Suzana Pinheiro Pimenta

**Avaliação dos efeitos da doxíciclina sobre o bloqueio de
metaloproteinases e na evolução funcional das pacientes
com linfangioleiomiomatose**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências**

Programa de Pneumologia

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Ribeiro de
Carvalho**

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pimenta, Suzana Pinheiro

Avaliação dos efeitos da doxíciclina sobre o bloqueio de metaloproteinases e na evolução funcional das pacientes com linfangioleiomiomatose / Suzana Pinheiro Pimenta. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pneumologia.

Orientador: Carlos Roberto Ribeiro de Carvalho.

Descritores: 1.Linfangioleiomiomatose 2.Metaloproteinases da matriz
3.Doxiciclina. 4.Fator D de crescimento do endotélio vascular

USP/FM/DBD-243/11

DEDICATÓRIA

À minha mãe Terezinha, amiga e guerreira, a prova viva de
que a sabedoria e a sensatez são infinitamente mais
valiosas do que quaisquer diplomas.

Ao meu marido Eduardo, meu melhor amigo, o amor da
minha vida, meu porto seguro e meu norte
nas horas mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Parece que foi ontem que chegou a proposta para um doutorado. E aí ? Voltar pra Manaus ou embarcar nesta nova jornada? Bem, vocês já sabem qual foi a escolha...

Agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado, auxiliando nos momentos fáceis e difíceis, provando sua infinita misericórdia.

Às pacientes que participaram deste estudo, muito obrigada. Apesar de não termos encontrado a cura, demos mais um passo em sua direção.

Bem, se alguém pode dizer que tem uma família presente, esta sou eu. Agradeço ao meu marido por confiar em mim e me apoiar nesta jornada, aos meus pais Omar (*in memoriam*) e Terezinha por sempre terem acreditado em mim e investido em minha educação e à minha irmã Silvana pelo apoio incondicional. Obrigada por vocês fazerem parte da minha vida e me ajudarem a chegar até aqui.

Ao meu orientador Carlos Carvalho, um líder nato que tive o privilégio de conhecer e em quem encontrei um amigo. Obrigada por todos os conselhos e pela paciência durante estes anos.

A todos os amigos do grupo do interstício, em especial Alexandre Kawassaki e Bruno Baldi em quem encontrei dois irmãos, e ao Dr. Ronaldo Kairalla pelos valiosos ensinamentos na prática clínica, muito obrigada.

À Dra Teresa Takagaki pelo apoio e orientação inestimáveis, muito obrigada. Você é uma inspiração para todos os pneumologistas.

Aos Professores Francisco Vargas, Mário Terra e Rogério de Souza pelo trabalho realizado junto à pós -graduação da Pneumologia.

Ao Dr. João Marcos Salge e toda a equipe da Função Pulmonar pela ajuda durante meu protocolo.

À equipe da UTI do Hospital AC Camargo, uma grande família composta por pessoas maravilhosas, obrigada.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. Introdução.....	1
1.1. História natural da doença.....	2
1.2. Quadro clínico.....	4
1.2.1. Acometimento pulmonar.....	4
1.2.2. Acometimento extra-pulmonar.....	4
1.3. Diagnóstico.....	5
1.3.1. Radiologia.....	6
1.3.2. Função pulmonar.....	7
1.3.3. Testes funcionais de exercício.....	7
1.3.3.1. Teste de caminhada.....	7
1.3.3.2. Teste de exercício cardiopulmonar.....	9
1.3.4. VEGF-D.....	9
1.3.5. Biópsia.....	10
1.4. Biologia celular e molecular da LAM e seus alvos terapêuticos.....	11
1.4.1. Biologia celular do complexo TSC1/TSC2.....	11
1.4.2. Biologia molecular do complexo hamartina / tuberina.....	12
1.4.3. Linfangiogênese.....	14
1.4.4. Bloqueio hormonal.....	15
1.4.5. Destruição cística e a expressão de metaloproteinases.....	16
2. Hipótese do estudo.....	18
3. Objetivos.....	20
3.1. Objetivos primários.....	21
3.2. Objetivos secundários.....	21

4. Metodologia.....	22
4.1. Casuística.....	23
4.2. Delineamento do estudo.....	23
4.3. Testes.....	24
4.3.1. Prova de função pulmonar.....	24
4.3.2. Teste de caminhada.....	24
4.3.3. Qualidade de vida relacionada à saúde.....	27
4.3.4. Coleta de sangue e urina.....	27
4.3.4.1. Metaloproteinases -2 e -9.....	27
4.3.4.2. VEGF-D.....	28
4.4. Desfechos.....	29
4.4.1. Desfechos primários.....	29
4.4.2. Desfechos secundários.....	29
4.5. Análise Estatística.....	29
5. Resultados.....	30
5.1. Casuística e características clínico-demográficas.....	31
5.2. Características funcionais, qualidade de vida e títulos de VEGF-D das 31 pacientes com LAM que completaram o estudo.....	33
5.2.1. Função pulmonar.....	33
5.2.2. Teste de caminhada.....	34
5.2.3. Qualidade de vida.....	35
5.2.4. Dosagem de VEGF-D.....	37
5.3. Análise dos desfechos primários.....	39
5.3.1. Bloqueio de metaloproteinases.....	39
5.3.2. Variação do VEF ₁	42
5.4. Análise do desfecho secundário - DDR.....	48
5.5. Eventos adversos relacionados à doxíciclina.....	53
6. Discussão.....	55
7. Conclusão.....	64
8. Referências.....	66
9. Anexos.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

m: metros

mL: mililitros

mL/min/mmHg : mililitros por minuto por milímetros de mercúrio

L: litros

SpO₂: oximetria de pulso

s: segundos

LISTA DE SIGLAS

ADO₂: área de dessaturação da oxiemoglobina

Akt: *protein kinase B*

AML: angiomolipoma

ATS: *American Thoracic Society*

CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CVF: capacidade vital forçada

CPT: capacidade pulmonar total

DDR: *desaturation distance ratio*

DL_{CO}: difusão de monóxido de carbono

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

ET: esclerose tuberosa

HC-FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HMB-45: *human melanoma black - 45*

LAM: linfangioleiomiomatose

MEC: matriz extracelular

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

MMP: metaloproteinase

PAI-1: *plasminogen activator inhibitor*

PDGF: *platelet-derived growth factor*

PDK1: *phosphoinositide-dependent kinase 1*

PFP: prova de função pulmonar

PI3K: *phosphoinositide 3-kinase*

PROX-1: *transcription factor required for lymphatic vessel growth*

pS6: *phosphorylation of S6*

RE: receptor de estrogênio

Rheb: *Ras homologue enriched in brain*

RI: receptor de insulina

S6K: *S-6 kinase*

SF - 36: *short form - 36*

TCAR: tomografia computadorizada de alta resolução

TC6M: teste de caminhada de seis minutos

TECP : teste de exercício cardiopulmonar

TIMP: *tissue inhibitor of metalloproteinases*

TSC: *tuberous sclerosis complex*

uPA: *urokinase-type plasminogen activator*

VEGF-R: *vascular endothelial growth factor receptor*

VEF₁: volume expirado ao final do primeiro segundo

VEGF-D: *vascular endothelial growth factor - D*

VO₂max: consumo máximo de oxigênio

VR: volume residual

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos e clínicos das 41 pacientes com LAM, no momento do início do protocolo e das 31 pacientes que completaram 12 meses de tratamento *

Tabela 2 - Função pulmonar de 31 pacientes com LAM, antes e após 12 meses de tratamento com doxiciclina *

Tabela 3 - Dados do TC6M de 31 pacientes com LAM, antes e após 12 meses de tratamento com doxiciclina *

Tabela 4 - Qualidade de vida (SF-36) de 31 pacientes com LAM, antes e após 12 meses de tratamento com doxiciclina *

Tabela 5 - Parâmetros funcionais e títulos de MMP e VEGF-D do grupo G1, antes e após doxiciclina *

Tabela 6 - Parâmetros funcionais e títulos de MMP e VEGF-D do grupo G2, antes e após doxiciclina *

Tabela 7 - Domínios do questionário de qualidade de vida SF-36, antes e após doxiciclina, no grupo G1 *

Tabela 8 - Domínios do questionário de qualidade de vida SF-36, antes e após doxiciclina, no grupo G2 *

Tabela 9 - Marcadores funcionais de resposta à doxiciclina *

Tabela 10 - Parâmetros funcionais e títulos de MMP e VEGF-D do grupo DDR1, antes e após doxiciclina *

Tabela 11 - Parâmetros funcionais e títulos de MMP e VEGF-D do grupo DDR2, antes e após doxíciclina *

Tabela 12 - Domínios do questionário de qualidade de vida SF-36 do grupo DDR1, antes e após doxíciclina *

Tabela 13 - Domínios do questionário de qualidade de vida SF-36 do grupo DDR2, antes e após doxíciclina *

Tabela 14 - Eventos adversos apresentados por pacientes com LAM durante o tratamento com doxíciclina, sendo que 31 pacientes usaram por 12 meses

Tabela 15 - Comparação entre os grupos G1 e G2, em relação à influência do bloqueio hormonal concomitante ao uso de doxíciclina, nas 31 pacientes com LAM *

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações radiológicas compatíveis com diagnóstico de Linfangioleiomiomatose, obtidas de duas pacientes participantes do protocolo

Figura 2. *Desaturation-Distance Ratio* (DDR)

Figura 3. Células LAM: morfologia e marcadores imunohistoquímicos

Figura 4. Esquema das vias de sinalização que participam do metabolismo molecular da LAM e seus potenciais alvos terapêuticos

Figura 5. Teste de caminhada

Figura 6. Títulos de VEGF-D sérico de 31 pacientes em uso de doxíciclina, coletados no mês basal, 6º mês e 12º mês do protocolo, bem como de 10 controles [†]

Figura 7. Títulos de MMP-9 urinária de 31 pacientes em uso de doxíciclina, coletados no mês basal, 6º mês e 12º mês do protocolo, bem como de 10 controles [†]

Figura 8. Títulos de MMP-9 sérica de 31 pacientes em uso de doxíciclina, coletados no mês basal, 6º mês e 12º mês do protocolo, bem como de 10 controles [†]

Figura 9. Distribuição das 31 pacientes com LAM em dois grupos de acordo com a variação do VEF₁ após 12 meses do uso de doxíciclina ^{*}

Figura 10. Variação das medianas da diferença do VEF₁ e da CVF entre o 12º mês e o mês basal do tratamento com doxíciclina

Figura 11. Desfecho secundário: variação do DDR após 12 meses do tratamento com doxíciclina

Figura 12. Seguimento do VEF₁ de 20 pacientes com LAM que mantiveram o uso de doxiciclina por um período médio de 18 meses após o término do protocolo, divididas nos grupos G1 e G2 *

Figura 13. Evolução do VEF₁, em litros, das 10 pacientes que descontinuaram o protocolo

RESUMO

A Linfangioleiomiomatose (LAM) é uma rara afecção, caracterizada pela substituição do parênquima pulmonar por cistos, resultando em prejuízo na troca gasosa e progressiva piora funcional. A patogênese da formação dos cistos permanece incerta, mas tem sido associada à hiperreatividade de metaloproteinases (MMP), principalmente MMP-2 e -9. Neste estudo foram avaliados os efeitos da doxíciclina, um potente inibidor de MMP, sobre a eficácia no bloqueio dos níveis sérico e urinário das MMP-2 e -9 após 12 meses de tratamento, bem como sobre os parâmetros funcionais das pacientes com LAM. Foi delineado um ensaio clínico prospectivo, não randomizado e não controlado, no qual as pacientes com LAM receberam doxíciclina (100 mg/dia) por 12 meses, realizando avaliações nos meses basal, 6º e 12º mês, através de prova de função pulmonar completa, teste de caminhada de seis minutos (TC6M), questionário de qualidade de vida (SF-36) e coleta de amostras de urina e sangue para dosagem das MMP-2 e -9. No total, 31 pacientes, com idade média (DP) de 43 (8) anos e diagnóstico estabelecido de LAM, receberam doxíciclina durante 12 meses. Após análise, observou-se bloqueio efetivo sobre a MMP-9 urinária, sendo a mediana (IQ) pré-doxíciclina de 10.487 pg/mL (4.565-20.963) e de 4.061 pg/mL (712-9.985) após 12 meses de doxíciclina ($p < 0,001$). A MMP-2 sérica foi igualmente bloqueada, sendo a mediana (IQ) basal de 0 pg/mL (0-833) e de 0 pg/mL (0-179) após 12 meses ($p = 0,005$). Não houve mudança significativa na MMP-9 sérica e os níveis urinários de MMP-2 não foram detectados nas pacientes. Na análise funcional, apesar de ter havido declínio de 70 mL na média do VEF₁ das 31 pacientes, após 12 meses de tratamento, observou-se dois grupos distintos funcionalmente e em relação à qualidade de vida. Estes grupos foram obtidos de acordo com a variação do VEF₁, sendo o primeiro grupo compreendido por 13 pacientes, em que o VEF₁ permaneceu estável ou aumentou (G1), e o segundo com 18 pacientes que apresentaram queda no VEF₁ (G2). A mediana (IQ) da variação do VEF₁ em mL no grupo G1 foi de 70 mL (30 - 110) e no grupo G2 foi de -140 mL [-260 - (-110)], sendo $p < 0,001$. A mediana da variação da CVF também seguiu a mesma tendência, havendo ganho de 170 mL (30 - 250) no G1 e perda de -20 mL [-300 - (-80)] no G2 ($p = 0,005$). Embora não tenham sido observadas variações

importantes nos volumes pulmonares, DL_{CO} e no TC6M, o G1 apresentou melhora significativa nos domínios do SF-36 em relação ao G2. Foram observados alguns marcadores funcionais de resposta à doxíciclina, quando comparados G1 e G2 antes do início do tratamento, demonstrando que pacientes com maior relação VEF_1/CVF e menor CPT apresentaram melhor resposta. Epigastralgia, náuseas e diarreia foram os efeitos adversos mais prevalentes, na maioria das vezes auto-limitados. Concluindo, pela primeira vez conseguiu-se evidenciar, em pacientes com LAM, a redução dos níveis séricos e urinários de MMP após uso de doxíciclina por 12 meses, mostrando-se uma medicação segura e aparentemente efetiva em tratar um subgrupo de pacientes funcionalmente menos obstruídas, com efeitos colaterais leves e toleráveis.

Descritores: linfangioleiomiomatose; metaloproteinases da matriz; doxíciclina; fator D de crescimento do endotélio vascular

SUMMARY

Lymphangiomyomatosis (LAM) is a rare disease, characterized by substitution of lung parenchyma by cysts, resulting in impairment in the gas exchange and progressive functional worsening. The pathogenesis of development of cysts remains uncertain, but has been associated to overexpression of metalloproteinases (MMP), especially MMP-2 and -9. In this study, there have been analyzed the MMP-2 and MMP-9 blockage in the urine and blood of LAM patients, after doxycycline administration during 12 months, as well as on functional and quality of life parameters of LAM patients. A prospective clinical trial, non randomized and uncontrolled, has been designed, in which LAM patients have received doxycycline (100mg/day) for 12 months, and underwent pulmonary function tests, six-minute walk test (6MWT), quality of life assessment and blood and urine samples for MMP-2 e -9 dosage, undergoing evaluation in months basal, 6th and 12th. Overall, 31 patients mean age (SD) 43 (8) with established diagnosis of LAM have received doxycycline for 12 months. After analysis, it was observed an effective blockage over urinary MMP-9 levels, with a pre-doxycycline median (IQ) of 10,487 pg/mL (4,565-20,963), and 4,061 pg/mL (712-9,985) after 12-month doxycycline administration ($p < 0.001$). The serum MMP-2 has been as well blocked with a basal median (IQ) of 0 pg/mL (0-833), and 0 pg/mL (0-179) after 12 months ($p = 0.005$). There was no significant difference in serum MMP-9 levels, and urinary MMP-2 levels were untraceable. During functional parameters analysis, although there was a mean decline of 70 mL in FEV₁ in the 31 patients after doxycycline treatment, we noticed two different groups concerning to the assessment of function tests and quality of life. These groups were obtained according to FEV₁ variation; the first group comprised 13 patients in which the FEV₁ increased or remained stable (G1), and the second group comprised 18 LAM patients in which FEV₁ decreased (G2). The median (IQ) increase of FEV₁ in mL, in G1, was 70 mL (30 - 110) and in G2 there was a decrease of -140 mL [-260 - (-110)], being $p < 0.001$. The median (IQ) variation in FVC followed the same tendency, presenting a increase of 170 mL (30 - 250) in G1 and a decrease of - 20mL [-300 -(-80)] in G2 ($p = 0.005$). Although there have been no relevant changes in lung volumes, DL_{CO} and 6MWT variables, patients from G1

presented significant improvement in the quality of life when compared to G2. Continuing the analysis, we noticed some functional markers of the response to doxycycline, when comparing G1 and G2 before starting the treatment. Patients with higher FEV₁/FVC ratio and lower TLC presented better response to doxycycline. Epigastric pain, nausea and diarrhea were the more prevalent side effects, most often self-limited. Concluding, for the first time, it was demonstrated the decrease in serum and urinary MMP levels in LAM patients, after using doxycycline for a period of 12 months, which proved to be a safe medication, apparently effective to treat a subgroup of patients with less obstructive disease, presenting mild and well tolerated side effects.

Descriptors: lymphangiomyomatosis; matrix metalloproteinases; doxycycline; vascular endothelial growth factor - D

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Linfangioleiomiomatose (LAM) é uma rara afecção que acomete quase exclusivamente mulheres, caracterizada pela proliferação anormal de células semelhantes às musculares lisas (células LAM), ocasionando obstrução de vasos sanguíneos, linfáticos e de vias aéreas, bem como destruição cística do pulmão.^{1,2} ³ Pode ocorrer na forma esporádica (LAM-E) ou associada ao complexo da Esclerose Tuberosa (LAM-ET).

As células LAM apresentam afinidade por pulmões, rins e vasos linfáticos. O mecanismo desta seletividade permanece indefinido, mas postula-se que os fatores de adesão celular e a elevada atividade de proteases possam facilitar a invasão destas células nos vasos sanguíneos e linfáticos.⁴

O diagnóstico de LAM representa um expressivo impacto negativo na vida das pacientes devido ao seu caráter degenerativo progressivo, pela substituição do parênquima pulmonar por cistos, acarretando em prejuízo funcional e comprometendo a qualidade de vida destas mulheres.

A etiologia da LAM permanece incerta, assim como a patogênese da formação dos cistos pulmonares, porém vários estudos têm sido realizados buscando identificar os “gatilhos” desta doença e seus potenciais alvos terapêuticos.⁵ O reconhecimento de intensa atividade tecidual e de títulos séricos elevados de metaloproteinases (MMP) têm sido implicados na formação dos cistos pulmonares.^{6,7}

Atualmente, o único tratamento curativo viável para a LAM é o transplante pulmonar, tendo em vista a constante dificuldade em realizar ensaios clínicos randomizados e placebo-controlados pela raridade da doença, mesmo em grandes centros especializados.

1.1. História natural da doença

Alterações pulmonares consistentes com LAM foram primeiramente descritas em 1918, porém somente em 1937, houve o primeiro relato de caso de LAM esporádica.^{8,9} No Brasil, os primeiros dois relatos de LAM foram descritos em 1982,

no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).¹⁰

As características demográficas e a prevalência da LAM vêm mudando nas últimas décadas. Anteriormente, a doença era considerada fatal, acometendo somente mulheres em idade fértil e as únicas opções de tratamento eram ooforectomia, progesterona e transplante pulmonar.³

Atualmente, devido ao conhecimento mais aprofundado das características clínico-radiológicas e histopatológicas, bem como os registros das populações de pacientes do Japão, Reino Unido, Estados Unidos e Brasil, muitos mitos foram dissipados.¹¹⁻¹⁴

A prevalência estimada da LAM-E é de 1 - 2:1.000.000 habitantes^{15, 16} e aproximadamente 15 a 34% dos pacientes portadores de Esclerose Tuberosa (ET) apresentam achados radiológicos típicos de LAM.^{13, 17} A idade média encontrada, ao diagnóstico, em um estudo com 230 pacientes foi de 41 anos,¹³ porém tem havido um número crescente de mulheres diagnosticadas no período pós-menopausa, sendo que 50% delas nunca haviam apresentado pneumotórax até a doença ser reconhecida.¹⁸

Entre as 61 pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Doenças Intersticiais do HC-FMUSP, nos últimos 25 anos, a média ao diagnóstico foi de 39 anos.

Apesar da quase exclusividade de acometimento no sexo feminino, a LAM-E foi descrita em um indivíduo, geneticamente comprovado como sendo do sexo masculino, sem evidência de mutação no complexo TSC1/TSC2.¹⁹

A mortalidade em 10 anos, a partir do início dos sintomas, varia de 10 a 20%^{16, 20}, dependendo das séries, e chega a 30% em 10 anos a partir do momento da biópsia,²¹ porém já foram relatados casos de LAM em octogenárias, bem como pacientes com 30 anos de evolução de doença.²² A doente mais velha do nosso ambulatório está com 73 anos e seu diagnóstico foi em 1985. A mortalidade está relacionada a determinadas peculiaridades da apresentação clínica no momento do diagnóstico, sendo a dispneia e hemoptise piores marcadores prognósticos do que pneumotórax; a associação da LAM com ET indica melhor prognóstico, visto que o acometimento pulmonar tende a ser mais leve; pacientes mais jovens, em idade reprodutiva, tendem a ter pior evolução.²³

1.2. Quadro clínico

1.2.1. Acometimento pulmonar

As manifestações clínicas mais frequentes em pacientes com LAM são dispneia, de caráter progressivo, com prevalência de 60 a 85%, e pneumotórax espontâneo (40 a 80% dos casos), podendo ser recorrente.^{2, 24, 25}

Quilotórax pode também ocorrer (prevalência de 20 a 40%), sendo secundário à obstrução dos vasos linfáticos da pleura ou do ducto torácico pelas células LAM. O tratamento pode ser conservador, mas geralmente é de difícil resolução.^{12, 26, 27} Similarmente, a hemoptise e quilo-optise, menos comuns e de leve intensidade, são secundárias à obstrução de capilares pulmonares e vasos linfáticos sendo, entretanto, evidenciada infiltração com lesão da parede da artéria pulmonar, por células LAM, em uma paciente com hemorragia alveolar fatal.²⁸ Quilopericárdio e quilúria são sintomas muito raros.

O exame físico mostra-se muitas vezes sem alterações, porém, ocasionalmente, podem ser auscultados sibilos ou ainda crepitações.²⁹ Em casos avançados podem ocorrer hipertensão pulmonar e disfunção de ventrículo direito, provavelmente secundária à hipoxemia.³⁰

1.2.2. Acometimento extra-pulmonar

As manifestações extra-pulmonares mais comuns na LAM são abdominais, geralmente silentes e podem preceder em até anos do início dos sintomas respiratórios.

Os angiomiolipomas renais (AML) são tumores compostos por células LAM, vasos sanguíneos e gordura, sendo geralmente menos frequentes, pequenos e solitários na LAM-E e múltiplos, volumosos e com maior tendência a sangramento espontâneo na LAM-ET.³¹ Em um estudo com 323 pacientes, a frequência de AML relatada na LAM-E foi de 32% e nos casos de LAM-ET os AML foram observados em 93% delas.³²

O envolvimento linfático extratorácico pode acometer até um terço das pacientes com LAM. As linfadenomegalias podem ser retroperitoneais, retrocrurais e até pélvicas.³¹ Outro achado típico são os linfangioleiomiomas, massas secundárias à dilatação dos vasos linfáticos, podendo levar à formação de ascite quilosa, mais comuns na LAM-E e podem estar associados à maior gravidade da doença.³²

Meningiomas podem ser evidenciados na LAM, associada ou não à esclerose tuberosa, porém sua incidência não parece ser maior que a da população geral.³³ O uso de progestágenos parece estar associado ao aumento da incidência dos meningiomas, tendo em vista sua ação mitogênica.³⁴

1.3. Diagnóstico

Os sintomas respiratórios relatados pelas pacientes, como tosse e dispneia aos esforços, são comuns a outras doenças, tais como asma e enfisema. Portanto, deve-se suspeitar de LAM em mulheres jovens com dispnéia progressiva aos esforços e/ou pneumotórax e/ou hemoptise.

A *European Respiratory Society*, com o intuito de padronizar as condutas relacionadas à LAM, definiu os seguintes critérios diagnósticos³⁵:

1) associação entre os cistos pulmonares na tomografia computadorizada de tórax de alta resolução (TCAR) e uma biópsia pulmonar evidenciando os marcadores histopatológicos de LAM.

2) achados característicos na TCAR associado a qualquer um dos seguintes: angiomiolipoma renal, derrame pleural ou ascite quilosa, linfangioleiomioma ou envolvimento ganglionar por LAM, diagnóstico definitivo ou provável de esclerose tuberosa.

Recentemente, estudos têm abordado a relevância do VEGF-D (*vascular endothelial growth factor*) no diagnóstico da LAM.³⁶⁻³⁸ Young e colaboradores obtiveram, para valor de corte > 800 pg/mL do VEGF-D, uma sensibilidade de 60% e especificidade de 100% em uma coorte de pacientes com LAM.³⁹ Aproximadamente um quarto delas apresentaram VEGF-D < 800 pg/mL.

1.3.1. Radiologia

A radiografia de tórax pode apresentar-se normal ou mostrar sinais de pneumotórax ou derrame pleural.

A TCAR, no entanto, é o exame indicado para avaliação e seguimento de pacientes com LAM. ³⁵ Os cistos pulmonares (Figura 1) são considerados os marcadores característicos desta doença e estão presentes em 100% das pacientes. ⁴⁰ Distribuem-se homogeneamente no parênquima, apresentam paredes finas e lisas e seu diâmetro geralmente varia de dois e cinco milímetros, podendo entretanto alcançar até 10 milímetros. ⁴¹ É possível mensurar a gravidade da doença pulmonar utilizando uma análise semiquantitativa pela TCAR, ⁴² porém os métodos quantitativos tem se mostrado superiores, correlacionando-se melhor com a função pulmonar e troca gasosa. ^{43, 44}

A tomografia de abdome deve ser solicitada de rotina. Um estudo mostrou que de 80 pacientes com LAM-E, 61 (76%) apresentavam achados abdominais positivos, sendo os angiomiolipomas renais (Figura 1) os mais comuns, presentes em 43 pacientes (54%), seguido por linfadenomegalias abdominais em 31 (39%) e linfangioleiomas em 13 (16%). ³¹ Na LAM-ET os AML são ainda mais freqüentes.

Figura 1. Alterações radiológicas compatíveis com diagnóstico de Linfangioleiomiomatose, obtidas de duas pacientes participantes do protocolo.

A. Cistos pulmonares com paredes finas, homogeneamente distribuídos pelo parênquima pulmonar; B. Angiomiolipoma renal em rim esquerdo.

1.3.2. Função pulmonar

Os testes de função pulmonar são o método mais prático para avaliar o comprometimento pulmonar na LAM.²³ Inicialmente, a prova de função pulmonar pode apresentar-se normal nas pacientes. Em grandes séries, as alterações mais frequentemente observadas foram a obstrução ao fluxo aéreo e a redução na difusão do monóxido de carbono (DL_{CO}).^{13, 45, 46} A análise de 275 pacientes, realizada por Taveira-DaSilva e colaboradores do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, demonstraram que pacientes com LAM apresentam declínio anual no VEF_1 e DL_{CO} de 75 ± 9 mL ($1,7 \pm 0,4\%$ do valor predito) e $0,69 \pm 0,07$ mL/min/mmHg ($2,4 \pm 0,4\%$ do valor predito), respectivamente.⁴⁵ Outro estudo demonstrou redução anual mais expressiva no VEF_1 e DL_{CO} , respectivamente, de 118 ± 142 mL e $0,905 \pm 1,54$ mL/min/mmHg.¹⁵

Raramente se identifica padrão restritivo isolado e, quando presente, está, na maioria das vezes, associado a derrame pleural quiloso ou pneumotórax.

A variação significativa após o uso de broncodilatador pode ocorrer, sendo vista em 6 - 26% dos casos.^{47, 48}

A capacidade pulmonar total pode estar normal ou aumentada, geralmente com aumento do volume residual associado, além hipoxemia em grau variável.^{47, 49}

A monitoração da função pulmonar, principalmente do VEF_1 e da DL_{CO} , é fundamental, sendo que reduções anuais acima de 5 a 10% do valor predito indicam doença rapidamente progressiva.²³ Avaliações seriadas de VEF_1 e DL_{CO} a cada 3 a 6 meses em pacientes com doença progressiva e a cada 6 a 12 meses naqueles com doença mais estável são medidas importantes para a monitoração das pacientes com LAM.

1.3.3. Testes funcionais de exercício

1.3.3.1. Teste de caminhada

A hipoxemia induzida pelo esforço torna o teste de caminhada de seis minutos (TC6M) uma ferramenta viável, de baixo custo e validada para avaliar o desempenho durante o exercício submáximo nas pneumopatias intersticiais.^{50, 51}

Sua aplicação em doenças císticas mostrou correlação significativa entre o escore tomográfico e a distância caminhada em paciente com LAM e Histiocitose de Células de Langerhans.⁴⁴

A definição sobre qual parâmetro derivado do T6CM (distância caminhada ou a dessaturação) teria melhor correlação com os testes funcionais em pacientes com pneumopatia intersticial,⁵²⁻⁵⁴ sugere que a combinação destes dois parâmetros possa ser mais útil.

Baseado neste princípio foi delineado, por nosso grupo, um índice composto, denominado *Desaturation - Distance Ratio* (DDR) resultado da divisão entre a área de dessaturação da oxiemoglobina (ADO_2) e a distância caminhada.⁵⁵ O TC6M foi realizado com um *holter* de oximetria, sendo registradas 180 medidas da oximetria de pulso (SpO_2) durante os 360 segundos do teste. A ADO_2 era obtida subtraindo-se cada SpO_2 aferida de 100% (considerando 100% como a maior SpO_2 possível), em todas as 180 aferições. Os resultados das subtrações eram somados e multiplicados por dois, visto que o intervalo entre os registros era de dois segundos, obtendo-se assim a ADO_2 (conforme exemplificado na Figura 2).

Figura 2. *Desaturation-Distance Ratio* (DDR): Calculado usando a razão entre ADO_2 (área azul – obtida pela SpO_2 registrada a cada 2 segundos) e a distância caminhada durante o TC6M. No exemplo acima, a paciente apresentou $ADO_2 = 3900$ e caminhou 213 metros, resultando em um $DDR = 18,3$.

ADO_2 : área de dessaturação da oxiemoglobina; SpO_2 : oximetria de pulso

Resumindo: quanto maior for a ADO_2 , maior será o período de dessaturação durante a caminhada, e quanto menor for a distância percorrida, maior será o valor do DDR, refletindo pior capacidade funcional.

1.3.3.2. Teste de exercício cardiopulmonar

As alterações registradas no teste de exercício cardiopulmonar (TECP), em pacientes com LAM, podem estar relacionadas com limitação cardiovascular, fadiga muscular e limitação ventilatória e/ou de troca gasosa.⁴⁶ Embora o VEF_1 e a DL_{CO} possam prever o consumo máximo de oxigênio (VO_2 max), pacientes que apresentem função pulmonar normal podem desenvolver hipoxemia durante o exercício.⁴⁶

Foi observado que valores reduzidos do VO_{2max} estão correlacionados com pior escore de gravidade histológica, tornando o TECP uma importante ferramenta para predição de sobrevida em pacientes com LAM.²³

1.3.4. VEGF-D

O VEGF-D é uma proteína precursora que ao submeter-se à proteólise desencadeada pela plasmina, adquire alta afinidade pelo receptor tirosina-quinase presente na superfície do endotélio linfático (VEGFR-3). As células LAM produzem grande quantidade de plasmina, elevando os níveis de VEGF-D em pacientes com LAM.³⁶

Estudos mostraram associação entre os títulos séricos de VEGF-D e o envolvimento linfático³⁷ e função pulmonar em pacientes com LAM.³⁸

A implicação da dosagem do VEGF-D sérico no diagnóstico de LAM foi demonstrada recentemente, sendo obtidos valores para sensibilidade de 60% e para especificidade de 100%.³⁹

1.3.5. Biópsia

O método definido como padrão ouro para o diagnóstico da LAM é a biópsia a céu aberto, possibilitando a amostragem de parênquima e de vasos linfáticos e sanguíneos, evidenciando a invasão das células LAM.⁴⁷ No estudo histopatológico, observa-se a proliferação de células musculares lisas imaturas (células LAM), com características benignas e positividade para o antígeno α -actina de músculo liso. São evidenciados dois tipos celulares principais das células LAM: as epitelióides e as fusiformes. Estas células se agrupam em aglomerados noduliformes de vários tamanhos, sendo que as epitelióides são mais periféricas, com aspecto poligonal e imunorreatividade para o HMB-45 (*human melanoma black* - 45), enquanto que as fusiformes são centrais, semelhantes a miofibroblastos, com maior capacidade proliferativa e maior imunorreatividade para metaloproteinasas (MMP), principalmente MMP-2, além de MMP-1, -9 e -14 (Figura 3).^{1, 23, 26, 56}

Observa-se ainda a expressão de receptores de estrogênio e progesterona,²⁶ sendo sua primeira descrição em 1984, a partir de um trabalho realizado por nosso grupo, no HC-FMUSP.⁵⁷

Em pacientes submetidas à biópsia a céu aberto, a gravidade histológica da doença pode ser estabelecida através de um escore, onde se avalia a porcentagem de cistos e nódulos de células musculares lisas em substituição ao tecido pulmonar normal: escore 1- menor que 25%; escore 2- 25 a 50%; e escore 3- maior que 50%. Esse escore tem implicações prognósticas.²³

Figura 3. Células LAM: morfologia e marcadores imunohistoquímicos, obtidas de material de biópsia de paciente do estudo.

Aglomerado de células LAM, localizado na parede do cisto pulmonar. A seta rosa evidencia as células epitelióides; a seta amarela evidencia as células do tipo fusiforme, responsáveis pela produção das MMP.

HMB-45: *human melanoma black* - 45; MMP: metaloproteinase

1.4. Biologia celular e molecular da LAM e seus alvos terapêuticos

A compreensão das vias de sinalização e biomarcadores no processo fisiopatológico da LAM tem auxiliado na descoberta de opções diagnósticas e terapêuticas para esta afecção.

1.4.1. Biologia celular do complexo TSC1/TSC2

A compreensão do processo fisiopatológico da LAM iniciou-se na observação, em 1966, da similaridade entre as lesões da ET e da LAM-E.⁵⁸ A Esclerose Tuberosa é uma facomatose autossômica dominante, sendo relatado que a LAM pode acometer até 34% dos portadores desta doença.^{17, 59} Um mecanismo fisiopatogênico comum entre elas foi proposto em 1972, sendo a LAM considerada,

por muitos, uma forma frustra da ET.⁴ Posteriormente, foram identificadas mutações, em pacientes com ET, nos genes TSC1 ou TSC2 (supressores tumorais) localizados nos cromossomos 9q34 e 16p13, respectivamente.⁶⁰ Mutações adquiridas nesses genes são, provavelmente, a causa da LAM-E, tendo em vista que a perda de heterozigotidade (LOH) de TSC2 já foi relatada em células LAM de pulmões, angiomiolipomas e quilotórax de pacientes com LAM-E.^{22, 61-63} As mutações em TSC2 ocorrem mais frequentemente que aquelas em TSC1.²²

1.4.2. Biologia molecular do complexo hamartina / tuberina

Os genes supressores tumorais TSC1 e TSC2 codificam, respectivamente, proteínas denominadas hamartina e tuberina, as quais regulam o metabolismo celular (crescimento, mobilidade e sobrevivência) através da via de sinalização Akt / mTOR,^{5, 22} conforme ilustrado na Figura 4. Neste processo, o complexo hamartina/tuberina funciona como uma proteína ativadora da GTPase, regulando negativamente Rheb (*ras homologue enriched in brain*) por converter Rheb-GTP em Rheb-GDP e desse modo inativando Rheb e inibindo a mTOR (*mammalian target of rapamycin*).^{64, 65} A função maior da mTOR é ativar a proteína pS6 (*phosphorylation of S6*) via fosforilação de Ser240\244 (Figura 4).

A disfunção do complexo hamartina/tuberina resulta em perda da regulação da via de sinalização Akt/mTOR, podendo esta desregulação ocorrer a montante da via, como na sinalização do receptor de estrogênio (RE), na sinalização do PDGF (*platelet-derived growth factor*) ou naqueles relacionados ao receptor de superfície celular da tirosina quinase e ao receptor acoplado à proteína G.^{66, 67} Abaixo da via Akt/mTOR ocorre ativação constitutiva de mTOR quinase e S-6 kinase (S6K) levando ao aumento da translação de proteína e, por último, à uma proliferação celular exacerbada, migração e invasão das células LAM.²²

Figura 4. Esquema das vias de sinalização que participam do metabolismo molecular da LAM e seus potenciais alvos terapêuticos.*

PDGF: *platelet-derived growth factor*; RI: receptor de insulina; PI3K: *phosphoinositide 3-kinase*; PDK1: *phosphoinositide-dependent kinase 1*; RE: receptor de estrogênio; Akt: *protein kinase B*; TSC: *tuberous sclerosis complex*; Rheb: *ras homologue enriched in brain*; mTOR: *mammalian target of rapamycin*; S6K: *S-6 kinase*; pS6: *phosphorylation of S6*.

* adaptado de McCormack, *Chest* 2008

A proposta terapêutica para inibir a via Akt/mTOR é o sirolimus (Rapamicina), imunossupressor utilizado por pacientes transplantados renais e, mais recentemente, para prevenir a proliferação de células musculares lisas em *stents* cardiovasculares que forma um complexo que liga e bloqueia a mTOR, inibindo a proliferação de células LAM (Figura 4).⁵

Esta medicação foi testada em ratos portadores de mutação do TSC2, mostrando diminuição dos tumores renais e supressão da fosforilação da S6.⁶⁸

Um estudo não randomizado de 24 meses avaliou, como desfecho primário, o efeito do sirolimus sobre o volume dos AML de pacientes com LAM, seguidas posteriormente por 12 meses sem a droga. Os AML tiveram redução de 53% após 12 meses, tendo voltado a crescer após a cessação do tratamento. Na análise secundária foi observada melhora funcional em um subgrupo destas pacientes.⁶⁹

Em estudo mais recente com sirolimus, randomizado e placebo-controlado, as pacientes foram tratadas por 12 meses, seguidas por período de observação de 12 meses sem a medicação, sendo a dose inicial de 2 mg/dia, ajustada para nível sérico de 5 a 15 ng/mL. Os níveis de VEGF-D também foram dosados. As pacientes apresentavam VEF₁ e DL_{CO} basais de 48% e 43% do predito, respectivamente. Foi observado ganho ao final de 12 meses no VEF₁ e CVF do grupo sirolimus quando comparado à perda funcional no grupo placebo, com diferença significativa, além da redução expressiva dos títulos de VEGF-D do grupo tratado. No período observacional, houve queda semelhante do VEF₁ em ambos os grupos.⁷⁰

1.4.3. Linfangiogênese

A primeira descrição do acometimento linfático na LAM foi realizada em 1976,⁷¹ e a alteração histopatológica típica é a proliferação e dilatação de vasos linfáticos dentro de aglomerados de células LAM, com aspecto cístico ou em fenda.⁷²

Nos últimos 10 anos, houve um importante progresso no entendimento da linfangiogênese. Foram evidenciados marcadores imunohistoquímicos específicos do endotélio linfático, como o VEGF-R (*vascular endothelial growth factor receptor*) e PROX-1 (*transcription factor required for lymphatic vessel growth*), no material de biópsia de linfangioleiomiomas e linfonodos, além de marcadores como VEGF-D no sangue de pacientes com LAM.⁷³

Ninhos de células LAM revestidos por células endoteliais linfáticas foram evidenciados no interior de vasos linfáticos e em derrames pleural e peritoneal quiloso, sugerindo uma rota para a disseminação das células LAM para locais distantes.^{72, 74}

O sirolimus parece ser uma opção terapêutica na inibição do processo de linfangiogênese. Estudos laboratoriais evidenciaram a redução de vasos linfáticos

nos tumores de ratos TSC-2 *null* após o uso de sirolimus,⁷⁵ e relatos de caso mostraram resolução do derrame quiloso após tratamento com esta medicação.²²

1.4.4. Bloqueio hormonal

A maior parte do tratamento instituído para as pacientes com LAM tem sido baseado na terapia anti-estrogênica, tendo em vista a piora clínica descrita na gravidez e com uso de estrógenos, bem como a identificação de receptores de estrogênio e progesterona nas células de LAM.^{5, 12, 57, 76, 77} No entanto, todos estes estudos basearam-se em análise retrospectiva ou relatos de pequenas coortes de pacientes e nenhum foi placebo-controlado.

Foi demonstrado que o estradiol estimula o crescimento de angiomiolipomas humanos em ratos Eker TSC2 *null*⁵ e a ativação de receptores de estradiol nas células LAM aumenta a atividade das MMP-2.⁷⁸ A estimulação de receptores de estrogênio (RE) aparentemente ativam a via Akt/mTOR por caminho alternativo (Figura 4), podendo explicar a seletividade em relação ao sexo na LAM.²²

A progesterona tem sido usada em pacientes com LAM, tendo se mostrado efetiva em algumas séries de casos, como a de Taveira-DaSilva e colaboradores, na qual a progesterona (na dose intramuscular de 400 a 1600 mg mensal ou 10 a 60 mg por dia por via oral) promoveu melhora ou estabilização do VEF₁, porém sem significância estatística.⁴⁵ Outro estudo retrospectivo, não evidenciou incremento funcional, mostrando que o grupo tratado com progesterona não apresentou declínio menor no VEF₁ do que no grupo tratado.¹⁵

Os análogos de GnRh (*gonadotropin-releasing hormone*) também são opções terapêuticas para o bloqueio hormonal. A goserelina revelou-se eficaz em estabilizar a queda do VEF₁ em um pequeno grupo de pacientes⁷⁹, enquanto outro estudo mostrou perda funcional na vigência de triptorelina.⁸⁰ Outro tratamento utilizado foi a ooforectomia, sendo que não houve melhora em 15 de 30 pacientes submetidas à ooforectomia bilateral.³

As diretrizes da *European Respiratory Society* sugerem que a progesterona não deve ser usada rotineiramente em pacientes com LAM, podendo ser feito um ensaio terapêutico por 6 a 12 meses naqueles casos em que a doença apresenta caráter rapidamente progressivo ou grave.³⁵

Embora a LAM seja uma doença com predominância em mulheres pré-menopausadas, não há consenso na literatura em relação à indicação do bloqueio hormonal nesta doença.

1.4.5. Destruição cística e a expressão de metaloproteinases

A substituição do parênquima pulmonar por cistos nas pacientes com LAM resultam em limitação funcional e hipoxemia progressiva. A gênese da formação destes cistos ainda não está completamente esclarecida, porém o papel das metaloproteinases (MMP), enzimas capazes de degradar o colágeno e a elastina da matriz extracelular (MEC), vem sendo explorado.⁷

As células LAM do tipo fusiformes expressam MMP, componentes funcionais da MEC, responsáveis pelo remodelamento pulmonar e linfangiogênese, tendo sua atividade regulada pelos inibidores teciduais de MMP (TIMP).⁸¹ A degradação de fibras elásticas pôde ser observada nas áreas com proliferação de células musculares lisas, em biópsias de pulmão de pacientes com LAM, por meio de microscopia eletrônica.⁸² Na análise imunohistoquímica, observou-se significativa reatividade de MMP-2 e MMP-9 no tecido pulmonar de portadoras de LAM, quando comparado com pulmão normal.⁶ Matsui e colaboradores evidenciaram intensa atividade de MMP-2 nas células de pacientes com LAM, bem como de MT1-MMP, responsável por ativar a conversão da proenzima da MMP-2 na superfície da membrana celular.⁷ Glassberg e colaboradores demonstraram aumento na síntese e na atividade de MMP-2 em células musculares lisas derivadas de biópsia de pulmão com LAM, após tratamento com 17 β -estradiol, bem como a inibição desta atividade após exposição à doxiciclina.⁷⁸

Concordante com a hiperreatividade tecidual das MMPs descrita nas pacientes com LAM, Odajima e associados demonstraram títulos séricos e plasmáticos significativamente elevados de MMP -9 nestas pacientes, quando comparados a controles, quantificado por zimografia.⁸³

O mecanismo especulado para explicar o aumento da atividade MMP na LAM reside na produção exacerbada de plasmina, demonstrada nas lesões de LAM quando comparadas ao pulmão normal ao redor. A expressão do fator de transcrição *serum response factor* nas células LAM e a consequente estimulação dos seus alvos,

urokinase-type plasminogen activator (uPA) e plasminogênio, ocasiona a clivagem do plasminogênio pela uPA, gerando a plasmina protease, capaz de clivar os zimógenos da MMP, criando assim a metaloproteinase na sua forma ativa. Neste processo foi também evidenciada inibição do PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor*) e do TIMP-3.⁸⁴

Tem crescido o interesse no bloqueio das MMP como potencial alvo terapêutico. De fato, um relato de caso descreveu o uso de doxíciclina, um conhecido inibidor de MMP, em uma paciente com LAM em lista de transplante pulmonar. Após o tratamento por quatro meses, a paciente apresentou melhora no VEF₁ e na troca gasosa, concomitante à redução expressiva dos níveis de MMP dosados na urina.⁸⁵ Posteriormente, nosso grupo mostrou a redução dos níveis séricos de MMP-2 ($p=0,04$) e MMP-9 ($p=0,05$) e urinários de MMP-9 ($p=0,10$) em uma coorte de pacientes em nosso serviço, após o uso de doxíciclina na dose de 100 mg/dia por seis meses.⁸⁶

A doxíciclina, pertencente à família das tetraciclina, é usada na prática clínica pelo seu efeito antimicrobiano. Quando administrada em baixas doses, age sobre o remodelamento da MEC, migração e proliferação celular *in vitro* sendo este efeito causado, em parte, pela inibição das metaloproteinases.⁸⁷

Até o momento, não existem ensaios clínicos prospectivos que tenham avaliado a eficácia e a segurança do uso de doxíciclina no bloqueio das metaloproteinases em pacientes portadoras de LAM por um período superior a seis meses, bem como a influência deste bloqueio sobre os parâmetros funcionais, o que nos incentivou a delinear este estudo.

HIPÓTESE DO ESTUDO

2. HIPÓTESE DO ESTUDO

Devido ao possível bloqueio da atividade das MMP secundário ao uso de doxiciclina por pacientes com linfangioleiomiomatose, acreditamos que ocorrerá uma menor perda funcional nessas pacientes após 12 meses de tratamento.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos primários

Avaliar a eficácia do bloqueio induzido pela doxíciclina após 12 meses de tratamento através da dosagem dos níveis urinários e séricos de MMP-2 e MMP-9 em pacientes com LAM, comparadas com um grupo controle.

Avaliar a variação do VEF₁ após 12 meses de tratamento com doxíciclina.

3.2. Objetivos secundários

Analisar os efeitos da doxíciclina sobre as variáveis derivadas do TC6M, em particular o DDR, em pacientes com LAM após 12 meses de tratamento.

Avaliar o impacto da doxíciclina sobre a função pulmonar, qualidade de vida e dosagem de VEGF-D em pacientes com LAM.

Descrever os eventos adversos relacionados ao uso de doxíciclina em pacientes com LAM.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. Casuística

Todas as pacientes com diagnóstico de Linfangioleiomiomatose em acompanhamento no Ambulatório de Doenças Intersticiais do HC-FMUSP, no período de novembro de 2006 a julho de 2009, foram convidadas a participar do estudo.

O projeto foi previamente aprovado pelo Departamento de Cardiopneumologia e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq). As pacientes foram informadas sobre todos os aspectos inerentes ao protocolo de pesquisa e, após leitura e aceitação do termo de consentimento livre e esclarecido, foram incluídas no estudo.

As medicações previamente utilizadas pelas pacientes não foram alteradas durante o protocolo.

O critério de inclusão abrangeu pacientes com diagnóstico clínico-radiológico ou histopatológico estabelecido de linfangioleiomiomatose.

O critério de exclusão compreendeu pacientes submetidas a transplante pulmonar.

4.2. Delineamento do estudo

Ensaio clínico prospectivo não randomizado e não controlado, no qual as pacientes foram submetidas à prova de função pulmonar (PFP), a um teste de caminhada de seis minutos com *holter* de oximetria (TC6M), a um questionário de qualidade de vida relacionado à saúde e à coleta de amostras de sangue para dosagem de MMP-2, MMP-9 e VEGF-D e de urina para dosagem de MMP-2 e -9.

Após a realização dos exames, as pacientes receberam doxiciclina na dose de 100 mg/dia, repetindo a mesma avaliação após seis e 12 meses de uso da medicação.

4.3. Testes

4.3.1. Prova de função pulmonar

As medidas de fluxos e volumes pulmonares e de difusão, através da técnica do monóxido de carbono (DL_{CO}) foram mensuradas utilizando um pletismógrafo de corpo inteiro *Elite Series Medgraphics* (Saint Paul, MN, EUA) no Laboratório de Função Pulmonar do Hospital das Clínicas. Todos os testes foram realizados no mesmo aparelho, seguindo as recomendações determinadas pelas Diretrizes da Função Pulmonar da Sociedade Brasileira de Pneumologia.⁸⁸

Os parâmetros analisados foram capacidade vital forçada (CVF), volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1), relação VEF_1/CVF , capacidade pulmonar total (CPT), volume residual (VR), relação VR/CPT e DL_{CO} . Os cálculos utilizados para determinar os valores preditos foram delineados por Pereira e colaboradores para espirometria, e por Neder e colaboradores para volumes pulmonares e DL_{CO} , tendo como referência a população brasileira.⁸⁹⁻⁹¹

4.3.2. Teste de caminhada

O TC6M foi realizado por um médico treinado, utilizando um corredor plano de 30 metros de comprimento, demarcado nas extremidades por pinos de sinalização, seguindo as recomendações da *American Thoracic Society* (ATS), conforme Figura 5.⁹² As pacientes foram orientadas a caminhar o mais rápido que pudessem, durante seis minutos, podendo realizar paradas temporárias ou reduzir a velocidade caso sentissem algum desconforto. Pacientes que nunca realizaram um TC6M submeteram-se a um prévio, respeitando-se um período de pelo menos 20 minutos de repouso para a realização do teste definitivo.

A distância caminhada era registrada em metros e a escala de Borg usada para avaliação de dispneia e fadiga em membros inferiores, era aplicada antes e imediatamente ao final do teste.⁹³

Quadro 1. Escala de Borg

0	Nenhuma
0,5	Muito, muito leve
1	Muito leve
2	Leve
3	Moderada
4	Pouco intensa
5	Intensa
6	
7	Muito intensa
8	
9	Muito, muito intensa
10	Máxima

Foi utilizado um *holter* de oximetria da marca NONIN *WristOx* 3100 (Plymouth, MN, EUA) com sensor do tipo *PureLight* LED que permite registrar a dessaturação da oxiemoglobina com maior acurácia. O *holter* era fixado ao punho da paciente e o sensor no dedo indicador, conforme mostra a Figura 5. Durante o teste de caminhada, o aparelho registrava a SpO₂ em ar ambiente e a frequência cardíaca, a cada 2 segundos, durante os 360 segundos, resultado assim em 180 aferições. Os dados gravados eram então transferidos para um computador, analisados utilizando o *nVISION software* (Plymouth, MN, EUA), conforme Anexo A, e então exportados para uma planilha do EXCEL 4.0.

A partir destas variáveis era calculado o DDR, resultado da divisão entre a área de dessaturação da oxiemoglobina (ADO_2) e a distância caminhada, conforme discutido anteriormente.

Figura 5. Teste de caminhada

A. *Holter* de oximetria de pulso fixado no punho da paciente, registrando a SpO_2 e a frequência cardíaca.

B. Corredor de 30 metros, com pinos de sinalização nas extremidades e marcação a cada 3 metros.

Além do DDR, os outros parâmetros extraídos e analisados do TC6M foram a SpO_2 basal, a SpO_2 mínima (sustentada por um período maior ou igual a 10 segundos), o índice de Borg e a distância caminhada, representada tanto em metros quanto em porcentagem dos valores preditos, tendo como referência a população brasileira.⁹⁴

4.3.3. Qualidade de vida relacionada à saúde

Todas as pacientes responderam ao questionário genérico de qualidade de vida *short-form* com 36 questões (SF-36), validado para língua portuguesa (Anexo B).⁹⁵⁻⁹⁷

O SF-36 é um questionário multidimensional, de fácil administração e compreensão, composto por 36 itens, englobados em dois domínios maiores (saúde física e saúde mental), subdivididos em oito domínios menores, com escore final de 0 a 100, quais sejam:

1. Capacidade física
2. Limitações usuais devido a aspectos físicos
3. Dor
4. Saúde geral
5. Vitalidade
6. Limitações usuais devido a aspectos emocionais
7. Bem estar emocional
8. Desempenho social

4.3.4. Coleta de sangue e urina

Foram coletadas amostras de pacientes com LAM e igualmente de 10 mulheres saudáveis, padronizadas como controles.

4.3.4.1. Metaloproteinases -2 e -9

As amostras de sangue e urina foram coletadas em frasco seco e, logo após, centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 minutos e armazenadas a -80° C para posterior análise.

Os níveis sérico e urinário de MMP -2 e -9 (R&D System, Inc., Minneapolis, MN, EUA) foram mensurados através do método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent*

assay) em acordo com as instruções do fabricante. Placas com 96 poços (Costar/Corning, Inc., Cambridge, USA) foram sensibilizadas com 100µL de anticorpo monoclonal e incubadas por 18 horas a 4°C. Posteriormente, a placa foi bloqueada, para evitar ligações inespecíficas com 300µL de solução de bloqueio (BSA 2%) e incubada por 2 horas a 37°C. Após o bloqueio, foi adicionado 100µL por poço das amostras e dos padrões diluídos previamente em PBS. A placa foi incubada por 18 horas a 4°C. sendo então adicionados 100µL do anticorpo conjugado (biotinilado) e, após período de incubação, foram adicionados 100µL de Streptavidina HRP (1:250) por poço e incubado por mais 30 minutos a 37°C.

A revelação foi realizada através da adição de 100µL da Solução de Revelação (H₂O₂ + Tetrametilbenzidina) por poço e incubado de 5 a 30 minutos a 37°C de acordo com cada proteína. A reação foi parada com 50µL de H₂SO₄ 30% por poço e agitado lentamente.

Os títulos de MMP foram quantificados por comparação de densidade óptica no leitor de ELISA (Power Wave, Bio-tek, EUA) utilizando filtro de 450nm. O limite de detecção para MMP -2 foi de 156,2 pg/mL e para MMP -9 de 15,6 pg/mL.

4.3.4.2. VEGF-D

A análise e quantificação do VEGF-D foi realizada apenas em amostras séricas, sendo igualmente coletadas em tubo seco, seguindo a mesma técnica descrita acima. O limite de detecção para VEGF-D foi de 15,6 pg/mL.

4.4. Desfechos

4.4.1. Desfechos primários

Bloqueio de MMP-2 e MMP-9 sérica e urinária após o uso de doxiciclina por 12 meses.

Variação do VEF₁ em mL após o uso de doxiciclina por 12 meses.

4.4.2. Desfechos secundários

Variação do DDR após 12 meses do uso de doxiciclina.

Medida dos fluxos (CVF, VEF1/CVF) e volumes pulmonares (CPT, VR, VR/CPT), da difusão do monóxido de carbono, das variáveis do TC6M como a distância caminhada e a SpO₂ mínima e a dosagem de VEGF-D, antes e após 12 meses de doxiciclina.

4.5. Análise Estatística

As variáveis paramétricas, definidas pela curva de normalidade no histograma, foram expressas em média e desvio-padrão (DP) e comparadas por teste t de *Student*. Variáveis não paramétricas foram expressas através de mediana e intervalo interquartil (IQ) e comparadas utilizando o teste de *Wilcoxon* para as pareadas e o teste de *Mann-Whitney* para variáveis não-pareadas. Variáveis categóricas foram comparadas utilizando-se o teste exato de *Fisher*. A significância estatística foi assumida para valores de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o *software* SPSS 15.0 (SPSS. Inc. Chicago, IL, EUA).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Casuística e características clínico-demográficas

No período de 2006 a 2009, foram arroladas 42 pacientes com diagnóstico de LAM em acompanhamento no Ambulatório de Doenças Intersticiais do HC-FMUSP. Durante o recrutamento para o protocolo, uma paciente foi excluída por ter sido submetida a transplante pulmonar sendo, portanto, iniciada doxiciclina na dose de 100 mg/dia para 41 pacientes.

Durante o estudo, 10 pacientes perderam o seguimento, sendo duas por piora dos sintomas respiratórios (uma admitida em lista de transplante pulmonar após quatro semanas do início do protocolo e outra transplantou após 6 meses de tratamento); três por eventos adversos relacionados à doxiciclina (descritos posteriormente) e cinco pacientes desistiram do protocolo (uma optou por tratamento homeopático; uma transferiu-se para outro estado; três optaram por interromper a medicação após 6 meses pois não notaram melhora clínica, mas permaneceram em acompanhamento) .

Ao final do seguimento, 31 pacientes completaram 12 meses de tratamento. Na Tabela 1 constam os dados demográficos e clínicos das pacientes.

Tabela 1 - Dados demográficos e clínicos das 41 pacientes com LAM, no momento do início do protocolo e das 31 pacientes que completaram 12 meses de tratamento .

	n = 41	n = 31
Características		
Idade em anos (DP)	44 (9)	43 (8)
Tempo até diagnóstico em meses (IQ) [†]	12 (8-24)	9 (6-24)
Clínica n (%)		
Tabagismo prévio	10 (24)	9 (29)
Esclerose Tuberosa	5 (12)	4 (13)
Dispneia	32 (78)	23 (74)
Hemoptise	6 (15)	5 (16)
Derrame quiloso	5 (12)	4 (13)
Pneumotórax	28 (68)	21 (68)
Angiomiolipoma	16 (39)	13 (42)
Linfangioleiomiomas	4 (10)	3 (10)
Diagnóstico n (%)		
Histopatológico	37 (90)	29 (94)
Biópsia pulmonar	35 (85)	27 (87)
Biópsia extrapulmonar	2 (5)	2 (7)
Clínico-radiológico	4 (10)	2 (6)
Bloqueio hormonal n (%)		
Análogo de GnRh	18 (44)	14 (45)
Ooforectomia	6 (15)	4 (13)
Menopausa	8 (20)	4 (13)

n = número de pacientes; m = meses; GnRh = gonadotropin-releasing hormone; DP = desvio padrão; IQ= interquartile.

* os valores foram distribuídos em média (DP) ou mediana (IQ).

[†] período de tempo, em meses, entre o início dos sintomas e o diagnóstico

5.2. Características funcionais, qualidade de vida e títulos de VEGF-D das 31 pacientes com LAM que completaram o estudo

5.2.1. Função pulmonar

As pacientes apresentavam obstrução leve associada ao aumento de relação VR/CPT e redução leve da DL_{CO} ao início do protocolo, conforme demonstrado na Tabela 2. Após 12 meses do uso de doxiciclina, foi observada redução de 70 mL na média do VEF_1 e de 0,24 mL/min/mmHg na média da DL_{CO} .

Tabela 2 - Função pulmonar de 31 pacientes com LAM, antes e após 12 meses de tratamento com doxiciclina *

Variáveis	Basal	12° mês	p
	n = 31	n = 31	
CVF em litros (DP)	3,17 (0,6)	3,19 (0,6)	0,792
% predito (DP)	92,2 (13,9)	92,6 (14,3)	0,751
VEF_1 em litros (DP)	2,24 (0,7)	2,17 (0,7)	0,034
% predito (DP)	78,9 (23,2)	76,7 (24,6)	0,042
VEF_1 / CVF (DP)	0,70 (0,2)	0,67 (0,2)	0,003
CPT em litros (DP)	5,03 (0,8)	5,09 (0,7)	0,408
% predito (DP)	103,4 (13,9)	104,8 (13,8)	0,393
VR em litros (DP)	1,82 (0,6)	1,91 (0,7)	0,263
% predito (DP)	130,4 (47,3)	136,8 (52,5)	0,282
VR / CPT (DP)	0,36 (0,08)	0,37 (0,1)	0,295
DL_{CO} em mL/min/mmHg (DP) [†]	17,0 (6,8)	16,76 (6)	0,713
% predito (DP)	65,2 (24,8)	64,3 (22)	0,745

n = número de pacientes; DP = desvio padrão; CVF = capacidade vital forçada; VEF₁ = volume expirado ao final do primeiro segundo; CPT = capacidade pulmonar total; VR = volume residual; DLco = difusão de monóxido de carbono.

* os valores foram distribuídos em média (DP); as variáveis foram comparadas utilizando teste t de *Student*.

† duas pacientes não realizaram difusão.

5.2.2. Teste de caminhada

Ao início do protocolo, as pacientes apresentaram um valor predito médio para a distância caminhada de 90%, com mediana SpO₂ mínima ao final do TC6M de 94% e mediana do DDR de 4,0, conforme Tabela 3.

Na análise do TC6M, foi evidenciado incremento de 25 metros na média da distância percorrida, estabilização da SpO₂ basal e queda de um ponto na SpO₂ mínima após tratamento com doxiciclina (Tabela 3). Houve redução de 4,0 para 3,8 na mediana do DDR, seguindo a mesma tendência das outras variáveis.

Tabela 3 - Dados do TC6M de 31 pacientes com LAM, antes e após 12 meses de tratamento com doxiciclina *

Variáveis [†]	Basal n = 31	12° mês n = 30	p
Distância			
metros (DP)	490 (109)	515 (90)	0,132
% pred (DP)	90 (20)	95 (17)	0,113
SpO ₂ basal (IQ)	96 (95 - 98)	96 (94 - 97)	0,282
SpO ₂ mínima (IQ)	94 (87 - 95)	93 (85 - 95)	0,02
Borg dispneia			
inicial (IQ)	0 (0 -0)	0 (0 -0)	0,748
final (IQ)	2 (1 - 3,5)	2,5 (1 - 3)	0,968
Borg MMII			
inicial (IQ)	0 (0 -0)	0 (0 -0)	0,458
final (IQ)	0 (0 - 1,5)	0 (0 - 2)	0,875
DDR (IQ)	4,0 (2,3 - 6,7)	3,8 (2,3 - 9,1)	0,28

n = número de pacientes; DP = desvio padrão; IQ= interquartil; SpO₂ = oximetria de pulso; MMII = membros inferiores; DDR = *desaturation distance ratio*; pred = valor predito.

* os valores representados em média (DP) foram comparados pelo teste t *Student* e aqueles em mediana (IQ) foram comparados pelo teste de *Wilcoxon*.

[†] uma paciente não realizou o TC6M no 12o. mês.

5.2.3. Qualidade de vida

Ao início do protocolo, os domínios do SF-36 em que as pacientes apresentaram menor pontuação, e, portanto pior desempenho, foram o de limitação por aspectos físicos, vitalidade e bem estar emocional, conforme Tabela 4.

A análise do questionário SF-36 revelou melhora nas medianas dos domínios limitação por aspectos físicos e bem estar emocional após 12 meses de doxiciclina, além de estabilização na maioria dos outros domínios, conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Qualidade de vida (SF-36) de 31 pacientes com LAM, antes e após 12 meses de tratamento com doxiciclina *

Domínios	Basal n = 31	12º mês n = 31	p
Saúde física			
Capacidade física	70 (60 - 85)	70 (50 - 88)	0,465
Limitação por aspectos físicos	50 (50 - 50)	75 (25 - 100)	0,054
Dor	78 (56 - 95)	70 (58 - 90)	1
Saúde geral	75 (48 - 80)	75 (58 - 80)	0,717
Saúde mental			
Vitalidade	65 (53 - 80)	65 (55 - 80)	0,611
Limitação por aspectos emocionais	100 (33 - 100)	100 (67 - 100)	0,147
Bem estar emocional	62 (52 - 84)	80 (58 - 84)	0,006
Desempenho social	88 (56 - 94)	88 (63 - 100)	0,165

* todos os valores foram expressos em mediana (IQ) e as comparações realizadas pelo teste de Wilcoxon.

5.2.4. Dosagem de VEGF-D

Foram coletadas amostras de sangue de 10 mulheres saudáveis, utilizadas como controles, e de 31 pacientes com LAM.

Os controles compreenderam mulheres sem doenças respiratórias ou outras comorbidades e sem história prévia de tabagismo, com idade média (DP) de 40 (4) anos, não apresentando diferença estatística quando comparadas às pacientes com LAM ($p=0,29$). A mediana (IQ) dos níveis séricos dos controles foi de 185 pg/mL (142 - 247), havendo diferença estatística quando comparada à mediana das pacientes (Figura 6).

Houve aumento discreto dos níveis séricos de VEGF-D ao final do protocolo, sendo a mediana (IQ) basal e após 12 meses de doxiciclina, respectivamente, 821 ng/mL (407-2.113) e 913 ng/mL (313-2.262), com $p=0,59$.

Figura 6. Títulos de VEGF-D sérico de 31 pacientes em uso de doxiciclina, coletados no mês basal, 6º mês e 12º mês do protocolo, bem como de 10 controles [†]

[†] duas pacientes não coletaram amostra no mês basal e três pacientes não coletaram no 6º mês e no 12º mês.

5.3. Análise dos desfechos primários

5.3.1. Bloqueio de metaloproteinases

Os controles compreenderam mulheres sem doenças respiratórias ou outras comorbidades e sem história prévia de tabagismo, com idade média (DP) de 40 (4) anos, não apresentando diferença estatística quando comparadas às pacientes com LAM ($p=0,29$).

Houve bloqueio efetivo sobre a MMP-9 urinária, sendo a mediana (IQ) pré-doxiciclina de 10.487 pg/mL (4.565-20.963) e de 4.061 pg/mL (712-9.985) após 12 meses de doxiciclina ($p<0,001$), conforme mostra a Figura 7. A MMP-2 sérica apresentou bloqueio igualmente significativo, sendo a mediana (IQ) basal de 0 pg/mL (0-833) e de 0 pg/mL (0-179) após 12 meses de tratamento ($p=0,005$).

Não houve mudança significativa nos níveis séricos de MMP-9 após o tratamento, sendo as medianas (IQ) do mês basal e 12º mês, respectivamente, 933 ng/mL (730-1.202) e 1.045 ng/mL (809-1.256), conforme mostra a Figura 8.

Os níveis urinários de MMP-2 não foram detectados nas pacientes com LAM.

As medianas (IQ) dos níveis séricos e urinários da MMP-9 dos controles foram, respectivamente, 89,9 ng/mL (80-120) e 200 pg/mL (89-263). Quando comparados com os títulos das pacientes houve diferença significativa na MMP-9 sérica ($p<0,0001$) e na MMP-9 urinária ($p<0,0001$). Os títulos de MMP-2 sérica e urinária não foram detectados nos controles.

Figura 7. Títulos de MMP-9 urinária de 31 pacientes em uso de doxiciclina, coletados no mês basal, 6º mês e 12º mês do protocolo, bem como de 10 controles [†]

[†] duas pacientes não coletaram amostra no mês basal e no 12º mês e três pacientes não coletaram no 6º mês.

Figura 8. Títulos de MMP-9 sérica de 31 pacientes em uso de doxiciclina, coletados no mês basal, 6º mês e 12º mês do protocolo, bem como de 10 controles [†]

[†] duas pacientes não coletaram amostra no mês basal e no 12º mês e três pacientes não coletaram no 6º mês.

5.3.2. Variação do VEF₁

As 31 pacientes foram divididas em dois grupos, de acordo com a variação do VEF₁, sendo o primeiro grupo compreendido por 13 pacientes em que o VEF₁ permaneceu estável ou aumentou (G1) e o segundo abrangeu 18 pacientes que apresentaram queda no VEF₁ (G2), após 12 meses de doxiciclina (Figura 9).

No grupo G1, as médias (DP) do VEF₁ em litros, obtidas no mês basal, 6º e 12º mês foram, respectivamente, 2,31 (0,42), 2,38 (0,5) e 2,4 (0,45). No grupo G2, as médias (DP) foram 2,19 (0,86), 2,0 (0,88) e 2,01 (0,85) respectivamente, nos mesmos períodos.

Figura 9. Distribuição das 31 pacientes com LAM em dois grupos de acordo com a variação do VEF₁ após 12 meses do uso de doxiciclina *

* G1 = grupo em que o VEF₁ aumentou ou estabilizou; G2 = grupo em que o VEF₁ diminuiu

A mediana (IQ) da variação do VEF₁ em mL no grupo G1 foi de 70 mL (30 - 110) e no grupo G2 foi de - 140 mL [-260 - (- 110)], havendo diferença significativa entre estas medianas (Figura 10). A mediana da variação da CVF também seguiu a mesma tendência, havendo ganho de 170 mL (30 - 250) no G1 e perda de - 20mL [-300 -(-80)] no G2 ($p=0,005$).

Figura 10. Variação das medianas da diferença do VEF₁ e da CVF entre o 12º mês e o mês basal do tratamento com doxiciclina. As 31 pacientes foram divididas em dois grupos, sendo o G1 constituído daquelas que estabilizaram ou melhoraram o VEF₁ e o G2 as pacientes que diminuíram o VEF₁

Nas Tabelas 5 e 6, estão demonstrados os parâmetros funcionais e os níveis de MMP-2, MMP-9 e VEGF-D antes e após doxíciclina das 31 pacientes, divididas nos grupos G1 e G2 de acordo com a variação do VEF₁.

Apesar da maioria das variáveis funcionais não apresentarem aumento significativo em seus valores após o uso de doxíciclina, observou-se que o grupo que apresentou aumento no VEF₁ (G1) mostrava melhor perfil funcional que o grupo G2.

Os títulos de VEGF-D mostraram-se superiores no grupo com pior perfil funcional (G2).

Os títulos de MMP-2 sérica e MMP-9 urinária apresentaram redução em ambos os grupos, sendo mais efetiva no grupo G2. Foi evidenciado aumento nos níveis séricos de MMP-9 em ambos os grupos, mas sem significância estatística.

Tabela 5 - Parâmetros funcionais e títulos de MMP e VEGF-D do grupo G1, antes e após doxíciclina *

Variáveis	G1 (n = 13)		
	pré - doxi	pós - doxi	p
CVF em litros (DP)	3 (0,3)	3,2 (0,3)	0,02
VEF ₁ em litros (DP)	2,31 (0,4)	2,4 (0,4)	0,003
VEF ₁ /CVF (DP)	0,77 (0,1)	0,76 (0,1)	0,17
CPT em litros (DP)	4,6 (0,5)	4,8 (0,6)	0,31
VR em litros (DP)	1,6 (0,5)	1,6 (0,6)	0,96
VR/CPT (DP)	0,34 (0,08)	0,33 (0,08)	0,64
DLco em mL/min/mmHg (DP)	18,5 (6)	18 (5)	0,51
SpO ₂ mínima (IQ)	94 (93-95)	94 (91-95)	0,5
Distância em metros (DP)	515 (66)	523 (52)	0,63
DDR (IQ)	3 (2,2-4,2)	3,5 (2,6-5,1)	0,18
MMP-2 sérica (IQ)	0 (0-182)	0 (0-40)	0,14
MMP-9 sérica (IQ)	837 (716-1033)	1103 (773-1237)	0,33
MMP-9 urinária (IQ)	8905 (5607-21829)	6735 (674-8983)	0,05
VEGF-D (IQ)	413 (277-2113)	328 (257-2008)	0,37

* os valores representados em média (DP) foram comparados pelo teste t *Student* e aqueles em mediana (IQ) foram comparados pelo teste de *Wilcoxon*

Tabela 6 - Parâmetros funcionais e títulos de MMP e VEGF-D do grupo G2, antes e após doxíciclina *

Variáveis	G2 (n = 18)		
	pré - doxi	pós - doxi	p
CVF em litros (DP)	3,2 (0,7)	3,2 (0,7)	0,114
VEF ₁ em litros (DP)	2,2 (0,9)	2 (0,9)	<0,001
VEF ₁ /CVF (DP)	0,65 (0,2)	0,61 (0,2)	0,009
CPT em litros (DP)	5,3 (0,8)	5,3 (0,7)	0,922
VR em litros (DP)	2 (0,6)	2,1 (0,7)	0,129
VR/CPT (DP)	0,37 (0,08)	0,4 (0,11)	0,032
DLco em mL/min/mmHg (DP)	15,9 (7,5)	15,8 (6,6)	0,967
SpO ₂ mínima (IQ)	92,5 (83-95)	92 (78-95)	0,087
Distância em metros (DP)	472 (130)	509 (112)	0,119
DDR (IQ)	5,2 (2,6-10,4)	4,4 (2,2-10)	0,523
MMP-2 sérica (IQ)	188 (0-905)	0 (0-214)	0,017
MMP-9 sérica (IQ)	1011 (748-1272)	1042 (809-1307)	0,756
MMP-9 urinária (IQ)	10487 (4526-15653)	3970 (765-9985)	0,001
VEGF-D (IQ)	995 (535-2000)	1124 (810-2262)	0,211

* os valores representados em média (DP) foram comparados pelo teste t *Student* e aqueles em mediana (IQ) foram comparados pelo teste de *Wilcoxon*

As Tabelas 7 e 8 demonstram a análise da qualidade de vida antes e após a doxíciclina das 31 pacientes, divididas nos grupos G1 e G2 de acordo com a variação do VEF₁. Observa-se melhora das medianas em seis dos oito domínios no grupo G1, especialmente no desempenho social (p=0,04) e na limitação por aspectos físicos (p=0,02). Em contrapartida, houve melhora das medianas em apenas dois domínios no grupo G2, mas sem significância estatística.

Tabela 7 - Domínios do questionário de qualidade de vida SF-36, antes e após doxiciclina, no grupo G1 *

Domínios	G1 (n = 13)		
	pré - doxi	pós - doxi	p
Saúde física			
Capacidade física	75 (65-85)	80 (75-95)	0,28
Limitação por aspectos físicos	50 (50-50)	100 (50-100)	0,02
Dor	57,5 (55-90)	70 (55-77,5)	1
Saúde geral	80 (45-90)	75 (70-85)	0,41
Saúde mental			
Vitalidade	70 (45-90)	70 (70-85)	0,43
Limitação por aspectos emocionais	33 (33-100)	100 (33-100)	0,16
Bem estar emocional	68 (40-84)	76 (52-88)	0,05
Desempenho social	75 (50-87,5)	87,5 (62,5-100)	0,04

* os valores foram representados em mediana (IQ) e foram comparados pelo teste de *Wilcoxon*

Tabela 8 - Domínios do questionário de qualidade de vida SF-36, antes e após doxiciclina, no grupo G2 *

Domínios	G2 (n = 18)		
	pré - doxi	pós - doxi	p
Saúde física			
Capacidade física	70 (51-84)	62,5 (46-81)	0,084
Limitação por aspectos físicos	50 (50-50)	50 (25-100)	0,668
Dor	79 (60-97,5)	67,5 (57,5-90)	0,821
Saúde geral	70 (51-80)	67,5 (50-80)	0,905
Saúde mental			
Vitalidade	62,5 (55-79)	65 (55-80)	0,954
Limitação por aspectos emocionais	100 (33-100)	100 (67-100)	0,426
Bem estar emocional	66 (57-83)	80 (63-84)	0,053
Desempenho social	87,5 (75-97)	87,5 (62,5-97)	1

* os valores foram representados em mediana (IQ) e foram comparados pelo teste de *Wilcoxon*

Após a análise dos grupos, alguns marcadores funcionais de resposta à doxiciclina foram evidenciados, quando comparados os grupos G1 e G2 antes do início da medicação, tendo em vista a diferença funcional entre eles (Tabela 9). Pacientes que se apresentavam menos obstruídas (maior VEF_1 / CVF) e com menor CPT e VR no momento do início do protocolo, foram aquelas que responderam melhor à doxiciclina. Os títulos de MMP não marcaram resposta à doxiciclina.

Tabela 9 - Marcadores funcionais de resposta à doxiciclina *

Variável	Pré - doxiciclina		
	G1	G2	p
CVF em litros (DP)	3 (0,3)	3,2 (0,7)	0,12
VEF ₁ / CVF (DP)	0,77 (0,1)	0,65 (0,2)	0,031
CPT em litros (DP)	4,6 (0,5)	5,3 (0,8)	0,006
VR em litros (DP)	1,6 (0,5)	2 (0,6)	0,087
DLco em mL/min/mmHg (DP)	18,5 (6)	15,9 (7,5)	0,297

* as comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o teste de *Mann-Whitney*

5.4. Análise do desfecho secundário - DDR

As pacientes foram divididas em dois grupos, de acordo com o delta de variação do DDR após 12 meses de tratamento com doxiciclina. Das 31 pacientes, um total de 30 participaram desta análise, visto que uma paciente não realizou o TC6M no 12º mês.

O grupo definido como DDR1 apresentou redução no DDR após 12 meses de doxiciclina, sendo considerado, portanto, como grupo respondedor, visto que a queda no DDR corresponde a melhor desempenho funcional no TC6M. O grupo DDR2 apresentou aumento no DDR, sendo considerado o grupo não respondedor, refletindo pior desempenho no TC6M (Figura 11).

A mediana de variação do DDR encontrada no grupo DDR1 foi de - 0,7 [-1,5 - (-0,3)] e no grupo DDR2 foi de 0,9 (0,4 - 3,1).

Figura 11. Desfecho secundário: variação do DDR após 12 meses do tratamento com doxiciclina.

Nas Tabelas 10 e 11 estão demonstrados os parâmetros funcionais e os níveis de MMP-2, MMP-9 e VEGF-D antes e após doxiciclina das 30 pacientes, divididas nos grupos DDR1 e DDR2 de acordo com a variação do DDR.

Tabela 10 - Parâmetros funcionais e títulos de MMP e VEGF-D do grupo DDR1, antes e após doxíciclina *

Variável	DDR1 (n = 12)		
	pré - doxi	pós - doxi	p
DDR (IQ)	3,9 (2,7-8)	3,0 (2-6)	0,002
CVF em litros (DP)	3,2 (0,4)	3,2 (0,4)	0,683
VEF ₁ em litros (DP)	2,2 (0,6)	2,1 (0,7)	0,048
VEF ₁ /CVF (DP)	0,69 (0,16)	0,68 (0,17)	0,204
CPT em litros (DP)	5 (0,7)	5 (0,8)	0,79
VR em litros (DP)	1,7 (0,4)	1,9 (0,6)	0,197
VR/CPT (DP)	0,34 (0,05)	0,37 (0,08)	0,16
DLco em mL/min/mmHg (DP)	17,5 (7,5)	15,7 (5,3)	0,071
SpO ₂ mínima (IQ)	94 (85-95)	95 (82-97)	0,394
Distância em metros (DP)	488 (114)	519 (104)	0,044
MMP-2 sérica (IQ)	0 (0-593)	0 (0-170)	0,08
MMP-9 sérica (IQ)	876 (679-1172)	1144 (796-1257)	0,534
MMP-9 urinária (IQ)	13426 (4506-22696)	2322 (674-7721)	0,008
VEGF-D (IQ)	996 (435-2056)	736 (377-1339)	0,722

* os valores representados em média (DP) foram comparados pelo teste t *Student* e aqueles em mediana (IQ) foram comparados pelo teste de *Wilcoxon*

DDR1: grupo em que o DDR diminuiu após o uso de doxíciclina, refletindo melhora funcional;

DDR2: grupo em que o DDR aumentou, refletindo piora funcional

Tabela 11 - Parâmetros funcionais e títulos de MMP e VEGF-D do grupo DDR2, antes e após doxíciclina *

Variável	DDR2 (n = 18)		
	pré - doxi	pós - doxi	p
DDR (IQ)	3,7 (2,2-6,3)	4,4 (2,7-9,6)	< 0,001
CVF em litros (DP)	3,2 (0,6)	3,2 (0,7)	0,863
VEF ₁ em litros (DP)	2,3 (0,7)	2,3 (0,7)	0,178
VEF ₁ /CVF (DP)	0,72 (0,15)	0,70 (0,16)	0,016
CPT em litros (DP)	5 (0,7)	5,1 (0,7)	0,318
VR em litros (DP)	1,8 (0,5)	1,8 (0,6)	0,575
VR/CPT (DP)	0,35 (0,08)	0,36 (0,10)	0,804
DLco em mL/min/mmHg (DP)	17,3 (6,1)	18 (6)	0,379
SpO ₂ mínima (IQ)	94 (89-96)	92 (87-95)	0,012
Distância em metros (DP)	509 (81)	513 (82)	0,767
MMP-2 sérica (IQ)	0 (0-833)	0 (0-192)	0,028
MMP-9 sérica (IQ)	933 (749-1202)	987 (754-1275)	0,427
MMP-9 urinária (IQ)	6787 (5524-13971)	4917 (655-10734)	0,02
VEGF-D (IQ)	580 (383-2115)	936 (312-2332)	0,433

* os valores representados em média (DP) foram comparados pelo teste t *Student* e aqueles em mediana (IQ) foram comparados pelo teste de *Wilcoxon*

Houve redução significativa da relação VEF₁/CVF no grupo DDR2, porém houve redução, igualmente significativa, do VEF₁ no grupo DDR1.

A variação da DL_{CO} após doxíciclina não acompanhou a variação do DDR, apresentando declínio no grupo DDR1 e aumento no DDR2, porém os valores não foram significativos. Conforme esperado, houve melhora na distância caminhada (p = 0,044) e na SpO₂ mínima no grupo DDR1.

Houve redução nos níveis séricos da MMP-2 e urinários da MMP-9, em ambos os grupos, principalmente no grupo DDR1.

As Tabelas 12 e 13 demonstram a análise da qualidade de vida antes e após a doxiciclina das 30 pacientes, divididas nos grupos DDR1 e DDR2.

Tabela 12 - Domínios do questionário de qualidade de vida SF-36 do grupo DDR1, antes e após doxiciclina *

Domínios	DDR1 (n = 12)		
	pré - doxi	pós - doxi	p
Saúde física			
Capacidade física	78 (61-86)	70 (65-88)	0,873
Limitação por aspectos físicos	50 (50-50)	80 (25-100)	0,193
Dor	85 (65-100)	75 (65-90)	0,244
Saúde geral	73 (53-81)	70 (60-80)	0,532
Saúde mental			
Vitalidade	65 (50-81)	65 (59-80)	0,821
Limitação por aspectos emocionais	100 (33-100)	100 (58-100)	0,596
Bem estar emocional	68 (51-89)	80 (58-85)	0,182
Desempenho social	88 (50-100)	81 (63-91)	0,599

* os valores foram representados em mediana (IQ) e foram comparados pelo teste de *Wilcoxon*
 DDR1: grupo em que o DDR diminuiu após o uso de doxiciclina, refletindo melhora funcional;
 DDR2: grupo em que o DDR aumentou, refletindo piora funcional

Tabela 13 - Domínios do questionário de qualidade de vida SF-36 do grupo DDR2, antes e após doxíciclina *

Domínios	DDR2 (n = 18)		
	pré - doxi	pós - doxi	p
Saúde física			
Capacidade física	70 (61-85)	75 (50-89)	0,268
Limitação por aspectos físicos	50 (50-50)	75 (31-100)	0,136
Dor	63 (48-90)	64 (58-79)	0,637
Saúde geral	78 (51-80)	75 (56-80)	0,954
Saúde mental			
Vitalidade	70 (60-79)	75 (56-84)	0,69
Limitação por aspectos emocionais	83 (33-100)	100 (67-100)	0,339
Bem estar emocional	68 (61-79)	78 (57-84)	0,022
Desempenho social	81 (75-88)	88 (75-100)	0,16

* os valores foram representados em mediana (IQ) e foram comparados pelo teste de *Wilcoxon*

Aparentemente, os grupos não se mostraram diferentes em relação à análise da qualidade de vida das pacientes.

5.5. Eventos adversos relacionados à doxíciclina

Durante o uso de doxíciclina, três das 41 pacientes (7%) necessitaram descontinuar o tratamento, sendo uma por colite aguda após um mês de uso, uma por diarreia crônica associada à perda ponderal significativa e uma por piora dos sintomas

relacionados à hemorróidas devido à diarreia (as duas últimas pacientes completaram 6 meses de tratamento).

Os sintomas encontram-se listados na Tabela 14. Entre as 31 pacientes que completaram 12 meses de tratamento com a doxiciclina, o sintoma mais comum foi a epigastralgia, acometendo 14 pacientes (45%), sendo geralmente de leve intensidade, necessitando ocasionalmente associar-se inibidor de bomba de prótons. Náusea (19%) e diarreia (16%) foram leves, auto-limitadas e raramente necessitaram tratamento específico. Duas pacientes queixaram-se de prurido e uma apresentou reação de fotossensibilidade, ambas revertidas após remoção da exposição excessiva à luz solar.

Tabela 14 - Eventos adversos apresentados por pacientes com LAM durante o tratamento com doxiciclina, sendo que 31 pacientes usaram por 12 meses

	n = 41	n = 31
Variáveis n (%)		
Náuseas	10 (24)	6 (19)
Epigastralgia	20 (49)	14 (45)
Diarreia	8 (20)	5 (16)
Vômitos	1(2)	(-)
Prurido	2 (5)	2 (6)
Dor torácica	1 (2)	1 (3)
Reação de fotossensibilidade	1 (2)	1 (3)
Lesão maculo-papulosa	2 (5)	2 (6)

DISCUSSÃO

A destruição cística do pulmão que ocorre na LAM tem como provável substrato fisiopatológico a hiperreatividade das MMP, enzimas capazes de degradar o colágeno e a elastina da MEC do pulmão.⁷

Nosso estudo foi o primeiro a demonstrar o bloqueio efetivo das MMP induzido pela doxíciclina, um conhecido inibidor de MMP, em uma coorte de pacientes com LAM, após 12 meses de tratamento com doxíciclina, além do seu efeito sobre o desempenho funcional e na qualidade de vida destas pacientes.

O comprometimento funcional ocasionado pela substituição do parênquima pulmonar por cistos foi bem documentado na LAM. Aberle e colaboradores evidenciaram uma boa correlação entre a análise semiquantitativa dos cistos, realizada pela TCAR, e parâmetros funcionais como VEF₁/CVF ($r = -0,929$, $p = 0,002$), VEF₁ ($r = -0,821$, $p = 0,02$) e DL_{CO} ($r = -0,80$, $p = 0,17$).⁹⁸ Em análise quantitativa dos cistos foram observadas correlações igualmente significativas entre o índice tomográfico (relação entre o volume de cistos e o volume do pulmão total) encontrado e as variáveis funcionais estáticas, sendo para o VEF₁, $r = -0,90$ ($p = 0,0005$); VR, $r = 0,70$ ($p = 0,02$); DL_{CO}, $r = -0,76$ ($p = 0,01$) e de esforço, sendo para o VO₂max, $r = -0,79$ ($p = 0,01$) e carga máxima, $r = -0,84$ ($p = 0,002$).⁴³

O declínio funcional anual nas pacientes com LAM foi evidenciado por Taveira-DaSilva e colaboradores, sendo estabelecida queda no VEF₁ e DL_{CO} de 75 ± 9 mL ($1,7 \pm 0,4\%$ do valor predito) e $0,69 \pm 0,07$ mL/min/mmHg ($2,4 \pm 0,4\%$ do valor predito), respectivamente.⁴⁵ Outro estudo demonstrou redução anual mais expressiva no VEF₁ e DL_{CO}, respectivamente, de 118 ± 142 mL e $0,905 \pm 1,54$ mL/min/mmHg.¹⁵ Em nosso estudo, foi observada redução anual de 70 mL na média do VEF₁ ($p = 0,034$) e de 0,24 mL/min/mmHg na média da DL_{CO} ($p = 0,713$). Apesar de a doxíciclina não ter conseguido reduzir a taxa de declínio do VEF₁, sendo este bem próximo ao limite inferior daquele encontrado na série de Taveira-DaSilva, observamos que a taxa de declínio na DL_{CO} foi menor e não significativo (Tabela 2).

Partindo do ponto de que nem todas as pacientes pioraram funcionalmente, decidimos dividi-las em dois grupos, de acordo com a variação do VEF₁ ao final de 12 meses (Figura 9). No grupo G1, houve incremento significativo na CVF ($p = 0,02$), além de redução da VR/CPT, estabilização da SpO₂ mínima e aumento na distância

caminhada em 8 metros, conforme Tabela 5. No grupo G2, houve queda na relação VEF_1/CVF ($p = 0,009$), aumento na relação VR/CPT ($p = 0,032$), decréscimo na SpO_2 mínima (não significativo) e, igualmente ao G1, houve aumento na distância percorrida no TC6M (Tabela 6). Quando comparados os dois grupos, antes do início da medicação (Tabela 9), mostramos que pacientes com menor comprometimento funcional, caracterizado por menor obstrução das vias aéreas, no momento do início do protocolo, foram aquelas que responderam melhor à doxiciclina.

Após o término do protocolo, a maioria das pacientes manteve-se usando doxiciclina, portanto avaliamos a progressão do VEF_1 em 20 destas pacientes, no período médio de 18 meses após o término do protocolo, sendo distribuídas novamente nos seus respectivos grupos (Figura 12). No gráfico pode-se observar que as pacientes pertencentes ao G1 apresentam leve redução na média do VEF_1 (2,33 L para 2,29 L) enquanto no G2, as pacientes mais graves mantiveram declínio importante na média do VEF_1 (2,17 L para 2,06 L), mostrando que, aparentemente, a doxiciclina parece ser mais efetiva em desacelerar a perda funcional nas pacientes com LAM menos graves.

Figura 12. Seguimento do VEF₁ de 20 pacientes com LAM que mantiveram o uso de doxiciclina por um período médio de 18 meses após o término do protocolo, divididas nos grupos G1 e G2 *

* G1 = grupo em que o VEF₁ aumentou ou estabilizou; G2 = grupo em que o VEF₁ diminuiu

A doxiciclina também se mostrou efetiva em melhorar a qualidade de vida das pacientes (Tabela 4), sendo o impacto significativo no domínio do bem estar emocional ($p = 0,006$) e limítrofe no domínio limitação por aspectos físicos ($p = 0,054$). A média (DP) do domínio maior, saúde física, antes e após 12 meses de doxiciclina, foi de 68 (13) e 73 (3) respectivamente, enquanto que para o domínio maior, saúde mental, os valores encontrados foram 80 (17) e 83 (15), respectivamente.

Em contraste com uma série de 230 pacientes, onde foi igualmente avaliada a qualidade de vida pelo SF-36 e obtidas médias (DP) para os domínios saúde física e saúde mental de 39,7 (0,8) e 50,2 (0,6) respectivamente, ¹³ observamos que nossas

pacientes apresentavam melhores escores ao início do protocolo. Esta diferença se deve, provavelmente, ao fato de as pacientes do referido estudo apresentarem menor VEF₁ e DL_{CO} que nossas pacientes. Ao dividirmos as pacientes nos grupos pela variação do VEF₁ (Tabelas 7 e 8), a melhora na qualidade de vida é mais proeminente no grupo G1.

Na análise do TC6M, houve estabilização da SpO₂ basal, incremento na distância caminhada e leve redução no DDR (Tabela 3) após tratamento de 12 meses com doxiciclina, sem significância estatística, porém houve decréscimo na SpO₂ mínima, com $p = 0,02$. O DDR aparentemente não se mostrou eficaz como marcador de resposta à doxiciclina, sendo provavelmente explicado pelo acometimento leve da DL_{CO} (média de 65,2% do valor predito) das pacientes ao início do protocolo, Conforme demonstrado por nosso grupo previamente,⁵⁵ o DDR apresentou correlação superior com a DL_{CO} ($r = -0,72$ e $p < 0,001$), quando comparada com as correlações entre distância caminhada e DL_{CO} ($r = 0,58$ e $p < 0,001$) e entre a SpO₂ mínima e DL_{CO} ($r = 0,61$ e $p < 0,001$), sendo a casuística compreendida por pacientes mais graves e com diferentes pneumopartias intersticiais, sendo a maioria com diagnóstico de fibrose pulmonar idiopática, com uma média do valor predito da DL_{CO} de 46%. O DDR reflete a troca gasosa durante o esforço, pois compreende a SpO₂ aferida a cada 2 segundos durante o TC6M, sendo pior quanto maior for o acometimento da membrana alvéolo-capilar.

Não houve influência da doxiciclina sobre os níveis séricos do VEGF-D, após o tratamento com doxiciclina. Apesar da inibição da angiogênese pela doxiciclina ter sido evidenciada *in vitro*, por um mecanismo independente da MMP,⁹⁹ assim como ter sido documentada a inibição da permeabilidade vascular induzida pelo VEGF,¹⁰⁰ não observamos, após o tratamento com doxiciclina, alteração significativa nos níveis séricos de VEGF-D.

Por outro lado, o bloqueio das metaloproteinases foi efetivo na MMP-2 sérica ($p=0,005$) e na MMP-9 urinária ($p < 0,001$), ao longo de 12 meses, nas 31 pacientes do estudo. Este bloqueio não mostrou associação com melhora funcional, visto que houve redução nos níveis séricos de MMP-2 e urinários de MMP-9 tanto no G1 quanto no G2, sendo, entretanto, mais expressivo neste último.

O uso de doxiciclina como bloqueador de MMP vem sendo utilizado em modelos experimentais, sendo evidenciada atividade anti-angiogênese mediada por MMP no cérebro de ratos após o uso desta medicação.¹⁰¹ Os derivados de tetraciclina reduzem a degradação tissular em aneurisma de aorta, inibem a invasão local de células neoplásicas e sua metastatização.^{102, 103} Chang e colaboradores demonstraram o efeito da doxiciclina sobre a adesão de células de LAM *in vitro* bem como sobre MMP -2 e -9, revelando redução na proliferação celular, porém às custas de doses muito elevadas de doxiciclina, sem bloqueio significativo sobre a expressão de MMP.¹⁰⁴ Estes achados, no entanto, são questionáveis visto que até o presente momento não há modelo animal de pulmão de LAM para estudo apropriado da fisiopatologia desta doença.

O mecanismo de ação da doxiciclina ainda permanece obscuro, porém especula-se que sua ação de inibição de MMP seja pela indução da atividade do TIMP.¹⁰⁵

Os eventos adversos apresentados pelas pacientes foram, na maioria, leves e auto-limitados, e apenas três pacientes (7%) que iniciaram o protocolo, necessitaram descontinuar a doxiciclina por efeitos colaterais, os quais foram prontamente revertidos após a suspensão.

Além das três pacientes citadas, outras sete perderam o seguimento do protocolo, no total de 10 das 41 pacientes arroladas no estudo. Destas 10 pacientes, oito mantiveram o acompanhamento em nosso serviço, sendo que uma transplantou ao final de seis meses, durante o tratamento com doxiciclina. Na Figura 13 está representada graficamente a evolução do VEF₁ (em litros) das 10 pacientes, em dois períodos de observação (médias de 14 e 30 meses, após o início do protocolo). Observa-se declínio do VEF₁ em todas as pacientes, com exceção de uma, quando comparado o VEF₁ basal com o VEF₁ do primeiro período de observação (Obs 1 = 14 meses) ou do segundo período (Obs 2 = 30 meses), conforme mostrado na legenda da Figura 13.

Figura 13. Evolução do VEF1, em litros, das 10 pacientes que descontinuaram o protocolo

▲ optou por tratamento homeopático

▲ desistiu do tratamento pois não notou melhora clínica (Basal = 2,19L e Obs 2 = 1,92L)

▲ parou por piora sintomas relacionados à hemorroidas (Basal = 2,06L e Obs 2 = 1,92L)

▲ parou por diarreia crônica após 6 meses de tratamento (Basal = 1,96L e Obs 2 = 1,76L)

▲ colite aguda após 1 mês de tratamento (Basal = 1,84L e Obs 2 = 1,74L)

▲ paciente transferiu-se para outro estado (Basal = 0,79L e Obs 2 = 0,39L)

▲ transplantou após 6 meses de tratamento

▲ desistiu do tratamento pois não notou melhora clínica (Basal = 0,58L e Obs 2 = 0,49L)

▲ admitida em lista de transplante após 4 semanas de tratamento (Basal = 0,58L e Obs 1 = 0,6L)

▲ desistiu do tratamento pois não notou melhora clínica

Obs 1 = primeiro tempo de observação, em média 14 meses após início do protocolo

Obs 2 = segundo tempo de observação, em média 30 meses após início do protocolo

Das 31 pacientes do nosso estudo, 22 delas apresentavam, no momento do protocolo, alguma forma de bloqueio hormonal, conforme Tabela 15. No entanto, estas pacientes mostraram-se igualmente distribuídas nos grupos G1 e G2 ($p = 0,696$), não influenciando na resposta funcional ao final do protocolo.

Tabela 15 - Comparação entre os grupos G1 e G2, em relação à influência do bloqueio hormonal concomitante ao uso de doxiciclina, nas 31 pacientes com LAM *

Grupos							
Bloqueio	G1		G2		Total		p
	n	%	n	%	n	%	
Não	3	33	6	66	9	29	0,696
Sim	10	45	12	55	22	71	
Análogo de GnRh	6		8				
Ooforectomia	2		2				
Menopausa	2		2				
Total	13	42	18	58	31	100	

* comparação entre grupos realizada através do teste exato de *Fisher*

Atualmente, vários esforços têm sido implementados na busca de alvos terapêuticos para a cura da LAM, procurando conhecer mais seu processo fisiopatológico, entendendo as alterações celulares e moleculares que ocorrem nesta doença. A criação de registros nacionais e internacionais, como o LAM Registry, desenvolvido pelo *National Heart, Lung and Blood Institute* (NHLBI), em associação com outros centros ¹⁰⁶ possibilitam o acesso a um grande número de dados clínicos, funcionais e de sobrevida destas pacientes. O NHLBI também organiza a captação, armazenamento e estudo de amostras de tecido e de líquidos orgânicos, como sangue,

urina e linfa de pacientes com LAM, distribuídas pelo mundo, além de buscar desenvolver o modelo animal ideal para o estudo da LAM ¹⁰⁷ A probabilidade de encontrar a cura definitiva para uma doença tão rara está, definitivamente, mais próxima.

Pela primeira vez conseguiu-se demonstrar que a doxiciclina pode ser útil em pacientes com LAM, porém ensaios clínicos prospectivos e randomizados são necessários para corroborar os achados evidenciados em nosso estudo.

CONCLUSÃO

A doxíciclina mostrou-se efetiva em bloquear a MMP-9 urinária e MMP-2 sérica em pacientes com LAM, após 12 meses de tratamento.

Houve melhora funcional em um subgrupo de pacientes, funcionalmente menos obstruídas, não sendo, porém, observada influência do bloqueio das MMP sobre esta melhora.

A análise do TC6M não mostrou alterações relevantes após o uso de doxíciclina e o DDR, aparentemente, não se mostrou eficaz como marcador de resposta ao tratamento.

Houve incremento na qualidade de vida das pacientes ao final do protocolo; não houve influência da doxíciclina sobre os níveis séricos do VEGF-D.

A doxíciclina mostrou-se uma medicação segura e com efeitos colaterais leves e toleráveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taveira-DaSilva AM, Steagall WK, Moss J. Lymphangioleiomyomatosis. *Cancer Control*. 2006;13(4):276-85.
2. Medeiros Jr P, Carvalho CRR. Linfangioleiomiomatose pulmonar. *J Bras Pneumol*. 2004;30(1):66-77.
3. Taylor JR, Ryu J, Colby TV, Raffin TA. Lymphangioleiomyomatosis. Clinical course in 32 patients. *N Engl J Med*. 1990;323(18):1254-60.
4. Clements D, Chang WYC, Johnson SR. Lymphangioleiomyomatosis. *Eur Respir Mon*. 2009;46:176-207.
5. Glasgow CG, Steagall WK, Taveira-Dasilva A, Pacheco-Rodriguez G, Cai X, El-Chemaly S, et al. Lymphangioleiomyomatosis (LAM): molecular insights lead to targeted therapies. *Respir Med*. 2010;104 Suppl 1:S45-58.
6. Hayashi T, Fleming MV, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Moss J, Ferrans VJ, et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in pulmonary lymphangioleiomyomatosis (LAM). *Hum Pathol*. 1997;28(9):1071-8.
7. Matsui K, Takeda K, Yu ZX, Travis WD, Moss J, Ferrans VJ. Role for activation of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(2):267-75.
8. Lutembacher R. Dyesmbryomes metatypiques des reinds; carcinose submallaire aigue du puomonavec emphseme generalise et double pneumothorax [Atypical kidney dysembryomas: acutesubmiliary carcinomatosis of the lung with emphysema and double pneumothorax]. *Ann Med*. 1918;5:435-50.
9. von Stossel E. Uber muskulare Cirrhose der lunge [Muscular cirrhosis of the lung]. *Beitr Klin Tuberk*. 1937;90:432-42.
10. Carvalho CRR, Saldiva PHN, Barbas Filho JV, Takagaki T. Pulmonary lymphangioleiomyomatosis. Two cases report. Considerations about diagnosis and treatment. In: Fith International Symposium on the Prevention and detction of Cancer, International Society for Preventive Oncology, 1982, São Paulo. *Cancer Detection Prev*. 1982;5:p. 112.
11. Kitaichi M, Nishimura K, Itoh H, Izumi T. Pulmonary lymphangioleiomyomatosis: a report of 46 patients including a clinicopathologic study of prognostic factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(2 Pt 1):527-33.
12. Johnson SR, Tattersfield AE. Clinical experience of lymphangioleiomyomatosis in the UK. *Thorax*. 2000;55(12):1052-7.
13. Ryu JH, Moss J, Beck GJ, Lee JC, Brown KK, Chapman JT, et al. The NHLBI lymphangioleiomyomatosis registry: characteristics of 230 patients at enrollment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(1):105-11.
14. Baldi BG, Carvalho CRR. Avanços no Campo da Linfangioleiomiomatose. In: Mauro Gomes, Sonia Maria Faresin. (Org.). *Pneumologia - Atualização e Reciclagem*. 7 ed. São Paulo: Editora Roca Ltda, 2008; p. 214-219.
15. Johnson SR, Tattersfield AE. Decline in lung function in lymphangioleiomyomatosis: relation to menopause and progesterone treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(2):628-33.

16. Urban T, Lazor R, Lacronique J, Murris M, Labrune S, Valeyre D, et al. Pulmonary lymphangioleiomyomatosis. A study of 69 patients. Groupe d'Etudes et de Recherche sur les Maladies "Orphelines" Pulmonaires (GERM"O"P). *Medicine (Baltimore)*. 1999;78(5):321-37.
17. Moss J, Avila NA, Barnes PM, Litzenberger RA, Bechtle J, Brooks PG, et al. Prevalence and clinical characteristics of lymphangioleiomyomatosis (LAM) in patients with tuberous sclerosis complex. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(4):669-71.
18. Cohen MM, Pollock-BarZiv S, Johnson SR. Emerging clinical picture of lymphangioleiomyomatosis. *Thorax*. 2005;60(10):875-9.
19. Schiavina M, Di Scioscio V, Contini P, Cavazza A, Fabiani A, Barberis M, et al. Pulmonary lymphangioleiomyomatosis in a karyotypically normal man without tuberous sclerosis complex. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(1):96-8.
20. Johnson SR, Whale CI, Hubbard RB, Lewis SA, Tattersfield AE. Survival and disease progression in UK patients with lymphangioleiomyomatosis. *Thorax*. 2004;59(9):800-3.
21. Matsui K, Beasley MB, Nelson WK, Barnes PM, Bechtle J, Falk R, et al. Prognostic significance of pulmonary lymphangioleiomyomatosis histologic score. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(4):479-84.
22. McCormack FX. Lymphangioleiomyomatosis: a clinical update. *Chest*. 2008;133(2):507-16.
23. Taveira-DaSilva AM, Pacheco-Rodriguez G, Moss J. The natural history of lymphangioleiomyomatosis: markers of severity, rate of progression and prognosis. *Lymphat Res Biol*. 2010;8(1):9-19.
24. Glassberg MK. Lymphangioleiomyomatosis. *Clin Chest Med*. 2004;25(3):573-82.
25. Almoosa KF, Ryu JH, Mendez J, Huggins JT, Young LR, Sullivan EJ, et al. Management of pneumothorax in lymphangioleiomyomatosis: effects on recurrence and lung transplantation complications. *Chest*. 2006;129(5):1274-81.
26. Johnson SR. Lymphangioleiomyomatosis. *Eur Respir J*. 2006;27(5):1056-65.
27. Ryu JH, Doerr CH, Fisher SD, Olson EJ, Sahn SA. Chylothorax in lymphangioleiomyomatosis. *Chest*. 2003;123(2):623-7.
28. Baldi BG, Pimenta SP, Kawassaki AM, Bernardi FD, Dolhnikoff M, Carvalho CRR. Pulmonary arterial involvement leading to alveolar haemorrhage in lymphangioleiomyomatosis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;in press.
29. Kelly J, Moss J. Lymphangioleiomyomatosis. *Am J Med Sci*. 2001;321(1):17-25.
30. Taveira-DaSilva AM, Hathaway OM, Sachdev V, Shizukuda Y, Birdsall CW, Moss J. Pulmonary artery pressure in lymphangioleiomyomatosis: an echocardiographic study. *Chest*. 2007;132(5):1573-8.
31. Avila NA, Kelly JA, Chu SC, Dwyer AJ, Moss J. Lymphangioleiomyomatosis: abdominopelvic CT and US findings. *Radiology*. 2000;216(1):147-53.
32. Avila NA, Dwyer AJ, Rabel A, Moss J. Sporadic lymphangioleiomyomatosis and tuberous sclerosis complex with lymphangioleiomyomatosis: comparison of CT features. *Radiology*. 2007;242(1):277-85.
33. Moss J, DeCastro R, Patronas NJ, Taveira-DaSilva A. Meningiomas in lymphangioleiomyomatosis. *Jama*. 2001;286(15):1879-81.
34. Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM. Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res*. 1993;53(6):1312-6.

-
35. Johnson SR, Cordier JF, Lazor R, Cottin V, Costabel U, Harari S, et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis and management of lymphangioleiomyomatosis. *Eur Respir J*. 2010;35(1):14-26.
 36. Seyama K, Kumasaka T, Souma S, Sato T, Kurihara M, Mitani K, et al. Vascular endothelial growth factor-D is increased in serum of patients with lymphangioleiomyomatosis. *Lymphat Res Biol*. 2006;4(3):143-52.
 37. Glasgow CG, Avila NA, Lin JP, Stylianou MP, Moss J. Serum vascular endothelial growth factor-D levels in patients with lymphangioleiomyomatosis reflect lymphatic involvement. *Chest*. 2009;135(5):1293-300.
 38. Pimenta SP, Baldi BG, Acencio MMP, Salge JM, Kairalla RA, Carvalho CRR. LAM Patients: VEGFD and lung functional impairment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179: A4337.
 39. Young LR, Vandyke R, Gulleman PM, Inoue Y, Brown KK, Schmidt LS, et al. Serum vascular endothelial growth factor-D prospectively distinguishes lymphangioleiomyomatosis from other diseases. *Chest*. 2010;138(3):674-81.
 40. Avila NA, Chen CC, Chu SC, Wu M, Jones EC, Neumann RD, et al. Pulmonary lymphangioleiomyomatosis: correlation of ventilation-perfusion scintigraphy, chest radiography, and CT with pulmonary function tests. *Radiology*. 2000;214(2):441-6.
 41. Muller NL, Chiles C, Kullnig P. Pulmonary lymphangioleiomyomatosis: correlation of CT with radiographic and functional findings. *Radiology*. 1990;175(2):335-9.
 42. Avila NA, Kelly JA, Dwyer AJ, Johnson DL, Jones EC, Moss J. Lymphangioleiomyomatosis: correlation of qualitative and quantitative thin-section CT with pulmonary function tests and assessment of dependence on pleurodesis. *Radiology*. 2002;223(1):189-97.
 43. Crausman RS, Lynch DA, Mortenson RL, King TE, Jr., Irvin CG, Hale VA, et al. Quantitative CT predicts the severity of physiologic dysfunction in patients with lymphangioleiomyomatosis. *Chest*. 1996;109(1):131-7.
 44. Paciocco G, Uslenghi E, Bianchi A, Mazzarella G, Roviato GC, Vecchi G, et al. Diffuse cystic lung diseases: correlation between radiologic and functional status. *Chest*. 2004;125(1):135-42.
 45. Taveira-DaSilva AM, Stylianou MP, Hedin CJ, Hathaway O, Moss J. Decline in lung function in patients with lymphangioleiomyomatosis treated with or without progesterone. *Chest*. 2004;126(6):1867-74.
 46. Taveira-DaSilva AM, Stylianou MP, Hedin CJ, Kristof AS, Avila NA, Rabel A, et al. Maximal oxygen uptake and severity of disease in lymphangioleiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(12):1427-31.
 47. Chu SC, Horiba K, Usuki J, Avila NA, Chen CC, Travis WD, et al. Comprehensive evaluation of 35 patients with lymphangioleiomyomatosis. *Chest*. 1999;115(4):1041-52.
 48. Yen KT, Putzke JD, Staats BA, Burger CD. The prevalence of acute response to bronchodilator in pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Respirology*. 2005;10(5):643-8.
 49. Johnson S. Rare diseases. 1. Lymphangioleiomyomatosis: clinical features, management and basic mechanisms. *Thorax*. 1999;54(3):254-64.
 50. ATS Statement: Guidelines for the Six-Minute Walk Test. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:111-17.
 51. Eaton T, Young P, Milne D, Wells AU. Six-minute walk, maximal exercise tests: reproducibility in fibrotic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(10):1150-7.

-
52. Carter R, Holiday DB, Nwasuruba C, Stocks J, Grothues C, Tiep B. 6-minute walk work for assessment of functional capacity in patients with COPD. *Chest*. 2003;123(5):1408-15.
 53. Lama VN, Flaherty KR, Toews GB, Colby TV, Travis WD, Long Q, et al. Prognostic value of desaturation during a 6-minute walk test in idiopathic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(9):1084-90.
 54. Lettieri CJ, Nathan SD, Browning RF, Barnett SD, Ahmad S, Shorr AF. The distance-saturation product predicts mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2006;100(10):1734-41.
 55. Pimenta SP, Rocha RB, Baldi BG, Kawassaki Ade M, Kairalla RA, Carvalho CR. Desaturation - distance ratio: a new concept for a functional assessment of interstitial lung diseases. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(9):841-6.
 56. Hayashi T, Rush WL, Travis WD, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Ferrans VJ. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pulmonary Langerhans' cell granulomatosis. *Arch Pathol Lab Med*. 1997;121(9):930-7.
 57. Brentani MM, Carvalho CR, Saldiva PH, Pacheco MM, Oshima CT. Steroid receptors in pulmonary lymphangiomyomatosis. *Chest*. 1984;85(1):96-9.
 58. Cornog JL, Jr., Enterline HT. Lymphangiomyoma, a benign lesion of chyliiferous lymphatics synonymous with lymphangiopericytoma. *Cancer*. 1966;19(12):1909-30.
 59. Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. *Lancet*. 2008;372(9639):657-68.
 60. Hohman DW, Noghrehkar D, Ratnayake S. Lymphangioleiomyomatosis: A review. *Eur J Intern Med*. 2008;19(5):319-24.
 61. Carsillo T, Astrinidis A, Henske EP. Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(11):6085-90.
 62. Crooks DM, Pacheco-Rodriguez G, DeCastro RM, McCoy JP, Jr., Wang JA, Kumaki F, et al. Molecular and genetic analysis of disseminated neoplastic cells in lymphangioleiomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(50):17462-7.
 63. Hirama M, Atsuta R, Mitani K, Kumasaka T, Gunji Y, Sasaki S, et al. Lymphangioleiomyomatosis diagnosed by immunocytochemical and genetic analysis of lymphangioleiomyomatosis cell clusters found in chylous pleural effusion. *Intern Med*. 2007;46(18):1593-6.
 64. Potter CJ, Huang H, Xu T. Drosophila Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell*. 2001;105(3):357-68.
 65. Tapon N, Ito N, Dickson BJ, Treisman JE, Hariharan IK. The Drosophila tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. *Cell*. 2001;105(3):345-55.
 66. Yu J, Henske EP. Estrogen-induced activation of mammalian target of rapamycin is mediated via tuberin and the small GTPase Ras homologue enriched in brain. *Cancer Res*. 2006;66(19):9461-6.
 67. Robb VA, Astrinidis A, Henske EP. Frequent [corrected] hyperphosphorylation of ribosomal protein S6 [corrected] in lymphangioleiomyomatosis-associated angiomyolipomas. *Mod Pathol*. 2006;19(6):839-46.
 68. Kenerson H, Dundon TA, Yeung RS. Effects of rapamycin in the Eker rat model of tuberous sclerosis complex. *Pediatr Res*. 2005;57(1):67-75.

-
69. Bissler JJ, McCormack FX, Young LR, Elwing JM, Chuck G, Leonard JM, et al. Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med*. 2008;358(2):140-51.
70. McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, et al. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med*. 2011;364(17):1595-606.
71. Vazquez JJ, Fernandez-Cuervo L, Fidalgo B. Lymphangioleiomyomatosis: morphogenetic study and ultrastructural confirmation of the histogenesis of the lung lesion. *Cancer*. 1976;37(5):2321-8.
72. Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Sato T, Souma S, Kondo T, et al. Lymphangiogenesis in lymphangioleiomyomatosis: its implication in the progression of lymphangioleiomyomatosis. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(8):1007-16.
73. Glasgow CG, Taveira-Dasilva AM, Darling TN, Moss J. Lymphatic involvement in lymphangioleiomyomatosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1131:206-14.
74. Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Souma S, Kashiwagi S, Hebisawa A, et al. Lymphangiogenesis-mediated shedding of LAM cell clusters as a mechanism for dissemination in lymphangioleiomyomatosis. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:1356-66.
75. Kobayashi S, Kishimoto T, Kamata S, Otsuka M, Miyazaki M, Ishikura H. Rapamycin, a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin, suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Sci*. 2007;98(5):726-33.
76. Yockey CC, Riepe RE, Ryan K. Pulmonary lymphangioleiomyomatosis complicated by pregnancy. *Kans Med*. 1986;87(10):277-8, 93.
77. Shen A, Iseman MD, Waldron JA, King TE. Exacerbation of pulmonary lymphangioleiomyomatosis by exogenous estrogens. *Chest*. 1987;91(5):782-5.
78. Glassberg MK, Elliot SJ, Fritz J, Catanuto P, Potier M, Donahue R, et al. Activation of the estrogen receptor contributes to the progression of pulmonary lymphangioleiomyomatosis via matrix metalloproteinase-induced cell invasiveness. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(5):1625-33.
79. Baldi BB, Medeiros Jr P, Pimenta SP, Lopes RI, Kairalla RA, Carvalho CRR. Evolução da função pulmonar após tratamento com goserelina em pacientes com linfangioleiomiomatose. *J Bras Pneumol*. 2011;37(3):375-79.
80. Harari S, Cassandro R, Chiodini I, Taveira-DaSilva AM, Moss J. Effect of a gonadotrophin-releasing hormone analogue on lung function in lymphangioleiomyomatosis. *Chest*. 2008;133(2):448-54.
81. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, lymphangiogenesis, and extracellular matrix. *Lymphat Res Biol*. 2006;4(2):83-100.
82. Fukuda Y, Kawamoto M, Yamamoto A, Ishizaki M, Basset F, Masugi Y. Role of elastic fiber degradation in emphysema-like lesions of pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Hum Pathol*. 1990;21(12):1252-61.
83. Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Inoue H, Seyama K, Nishimura M. Matrix metalloproteinases in blood from patients with LAM. *Respir Med*. 2009;103(1):124-9.
84. Zhe X, Yang Y, Jakkaraju S, Schuger L. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 downregulation in lymphangioleiomyomatosis: potential consequence of abnormal serum response factor expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(4):504-11.

85. Moses MA, Harper J, Folkman J. Doxycycline treatment for lymphangiomyomatosis with urinary monitoring for MMPs. *N Engl J Med*. 2006;354(24):2621-2.
86. Pimenta SP, Baldi BG, Acencio MMP, Kairalla RA, Carvalho CRR. Doxíciclina em pacientes com LAM: estudo clínico avaliando segurança e eficácia no bloqueio de metaloproteinases *J Bras Pneumol*. 2011;in press.
87. Nelson ML. Chemical and biological dynamics of tetracyclines. *Adv Dent Res*. 1998;12(2):5-11.
88. Diretrizes para Testes de Função Pulmonar. *J Bras Pneumol*. 2002;28, Supl 3.
89. Pereira CA, Sato T, Rodrigues SC. New reference values for forced spirometry in white adults in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2007;33(4):397-406.
90. Neder JA, Andreoni S, Castelo-Filho A, Nery LE. Reference values for lung function tests. I. Static volumes. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32(6):703-17.
91. Neder JA, Andreoni S, Peres C, Nery LE. Reference values for lung function tests. III. Carbon monoxide diffusing capacity (transfer factor). *Braz J Med Biol Res*. 1999;32(6):729-37.
92. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(1):111-7.
93. Borg G. Escala CR10 de Borg. In: Borg G (Editor). Escalas de Borg para dor e esforço percebido. *São Paulo: Manole*. 2000; p 43-47.
94. Iwama AM, Andrade GN, Shima P, Tanni SE, Godoy I, Dourado VZ. The six-minute walk test and body weight-walk distance product in healthy Brazilian subjects. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(11):1080-5.
95. Ciconelli RM, Ferraz MB, Santos W, Meinão I, Quaresma MR. Tradução para língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36). *Rev Bras Reumatol*. 1999;39:143-50.
96. Ware JE, Jr. SF-36 health survey update. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000;25(24):3130-9.
97. Zimmermann CS, Carvalho CR, Silveira KR, Yamaguti WP, Moderno EV, Salge JM, et al. Comparison of two questionnaires which measure the health-related quality of life of idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40(2):179-87.
98. Aberle DR, Hansell DM, Brown K, Tashkin DP. Lymphangiomyomatosis: CT, chest radiographic, and functional correlations. *Radiology*. 1990;176(2):381-7.
99. Gilbertson-Beadling S, Powers EA, Stamp-Cole M, Scott PS, Wallace TL, Copeland J, et al. The tetracycline analogs minocycline and doxycycline inhibit angiogenesis in vitro by a non-metalloproteinase-dependent mechanism. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1995;36(5):418-24.
100. Fainaru O, Adini I, Benny O, Bazinet L, Pravda E, D'Amato R, et al. Doxycycline induces membrane expression of VE-cadherin on endothelial cells and prevents vascular hyperpermeability. *Faseb J*. 2008;22(10):3728-35.
101. Lee CZ, Xu B, Hashimoto T, McCulloch CE, Yang GY, Young WL. Doxycycline suppresses cerebral matrix metalloproteinase-9 and angiogenesis induced by focal hyperstimulation of vascular endothelial growth factor in a mouse model. *Stroke*. 2004;35(7):1715-9.
102. Fife RS, Sledge GW, Jr. Effects of doxycycline on in vitro growth, migration, and gelatinase activity of breast carcinoma cells. *J Lab Clin Med*. 1995;125(3):407-11.
103. Tamargo RJ, Bok RA, Brem H. Angiogenesis inhibition by minocycline. *Cancer Res*. 1991;51(2):672-5.

104. Chang WY, Clements D, Johnson SR. Effect of doxycycline on proliferation, MMP production, and adhesion in LAM-related cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;299(3):L393-400.
105. Yao JS, Shen F, Young WL, Yang GY. Comparison of doxycycline and minocycline in the inhibition of VEGF-induced smooth muscle cell migration. *Neurochem Int*. 2007;50(3):524-30.
106. Nurok M, Eslick I, Carvalho CR, Costabel U, D'Armiento J, Glanville AR, et al. The International LAM Registry: a component of an innovative web-based clinician, researcher, and patient-driven rare disease research platform. *Lymphat Res Biol*. 2010;8(1):81-7.
107. Peavy H, Gail D, Kiley J, Shurin S. A National Heart, Lung, and Blood Institute history and perspective on lymphangioleiomyomatosis. *Lymphat Res Biol*. 2010;8(1):5-8.

ANEXOS

Anexo A. Holter de oximetria: curvas da oximetria de pulso e da frequência cardíaca durante o TC6M

Report Title

Dados do Doente

Nome: Angelica Tannure Firme

Idade: 0

DN:

Altura: 0 pol

IMC: 0.0

Médico: Suzana Pimenta

Peso: 0 lb

Identificação:

Nota1: LAM POS-DOXICICLINA 2

Nota2:

Data de Gravação: 24 June 2008

Hora: 09:02:05

Duração: 00:07:14

Analisado: 00:07:14

Comentários:

SpO2 (10 % por divisão)

Pulso (10 BPM por divisão)

Frequência Respiratória (10 BrPM por divisão)

Anexo B. Questionário de qualidade de vida**Medical Outcome Short-Form 36 (SF-36)****Nome:**

Instruções: Esta pesquisa questiona você sobre sua saúde. Estas informações nos manterão informados de como você se sente e quão bem é capaz de fazer suas atividades de vida diária. Responda cada questão marcando a resposta como indicado. Caso você esteja inseguro em como responder, por favor tente responder o melhor que puder.

- 1.** Em geral, você diria que sua saúde é: (circule uma)
- Excelente1
- Muito boa2
- Boa3
- Ruim4
- Muito ruim5

- 2.** Comparada a um ano atrás, como você classificaria sua saúde em geral, agora: (circule uma)
- Muito melhor agora do que a um ano atrás1
- Um pouco melhor agora do que a um ano atrás2
- Quase a mesma do que um ano atrás3
- Um pouco pior agora do que a um ano atrás4
- Muito pior agora do que a um ano atrás5

- 3.** Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. **Devido a sua saúde**, você tem dificuldade para fazer essas atividades? Neste caso quanto? (circule uma em cada linha)

Atividades	Sim Dificulta muito	Sim Dificulta um pouco	Não. Não dificulta de modo algum
a – Atividades vigorosas , que exigem muito esforçotais como correr, levantar objetos pesados, participar em esportes árduos	1	2	3
b- Atividades moderadas , tais como mover uma mesa, passar aspirador de pó, jogar bola, varrer a casa	1	2	3
c- Levantar ou carregar mantimentos	1	2	3
d- Subir vários lances de escada	1	2	3
e- Subir um lance de escada	1	2	3
f- Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar-se	1	2	3
g- Andar mais de 1 quilômetro	1	2	3
h- Andar vários quarteirões	1	2	3
i- Andar 1 quarteirão	1	2	3
j- Tomar banho ou vestir-se	1	2	3

4 – Durante as **últimas 4 semanas**, você tem alguns dos seguintes problemas com seu trabalho ou com alguma atividade diária regular, **como consequência de sua saúde física** (circule uma em cada linha)

	Sim	Não
a- Você diminuiu a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b- Realizou menos tarefas do que gostaria?	1	2
c- Esteve limitado no seu tipo de trabalho ou em outras atividades?	1	2
d- Teve dificuldade de fazer o seu trabalho ou outras atividades p. ex: necessitou de um esforço extra	1	2

5. Durante as **últimas 4 semanas**, você teve algum dos seguintes problemas com o seu trabalho ou com outra atividade diária regular, como consequência de algum problema emocional (como sentir-se deprimido ou ansioso) ? (circule uma em cada linha)

	Sim	Não
a- Você diminuiu a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b- Realizou menos tarefas do que gostaria?	1	2
c- Não trabalhou ou não fez qualquer das atividades com tanto cuidado como geralmente faz ?	1	2

6. Durante as **últimas 4 semanas**, de que maneira sua saúde física ou problemas emocionais interferiram nas suas atividades sociais normais, em relação a família,

vizinhos, amigos ou em grupo? (circule uma em cada linha)

De forma nenhuma1
 Ligeiramente2
 Moderadamente 3
 Bastante4
 Extremamente5

7. Quanta dor no corpo você teve nas últimas 4 semanas?
 (circule uma)

Nenhuma1
 Muito leve2
 Leve 3
 Moderada4
 Grave5
 Muito grave6

8. Durante as últimas 4 semanas, quanto a dor interferiu com o seu trabalho normal (incluindo tanto o trabalho fora de casa e dentro de casa)?
 (circule uma)

De maneira nenhuma1
 Um pouco2
 Moderadamente3
 Bastante4
 Extremamente5

9. Estas questões são sobre como você se sente e como tudo tem acontecido com você durante as últimas 4 semanas. Para cada questão, por favor dê uma resposta que mais se aproxime da maneira como você se sente. Em relação as últimas 4 semanas. (circule uma em cada linha)

	Todo	A	Uma	Alguma	Uma	Nunca
--	------	---	-----	--------	-----	-------

	tempo	maior parte do tempo	boa parte do tempo	parte do tempo	pequena parte do tempo	
a- Quanto tempo você tem se sentido cheio de vigor, cheio de vontade e cheio de força?	1	2	3	4	5	6
b- Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa muito nervosa?	1	2	3	4	5	6
c- Quanto tempo você tem se sentido tão deprimido que nada pode anima-lo?	1	2	3	4	5	6
d- Quanto tempo você tem se sentido calmo ou tranquilo?	1	2	3	4	5	6
e- Quanto tempo você tem se sentido com muita energia?	1	2	3	4	5	6
f- Quanto tempo você tem se sentido desanimado e abatido?	1	2	3	4	5	6
g- Quanto tempo você tem se sentido esgotado?	1	2	3	4	5	6
h- quanto tempo você tem se sentido uma pessoa feliz?	1	2	3	4	5	6
i- Quanto tempo você tem se sentido cansado?	1	2	3	4	5	6

10- Durante as **últimas 4 semanas**, quanto do seu tempo a sua saúde física ou problemas emocionais interferiram com suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc) ? (circule uma em cada linha)

Todo o tempo.....1
 A maior parte do tempo.....2
 Alguma parte do tempo.....3
 Uma pequena parte do tempo.....4
 Nenhuma parte do tempo.....5

11- O quanto **verdadeiro** ou **falso** é cada uma das afirmações para você?
 (circule uma em cada linha)

	Definitiva- mente verdadeiro	A maioria das vezes verdadeiro	Não sei	A maioria das vezes falsa	Definitiva- mente falsa
a- Eu costumo adoecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas	1	2	3	4	5
b- Eu sou tão saudável quanto qualquer outra pessoa que eu conheço	1	2	3	4	5
c- Eu acho que a minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d- Minha saúde é excelente	1	2	3	4	5

Anexo C. Consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

APTO:

BAIRRO:

CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD

(.....)

2. RESPONSÁVEL

LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador
etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : **EFEITOS DA DOXICICLINA SOBRE A AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA, FUNCIONAL E EXCREÇÃO DE METALOPROTEINASES NAS PACIENTES COM LINFANGIOLEIOMIOMATOSE**

2. PESQUISADORES

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. CARLOS ROBERTO RIBEIRO DE CARVALHO

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICO ASSISTENTE

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: Nº 31143

UNIDADE DO HCFMUSP: SERVIÇO DE PNEUMOLOGIA

PESQUISADORA EXECUTANTE: SUZANA PINHEIRO PIMENTA

CARGO/FUNÇÃO: PNEUMOLOGISTA

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: Nº 113795

UNIDADE DO HCFMUSP: SERVIÇO DE PNEUMOLOGIA

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	☒	RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☒
RISCO BAIXO	☒	RISCO MAIOR	☒		

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 6 MESES

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa: A Sra ou Srta está sendo convidada a participar de um estudo que tem por objetivo avaliar os efeitos de um remédio (doxíciclina) sobre a sua doença. Um trabalho isolado mostrou melhora da função pulmonar após tomar essa medicação por 6 meses. Assim, estamos propondo que você tome esse comprimido uma vez por dia e faça alguns exames antes e ao final do tratamento para

avaliarmos se houve melhora. Os exames que você vai fazer são simples e você já os vem realizando ao longo de seu tratamento. Ou seja, você fará um exame de imagem (tomografia de pulmão), exames de função pulmonar (medida de sua capacidade respiratória em repouso e durante uma caminhada de seis minutos) e um exame de urina e sangue para avaliar a resposta ao tratamento. Se ao final do estudo comprovarmos a eficiência da doxiciclina, passaremos a receitá-la rotineiramente para todas as pacientes com linfangioleiomiomatose, melhorando assim a qualidade de vida e estabilizando a progressão da doença.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: A Sra ou Srta será submetida à: coleta de urina e sangue para dosagem das metaloproteínas (obtendo assim o grau de atividade de sua doença); tomografia de pulmão (um raio X mais sofisticado) para avaliação do estágio atual de sua doença; teste de caminhada de 6 minutos, no qual a Sra ou Srta. irá andar por 6 minutos ou até que solicite parar o teste (em caso de falta de ar ou cansaço), sempre acompanhada por um profissional experiente para avaliar se está ocorrendo diminuição da oxigenação de seu sangue (através de um oxímetro – aparelho colocado no dedo da mão) e a distância percorrida. Caso a doxiciclina tenha o efeito esperado, você conseguirá andar mais tempo e com oxigenação melhor ao final do tratamento; espirometria completa (prova de sopro) para avaliar a função pulmonar, que está diretamente ligada à intensidade do seu fôlego; e o preenchimento de questionário de qualidade de vida SF-36 que compreende um simples conjunto de perguntas sobre sua saúde física e emocional
3. desconfortos e riscos esperados: durante o teste de caminhada a Sra ou Srta pode vir a apresentar piora da falta de ar ou do cansaço, porém terá liberdade para interromper o teste logo que apresentar estes sintomas ou qualquer outro desconforto. Durante todo o teste haverá um profissional experiente ao seu lado e sua frequência cardíaca e sua oxigenação estarão sendo continuamente monitorados. Quanto ao uso da medicação doxiciclina, poderão ocorrer diarreia, dor no estômago e manchas na pele, no entanto,

este remédio é muito bem tolerado por pacientes que fizeram uso (por outras causas), sendo seus efeitos colaterais muito pouco freqüentes e preveníveis com o uso de protetor solar e antiácidos. Caso ocorram, no entanto, e dependendo da gravidade, a Sra ou Srta tem toda liberdade de descontinuar o tratamento, não interferindo de forma alguma no seu acompanhamento clínico.

4. benefícios que poderão ser obtidos: conseguir andar mais tempo e com melhor oxigenação ao final do tratamento; otimizar seu fôlego e disposição para as atividades diárias; melhora da sua saúde física e emocional; ganho na função pulmonar e estabilização da linfangioleiomiomatose.
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: nenhum

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

Os pesquisadores poderão ser contatados durante o dia na enfermaria de Pneumologia – 3º. Andar do ICHCFMUSP (ramal interno: 6366), na secretaria de pneumologia – 7º andar ICHC (ramal 7202) ou pelos telefones 82326007/30862719

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Caso a Sra ou Srta deixe de participar deste estudo, poderá continuar normalmente seu acompanhamento ambulatorial em nosso serviço

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Todas as informações obtidas durante o estudo serão utilizados somente para este propósito, e garantimos a total confidencialidade dos dados coletados.

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Todos os testes utilizados neste estudo são seguros e com riscos mínimos a sua saúde, porém a equipe de pesquisadores estará disponível para sua assistência em qualquer complicação decorrente desta pesquisa.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Todos os testes utilizados neste estudo são seguros e com riscos mínimos. Caso ocorram eventuais complicações comprovadamente decorrentes ao protocolo de pesquisa, a equipe de pesquisadores avaliará a viabilidade de indenização.

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS
PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE
INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

1- SUZANA PINHEIRO PIMENTA R. OSCAR FREIRE 1929 APT401 PINHEIROS
82326007/30862719

2- CARLOS ROBERTO RIBEIRO CARVALHO consultório 31711320

vi. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do
pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo D. Parâmetros da prova de função pulmonar das 31 pacientes, no mês basal

	CVF 0	CVF pred 0	VEF ₁ 0	VEF ₁ pred 0	VEF ₁ /C VF 0	CPT 0	CPT pred 0	VR 0	VR pred 0	VR/CPT 0	VR/CPT pred 0	DLco 0	DLco pred 0
1	3,19	89	2,42	83	0,76	4,47	89	1,15	80	26	82	16,05	61
2	3,47	111	2,09	83	0,6	5,25	113	1,77	117	34	99	11,02	45
3	2,57	93	2,02	88	0,79	3,56	91	0,95	84	27	88	21,72	94
4	3,27	94	2,73	94	0,84	4,66	98	1,27	101	27	102	24,54	94
5	3,12	103	2,38	95	0,76	4,92	112	1,6	121	32	99	15,78	65
6	2,43	79	1,19	46	0,49	5,37	125	2,89	240	53	162	9,87	40
7	2,81	65	2,78	78	0,99	5,1	86	2,38	149	47	155	27,94	95
8	2,62	85	2,02	79	0,77	4,52	103	1,86	144	41	129	14,31	58
9	2,95	103	2,4	103	0,81	4,53	108	1,51	115	33	107	18,78	80
10	2,9	74	2,37	73	0,82	4,38	81	1,56	107	36	127	17,87	64
11	3,08	92	2,59	93	0,84	4,21	90	1,13	86	27	89	25,22	99
12	3,18	86	2,54	84	0,8	4,28	83	1,18	80	28	100	15,31	57
13	3,46	99	2,52	89	0,73	4,91	97	1,58	104	32	100	22,37	85
14	2,95	101	2,49	102	0,84	4,57	112	1,38	121	29	94	18,21	76
15	3,86	104	2,55	86	0,66	5,87	107	1,86	107	32	90	17,83	66
16	4,84	120	3,62	114	0,75	6,83	114	2,05	106	30	100	16,97	60
17	3,52	88	2,81	86	0,8	5,41	98	2,12	139	36	125	25,69	91
18	3,4	110	2,34	91	0,69	5,1	116	1,78	138	35	108	17,12	70
19	2,42	72	0,72	26	0,3	6,61	141	3,97	302	60	235	6	23
20	2,54	80	1	38	0,39	4,86	110	2,33	184	48	149	7,94	32
21	2,8	88	1,34	51	0,48	4,48	99	2,06	160	43	136	9,02	36
22	3,29	104	2,71	103	0,82	5,03	115	1,64	134	33	107	17,83	72
23	2,87	82	1,17	41	0,41	4,91	97	2	131	41	121	9,82	37
24	3,57	93	1,61	51	0,45	6,58	125	2,75	194	42	139	6,95	25
25	3,72	86	3,39	95	0,91	5,14	88	1,41	93	27	95	32,29	110
26	2,29	68	1,49	53	0,65	4,33	91	1,71	127	40	129	10,03	39
27	3,06	79	1,64	51	0,54	5,07	95	2,11	146	42	136	11,22	41
28	3,93	115	3,16	112	0,8	5,72	119	1,63	118	29	94	28,88	112
29	4,23	105	2,57	79	0,61	6,21	107	2,05	118	33	109	12,43	44
30	3,41	104	2,87	106	0,84	4,54	98	1,26	94	28	94	19,01	75
31	2,65	85	1,86	74	0,7	4,49	98	1,54	104	34	99	19	76
média	3,17	92,2	2,24	78,9	0,70	5,03	103,4	1,82	130,4	35,65	116,1	16,99	65,2
DP	0,6	13,9	0,70	23,2	0,2	0,8	13,9	0,6	47,3	8,3	30,5	6,8	24,8
mediana	3,12	92,1	2,40	83,7	0,76	4,91	99,4	1,71	118,4	33,00	106,7	17,12	64,8
IQ1	2,81	83,3	1,75	63,1	0,61	4,51	93,3	1,46	103,9	29,00	97,0	11,12	42,3
IQ3	3,47	103,3	2,65	94,1	0,82	5,31	112,5	2,06	141,4	41,00	129,2	20,37	82,5

Anexo E. Parâmetros da prova de função pulmonar das 31 pacientes, no 6 ° mês

	CVF 6	CVF pred 6	VEF ₁ 6	VEF1 pred 6	VEF ₁ /C VF 6	CPT 6	CPT pred 6	VR 6	VR pred 6	VR/CPT 6	VR/CPT pred 6	DLco 6	DLco pred 6
1	3,64	102	2,72	93	0,75	5,01	100	1,35	93	27	85	18,07	68
2	3,14	100	2,04	81	0,65	5,45	117	2,26	149	42	122	8,19	33
3	2,57	93	2	87	0,78	3,66	94	1,1	97	30	98	19,1	82
4	3,45	99	2,97	102	0,86	5,36	113	1,81	145	34	128	21,35	82
5	3,21	106	2,38	95	0,74	4,55	104	1,2	91	26	80	12,05	49
6	2,89	94	1,24	48	0,43	5,38	125	2,38	198	44	134	8,98	37
7	3,58	83	3,26	92	0,84	6,11	103	2,54	159	41,6	137	29,67	101
8	2,78	90	1,99	78	0,72	3,93	89	1,26	98	32	101	12,23	50
9	3,11	109	2,47	106	0,79	4,81	115	1,58	120	33	107	19,28	82
10	2,98	76	2,5	77	0,84	4,1	76	1,2	82	29	102	20,26	73
11	3,08	92	2,48	89	0,8	4,44	95	1,42	108	32	106	20,91	82
12	3,23	88	2,4	79	0,74	4,17	80	0,89	60	17	61	15,41	57
13	3,33	95	2,49	88	0,75	4,75	94	1,42	93	30	94	23,8	91
14	3,02	104	2,41	99	0,8	4,25	104	1,19	104	28	91	16,94	71
15	3,58	96	2,22	74	0,67	6,71	122	3,02	173	45,0	127	21,51	79
16	4,91	122	3,57	112	0,73	6,86	115	2,08	108	30,0	100	17,98	63
17	3,62	91	2,7	82	0,75	5,41	98	1,87	122	34	118	24,56	87
18	3,77	122	2,39	93	0,63	4,89	111	1,01	78	21	65	20,05	82
19	3	90	0,72	26	0,24	5,96	127	2,79	212	47	184	7,55	30
20	2,32	74	0,9	34	0,39	5,28	119	2,82	223	53	165	7,51	30
21	2,35	73	1,07	40	0,46	5,54	123	3,1	240	56	177	7,49	30
22	3,04	97	2,26	86	0,74	4,72	108	1,5	123	32	104	15,42	62
23	2,47	71	1,03	36	0,42	5,57	111	3,07	201	55	163	7,88	30
24	3,36	88	1,42	45	0,42	7,34	140	3,82	270	52	172	7,29	27
25	3,74	87	3,2	89	0,86	4,8	82	1,13	75	24	85	23,75	81
26	2,39	71	1,46	52	0,61	4,37	92	2,03	150	46	149	9,45	37
27	3,1	81	1,69	53	0,54	4,94	93	1,72	119	35	114	11,21	40
28	3,78	110	3,13	110	0,83	5,44	113	1,61	118	30	98	26,08	101
29	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
30	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
31	2,78	90	1,9	77	0,68	4,64	101	1,9	130	42	122	20	80
média	3,18	92,8	2,17	76,7	0,67	5,12	105,6	1,90	135,9	36,13	116,8	16,33	62,6
DP	0,5	13,5	0,7	24,3	0,2	0,9	15,1	0,8	53,7	10,4	32,6	6,6	23,8
mediana	3,12	92,1	2,38	82,2	0,74	4,94	104,2	1,72	120,3	33,00	106,7	17,98	68,3
IQ1	2,89	86,9	1,69	52,7	0,61	4,55	94,3	1,26	97,4	30,00	97,8	9,45	36,8
IQ3	3,58	100,3	2,50	92,7	0,79	5,45	114,9	2,38	158,5	44,00	134,1	20,91	81,6

Anexo F. Parâmetros da prova de função pulmonar das 31 pacientes, no 12 ° mês

	CVF 12	CVF pred 12	VEF ₁ 12	VEF1 pred 12	VEF ₁ /CV F 12	CPT 12	CPT pred 12	VR 12	VR pred 12	VR/CPT 12	VR/CPT pred12	DLco 12	DLco pred 12
1	3,83	107	2,73	93	0,71	5,39	107	1,69	117	31	98	21,01	79
2	3,26	104	2,09	83	0,64	5,46	117	2,32	153	43	125	10,37	42
3	2,55	93	2,05	89	0,81	3,84	99	1,3	115	34	111	16,72	72
4	3,44	99	2,85	98	0,83	5,24	110	1,94	155	37	140	22,13	85
5	3,34	110	2,44	98	0,73	4,67	107	1,39	105	30	93	13,1	54
6	2,96	96	1,26	49	0,42	5,75	133	2,76	229	48	146	9,54	39
7	3,06	71	2,94	83	0,96	5,46	92	2,44	152	44	145	25,6	87
8	2,81	91	2,05	80	0,73	3,92	89	1,17	91	30	94	13,25	54
9	3,22	113	2,51	108	0,78	4,41	105	1,24	94	28	91	20,04	85
10	2,96	75	2,44	75	0,83	3,96	73	1,04	71	26	92	18,95	68
11	3,25	96	2,68	96	0,83	4,82	102	1,75	130	36	117	23,28	91
12	3,21	87	2,55	84	0,8	4,56	88	1	68	22	78	18,38	68
13	3,36	96	2,55	90	0,76	4,46	89	0,89	58	20	63	22,05	84
14	2,93	100	2,35	96	0,8	4,24	104	1,21	106	29	94	16,73	70
15	3,65	98	2,2	74	0,6	5,76	105	2,11	121	36	102	17,34	64
16	4,93	123	3,31	104	0,67	6,88	115	2,08	108	30	100	17,02	60
17	3,56	89	2,77	84	0,78	5,61	102	2	131	36	125	28,92	103
18	3,55	115	2,33	91	0,66	5,7	129	2,29	177	40	124	18,43	75
19	2,84	85	0,63	23	0,22	6,19	132	3,72	283	60	235	6,5	25
20	1,96	62	0,86	33	0,44	4,69	106	2,36	187	50	155	19,72	80
21	2,35	73	0,93	35	0,4	5,33	118	3,08	239	58	183	6,92	28
22	3,04	97	2,37	90	0,78	4,37	100	1,21	99	28	91	15,53	63
23	2,56	73	1,04	37	0,41	5,35	106	2,91	191	54	160	9,07	35
24	3,54	93	1,4	44	0,39	6,43	122	2,75	194	43	142	6,8	25
25	3,76	87	3,27	91	0,87	4,99	86	1,31	87	26	92	24,53	83
26	2,32	69	1,34	48	0,58	4,63	98	2,35	174	51	165	9,92	39
27	3,15	82	1,47	46	0,47	5,15	97	2,06	142	40	129	13,2	48
28	3,62	106,6	3,06	109	0,85	5,58	116	1,83	132	33	106	22,66	88
29	4,07	101	2,29	71	0,56	5,77	100	1,84	105	32	105	11,23	40
30	2,99	91	2,73	101	0,91	4,62	100	1,28	95	28	89	22,98	91
31	2,74	89	1,85	75	0,67	4,62	101	2,0	132	43	124	18	72
média	3,19	92,6	2,17	76,7	0,67	5,09	104,8	1,91	136,8	36,97	119,8	16,76	64,3
DP	0,6	14,3	0,7	24,6	0,2	0,7	13,8	0,7	52,5	10,4	35,3	6,0	22,0
mediana	3,21	92,6	2,35	84,0	0,73	5,15	104,0	1,94	129,6	36,00	111,3	17,34	68,1
IQ1	2,89	85,9	1,66	59,9	0,57	4,59	98,1	1,29	102,1	29,50	93,6	12,17	44,9
IQ3	3,55	100,7	2,71	94,6	0,81	5,60	112,8	2,34	164,5	43,00	140,7	21,53	83,8

Anexo G. Parâmetros do Teste de caminhada das 31 pacientes, no mês basal

	SpO2 basal 0	SpO2 min 0	Dist 0	Dist pred 0	DDR 0	BorgInDisp 0	BorgFinDisp 0	BorgInMMII 0	BorgFinMMII 0
1	95	94	459	84	4,2	0,0	0,0	1,0	1,0
2	92	81	420	81	14,4	1,0	4,0	0,0	0,0
3	98	94	547	103	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0
4	98	96	495	88	2,6	0,0	3,0	0,0	5,0
5	97	95	429	81	3,8	1,0	2,0	0,0	0,0
6	89	77	564	104	12,1	0,0	4,0	0,5	5,0
7	98	97	495	86	1,7	0,0	1,0	0,0	0,0
8	96	88	561	105	6,0	0,0	3,0	0,0	4,0
9	96	95	483	93	3,0	0,0	1,0	0,0	0,0
10	97	95	537	95	2,2	2,0	7,0	0,0	0,0
11	98	96	570	104	1,7	0,0	0,0	0,0	2,0
12	97	93	480	87	4,2	0,0	1,0	0,0	1,0
13	97	94	660	123	2,1	0,0	1,0	0,0	0,0
14	96	95	337	62	4,0	0,0	0,0	0,0	5,0
15	96	94	579	110	3,2	0,0	2,0	0,0	0,0
16	96	93	351	67	5,7	0,0	0,0	0,0	0,0
17	98	96	438	78	2,4	0,0	2,0	0,0	0,0
18	96	94	522	97	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0
19	91	75	185	34	29,9	1,0	10,0	0,0	0,0
20	95	82	434	80	11,5	0,0	2,0	0,0	0,0
21	90	82	458	85	11,7	0,0	3,0	2,0	2,0
22	99	98	588	108	1,1	1,0	4,0	1,0	5,0
23	91	61	423	79	24,1	0,0	7,0	0,0	0,0
24	83	64	270	48	45,9	0,0	5,0	0,0	0,0
25	97	97	528	91	1,4	0,0	1,0	0,0	0,0
26	95	87	509	93	6,9	2,0	3,0	0,0	0,0
27	98	86	633	112	5,9	0,0	3,0	0,0	1,0
28	98	96	651	119	1,3	0,0	9,0	0,0	10,0
29	96	92	402	74	6,4	0,0	3,0	0,0	0,0
30	98	95	630	116	2,1	0,0	0,0	0,0	1,0
31	96	91	555	107	4,7	0,0	1,0	0,0	1,0
média	95	89	490	90	7,5	0,3	2,6	0,1	1,4
DP	3	9	109	20	9,7	0,6	2,7	0,4	2,4
mediana	96	94	495	91	4,0	0,0	2,0	0,0	0,0
IQ1	95	87	432	81	2,3	0,0	1,0	0,0	0,0
IQ3	98	95	563	104	6,7	0,0	3,5	0,0	1,5

Anexo H. Parâmetros do Teste de caminhada das 31 pacientes, no 6º mês

	SpO2 basal 6	SpO2 min 6	Dist 6	Dist pred 6	DDR 6	BorgInDisp 6	BorgFinDisp 6	BorgInMMII 6	BorgFinMMII 6
1	95	92	552	101	4,4	0,0	1,0	0,0	0,0
2	93	81	432	84	12,1	1,0	4,0	0,0	1,0
3	97	96	510	96	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0
4	97	95	534	95	2,5	0,0	3,0	0,0	4,0
5	97	95	483	91	2,5	0,0	3,0	0,0	0,0
6	92	79	525	97	11,7	0,0	3,0	0,0	4,0
7	97	96	501	87	2,1	0,0	2,0	0,0	0,0
8	95	84	525	98	8,7	0,0	2,0	0,0	4,0
9	95	95	483	93	2,7	0,0	1,0	0,0	0,0
10	96	95	537	95	1,4	3,0	7,0	0,0	0,0
11	97	96	522	95	2,1	0,0	0,0	0,0	1,0
12	96	90	528	96	5,9	0,0	2,0	1,0	2,0
13	98	94	618	115	2,0	0,0	3,0	0,0	0,0
14	99	96	411	76	2,1	1,0	3,0	0,0	1,0
15	95	91	570	108	4,9	0,0	2,0	0,0	0,0
16	97	93	327	62	6,3	0,0	0,0	0,0	4,0
17	98	96	546	97	1,9	0,0	2,0	0,0	0,0
18	97	95	603	113	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0
19	94	72	249	46	28,5	0,0	9,0	0,0	0,0
20	93	82	411	76	11,1	3,0	4,0	0,0	0,0
21	93	79	419	77	14,1	3,0	5,0	0,0	1,0
22	98	98	590	108	1,3	3,0	4,0	3,0	5,0
23	88	52	399	74	31,5	0,0	3,0	0,0	0,0
24	83	62	336	60	32,8	0,0	2,0	0,0	0,0
25	99	98	597	103	0,9	0,0	0,0	0,0	3,0
26	96	84	468	86	9,8	0,0	3,0	0,0	0,0
27	96	86	588	104	6,3	0,0	3,0	0,0	0,0
28	98	98	693	127	1,0	0,0	7,0	0,0	9,0
29	x	x	x	x	x	x	x	x	x
30	x	x	x	x	x	x	x	x	x
31	96	93	582	113	3,6	0,0	1,0	0,0	0,0
média	95	88	501	92	7,5	0,5	2,7	0,1	1,3
DP	3	11	98	18	8,9	1,1	2,2	0,6	2,2
mediana	96	93	525	95	3,6	0,0	3,0	0,0	0,0
IQ1	95	84	432	84	2,1	0,0	1,0	0,0	0,0
IQ3	97	96	570	103	9,8	0,0	3,0	0,0	2,0

Anexo I. Parâmetros do Teste de caminhada das 31 pacientes, no 12º mês

	SpO2 basal 12	SpO2 min 12	Dist 12	Dist pred 12	DDR 12	BorgInDisp 12	BorgFinDisp 12	BorgInMMII 12	BorgFinMMI I 12
1	95	92	570	104	4,3	0,0	1,0	0,0	0,0
2	94	85	450	87	8,6	1,0	4,0	0,0	0,0
3	96	96	498	94	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0
4	97	92	501	90	4	2,0	3,0	3,0	5,0
5	98	94	480	91	3,5	2,0	4,0	0,0	0,0
6	92	78	510	94	12,4	0,0	4,0	0,0	4,0
7	98	96	510	89	2,4	0,0	1,0	0,0	0,0
8	93	84	528	99	9,7	0,0	3,0	0,0	3,0
9	96	95	480	92	3,1	0,0	1,0	0,0	0,0
10	97	97	480	85	1,9	0,0	3,0	0,0	0,0
11	97	95	576	106	2,2	0,0	0,0	0,0	0,5
12	96	91	585	106	5,1	0,0	1,0	0,0	0,0
13	97	94	630	118	3	0,0	3,0	0,0	0,0
14	99	97	423	78	2,1	0,0	2,0	0,0	0,0
15	96	91	549	104	4,4	0,0	2,0	0,0	1,0
16	92	90	363	69	9	2,0	2,0	5,0	5,0
17	97	95	540	96	2,6	0,0	3,0	0,0	0,0
18	98	95	600	112	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0
19	x	x	x	x	x	x	x	x	x
20	93	77	396	73	15,6	0,0	2,0	0,0	2,0
21	91	78	387	72	16,1	0,0	4,0	3,0	1,0
22	96	95	579	106	2	0,0	4,0	0,0	7,0
23	91	61	450	84	23,5	0,0	2,0	0,0	0,0
24	76	54	339	60	41,2	0,0	3,0	0,0	3,0
25	99	98	591	102	1,1	0,0	1,0	0,0	3,0
26	94	92	456	84	10,1	1,0	3,0	0,0	0,0
27	97	74	615	109	5,1	0,0	5,0	0,0	0,0
28	98	97	711	131	1,1	0,0	3,0	0,0	2,0
29	96	86	420	77	9,1	0,0	3,0	0,0	0,0
30	96	95	645	119	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0
31	96	93	594	115	3,4	0,0	1,0	0,0	1,0
média	95	89	515	95	7,1	0,3	2,3	0,4	1,3
DP	4	11	90	17	8,3	0,6	1,4	1,2	1,9
mediana	96	93	510	94	3,8	0,0	2,5	0,0	0,0
IQ1	94	85	452	84	2,3	0,0	1,0	0,0	0,0
IQ3	97	95	584	106	9,1	0,0	3,0	0,0	2,0

Anexo J. Níveis séricos e urinários das MMP e séricos de VEGF-D das 31 pacientes, nos meses basal, 6 e 12.

	MMP2Sg 0	MMP2Sg 6	MMP2Sg 12	MMP9Sg 0	MMP9Sg 6	MMP9Sg 12	MMP9Ur 0	MMP9Ur 6	MMP9Ur 12	VEGFD 0	VEGFD 6	VEGFD 12
1	0	0	0	1202	1252	1474	1405	29	29	1149	1202	2352
2	0	0	0	673	764	1162	4486	2414	559	407	1182	270
3	0	0	179	1624	1057	1210	24430	47532	7698	407	458	411
4	0	0	0	1256	1295	1236	5524	7677	12636	359	276	313
5	730	733	0	414	397	1240	26630	2690	712	2113	2216	2624
6	0	0	0	282	557	1408	15760	17028	5773	2115	1874	1907
7	0	0	x	976	1009	x	6306	11291	x	420	233	x
8	971	952	159	872	587	578	24764	35583	12356	2842	3492	2312
9	0	0	0	804	356	1045	6453	232	10583	383	270	344
10	0	0	0	730	401	834	20963	17804	8131	188	753	313
11	x	0	0	x	1147	487	x	454	326	x	832	217
12	0	0	0	741	708	590	5635	6954	8450	2537	2951	99
13	833	468	166	933	764	844	11358	9140	2801	221	147	90
14	1540	1569	182	969	1371	682	13426	5824	2021	996	866	889
15	613	0	x	1463	929	x	6787	1653	x	410	303	x
16	189	181	214	1280	1243	1076	10487	10222	10041	4508	4373	4561
17	833	0	184	749	811	856	42038	25535	11186	535	945	886
18	0	0	0	1072	1159	586	6247	11058	787	464	424	399
19	0	0	0	1124	693	856	48705	2386	9985	1476	1128	1820
20	905	842	273	1609	997	1334	11959	5824	3970	580	708	x
21	1383	1490	1125	852	970	928	1888	4331	765	1347	1419	2251
22	0	0	0	1194	879	809	4565	1909	313	203	325	312
23	457	0	167	876	420	1367	28652	15653	10160	2150	1008	2293
24	1135	1216	261	1732	956	1307	654	274	341	2176	1384	1955
25	0	0	0	322	331	1042	15653	18505	7791	1616	997	1116
26	2117	2001	631	248	695	574	42970	35435	21879	2330	2599	2653
27	0	0	0	685	505	1126	1126	357	37	648	504	1134
28	0	0	0	1272	1044	126	4527	4907	6129	2000	1672	582
29	0	x	0	266	x	1256	13971	x	4061	247	x	2366
30	0	x	0	1011	x	1743	786	x	265	821	x	936
31	x	x	0	x	x	1509	x	x	2623	x	x	125
média	404	338	122	939	832	1010	14074	10811	5600	1229	1234	1269
DP	586	589	239	408	309	367	13323	12227	5359	1048	1052	1113
mediana	0	0	0	933	845	1045	10487	6389	4061	821	971	913
IQ1	0	0	0	730	579	809	4565	2267	712	407	450	313
IQ3	833	534	179	1202	1047	1256	20963	15997	9985	2113	1482	2262

Anexo L. Escores do domínio maior saúde física do questionário de qualidade de vida das 31 pacientes, nos meses basal, 6 e 12.

	Cap. fis. 0	Cap. fis. 6	Cap. fis. 12	LimAspFísico 0	LimAspFísico 6	LimAspFísico 12	Dor 0	Dor 6	Dor 12	SaudGera 0	SaudGera 6	SaudGera 12
1	95	100	100	50	100	100	45	90	80	80	80	80
2	75	55	65	50	50	50	55	58	55	40	45	60
3	100	95	95	50	100	100	100	100	90	100	80	80
4	65	70	80	50	100	100	100	100	100	40	40	40
5	30	55	40	50	75	0	80	58	45	70	90	60
6	60	65	75	50	100	100	55	90	70	80	85	75
7	85	95	95	50	100	100	58	58	58	65	70	70
8	75	75	75	50	75	50	58	90	78	90	95	90
9	60	55	40	50	100	100	90	68	45	95	90	85
10	75	70	80	50	25	25	45	45	70	45	70	70
11	100	100	100	50	100	100	100	45	10	80	75	90
12	85	95	85	50	100	100	80	53	70	90	95	95
13	65	75	80	50	100	75	23	80	78	45	85	75
14	65	80	70	50	100	100	80	68	68	10	35	50
15	95	90	90	50	100	100	90	90	90	65	75	75
16	70	35	40	50	100	25	45	45	58	45	55	80
17	70	65	60	50	50	25	68	68	58	50	70	55
18	95	100	100	50	100	100	100	100	100	100	100	100
19	25	40	25	50	50	25	68	90	58	15	50	25
20	70	70	55	50	100	75	100	80	45	80	80	75
21	35	40	5	50	0	0	45	48	58	80	80	40
22	55	65	50	50	50	50	35	45	45	75	80	35
23	50	55	70	50	100	100	100	70	90	75	65	80
24	50	40	45	50	25	25	100	100	100	80	85	70
25	85	100	70	50	100	75	58	58	58	85	90	65
26	65	55	50	50	75	0	78	90	100	55	50	60
27	80	75	65	50	0	0	68	68	68	60	60	50
28	90	85	85	50	100	100	90	80	80	80	85	85
29	25	x	20	50	x	0	58	x	58	35	x	20
30	100	x	100	50	x	50	100	x	90	85	x	80
31	80	100	100	50	100	100	90	100	90	55	80	80
média	70	72	68	50	78	63	73	73	70	66	74	68
DP	22	21	26	0	33	40	23	20	21	23	17	20
mediana	70	70	70	50	100	75	78	70	70	75	80	75
IQ1	60	55	50	50	50	25	56	58	58	48	65	58
IQ3	85	95	88	50	100	100	95	90	90	80	85	80

Anexo M. Escores do domínio maior saúde mental do questionário de qualidade de vida das 31 pacientes, nos meses basal, 6 e 12.

	Vitalidade 0	Vitalidade 6	Vitalidade 12	LimAspEmoc 0	LimAspEmoc 6	LimAspEmoc 12	BemEstarEmoc 0	BemEstarEmoc 6	BemEstarEmoc 12	DesempSoc 0	DesempSoc 6	DesempSoc 12
1	75	95	85	67	100	100	68	80	96	75	100	100
2	35	30	40	33	33	67	32	32	44	50	50	25
3	95	100	80	100	100	100	96	100	80	100	100	88
4	15	50	25	0	100	100	40	52	52	75	88	100
5	70	85	65	0	33	33	72	84	72	63	75	63
6	80	100	85	100	100	100	84	100	88	88	100	100
7	65	85	85	0	100	100	64	92	92	63	100	100
8	75	80	70	33	100	0	76	72	76	75	100	88
9	85	75	80	100	100	100	88	76	92	100	100	88
10	65	25	30	33	67	67	52	48	52	13	63	50
11	85	80	85	100	100	33	84	80	80	100	100	100
12	50	65	60	100	100	100	28	44	44	25	50	63
13	25	70	65	33	100	33	24	80	52	38	100	75
14	50	55	55	100	100	100	16	44	40	50	63	63
15	70	90	90	33	100	100	52	72	72	88	88	88
16	70	70	80	100	100	67	60	72	60	50	75	75
17	60	80	75	100	67	67	72	80	84	75	63	88
18	95	85	90	100	100	100	92	84	80	100	100	100
19	50	70	45	0	67	67	52	72	72	38	88	38
20	80	95	80	100	100	67	64	80	80	88	100	100
21	55	40	35	33	100	100	68	84	80	100	88	88
22	60	45	30	0	33	67	64	64	56	88	75	50
23	85	90	80	100	100	100	92	100	92	100	100	100
24	35	70	60	0	100	100	64	84	88	25	75	63
25	65	55	65	100	67	33	56	40	60	100	63	75
26	75	75	75	33	100	100	68	76	76	88	100	100
27	55	55	65	67	100	33	84	84	84	88	100	88
28	50	80	60	100	100	100	48	84	80	88	100	88
29	80	x	55	100	x	100	80	x	84	88	x	38
30	60	x	25	100	x	0	84	x	48	75	x	63
31	80	90	85	100	100	100	88	92	96	100	100	100
média	64	72	65	63	89	75	65	74	73	74	86	79
DP	19	20	20	42	22	32	21	18	17	26	17	22
mediana	65	75	65	100	100	100	68	80	80	88	100	88
IQ1	53	55	55	33	100	67	52	72	58	56	75	63
IQ3	80	85	80	100	100	100	84	84	84	94	100	100