libertação de substâncias líticas, como as perforinas e granzimas, ou indirectamente, através da produção de numerosas citocinas que podem induzir o recrutamento, activação e diferenciação de outras células inflamatórias. Não se pode excluir, igualmente, a interferência nos processos de reparação com fibrose e remodelação, após cessação tabágica.

Parece-nos fundamental a continuidade da investigação nesta área, para que seja possível determinar as acções destas células na DPOC.

7. Inflamação sistémica

A perda de peso e a fraqueza muscular ocorrem, frequentemente, em doentes com DPOC. O baixo peso corporal tem vindo a ser demonstrado como um factor de mau prognóstico⁷⁹.

Neste estudo, os doentes com menor IMC possuíam uma maior deterioração da função respiratória, avaliada pelo FEV_1 e FEV_1/FVC , o que demonstra a diminuição da massa muscular ou peso com a progressão da doença. Um IMC inferior a 25 kg/m² aumenta o risco de mortalidade nos doentes com DPOC⁸⁰, o mesmo se verificando nos que têm um baixo FEV_1 ⁸¹, pelo que o seu prognóstico é reservado.

A fraqueza muscular ocorre em doentes com DPOC como parte de uma diminuição do peso, mas também por um processo isolado, sugerindo a presença de um estado hipermetabólico com resposta catabólica⁸². Este pode ser activado por citocinas produzidas nos locais de inflamação ou na circulação, que actuam directa ou indirectamente, originando alterações hormonais, como o aumento da noradrenalina, adrenalina ou esteróides endógenos.

Em estudos animais, os processos inflamatórios conduzem a que vários aminoácidos sejam desviados do músculo para o fígado de forma a possibilitar a síntese de proteínas de fase aguda⁸³. Ficou demonstrado, em doentes com estados hipermetabólicos, que os níveis de proteínas de fase aguda estão⁸⁴ francamente aumentados, contribuindo para a perda de peso. Uma das proteínas de fase aguda, o $TNF-\alpha$, produzido pelos macrófagos e mastócitos, pode encontrar-se aumentado²¹ relacionando-se as suas concentrações com a perda de peso em doentes com DPOC estável⁴⁰. Este mediador induz a produção de IL-8 pelas células epiteliais⁸⁵, eosinófilos⁸⁶ e neutrófilos⁸⁷. Os resultados obtidos no nosso estudo permitem concluir que existe uma associação entre a IL-8 na expectoração induzida, um marcador da actividade inflamatória no pulmão e a diminuição da massa corporal na população estudada.

Eid⁴¹ formula a hipótese de que, à medida que a inflamação pulmonar progride, ocorre, inicialmente, uma perda preferencial de proteínas musculares, o que reflecte uma resposta hipercatabólica mantida. Quando esta inflamação se torna persistente verificar-se-á perda de peso com consequentes efeitos na morbidade e mortalidade dos doentes com

DPOC. Langen e colaboradores⁸⁸ confirmam que o $TNF-\alpha$ induz a activação do factor nuclear κB interferindo na diferenciação das proteínas musculares. Estabelecem uma relação directa entre as citocinas e a fraqueza muscular.

Estes dados permitem concluir que a alteração observada no peso corporal de doentes com DPOC moderada a grave pode estar relacionada com uma resposta catabólica induzida pela inflamação crónica.

V - CONCLUSÕES

Do estudo realizado podemos concluir que:

- Na população estudada de doentes com DPOC moderada a grave, ex-fumadores, existe uma inflamação pulmonar crónica heterogénea, com inúmeras células e mediadores implicados, que persiste mesmo na ausência de um factor agressor.
- Existe um subgrupo de doentes, com reversibilidade à medicação broncodilatadora, que apresenta características inflamatórias semelhantes às da asma brônquica (aumento dos valores de NO no ar expirado e eosinófilos na expectoração induzida) e significativamente diferentes da restante população de doentes com DPOC.
- A presença de uma obstrução com reversibilidade das vias aéreas pode ser justificada pelas características inflamatórias neste subgrupo. Estes dados sugerem a existência de um mecanismo inflamatório na génese da reversibilidade. A inflamação das vias aéreas mais centrais, avaliada pelas células na expectoração, parecer relacionar-se com a obstrução que acontece maioritariamente nas vias aéreas periféricas, estimada pelos marcadores solúveis doseados.
- O recrutamento de eosinófilos nas vias aéreas dos doentes com DPOC não ocorre por aumento da produção e libertação de IL-5 por uma população de linfócitos T, pondo em evidência características inflamatórias diferentes da asma brônquica.

- O subgrupo de doentes com reversibilidade do FEV₁, valores mais elevados de NO no ar expirado e eosinofilia na expectoração, poderá beneficiar do tratamento com corticosteróides orais ou inalados. São necessários ensaios clínicos controlados que confirmem a eficácia destes fármacos na DPOC com resposta à prova de broncodilatação.
- O doseamento de NO no ar expirado e a expectoração induzida permitem prever, de forma não invasiva, quais os doentes com inflamação eosinofílica das vias aéreas e podem ser um factor a considerar na avaliação inicial da doença e na monitorização da resposta ao tratamento com corticosteróides. O estudo das células adquiridas através da expectoração induzida possibilita ainda a detecção das subpopulações linfocitárias T na DPOC.
- A diminuição do IMC, associada ao aumento de mediadores inflamatórios, confirma a presença de um componente sistémico na DPOC.

Trabalho realizado no âmbito do «Segundo Curso de Mestrado em Patologia do Aparelho Respiratório» Faculdade de Ciências Médicas — Universidade Nova de Lisboa

Trabalho subsidiado pela Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde -Ministério da Saúde P. I. n.º 47/01

AGRADECIMENTOS

À técnica Iolanda Caires, à Engenheira Helena Carvalho, ao Dr. Pedro Cabral e à Professora Doutora Cristina Bárbara o nosso agradecimento sincero pela contribuição e empenhamento indispensáveis à execução do presente trabalho.

BIBLIOGRAFIA

1. Fonte: Instituto de Gestão Informática e Financeira da Saúde (IGIFS).
2. Global initiative for chronic obstructive lung disease. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of

- chronic obstructive pulmonary disease. NHLB/WHO workshop report. Bethesda, National Heart, Lung and Blood Institute 2001, NIH publication n.º 2 70 1: 1-100.
3. KERSTJENS HA, BRAND PL, HUGHES MD, ROBINSON NJ, POSTMA DS, SLUITER HJ, BLEECKER ER, DEKHUIJZEN PN, DE JONG PM, MENGELERS HJ. A comparison of broncodilator therapy with or without inhaled corticosteroid therapy for obstructive airways disease: Dutch Chronic Non-Specific Lung Disease Study Group. *N Engl J Med* 1992; 327: 1413-1419
 4. CHANEZ P, VIGNOLA AM, O'SHAUGNESSY T, ENANDER I, LI D, JEFFERY PK, BOUSQUET J. Corticosteroid reversibility in COPD is related to features of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 542-548
 5. FUJIMOTO K, KUBO K, YAMAMOTO H, YAMAGUCHI S, MATSUZAWA Y. Eosinophilic inflammation in the airway is related to glucocorticoid reversibility in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 1999; 115: 697-702
 6. PAPI A, ROMAGNOLI M, BARALDO S, BRACCIONI F, GUZZINATI I, SAETTA M, CIACCIA A, FABBRI LM. Partial reversibility of airflow limitation and increased exhaled nitric oxide and sputum eosinophilia in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1773-1777
 7. PIZZICHINI E, PIZZICHINI MM, GIBSON P, PARAMESWARAN K, GLEICH J, BERMAN L, DOLOVICH J, HARGREAVE FE. Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1511-1517
 8. LACOSTE JY, BOUSQUET J, CHANEZ P, VAN VYVE T, SIMONY-LAFONTAINE J, LEQUEU N, VIC P, ENANDER I, GODARD P, MICHEL FB. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 537-48
 9. American Thoracic Society. Standardization of spirometry, 1994 update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1107-1136.
 10. QUANJER PH, TAMMELING GJ, COTES JE, PEDERSEN OF, PESLIN R, YERNAULT JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993; 6, (suppl. 16): 5-40
 11. RENNARD SI, ANDERSON W, ZUWALLACK R, BROUGHTON J, BAILEY W, FRIEDMAN M, WISNIEWSKI M, RICKARD K. Use of a long-acting inhaled β_2 -adrenergic agonist, salmeterol xinafoate in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1087-1092
 12. ROCHE N, LEPAGE T, BOURCEREAU J, TERRIOUX P. Guidelines versus clinical practice in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001; 18: 903-908

13. ANTHONISEN NR, WRIGHT EC. Bronchodilator response in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 814-819
14. GOMPERTZ S, BAYLEY DL, HILL SL, STOCKLEY RA. Relationship between airway inflammation and the frequency of exacerbation in patients with smoking related COPD. *Thorax* 2001; 56: 36-41
15. BHOWMIK A, SEEMUNGAL TAR, SAPSFORD RJ, DEVALIA JL, WEDZICHA JA. Comparison of spontaneous and induced sputum for investigation of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1998; 53: 953-6
16. HUNNINGHAKE GW, CRYSTAL RG. Cigarette smoking and lung destruction: accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 833-838
17. STOCKLEY RA. New perspectives on the protease/anti-protease balance. *Eur Respir Rev* 1997; 7 (43): 128-130
18. LINDEN M, RASMUSSEN JB, PIITULAINEN E, TUNEK A, LARSON M, TEGNER H, VENGE P, LAITINEN A, BRATTSAND R. Airway inflammation in smokers with nonobstructive and obstructive chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1993; 148: 1226-1232
19. RONCHI MC, PIRAGINO C, ROSI E, AMENDOLA M, DURANTI R, SCANO G. Role of sputum differential cell count in detecting airway inflammation in patients with chronic bronchial asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1996; 51: 1000-1004
20. BAGGIOLINI M. Neutrophil activation and the role of interleukin-8 and related cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 99: 196-199
21. KEATINGS VM, COLLINS PD, SCOTT DM, BARNES PJ. Differences in interleukin factor-8 and tumour necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 530-534
22. BHOWMIK A, SEEMUNGAL TAR, SAPSFORD RJ, WEDZICHA JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 2000; 55: 114-120
23. BALZANO G, STEFANELLI F, IORIO C, FELICE A, MELILLO M, MARTUCCI M, MELILLO G. Eosinophilic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1486-1492
24. SAETTA M, DI STEFANO A, MAESTRELLI P, TURATO G, RUGGIERI MP, ROGGIERI A, CALCAGNI P, MAPP CE, CIACCIA A, FABBRI LM. Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 1646-1652
25. HARGREAVE FE, LEIGH R. Induced sputum, eosinophilic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: S53-S57
26. MARTTI L, QVARFORDT I, RIISE GC, BENGT AA, LARSSON S, LINDEN A. Increased levels of interleukin-16 in the airways of tobacco smokers: relationship with peripheral blood T lymphocytes. *Thorax* 1999; 54: 911-916
27. O'SHAUGHNESSY TC, ANSARI TW, BARNES NC, JEFFERY PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8 T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 852-857
28. SAETTA M, DI STEFANO A, TURATO F, FACCHINI FM, CORBINO L, MAPP E, MAESTRELLI P, CIACCIA A, FABBRI LM. CD8 T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 822-826
29. DE JONG JW, VAN DER BELT-GRITTER B, KOETER GH, POSTMA DS. Peripheral blood lymphocytes cell subsets in subjects with chronic obstructive pulmonary disease: association with smoking, IgE and lung function. *Respir Med* 1997; 91: 67-76
30. KEMENY DM, NOBLE A, HOLMES BJ, DIAZ-SANCHEZ D. Immune regulation: a new role for the CD8+ T cell. *Immunol Today* 1994; 15:107-110
31. CLINI E, BIANCHI L, PAGANI M, AMBROSINO N. Endogenous nitric oxide in patients with stable COPD: correlates with severity of disease. *Thorax* 1998; 53:881-883.
32. RUTGERS SR, VAN DER MARK TW, COERS W, MOSHAGE H, TIMENS W, KAUFFMAN HF, KOETER GH, POSTMA DS. Markers of nitric oxide metabolism in sputum and exhaled air are not increased in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999; 54: 576-580
33. MAZIAK W, LOUKIDES S, CULPITT S, SULLIVAN P, KHARITONOV A, BARNES PJ. Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:998-1002
34. AGUSTI AG, VILLAVERDE M, TOGORES B, BOSCH M. Serial measurements of exhaled nitric oxide during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999; 14: 523-528
35. KANAZAWA H, SHOJI S, YOSHIKAWA T, HIRATA K, YOSHIKAWA J. Increase production of endogenous nitric oxide in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:1244-1250
36. CORRADI M, MAJORI M, CACCIANI GC, CONSIGLI GF, DEMUNARI E, PESCI A. Increased exhaled nitric oxide in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999; 54:572-575
37. ANSARIN K, CHATKIN M, FERREIRA IM, GUTIERREZ CA, ZAMEL N, CHAPMAN KR. Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease: relationship to pulmonary function. *Eur Respir J* 2001; 17:934-938.
38. MONTUSCHI P, KHARITONOV SA, BARNES PJ. Exhaled carbon monoxide and nitric oxide in COPD. *Chest* 2001; 120:496-501.
39. AGUSTI AG. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Novartis Found Symp* 2001; 234:242-249.
40. DI FRANCIA M, BARBIER D, MEGE JL, OREHEK J. Tumour necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic

ASSOCIAÇÃO ENTRE A REVERSIBILIDADE BRÔNQUICA E A INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS EM DOENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA/ANTÓNIO BUGALHO, NUNO NEUPARTH

- obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:1453-1455.
41. EID AA, IONESCU AA, NIXON LS, LEWIS-JENKINS V, MATTHEWS SB, GRIFFITHS TL, SHALE DJ. Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1414-1418.
 42. S. KHARITONOV, K. ALVING, P.J. BARNES. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. *Eur Respir J* 1997, 10: 1683-1693.
 43. CAIRES I, NEUPARTH N, RENDAS AB. Controlo do débito expiratório na medição do óxido nítrico expirado. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 1999; V, 5: 515.
 44. PIN I, GIBSON PG, KOLENDOWICZ et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992, 47: 25-29
 45. PAVORD ID, PIZZICHINI MMM, PIZZICHINI E, HARGREAVE FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax* 1997; 52: 498-501
 46. SPANEVELLO A, CONFALONIERI M, SULOTTO F, ROMANO F, BALZANO G, MIGLIORI GIB, BIANCHI A, MICHETTI G. Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1172-1174
 47. GOMEZ FP, MARTINEZ PALLI G, BARBERA JA, ROCA J, RODRIGUEZ-ROISIN R. Measurement of exhaled nitric oxide in healthy subjects. *Med Clin* 1998; 13, 111: 1-5
 48. SALEH D, ERNST P, LIM S, BARNES PJ, GIAID A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J* 1998; 12: 929-937
 49. DEL POZO V, DE ARRUDA-CHAVES E, DE ANDRES B, CARDABA B, LOPEZ-FARRE A, GALLARDO S, CORTEGANO I, VIDARTE L, JURADO A, SASTRE J, PALOMINO P, LAHOZ C. Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 1997, 158: 859-864
 50. FERREIRA HH, MEDEIROS MV, LIMA CS, FLORES CA, SANNOMIYA P, AUTUNES E, DE NUCCI G. Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. *Eur J Pharmacol* 1996; 310: 201-207
 51. FEDER LS, STEITS D, CHAPMAN RW, MANFRA D, CRAWLEY Y, JONES H, MINNICOZZI M, FERNANDEZ X, PASTER T, EGAN RW, KREUTNER W, KUNG TT. Role of nitric oxide on eosinophilic lung inflammation in allergic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 436-442.
 52. RAMESH G, JINDAL SK, GANGULY NK, DHAWAN V. Increased nitric oxide production by neutrophils in bronchial asthma. *Eur Respir J* 2001; 17: 868-871
 53. ICHINOSE M, SUGIURA H, YAMAGATA S, KOARAI A, SHIRATO K. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 162: 701-706
 54. HOGMAN M, HOLMKVIST T, WEGENER T, EMTNER M, ANDERSSON M, HEDENSTROM H, MERILAINEN P. Extended NO analysis applied to patients with COPD, allergic asthma and allergic rhinitis. *Respir Med* 2002; 96: 24-30
 55. BRIGHTLING CE, MONTERIO W, GREEN RH, PARKER D, MORGAN MDL, WARDLW AJ, PAVORD ID. Induced sputum and other outcome measures in chronic obstructive pulmonary disease: safety and repeatability. *Respir Med* 2001; 95: 999-1002
 56. YAMAMOTO C, YONEDA T, YOSHIKAWA M, FU A, TOKUYAMA T, TSUKAGUCHI K, NARITA N. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest* 1997; 112: 505-510
 57. RUTGERS SR, POSTMA DS, TEN HACKEN NH, KAUFFMAN HF, VAN DER MARK TW, KOETER GH, TIMENS W. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke. *Thorax* 2000; 55: 12-18
 58. TAKAHASHI GW, ANDREWS DF, LILLY MB, SINGER JW, ALDERSON MR. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes. *Blood* 1993; 81: 357-364
 59. RIISE GC, LARSSON S, LOFDAHI CG, ANDERSSON BA. Circulating cell adhesion molecules in bronchial lavage and serum in COPD patients with chronic bronchitis. *Eur Respir J* 1994; 7: 1673-1677
 60. HULBERT WM, MCLEAN T, HOGG JC. The effect of acute airway inflammation on bronchial reactivity in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 7-11
 61. RUTGERS SR, TIMENS W, KAUFMANN HF, VAN DER MARK TW, KOETER GH, POSTMA DS. Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J* 2000; 15: 109-115
 62. KEATINGS V, BARNES PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 449-453
 63. SAETTA M, TURATO G, FACCHINI FM, CORBINO L, LUCCHINI RE, CASONI G, MAESTRELLI P, MAPP CE, CIACCIA A, FABBRI LM. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 156: 1633-1639
 64. STANESCU D, SANNA A, VERITER C, KOSTIANEV S, CALCAGNI PG, FABBRI LM, MAESTRELLI P. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV₁ in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax* 1996; 51: 267-271
 65. BURROWS B, BLOOM JW, TRAVER GA, CLINE MG. The course and prognosis of different forms of chronic airways obstruction in a sample from the general population. *N Engl J Med* 1987; 317: 1309-1314
 66. JORENBY DE, LEISCHOW SJ, NIDES MA, RENNARD SI, JOHNSTON JA, HUGHES AR, SMITH SS, MURAMOTO ML, DAUGHTON DM, DOAN K, FIORE MC, BAKER TB. A controlled trial of sustained-release

- bupropion, a nicotine patch, or both for smoking cessation. *N Engl J Med* 1999; 340: 685-691
67. RIISE GC, AHLSTEDT S, LARSSON S, ENANDER I, JONES I, LARSSON P, ANDERSSON B. Bronchial inflammation in chronic bronchitis assessed by measurement of cell products in bronchial lavage fluid. *Thorax* 1995; 50: 360-365
68. D'Ippolito Eosinophils in induced sputum from asymptomatic smokers with normal lung function. *Respir Med* 2001; 95: 969-974
69. SAETTA M, DI STEFANO A, MAESTRELLI P, TURATO G, MAPP CE, PIENO M, ZANGUOCH G, DEL PRETE G, FABBRI LM. Airway eosinophilia and expression of interleukin-5 protein in asthma and in exacerbations of chronic bronchitis. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 766-774
70. SHUTE J. Interleukin-8 is a potent eosinophil chemo-attractant. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 203-206
71. DI STEFANO A, MAESTRELLI P, ROGGERI A, TURATO G, CALABRO S, POTENA A, MAPP CE, CIACCIA A, COVACEV L, FABBRI LM. Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 803-810
72. MATSUMOTO K, AIZAWA H, INOUE H, KOTO H, TAKATA S, SHIGYO M, NAKANO H, HARA N. Eosinophilic airway inflammation induced by repeated exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J* 1998; 12: 387-394
73. LOUIS R, SHUTE J, BIAGI S, STANCIU L, MARRELI F, TENOR H, HIDI R, DJUKANOVIC M Cell infiltration ICAM-1 expression, and eosinophil chemotactic activity in asthmatic sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 466-472
74. PIZZICHINI E, PIZZICHINI MM, KIDNEY JC, EFTHIMIADIS A, HUSSACK P, POPOV T, COX G, DOLOVICH J, O'BYRNE P, HARGREAVE FE. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur Respir J* 1998; 11: 828-834
75. PELEMAN RA, RYTILA PH, KIPS JC, JOOS GF, PAUWELS RA. The cellular composition of induced sputum in COPD. *Eur Respir J* 1999; 13: 839-843
76. LOPPOW D, BOTTCHE M, GERCKEN G, MAGNUSSEN H, JORRES RA. Flow cytometric analysis of the effect of dithiothreitol on leukocyte surface markers. *Eur Respir J* 2000; 16: 324-329
77. MILLER LG, GOLDSTEIN G, MURPHY M, GINNS LC. Reversible alterations in immunoregulatory T cells in smoking. Analysis by monoclonal antibodies and flow cytometry. *Chest* 1982; 82: 526-529
78. AMADORI A, ZAMARCHI R, DE SILVESTRO G, FORZA G, CAVATTON G, DANIELI GA, CLEMENTI M, CHIECO-BIANCHI L. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med* 1995, 1: 1279-1283
79. WILSON D, ROGERS OR, WRIGHT E, ANTHONISEN NR. Body weight in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1989; 131 1435-1438
80. SCHOLS AMWJ, SLAGEN J, VOLOVICS L, WOUTERS EFM. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1791-1797
81. ANTHONISEN NR, WRIGHT EC, HODGKIN JE AND THE IPPB TRIAL GROUP. Prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 14-20
82. SCHOLS AMWJ, SOETERS PB, DINGEMANS ANC, MOSTART R, FRANTZEN PJ, WOUTERS EFM. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with chronic obstructive pulmonary disease eligible for pulmonary rehabilitation. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1151-1156
83. AUSTGEN TR, CHAKRABARTI R, CHEN MK. Adaptive regulation in skeletal muscle glutamine metabolism in endotoxin-treated rats. *Trauma* 1992; 32: 600-607
84. SCHOLS AMWJ, BUURMAN WA, STAAL-VAN DEN BREKET N, DENTENER MA, WOUTERS EFM. Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1996; 51: 819-824
85. KWON OJ, AU BT, COLLINS PD, ADCOCK IM, MAK JC, ROBBINS RR, CHUNG KF, BARNES PJ. Tumor necrosis factor-induced IL-8 expression in cultured human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 1994; 267: L398-L405
86. COSTA JJ, MATOSSIAN K, RESNICK MB, BEIL WJ, WONG DT, GORDON JR, DVORAK AM, WELLER PF, GALLI SJ. Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor-alpha and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *J Clin Invest* 1993; 91: 2673-2684
87. CASSATELLA MA, MEDA L, BONORA S, CESKA M, CONSTANTIN G. IL-10 inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 β in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993; 178: 2207-2211
88. LANGEN RC, SCHOLS AM, KELDERS MC, WOUTERS EF, JANSSEN-HEININGER YM. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *FASEB J* 2001; 15: 1169-1180.