

**PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO SISTÊMICA
EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA PULMONAR
OBSTRUTIVA CRÔNICA: PAPEL DO FUMO E USO DE
CORTICÓIDES**

PRODUCTION OF REACTIVE SYSTEMIC OXYGEN SPECIES AT DIFFERENT
STAGES OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE: ROLE OF
SMOKING AND USE OF CORTICOSTEROIDS

Eduarda de Souza Belisário*

Fisioterapia, Universidade Vila Velha, Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Translacional, Vila Velha-ES, eduardabelisario@gmail.com

Amanda Christina G.C. Gouveia*

Educação Física, Universidade Vila Velha, Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Translacional, Vila Velha-ES, amanda.cgcarmo@yahoo.com.br

Carla Cristina de Castro Bulian

Médica pneumologista, Universidade Vila Velha, Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Translacional, Vila Velha-ES, carlabulian@uol.com.br

Rafaela Aires

Fisioterapia, Universidade Vila Velha, Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Translacional, Vila Velha-ES, rafares2@gmail.com

Thiago Pereira Mello

Farmácia, Universidade Vila Velha, Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Translacional, Vila Velha-ES, pereiratmc@gamil.com

Elisardo Corral Vasquez

Biomedicina, Universidade Vila Velha, Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Translacional, Vila Velha-ES, elisardo.vasquez@uvv.br

Carmem Luíza Sartório

Odontologia, Universidade Vila Velha, Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Translacional, Vila Velha-ES, carmemsartorio@gmail.com

Bianca Prandi Campagnaro

Ciências Biológicas, Universidade Vila Velha, Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Translacional, Vila Velha-ES, bianca.campagnaro@uvv.br

*As autoras contribuíram igualmente para a produção deste artigo

RESUMO

Na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), a inalação de partículas ou gases tóxicos, principalmente o tabaco, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) causando uma resposta inflamatória exacerbada. Avaliar a produção de ROS em pacientes portadores de diferentes níveis de gravidade de DPOC e sua relação com tratamentos farmacológicos e fumo. Pacientes ex-tabagistas, com idade variando de 45 a 80 anos (N= 52) foram divididos após avaliação espirométrica e anamnese em 4 grupos: (1) pacientes sem uso de medicações inalatórias (Controle, N=11), (2) pacientes em uso de Formoterol (DPOC II, N=11), (3) pacientes em uso de Formoterol e Brometo de Tiotrópio (DPOC III, N=16) e (4) pacientes em uso de Salmeterol + Brometo de Tiotrópio e Fluticasona (DPOC IV, N=14). Foram coletados 5 ml de sangue periférico para análise do estresse oxidativo por citometria de fluxo. Pacientes dos grupos DPOCII, DPOCIII e DPOCIV, apresentaram maior produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio quando comparados ao grupo Controle ($p<0,05$). Entre DPOC, o grupo III apresentou a maior produção de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio quando comparados aos grupos DPOC II e IV ($p<0,05$). A produção de radical hidroxila e ânion peroxinitrito no grupo DPOC IV (1384 ± 57 , a.u) foi menor quando comparado com o grupo DPOC III (2289 ± 43 , a.u) e maior que a do grupo Controle (771 ± 20 , a.u). O grupo DPOC IV apresentou valores de DAF (indicativo de produção de NO) significativamente menores que os demais grupos (Controle: 3740 ± 221 ; DPOC II: 2948 ± 150 ; DPOC III: 2734 ± 90 vs. DPOC IV: 1889 ± 70 a.u; $p<0,05$). Ao observar-se a relação da função pulmonar (VEF1) com as ROS, observou-se significativa correlação negativa entre estes parâmetros, sendo que entre o NO e a função pulmonar observou-se uma correlação positiva. Os resultados do presente estudo demonstraram que portadores de DPOC apresentam um aumento de ROS, o que se apresenta relacionado ao prejuízo da função pulmonar. Pacientes do grupo DPOC IV apresentaram uma diminuição da produção de ROS quando comparados ao grupo DPOC III e DPOCII, o que poderia ser devido ao uso de corticoide inalatório, à menor carga tabágica e ao maior tempo de cessação do fumo, que foram observados no grupo DPOC IV.

Palavras-chave: Doença pulmonar obstrutiva crônica; Espécies reativas de oxigênio; Corticóide inalatório; Citometria de fluxo.

Abstract

In chronic obstructive pulmonary disease (COPD), the inhalation of toxic particles or gases, mainly tobacco, increases the production of reactive oxygen species (ROS) causing an exacerbated inflammatory response. To evaluate the production of ROS in patients with different levels of COPD severity and its relationship with pharmacological treatments and smoking. Ex-smokers, aged between 45 and 80 years (N= 52) were divided after spirometric evaluation and anamnesis into 4 groups: (1) patients not using inhaled medication (Control, N=11), (2) patients using Formoterol (COPD II, N=11), (3) patients using Formoterol and Tiotropium Bromide (COPD III, N=16) and (4) patients using Salmeterol + Tiotropium Bromide and Fluticasone (COPD IV, N=14). 5 ml of peripheral blood was collected for analysis of oxidative stress by flow cytometry. Results: Patients in the COPDII, COPDIII and COPDIV groups showed greater production of superoxide anion and hydrogen peroxide when compared to the control group ($p<0.05$). Among COPD, group III showed the highest production of superoxide anions and hydrogen peroxide when compared to groups COPD II and IV ($p<0.05$). The production of hydroxyl radical and peroxy nitrite anion in the COPD IV group (1384 ± 57 , a.u) was lower when compared to the COPD III group (2289 ± 43 , a.u) and higher than that of the Control group (771 ± 20 , a.u). The COPD IV group had DAF values (indicative of NO production) significantly lower than the other groups (Control: 3740 ± 221 ; COPD II: 2948 ± 150 ; COPD III: 2734 ± 90 vs. COPD IV: 1889 ± 70 a.u; $p<0.05$). When observing the relationship between pulmonary function (FEV1) and ROS, a significant negative correlation was demonstrated while between NO and pulmonary function a positive correlation was observed. The results of the present study demonstrated that patients with COPD have an increase in ROS, which appears to be related to impairment of lung function. Patients in the COPD IV group showed a decrease in ROS production when compared to the COPD III and COPD II groups, which could be due to the use of inhaled corticosteroids, lower smoking history and longer time to quit smoking, which were observed in the group COPD IV.

Keywords: Chronic obstructive pulmonary disease; Oxygen-reactive species; inhaled corticosteroid; Flow cytometry.

INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é definida pela inflamação crônica com limitação ao fluxo aéreo, não totalmente reversível, que agrupa tanto enfisema como bronquite crônica (KOSACZ N.M., et al. 2012; Liu, et al. 2022), associada a uma resposta

inflamatória anormal devido à inalação de partículas ou gases nocivos/tóxicos (GORECKI D., 2013; ZHANG, et al. 2014; BATH et al., 2015; BONATO et al., 2021; GOLD, 2020).

O principal fator de risco para o aparecimento da DPOC é o fumo do cigarro (BARNES, 2014; BARNES, 2010; HAO, et al. 2021), que leva a uma resposta inflamatória local no trato respiratório com alterações patológicas nas vias aéreas proximais, distais, parênquima e vasculatura pulmonar (OCHSNER; RABE, 2011), além de promover o estresse oxidativo pela formação excessiva de ROS (YOSHIDA; TUDER, 2007).

A fisiopatologia da DPOC está relacionada a uma inflamação sistêmica nas pequenas vias aéreas (bronquiolite respiratória), destruição parenquimatosa (enfisema) e obstrução crônica ao fluxo aéreo, contribuindo no agravamento de várias comorbidades (VIJAYAN, 2013). Além disso, leva ao prejuízo da capacidade funcional e qualidade de vida do indivíduo (SETHI, et al.; 2022). Este conjunto de alterações aumenta à medida que a doença progride e confere ao estado geral do indivíduo um componente de agravamento do quadro irreversível (BARNES, 2014; SETHI, et al 2022).

Os efeitos da inflamação crônica, a qual provoca uma obstrução do fluxo aéreo, levam aos sintomas que estabelecem o quadro clínico da DPOC (SAKATA, et al. 2012). Os principais mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC são o estresse oxidativo e a inflamação. A inflamação causada pela inalação da fumaça do cigarro, ou por inalação de partículas tóxicas, se deve principalmente a respostas da imunidade inata e da adquirida (SETHI S., et al.; 2022). É importante destacar que as células inflamatórias e epiteliais encontradas na superfície das vias aéreas liberam diversos fatores quimiotáticos responsáveis pelo estresse oxidativo exacerbado na DPOC. Portanto, o comprometimento das respostas imunes às infecções respiratórias (BONATO et al; 2021, BATH et al; 2015), podem tornar esses pacientes mais suscetíveis AO desenvolvimento e gravidade de outras doenças respiratórias como por exemplo, a COVID-19 (WIECZFINSKA, 2022; AHMAD MALIK et al., 2022).

O diagnóstico definitivo de DPOC é feito através da espirometria, um teste de função pulmonar que avalia a capacidade/funcionalidade das vias aéreas (SHAHAB, et al. 2006). O tratamento se baseia em uma diretriz internacional, o *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) e, de acordo com esta diretriz, são utilizados medicamentos inalatórios com broncodilatadores agonistas de receptores β_2 e os antagonistas dos receptores muscarínicos (M3) da acetilcolina (ACh) (GOLD 2020, BARNES, 2014), cuja função é promover a melhoria dos sintomas, mas que não impedem o declínio da função pulmonar em longo prazo e não evitam o estresse oxidativo (BARNES, 2014).

LAMA é a sigla utilizada para designar medicamentos inibidores da acetilcolina, e LABA para os agonistas beta adrenérgicos de longa ação. Por outro lado, a inflamação gerada pela DPOC em casos mais graves tem sido tratada pela associação de broncodilatadores e corticoides inalatórios (HATTOTUWA, et al. 2002). Porém, não se sabe o quanto o esse tratamento associado pode afetar sistemicamente parâmetros de estresse oxidativo.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o estresse oxidativo em pacientes portadores de DPOC do CRE do estado do ES, e sua relação com a severidade da doença, com o uso de diferentes medicações e ao hábito de fumar.

MATERIAIS E METÓDOS

População estudada

Amostra composta por 52 voluntários ex-tabagistas, com idade entre 45 a 80 anos, de ambos os sexos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Vila Velha número 733.678 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, Vitória ES. Todos os voluntários concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido previamente ao início dos protocolos.

Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos neste estudo pacientes portadores de DPOC, diagnosticados pela espirometria com a relação $VEF1/CVF < 70\%$ e pertencentes ao Programa de DPOC do Centro Regional de Especialidades do Estado do Espírito Santo (CRE), em uso de medicações inalatórias e que cessaram o tabagismo num período maior que 1 ano. Foram excluídos portadores de hipertensão arterial sistêmica, doenças metabólicas crônicas como: asma, câncer, além de infecções respiratórias agudas (aquelas com duração menor que 15 dias), estados febris agudos e tabagismo ativo.

Grupos de estudo

O grupo Controle foi composto por 11 pacientes ex-fumantes (por período igual ou superior a um ano) sem nenhuma doença pulmonar prévia. Os portadores de DPOC, faziam

uso de medicações inalatórias específicas para cada estágio da doença (GOLD, 2019): 11 pacientes do estágio moderado ($50\% \leq \text{VEF1} < 80\%$ do previsto), em uso de LABA, o Formoterol, classificados como DPOC estágio II, referido no texto como grupo DPOC II; 16 pacientes do estágio grave ($30\% \leq \text{VEF1} < 50\%$ do previsto), em uso de LABA, o Formoterol e LAMA, o Brometo de Tiotrópio classificados como DPOC estágio III, referido no texto como grupo DPOC III; e 14 pacientes do estágio muito grave ($\text{VEF1} < 30\%$ do previsto ou $\text{VEF1} < 50\%$ do previsto com insuficiência respiratória crônica), em uso de LABA, o Salmeterol associado a corticóide inalatório Fluticasona e LAMA, o Brometo de Tiotrópio, classificados como DPOC estágio IV, referido no texto como grupo DPOC IV. Todos os indivíduos envolvidos no estudo eram ex-tabagistas, ou seja, pararam de fumar num período maior que 1 ano.

Os pacientes selecionados foram contatados e foi solicitado seu comparecimento ao CRE Metropolitano para os seguintes procedimentos: responder a um questionário e coleta de sangue por profissionais habilitados (5 ml de sangue periférico). Esta amostra foi centrifugada, alíquota e processada para posterior determinação dos níveis citoplasmáticos de ROS por citometria de fluxo. Os voluntários foram também submetidos à espirometria para a confirmação do estágio da DPOC.

A prova de função pulmonar de cada paciente selecionado, e em uso de medicações inalatórias, foi realizada utilizando o espirômetro (MicroQuark – Cosmed versão 8.0B, 2003). O diagnóstico de DPOC foi feito pela avaliação das medidas na espirometria de VEF1 (volume expiratório forçado no primeiro segundo) e CVF (capacidade vital forçada), e a relação de $\text{VEF1}/\text{CVF} < 70\%$ do previsto foi considerada como critério para a seleção dos pacientes (Barnes P.J., 2014). Em seguida, os pacientes foram agrupados de acordo com os resultados obtidos na espirometria, analisando os valores de VEF1 após uso do broncodilatador, classificando-os em estágio II, moderado ($50\% \leq \text{VEF1} < 80\%$ do previsto), estágio III, grave ($30 \leq \text{VEF1} < 50\%$ do previsto), e estágio IV, muito grave ($\text{VEF1} < 30\%$ do previsto ou $\text{VEF1} < 50\%$ do previsto com insuficiência respiratória crônica).

Quantificação de ROS

Os níveis de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pelo etídeo, que é produto da oxidação do dihidroetídeo ou hidroetidina (DHE). As células sanguíneas foram ressuspensas em 1ml de PBS na concentração de 1×10^6 células/ml e incubadas, no escuro, com $160 \mu\text{M}$ de DHE em etanol absoluto, por 30 minutos à 37°C e, em seguida, mantidas resfriadas (4°C) e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro de fluxo (Campagnaro BP, et al 2013). Os sinais

foram obtidos utilizando o filtro de 585nm para etídeo. Como controle positivo, as células sanguíneas foram previamente incubadas com 50 μ M H₂O₂ por 5 minutos. Para o controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em etanol.

Os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF) que é produto da oxidação do diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA). As células sanguíneas foram ressuspendidas em 1ml de PBS na concentração de 1x10⁶ células/ml e incubadas, no escuro, com solução de 20mM H₂DCFDA (Tonini CL, et al 2013) em etanol absoluto, por 30 minutos à 37°C e, em seguida, mantidas resfriadas (4°C) e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro. Os sinais foram obtidos utilizando o filtro de 530nm para DCF. Como controle positivo, as células sanguíneas foram previamente incubadas com 50 μ M H₂O₂ por 5 minutos. Para o controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em etanol.

Os níveis de peroxinitrito e •OH foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pela hidroxifenilfluoresceína (HPF). As células sanguíneas foram ressuspendidas em 1ml de PBS na concentração de 1x10⁶ células/ml e incubadas, no escuro, com solução de 5 μ M HPF em etanol absoluto, por 15 minutos à 37°C e, em seguida, mantidas resfriadas (4°C) e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro. Os sinais foram obtidos utilizando o filtro de 530nm para HPF.

Os níveis de óxido nítrico (NO) foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pelo triazolofluoresceína (DAF-2T) que é produto da oxidação do diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA). As células sanguíneas foram ressuspendidas em 1ml de PBS na concentração de 1x10⁶ células/ml e incubadas, no escuro, com solução de 2 μ M DAF-2DA (56,57) em etanol absoluto, por 180 minutos à 37°C e, em seguida, mantidas resfriadas (4°C) e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro. Como controle positivo, as células foram previamente incubadas com 100mM de nitroprussiato de sódio por 10 minutos. Para o controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em etanol. Todas as análises foram realizadas com auxílio do *software* FACSDiva, pela determinação da intensidade média de fluorescência de 10.000 células.

Análise Estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Os diferentes grupos foram analisados estatisticamente usando-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo *post*

hoc de Tuckey. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na tabela 1 são apresentados dados demográficos e relacionados ao tabagismo na população avaliada no estudo. Foi observado que entre as pessoas envolvidas no estudo, os pacientes do grupo Controle e DPOC II eram principalmente mulheres. Os grupos DPOC III e DPOC IV eram compostos principalmente por indivíduos do sexo masculino. Indivíduos dos grupos DPOC apresentaram médias etárias superiores às do grupo controle (Controle 49 ± 3 anos vs. DPOC II 54 ± 2 anos, DPOC III 67 ± 3 anos e DPOC IV 67 ± 3 anos; $p < 0,05$).

A avaliação da carga tabágica, determinada em anos-maço demonstrou (tabela 1) que os pacientes dos grupos DPOC III e DPOC IV apresentaram maior carga tabágica quando comparados aos indivíduos dos grupos Controle (72 ± 17 e 57 ± 9 anos-maço respectivamente vs. Controle 31 ± 12 ; $p < 0,05$). Por outro lado, o grupo DPOCIII mostrou carga tabágica significativamente maior que o DPOC II e DPOCIV (DPOCIII 72 ± 17 vs. DPOCII 35 ± 8 e DPOCIV 57 ± 9 ; $p < 0,05$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos Controle e DPOC II.

Ao analisar o tempo de cessação do fumo entre os voluntários do estudo, nota-se que os pacientes do grupo DPOC II e III apresentaram menor média de tempo de cessação de fumo ($4,3 \pm 1,9$ anos e $5,8 \pm 3$ respectivamente) quando comparados com os indivíduos do grupo Controle (10 ± 3 anos) e DPOC IV (13 ± 3 anos). Não foi observada diferença significativa entre os grupos Controle e DPOC IV.

Tabela 1: Características gerais da população total de pacientes estudados

Variáveis	Grupos			
	Controle	DPOC II	DPOC III	DPOC IV
Idade, anos	49 ± 3	$54 \pm 2^*$	$67 \pm 3^{*#}$	$67 \pm 3^{*#}$
Gênero, n (%)				
Masculino	0 (0%)	4	9	13
Feminino	11 (100%)	7	7	1
Carga tabágica, anos-maço	31 ± 12	35 ± 8	$72 \pm 17^{*#}$	$57 \pm 9^{*#}$
Tempo da cessação do fumo (anos)	$10,5 \pm 8,9$	$4,3 \pm 1,9^*$	$5,85 \pm 3^*$	$12,9 \pm 10,2^{*#}$

VEF1, % previsto	85±0,9	60,93±2,3*	38,8±1,38*#	25,7±0,72**&
VEF1/CVF	85±127	61,47±1,67*	50,23±1,2**	42,35±1,98**&

Valores expressos como média±EPM; P<0,05 vs. *Controle; vs. #DPOC II; vs. &DPOC III.

Considerando-se os dados obtidos por espirometria, os indivíduos grupo Controle apresentaram maior valor de VEF1 (85±0,9%) quando comparados aos pacientes diagnosticados com DPOC em geral (Todos os grupos DPOC vs. Controle, p<0,05; Tabela 1 e Figura 1A). Entre os grupos DPOC, observamos uma diminuição progressiva do valor % previsto de VEF1 à medida em que a doença se agrava, onde pacientes do grupo DPOC II (60,93±2,3%) apresentaram maior valor quando comparados aos pacientes dos grupos DPOC III e DPOC IV (38,8±1,38% e 25,7±1,98% respectivamente, p<0,05). O grupo DPOC IV também apresentou VEF1 significativamente menor que o DPOC III (p<0,05). Da mesma forma, quando observada a análise da relação VEF1/CVF, as diferenças e significâncias estatísticas se mantiveram idênticas àquelas observadas no parâmetro VEF1 (p<0,05; Tabela 1 e Figura 1B).

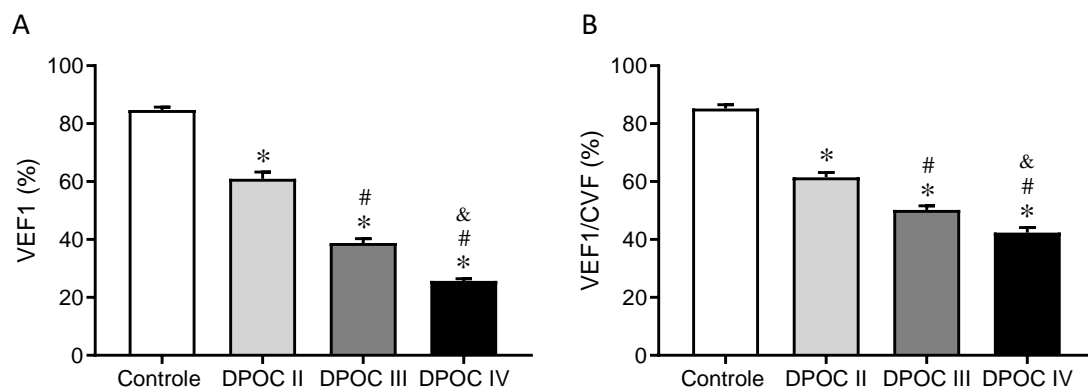


Figura 1. Gráfico de barras do percentual de VEF1 previsto e VEF1/CVF em pacientes do grupo Controle, DPOC II, DPOC III, DPOC IV. P<0,05 vs. *Controle, # DPOC II ou & DPOC III.

Quanto à produção de ROS, houve aumento progressivo coincidente com a gravidade da DPOC (Figura 2). No entanto, surpreendentemente o grupo DPOC IV mostrou uma menor produção de quando comparado com o DPOCIII nos níveis de ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, peróxido nitrito e radical hidroxila (Figura 2 A, B e C respectivamente).

Os pacientes dos grupos DPOCII, DPOCIII e DPOCIV, apresentaram maior produção

de ânions superóxido quando comparados ao grupo Controle (Controle: $3218 \pm 1,88$; DPOC II: 5156 ± 242 ; DPOC III: 6470 ± 241 ; DPOC IV: 5223 ± 151 , a.u, $p < 0,05$; Figura 2A). É importante ressaltar que os pacientes do estágio mais grave, grupo DPOCIV, mostraram valores mais elevados que o grupo DPOCII, porém, apresentaram menor produção de ânions superóxido quando comparado aos pacientes do grupo DPOCIII ($p < 0,05$).

Da mesma forma, os indivíduos do grupo Controle apresentaram menor produção de peróxido de hidrogênio quando comparados com os pacientes dos grupos DPOC II, DPOC III, DPOC IV (Controle: 3034 ± 98 ; DPOC II: 4607 ± 271 ; DPOC III: 6524 ± 691 ; DPOC IV: 4825 ± 233 , a.u, $p < 0,05$), sendo o grupo DPOC IV apresentou menor produção de peróxido de hidrogênio comparado ao grupo DPOC III, porém mantendo-se mais alto que o grupo DPOCII ($p < 0,05$; Figura 2B).

A produção de radicais hidroxila e peroxinitrito mostrou maior produção de radical hidroxila e peroxinitrito nos pacientes dos grupos DPOC II (1315 ± 43 , a.u), DPOC III (2289 ± 43 , a.u) e DPOC IV (1384 ± 57 , a.u) quando comparados aos indivíduos do grupo Controle (771 ± 20 , a.u; $p < 0,05$). Como diferencial, o grupo DPOC IV apresentou menor produção de radical hidroxila e peroxinitrito em comparação com o grupo DPOC III, porém, seus níveis foram estatisticamente similares aos grupo DPOC II (Figura 2 C).

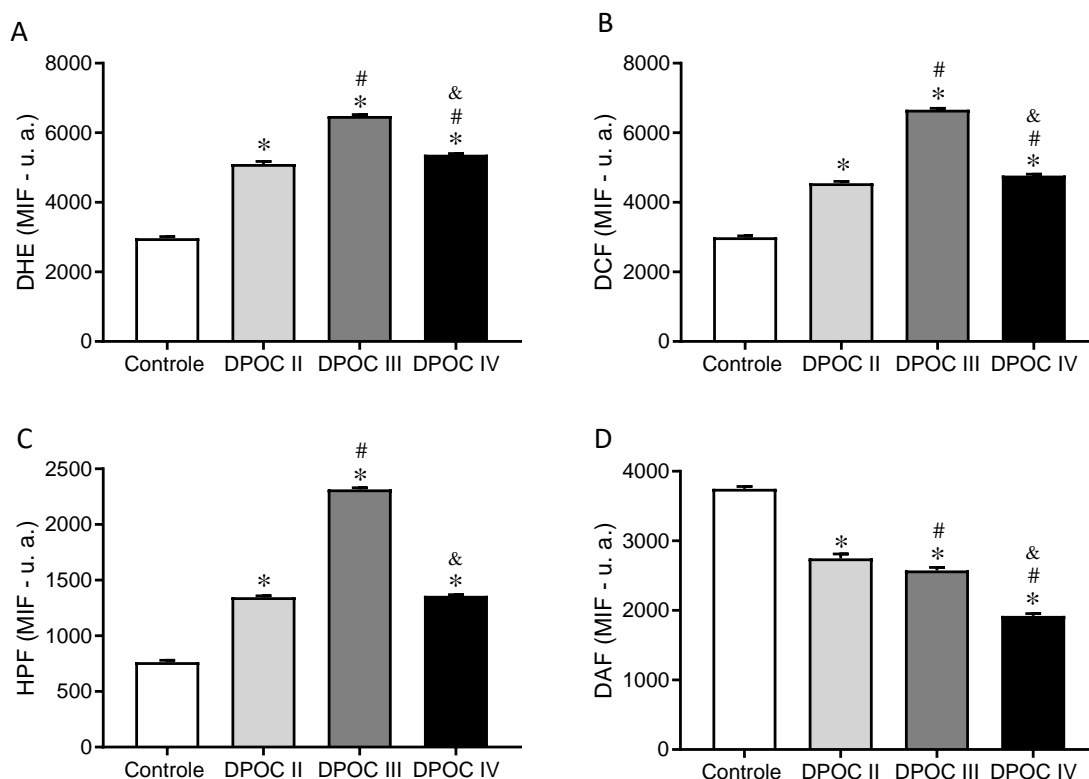


Figura 2. Gráfico dos níveis de ROS: ânions superóxido – DHE (A), peróxido de hidrogênio – DCF (B), peroxinitrito e radical hidroxila – HPF (C) e óxido nítrico – DAF (D) em pacientes do grupo Controle, DPOC II, DPOC III, DPOC IV. $P < 0,05^*$ vs. grupo Controle. # vs. grupo DPOC II. & vs. grupo DPOC III.

Maior produção de óxido nítrico foi apresentada nas amostras dos indivíduos do grupo Controle (3740 ± 221 , a.u) comparados aos pacientes dos grupos DPOC II (2948 ± 150 , a.u), DPOC III (2734 ± 90 , a.u), DPOC IV (1889 ± 70 , a.u; $p < 0,05$ - Figura 2 D). No entanto, o grupo DPOC IV teve uma produção de NO estatisticamente menor quando comparados com os grupos DPOC II e DPOC III.

Para verificar a relação entre a função pulmonar e a produção de ROS, foi demonstrada uma forte correlação negativa entre a produção de ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito/ radical hidroxila e a função pulmonar quantificada por VEF1 (Figura 3 A, B e C respectivamente). Por outro lado, a produção de NO (DAF) correlacionou-se positivamente com o VEF1, provavelmente devido ao papel protetor do NO na função pulmonar (Figura 3 D). Por outro lado, a correlação entre a produção de NO (DAF) e ânions superóxido (DHE) foi significativamente negativa, o que pode ser relacionado ao potencial de *scavenger* do ânion superóxido na inativação do NO, formando outras espécies como o peroxinitrito (Figura 3 E). Isto poderia ser associado ao resultado apresentado no gráfico 3 F, onde há uma correlação positiva entre HPF (peroxinitrito e radicais hidroxila) e DHE.

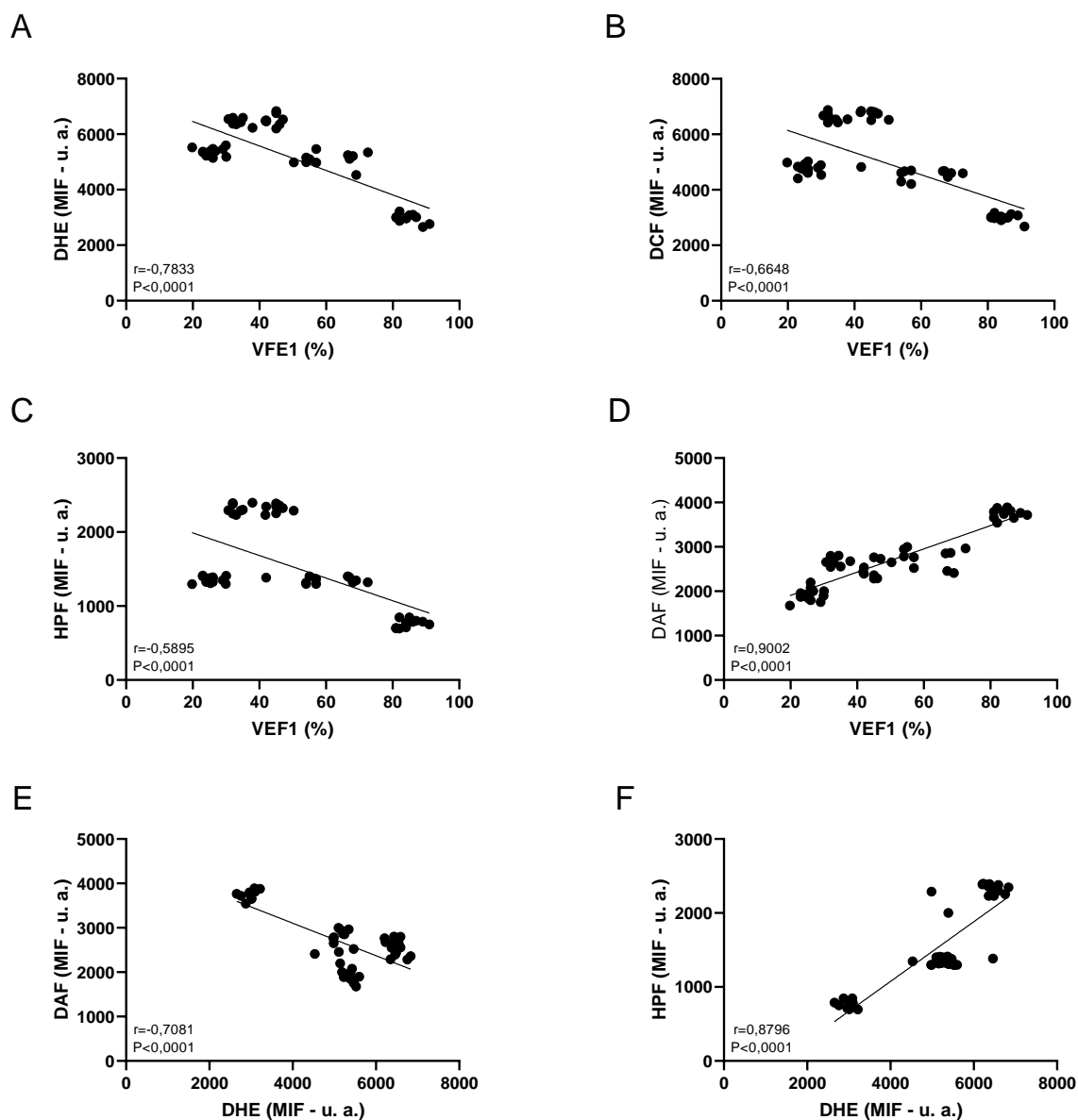


Figura 3. Gráficos da correlação: VEF1/ROS (A, B, C e D), DAF/DHE (E), HPF/DHE (F) em pacientes do grupo Controle, DPOC II, DPOC III, DPOC IV.

DISCUSSÃO

Os achados deste estudo permitem relacionar DPOC e produção de ROS, sendo que os indivíduos portadores da doença aumentam a produção de ROS sistêmica à medida que se aumenta a gravidade da DPOC. No entanto, surpreendentemente o grupo de maior gravidade e piores índices de função pulmonar, o DPOC IV, exibiu menor produção de ROS. Provavelmente, esta diferença pode estar relacionada ao maior período de abandono do hábito de fumar, menor carga tabágica prévia e ao uso de corticoides inalatórios, observados neste grupo.

A cessação do tabagismo é uma intervenção capaz de reduzir a progressão da DPOC, melhorar a sobrevida e reduzir a incidência de internações hospitalares (SCANLON, 2000). Logo, aqueles que cessam o tabagismo tem menos sintomas respiratórios e hiperresponsividade nas vias aéreas que aqueles que continuam fumando (Dye & Adler 1994). Turato e colaboradores (1995) avaliaram o processo inflamatório pulmonar em grupos tabagistas e ex-tabagistas e evidenciaram a presença destas células nos 2 grupos, comprovando a persistência da inflamação pulmonar após a cessação do tabagismo. Por outro lado, estudos não identificaram diferença no padrão inflamatório entre pacientes portadores de DPOC de tabagistas e ex-tabagistas (LAPERRE et al. 2006; GAMBLE et al. 2007). Neste estudo, a menor produção de produção de ROS nos indivíduos DPOC IV coincidiu com um maior tempo de abandono do hábito de fumar, o que pode contribuir para explicar o decréscimo do estresse oxidativo deste grupo quando comparado ao grupo DPOC III.

Nossos dados mostraram que a maior carga tabágica foi relacionada com a gravidade da DPOC apenas a partir do grupo DPOCIII e IV, já que os grupos Controle e DPOC II não apresentaram diferenças significativas entre si com relação a este parâmetro. Merece destaque que apesar do grupo DPOC IV apresentar os valores de VEF1 mais baixos quando comparados aos demais grupos, este apresentou menor carga tabágica quando comparado ao grupo DPOC III, o que poderia contribuir para explicar a atenuação na produção de ROS observada neste grupo quando comparado ao DPOC III, mesmo sem alteração da função pulmonar.

O estresse oxidativo é um importante mecanismo de envolvido na patogênese da DPOC através da indução de inflamação crônica, indução de senescência celular, autofagia prejudicada, reparo reduzido do DNA, aumento da autoimunidade, aumento da secreção de muco e resposta anti-inflamatória prejudicada aos corticosteroides (BARNES 2022). O estresse oxidativo, portanto, pode aumentar a progressão da DPOC, amplificar as exacerbações e aumentar as comorbidades por meio do estresse oxidativo sistêmico (BARNES 2022). Neste sentido, identificar o estresse oxidativo sistêmico pode ser útil para avaliar o estado geral do paciente com DPOC, bem como o estado e evolução da doença.

Há relatos nos quais as ROS liberadas na forma de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 encontram-se elevadas em portadores de DPOC (DEKHUIJZEN, et al. 1996). No presente estudo, foram avaliadas as produções citoplasmáticas de ROS plasmática em todos os grupos, tendo sido demonstrado que a produção de ROS estava aumentada nos grupos DPOC em relação ao grupo Controle. A inflamação está relacionada ao estresse oxidativo, de forma que o peróxido de hidrogênio exalado pode ser considerado um marcador indireto de estresse oxidativo na DPOC. Apesar disso, foi descrita ausência de diferenças na concentração de H_2O_2 exalado por pacientes controle e DPOC (BEURDEN et al., 2002). Por outro lado,

Dekhuijzen e colaboradores (1996) corroboram nossos achados, ao mostrarem que a quantidade de H_2O_2 exalado, é aumentada em portadores de DPOC exacerbado em comparação ao Controle e DPOC estável. Em nosso estudo, tendo em vista os dados obtidos pela função pulmonar pela VEF1, esperava-se que quanto pior fosse a função pulmonar, maior seria a produção de ROS nos diferentes estágios da DPOC. Entretanto, foi identificada a maior produção das ROS no grupo DPOC III quando comparado com os demais grupos DPOC, inclusive quando comparado ao grupo considerado mais grave clinicamente: o DPOC IV. Sendo assim, a produção de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , radicais hidroxila e peroxinitrito foi maior no grupo DPOC III que no grupo DPOC IV. Como possível justificativa, ao observar-se todos os grupos DPOC, o grupo DPOCII por sua menor gravidade poderia explicar sua menor produção de ROS comparado ao DPOC III. No entanto, para buscar uma possível explicação para a reduzida produção de ROS no grupo DPOC IV comparado ao DPOC III, pode ser aparentemente paradoxal, já que o grupo DPOC IV é o que tem a maior gravidade e pior função pulmonar. Desta forma, foi feita a avaliação de diversos parâmetros dos e constatou-se algumas diferenças que poderiam contribuir para explicar este aparente paradoxo como o uso associado de CI, a menor carga tabágica, o maior tempo de cessação do fumo no grupo DPOC IV comparado ao DPOC III, mesmo que os indivíduos sejam ex-fumantes. Por outro lado, para explicar a pior avaliação funcional do grupo DPOC IV, a produção ou bioviabilidade reduzida de NO, que teria efeito protetor e atuaria na melhor função pulmonar e balanço da homeostase endotelial e vascular, poderia ser outra explicação aventada.

A DPOC está relacionada à disfunção endotelial e à geração prejudicada de óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina pela NO sintase endotelial (eNOS) (DINH-XUAN et al., 2013). Foi descrito que um competidor do transporte de L-arginina está aumentado no soro de pacientes com DPOC estável e exacerbada, o que pode contribuir para o comprometimento da geração de NO vascular e disfunção endotelial, correlacionando-se com o estresse nitrosativo das vias aéreas e a inflamação neutrofílica e sugerindo uma associação entre disfunção endotelial e inflamação das vias aéreas na DPOC (CSOMA et al., 2019, TANIGUCHI, et al. 2021). Corroborando estes achados, no presente estudo, a produção de NO mostrou-se reduzida em todos os grupos DPOC quando comparados ao grupo controle, tendo redução progressivamente maior à medida que se observa a maior gravidade da DPOC. Ademais, ao correlacionar-se a função pulmonar (VEF1) e a liberação de NO, pode-se identificar na presente investigação uma clara e significativa correlação positiva, o que corrobora a importância do NO na função pulmonar, bem como do efeito prejudicial da redução de sua biodisponibilidade na evolução da DPOC e consequente deterioração da função pulmonar.

Neste contexto, vale lembrar que a reação do NO com $O_2^{\bullet-}$ ou por mecanismos de

oxidação de nitrito peroxidase poderia reduzir a biodisponibilidade do NO e explicar a diferença nas concentrações entre o grupo controle e os grupos DPOC (CAVALCANTI et al., 2009; ICHINOSE, et al. 2000). Ademais, o peroxinitrito *per se*, formado pela reação entre NO e $O_2^{\bullet-}$, pode exercer um relevante papel nas alterações locais e sistêmicas da DPOC (KANAZAWA et al., 2003). No presente estudo, os níveis de peroxinitrito e hidroxila mostraram-se aumentados na DPOC em comparação com os indivíduos controle. Um outro dado relevante, além da produção de ROS estar alterada na DPOC, foi que ao realizarmos a relação entre a produção de ânions superóxido (DHE) e de óxido nítrico (DAF), pode-se identificar uma correlação negativa, corroborando a potencial interação entre estes radicais como indicativo do *scavenger* de NO pelos ânions superóxido com consequente redução de sua biodisponibilidade e formação de outras espécies reativas como o peroxinitrito. Neste sentido, executando-se as correlações entre a produção de ânions superóxido e HPF (indicando produção de peroxinitrito e hidroxila), pode-se observar uma correlação positiva. Isso poderia estar relacionado ao aumento da formação de peroxinitrito à medida que os ânions superóxidos interagem com o NO.

As exacerbações da DPOC causam grande alteração na clínica e geram enorme impacto sócio-econômico (KARNER, et al. 2013). Para mitigar seus sinais e sintomas, são propostas diferentes medicações inalatórias, em forma de monoterapia e combinações, que usadas nos diversos estados da DPOC melhoram a qualidade de vida (GOLD, 2019). No acompanhamento dos pacientes em uso de medicações inalatórias, se o controle da DPOC é insuficiente com a monoterapia, faz-se a combinação de LABA, LAMA e/ou CI (TASHKIN ; FERGUNSON, 2013). No entanto, os mecanismos pelos quais os CI atuam ainda não é consensual. Avaliando-se o perfil celular inflamatório de ex-tabagistas, portadores de DPOC e em uso de Fluticasona 500 µg, foi mostrado que não há efeito de CI sobre os principais tipos de células inflamatórias pulmonares (HATTOTUWA, et al. 2002).

Por outro lado, um estudo com o uso de CI, mesmo em doses elevadas, não foi capaz de demonstrar diminuição da taxa de declínio no VEF1, mas reduziram a taxa de severidade das exacerbações nesta doença (JONES, et al. 2003). Em um estudo realizado na Bélgica, pacientes portadores de DPOC em uso de monoterapia com LAMA, foi demonstrado melhora na qualidade de vida e um aumento de 93 ml no VEF1 no final do período após o uso de broncodilatador, além de mostrar uma estabilização da progressão da doença (TROOSTERS, et al. 2010). Do mesmo modo, Saha e colaboradores (2006) mostraram que o uso de corticoide oral (CO), em baixas dose em longo prazo, sugere reduções na frequência de exacerbações, na taxa de declínio de VEF1 e uma redução da inflamação sistêmica. Da mesma forma, pacientes com DPOC em uso de Fluticasona 500 µg, 2 vezes ao dia e CO 30 µg, mostraram a diminuição da PCR sérica tanto no grupo que usava corticóide oral, quanto no grupo em uso de corticóide inalatório, mas sem melhora do

VEF1 com CI (CULPITT, et al. 1999).

Estes achados corroboram os dados do presente estudo, nos quais o uso de Fluticasona pelo grupo DPOC IV não foi capaz de alterar a função respiratória, quantificada pela VEF1. Apesar disso, nossos achados demonstram que o grupo DPOC IV apresentou redução da produção sistêmica de ROS. Neste contexto recentemente foi demonstrado por Prabhudesai e colaboradores (2023) que a fluticasona possui ação sistêmica e alta permeabilidade tecidual, atuando na inflamação e controle da produção de ROS. Isso vem trazer uma importante novidade, já que em estudos prévios os CI pareciam ter ação local na DPOC. Por outro lado, um estudo com pacientes portadores de DPOC em uso de corticoides inalatórios (CI), comparados com indivíduos saudáveis, os níveis de H₂O₂ exalado foram semelhantes, levando a crer que o uso de CI pode suprimir processos inflamatórios que contribuem para diminuir e não cessar o estresse oxidativo local (INONU, et al. 2012).

No presente estudo o uso do CI Fluticasona se mostrou associado à redução de ROS sistêmica, sendo menores os níveis plasmáticos de ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e hidroxila nos pacientes do grupo DPOC IV, em uso de Fluticasona associado a LABA/LAMA, quando comparado ao grupo DPOC III, de menor gravidade clínica e melhor função pulmonar, porém em uso apenas de LABA/LAMA. Diante do exposto, acreditamos que a utilização de CI pode modular a inflamação sistêmica e concomitantemente reduzindo a produção de ROS. Yang et al., (2009) descrevem que corticoides inibem a liberação de citocinas e mediadores inflamatórios, incluindo mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigênio por macrófagos. Desta forma, nosso estudo pode ser um referencial para o monitoramento da DPOC, uso de corticoides e avaliação da produção citoplasmática de ROS em células sanguíneas. Estes relatos demonstram que o presente estudo aporta uma importante informação associada aos efeitos sistêmicos protetores do uso de CI na DPOC, apesar de que ainda não exista consenso sobre este tema, sendo necessários estudos adicionais de grande porte e randomizados para esclarecer as lacunas sobre esta ferramenta terapêutica, bem como avaliar a influência do tempo de abandono do hábito de fumar e da carga tabágica utilizada previamente pela população de ex-fumantes.

CONCLUSÃO

A análise do estresse oxidativo por citometria de fluxo em conjunto aos dados da função pulmonar e de hábitos dos pacientes, mostrou que os indivíduos dos grupos DPOC II, DPOC III, DPOC IV apresentam aumento na produção de ROS, quando comparados ao

grupo Controle. Na análise global dos resultados, destacam-se algumas diferenças que poderiam justificar e contribuir para a paradoxal produção reduzida de ROS no grupo DPOC IV comparado ao grupo DPOC III. Mesmo com maior gravidade e pior função pulmonar, o grupo DPOC IV apresentou maior tempo de cessação de tabagismo e menor carga tabágica quando comparadas ao DPOC III. Por outro lado, a adição do uso de corticoides apenas no grupo DPOC IV, poderia modular a inflamação de forma diferenciada neste grupo, mitigando a produção de ROS.

Os achados deste estudo sugerem uma relação entre a produção de ROS e o uso de corticóides, carga tabágica e tempo de cessação do fumo na DPOC. Além disso, mostrou-se que a citometria de fluxo pode ser utilizada para avaliação do estresse oxidativo sistêmico em pacientes com DPOC, representando uma inovação na identificação de biomarcadores para o acompanhamento da evolução do tratamento de pacientes com DPOC, auxiliando no monitoramento do agravamento desta doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD MALIK J, AHMED S, SHINDE M, ALMERMESH MHS, ALGHAMDI S, HUSSAIN A, ANWAR S. **The Impact of COVID-19 On Comorbidities: A Review Of Recent Updates For Combating It.** Saudi J Biol Sci. 2022 May;29(5):3586-3599. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.02.006. Epub 2022 Feb 10. PMID: 35165505; PMCID: PMC8828435.

BARNES PJ. **Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease.** Clin Chest Med 2014; 35(1): 71-86

BARNES PJ. **Chronic obstructive pulmonary disease: effects beyond of lungs.** Plos Med; 2010(7)

BARNES PJ. **Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Antioxidants (Basel).** 2022 May 13;11(5):965. doi: 10.3390/antiox11050965. PMID: 35624831; PMCID: PMC9138026.

VAN BEURDEN WJ, DEKHUIJZEN PN, HARFF GA, SMEENK FW. **Variability of exhaled hydrogen peroxide in stable COPD patients and matched healthy controls.** Respiration. 2002;69(3):211-6. doi: 10.1159/000063622. PMID: 12097763.

INONU H, DORUK S, et al. **Oxidative stress levels in exhaled breath condensate associated with COPD and smoking.** Resp Care 2012; 57:413-419

BONATO M, SEMENZATO U, TINÈ M, et al. **Fatores de risco para o desenvolvimento e gravidade do COVID-19 em pacientes com DPOC.** *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:714570. Publicado em 9 de agosto de 2021. doi:10.3389/fmed.2021.714570

CAVALCANTI, A; BRUIN, P. **O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas.** Jornal brasileiro de pneumologia. 2009, <https://doi.org/10.1590/S1806-37132009001200011>.

- CULPITT SV, MAZIAK W, et al. **Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease.** Am J Respir Crit Care Med 1999; 160:1635–1639.
- DYE JA, ADLER KB. **Effects of cigarette smoke on epithelial cells of the respiratory tract.** Thorax 1994; 49(8):825-34.
- GAMBLE E, BARNES NC, et al. **Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis.** Eur Respir J 2007; 30:467-471
- GAN WQ, MAN SFP, et al. **Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta- analysis.** Thorax 2004; 59:574–580
- GORECKI D, SZPINDA M, WOSNIACK A. **Oxidant- antioxidant balance in the blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease after smoking cessation.** Oxid Med Cell Longev. 2013; 2013:1-9
- HAO G, QIU Q, HOU L, GU F. **The Effect of Symptom Clusters and Sleep Disorder on Quality of Life among Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.** J Healthc Eng. 2021 Aug 31;2021:1692480. doi: 10.1155/2021/1692480. PMID: 34594481; PMCID: PMC8478539.
- HATTOTUWA KL, GIZYCKI MJ, et al. **The effects of inhaled fluticasone on airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease.** Am J Respir Crit Care Med 2002; 165:1592–1596
- INICIATIVA GLOBAL PARA DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (GOLD). **Estratégia global para o diagnóstico, manejo e prevenção da doença pulmonar obstrutiva crônica (Online).** Disponível em: https://www.goldcopd.org/wp-content/uploads/2019/12/GOLD-2020-FINAL-ver1.2-03Dec19_WMV.pdf
- JONES PW, WILLITS LR, et al. **Disease severity and the effect of fluticasone propionate on chronic obstructive pulmonary disease exacerbations.** Eur Respir J 2003; 21:68–73
- KARNER C, CATES CJ, et al. **Combination inhaled steroid and long-acting beta2-agonist in addition to tiotropium versus tiotropium or combination alone for chronic obstructive pulmonary diseases** Cochrane Database Syst Rev 2013; 3:1- 39.
- KOSACZ NM, et al. **Chronic obstructive pulmonary disease among adults- United States, 2011.** CDC 2012; 61(46):938-943
- LAPERRE TS, POSTMA DS, et al. **Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD.** Thorax 2006; 61:115–121
- LIU Y, GREENLUND KJ, VANFRANK B, XU F, LU H, CROFT JB. **Smoking Cessation Among U.S. Adult Smokers With and Without Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 2018.** Am J Prev Med. 2022 Apr;62(4):492-502. doi: 10.1016/j.amepre.2021.12.001. Epub 2022 Feb 2. PMID: 35120768; PMCID: PMC8996345.
- OCHSNER NY, RABE KF. **Systemic manifestations of COPD.** Chest 2011; 139(1):165–173
- PRABHUDESAI P, SINGH BP, AGRAWAL G, SINGH AK, JADHAV AY, PATIL SR, BHAGAT S, PATIL S, BARKATE H. **Furoato de fluticasona/vilanterol Use Trends and Characteristics in Patients with Obstructive Airway Disease: A Real-World Study of 10,374 Patients from India.** Curativo. 2023 Fev 9;15(2):e34825. DOI:

10.7759/cureus.34825. PMID: 36919064; PMCID: PMC10008380.

SAHA S, SILVA R, et al. **COPD: an inhaled corticosteroid-resistant, oral corticosteroid-responsive condition.** Eur Respir J 2006; 27(4):863-865

SAKATA R, GALE PM, et al. **Impact of smoking on mortality and life expectancy in Japanese smokers: a prospective cohort study.** BMJ 2012; 345- 357

SCANLON PD, CONNETT JE, et al. **Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease.** The Lung Health Study. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161(2):381– 390.

SETHI S, MAKE BJ, ROBINSON SB, KUMAR S, et al. **Relação da Gravidade e Frequência da Exacerbação da DPOC com Riscos para Eventos Futuros e Carga Econômica na Taxa do Medicare População de serviço.** Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 20 de março de 2022; 17:593-608. doi: 10.2147/COPD.S350248. PMID: 35342290; PMCID: PMC8948172.

SHAHAB L, JARVIS M J, et al. **Prevalence, diagnosis and relation to tobacco dependence of chronic obstructive pulmonary disease in a national representative population sample.** Thorax 2006; 61:1043-104

TANIGUCHI A, TSUGE M, MIYAHARA N, TSUKAHARA H. **Reactive Oxygen Species and Antioxidative Defense in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.** Antioxidants (Basel). 2021 Sep 28;10(10):1537. doi: 10.3390/antiox10101537. PMID: 34679673; PMCID: PMC8533053.

TASHKIN DP, FERGUNSON GT. **Combination bronchodilatador therapy in the management of chronic obstructive pulmonary disease.** Resp Research 2013; 14:49-62

TROOSTERS T, CELLI B, et al. **Tiotropium as a first maintenance drug in COPD: secondary analysis of the UPLIFT1 trial.** Eur Respir J 2010; 36:65–73

TURATO G, DI STEFANO A, et al. **Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis.** Am J Respir Crit Care Med. 1995; 152(4):1262-1267.

VIJAYAN VK. **Chronic obstructive pulmonary disease.** Indian J Med Res 2013; 137(2):251-269

WIECZFINSKA, JOANNA et al. **“Oxidative Stress-Related Mechanisms in SARS-CoV-2 Infections.”** *Oxidative medicine and cellular longevity* vol. 2022 5589089. 8 Mar. 2022, doi:10.1155/2022/5589089

YANG, Y. H. et al. **Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid induced leucine zipper.** Journal of Immunology, Baltimore, v. 183, n. 2, p. 1435-1445, 2009

ZHANG J, LIN XF, BAI CX. **Comparison of clinical features between non-smokers with COPD and smokers with COPD: a retrospective observational study.** Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2014;9:57-63. doi: 10.2147/COPD.S52416. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24426780; PMCID: PMC3890400.

SOBRE OS AUTORES:

AUTOR 1: Mestranda no Programa Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Vila Velha. Graduada em Fisioterapia pela Universidade de Vila Velha (2020). Aluna de iniciação científica (bolsista UVV) no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Translacional (LFFT) do PPGCF-UVV desde 2017. Participou do projeto "Análise dos efeitos do probiótico kefir sobre crises epilépticas em camundongos". Possui experiência na área de Neurologia com ênfase em Fisiopatologia do Sistema Nervoso Central, atuando principalmente nos seguintes temas: modelos experimentais de crises convulsivas, isquemia cerebral, sistema nervoso entérico e autônomo.

AUTOR 2: Possui graduação em EDUCAÇÃO FÍSICA pelo CENTRO UNIVERSITÁRIO DE CARATINGA-UNEC (2002-2005) e especialização em Treinamento desportivo e Fisiologia do Exercício pelo CENTRO UNIVERSITÁRIO DE VOLTA REDONDA - UNIFOA (2006-2007). Atualmente cursa Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Vila Velha (UVV).

AUTOR 3: Possui graduação em Medicina pela Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais (1997). Residência em Pneumologia pela Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte - FELUMA (2001). Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Vila Velha (2014). Pneumologista - Secretaria de Saúde do Estado do Espírito Santo.

AUTOR 4: Doutora pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Graduada em Fisioterapia pela Universidade Federal do Espírito Santo (2013). Possui mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (2015). Possui experiência na área de Fisiologia com ênfase em Fisiologia Cardiovascular, atuando principalmente nos seguintes temas: modelos experimentais de infarto agudo do miocárdio, isquemia cerebral, hipertensão renovascular e diabetes; sistema nervoso autônomo, variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial, biologia molecular, produtos naturais, probióticos, bioprospecção de peptídeos e estresse oxidativo. Atuou como professora substituta no Curso de Fisioterapia da Universidade Federal do Espírito Santo (2019). Ministrou a disciplina de epidemiologia e bioestatística na pós-graduação e possui a prática diária, desde a iniciação científica, com a análise de dados e manuseio de softwares estatísticos. Atua na orientação técnica-científica de alunos de graduação e pós-graduação.

AUTOR 5: Farmacêutico pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) em 2002, Mestre (2005) e Doutor (2009) em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Pós-Doutor em Farmacologia pela Universidade de Santiago de Compostela (USC) - Espanha (2018). Professor Titular da Universidade Vila Velha (UVV) (Mestrado e Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Medicina). Pesquisador do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Translacional (UVV). Autor do perfil Farmaconaprática (Instagram: @farmaconapratica, com mais de 200 mil seguidores) e "Farmacologia na prática" no Youtube (com mais de 200 mil inscritos). Idealizador da Comunidade "Farmaco na Prática" com mais de 4000 membros. Autor do livro "Bibliquímica- Evidências das Ciências Biomédicas na Bíblia" (Instagram: @bibliquimica_). Bolsista em produtividade CNPq (PQ2, Área: Farmácia). H-Index (Web of Science): 21 //// H- Index (SCOPUS): 26 //// Google Scholar: 28. Até o momento, possui 73 publicações em revistas internacionais.

AUTOR 6: Doutorado em Fisiologia, obtido pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP, 1981), orientado pelo prof. Eduardo M Krieger e posteriormente contemplado com bolsa RHAE-CNPq, e matriculado na Universidade de Iowa, 1989-1991, no laboratório de Michael J Brody, como Professor Associado Visitante. A partir de 1997 voltou para Iowa City, no Laboratório de Alan Kim Johnson, onde foi matriculado como Professor Associado Visitante e se especializou em técnicas de biologia molecular, patch-clamping, cultura celular, transferência de genes de adenovírus e camundongos knockout, apoiado pelo CNPq e realizando pesquisas com apoio financeiro da NASA, NAVY e NIH. No Brasil, foi Professor/Pesquisador/Orientador da Faculdade de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal. Em 2019 completou 40 anos de trabalho

naquela instituição que o premiou como Professor Emérito e atualmente é Professor Titular do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Vila Velha (UVV), Brasil. No Laboratório de Fisiologia Translacional e Farmacologia tem se concentrado em mecanismos de disfunção endotelial, desequilíbrio de ERO/NO e comprometimento do controle da função cardiovascular utilizando modelos experimentais de hipertensão arterial e aterosclerose. Mais recentemente, tem-se dedicado a estudos relacionados com a microbiota intestinal e probióticos em doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. O apoio financeiro para projetos de pesquisa tem sido obtido principalmente da Facitec (Agência Municipal de Vitória), Fapes (Agência Estadual) e CNPq (Agência Federal). É apoiado pelo CNPq como Pesquisador, nível 1, há 30 anos. Membro do conselho editorial do Journal of Translational Medicine (seção Nutrição e Metabolismo) e do Journal of Food Microbiology. Ele foi editor principal de uma edição especial de Oxidative Medicine and Cellular Longevity e é revisor de vários periódicos. Publicou 160 artigos internacionais listados no PubMed, incluindo uma publicação no JACC (fator de impacto de 22) e esse artigo possui mais de 200 citações, possui 3 publicações na Chest e 13 na Hypertension, nas quais seu trabalho foi capa de imagem .

AUTOR 7: Possui graduação em Odontologia pela Universidade Federal do Espírito Santo (1991-1996), mestrado em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo (2000-2002), doutorado em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo e Uniklinikum Wuerzburg, Alemanha (2002-2006) e habilitação (licenciatura) em Biologia pelo IFES (2017-2018). Realizou estâncias pós-doutorais no Institut Català de Ciències Cardiovasculars - ICCV (2007), no Institut de Recerca del Hospital Universitari Vall d'Hebron, em Barcelona - Espanha (2007-2010), no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, do ICBS - UFRGS (2011-2013) e trabalhou como pesquisadora Pós-Doutoral no Laboratório de Cardiologia Experimental no Hospital San Raffaele em Milão - Itália (2015-2017) e foi pesquisadora Pós-Doutoral (bolsista PNPd- CAPES) no Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular - UFES (2017-2022). Atua como professora colaboradora no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas na UFES e pós-doutora no Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia - UFES. Na pesquisa científica atua principalmente na área de fisiopatologia cardiovascular, especialmente na área de hipertensão arterial, microcirculação coronariana, reatividade vascular, estresse oxidativo, disfunção endotelial, infarto do miocárdio, isquemia e reperfusão, proteção miocárdica e mecanismos da insuficiência cardíaca. Em docência, tem experiência no ensino teórico/prático de histologia/embriologia, fisiologia, farmacologia, biologia celular/molecular, patologia e odontologia - além de bioética e boas práticas.

AUTOR 8: Possui graduação em Ciências Biológicas (2005), mestrado (2008) e doutorado (2012) em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Atualmente é Professor Titular e Pesquisador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Vila Velha (UVV), onde ministra as disciplinas de Fisiologia Humana, Genética Humana, Biologia Celular e Biologia Molecular. Atua também como Pesquisador Associado do Laboratório de Fisiologia Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFES. Áreas de atuação: Fisiologia, Fisiopatologia, Estresse oxidativo, Genotoxicidade, Biologia Molecular e Biologia Celular. Bolsista de Produtividade da Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES).