

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**ALECSANDRA APARECIDA DOS SANTOS**

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DE UTILIZAÇÃO DA SALIVA COMO FONTE DE  
MATERIAL BIOLÓGICO PARA O ESTUDO DE BIOMARCADORES NA DOENÇA  
PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC)**

**São Paulo, SP**

**2008**



**ALECSANDRA APARECIDA DOS SANTOS**

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DE UTILIZAÇÃO DA SALIVA COMO FONTE DE  
MATERIAL BIOLÓGICO PARA O ESTUDO DE BIOMARCADORES NA DOENÇA  
PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC)**

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho, para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Professor Dr. Carlos Alberto Silva

**São Paulo, SP**

**2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Alecsandra Aparecida dos.

Análise da viabilidade de utilização da saliva como fonte de material biológico para o estudo de biomarcadores na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)/ Alecsandra Aparecida dos Santos. São Paulo: 2008.

55f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Silva

1. Doença pulmonar obstrutiva crônica. 2. Metaloproteinase 2 da matriz

3. Metaloproteinase 9 da matriz e saliva. I. Silva, Carlos Alberto.

CDU 616.24

## DEDICATÓRIA

*À minha mãe, Francisca, incentivadora do meu aprendizado, companheira em todos os momentos desta caminhada, meu exemplo de vida.*

*À minha irmã, Shirlei, que despertou em mim o desejo de ingressar em um curso de mestrado.*

*À minha irmã Débora, amiga, conselheira, que trouxe para minha vida a alegria dos meus sobrinhos, Marco Antônio e Luiz Felipe.*

*Por último, mas não pela ordem de importância, a Deus, pois, sem ele nada seria possível.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Alberto Silva, pela confiança em mim depositada, por compartilhar comigo parte de seu conhecimento, tempo, idéias, por saber compreender, ao longo desses anos, os momentos difíceis que passei, estimulando-me a seguir adiante e, sobretudo, por me ensinar biologia molecular, algo tão distante de minha realidade profissional, mas que certamente ampliou meus horizontes.*

*Às Professoras Doutoradas Carla Malaguti e Simone Dal Corso, por me ajudarem em todas as etapas deste trabalho, da elaboração do projeto à análise estatística, e que foram essenciais para minha formação.*

*À colega de mestrado, Rafaella, que vivenciou comigo os desafios desta pesquisa, dia após dia, no laboratório de Fisiologia do Exercício.*

*Às alunas da iniciação científica, Danúbia, Beatriz, Paula, Cássia e Renata, pessoas fundamentais durante o processo de avaliação dos pacientes e análise das amostras.*

*Ao Bruno, técnico do laboratório de Pesquisa, pela disponibilidade com que ajudou não só a mim, como aos demais.*

*À Joyce, mestranda da UNIFESP, por nos ensinar o método de Bradford.*

*Ao Professor Doutor José Antônio Silva Júnior, alguém tão notório na área da pesquisa científica e, ao mesmo tempo, dotado de tamanha simplicidade, que se configurou para mim num exemplo de inteligência e caráter.*

*À Professora Doutora Manoela Domingues Martins, da disciplina de Redação, a quem conhecer melhor representou uma experiência gratificante, pela energia inesgotável e extrema capacidade de se dedicar a várias tarefas com o mesmo dinamismo e perfeição.*

*À Flávia, por incentivar-me a trilhar novos caminhos na profissão, ao longo desses quatro anos de conhecimento e profunda admiração.*

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	vii
<i>Summary</i> .....	viii
<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos gerais da DPOC .....	2
1.2 O papel das enzimas proteolíticas na DPOC .....	6
1.3 As metaloproteinases na DPOC.....	8
<b>2 RELEVÂNCIA DO PRESENTE ESTUDO.....</b>	<b>13</b>
<b>3 ARTIGO I.....</b>	<b>16</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>38</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>47</b>

## RESUMO

**Objetivos:** O aumento da expressão das metaloproteinases da matriz (MMPs) é considerado um importante fator no desenvolvimento da DPOC. Nós realizamos este estudo para quantificar a expressão da MMP-2 e MMP-9 na saliva de pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis, e para avaliar a viabilidade dos componentes da saliva como fonte de material biológico para o estudo de biomarcadores em DPOC. **Métodos:** Foram selecionados pacientes com DPOC (n=16) e controles saudáveis (n=9). Em ambos os grupos foram realizados teste espirométrico e obtidas amostras de saliva de cada indivíduo. Os níveis de MMP-2 e MMP-9 na saliva foram determinados por Western Blot. **Resultados:** A MMP-2 e a MMP-9 foram significativamente maiores em pacientes com DPOC do que no grupo de indivíduos saudáveis. A concentração de MMP-2 foi correlacionada negativamente com o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) ( $r = -0,582$ ,  $p = 0,014$ ) em pacientes com DPOC. **Conclusão:** Os atuais achados abrem novas perspectivas para o estudo específico de biomarcadores na saliva para prever e monitorar a obstrução ao fluxo aéreo em pacientes com DPOC.

## SUMMARY

**Objectives:** The increased expression of matrix metalloproteinases (MMPs) is considered to be a key factor in the development of COPD. We performed this study to quantify the expression of MMP-2 and MMP-9 in saliva of COPD patients and healthy controls, and to evaluate feasibility of saliva compounds as a biological material source for the study of biomarkers in COPD. **Methods:** COPD patients (n=16) and healthy controls (n=9) were selected. In the both group spirometry test was performed and saliva samples were obtained from each subject. The saliva levels of MMP-2 and MMP-9 were determined by Western Blot. **Results:** MMP-2 and MMP-9 were significantly higher in COPD patients than in control subjects. MMP-2 concentration was correlated negatively with forced expiratory volume in one second (FEV<sub>1</sub>) ( $r = -0,582$ ;  $p = 0,014$ ) in COPD patients. **Conclusion:** The current findings open new perspectives to study specific biomarkers in saliva to predict and monitor airway obstruction in COPD patients.



## 1.1 Aspectos gerais da doença pulmonar obstrutiva crônica

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é definida pela limitação ao fluxo aéreo, geralmente progressiva, não totalmente reversível, em decorrência à resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas ou gases nocivos<sup>1</sup>. O principal fator etiológico é o tabagismo e o comprometimento não é apenas dos pulmões, pois se observam manifestações sistêmicas, que incluem limitações ao exercício, disfunção dos músculos periféricos e desnutrição, o que ocasiona internações freqüentes por exacerbação<sup>2</sup>.

A exposição à fumaça de cigarro é o fator de risco mais comum para DPOC, sendo a cessação do tabagismo importante medida tanto para a prevenção quanto para o tratamento da doença<sup>3</sup>. Poluição ambiental, predisposição genética, exposição a poluentes químicos e ocupacionais, alterações no crescimento e desenvolvimento pulmonar, estresse oxidativo, gênero, estado socioeconômico, nutrição, infecções respiratórias, comorbidades e idade; também podem desencadear a doença<sup>1</sup>.

A DPOC é mundialmente responsável por alto índice de mortalidade e morbidade, porém há variações na prevalência da doença entre os países<sup>4</sup>. Entretanto, este índice é proporcional ao número de tabagistas, exposição aos fatores de risco e o envelhecimento da população<sup>1</sup>. No Brasil, o perfil epidemiológico da doença não está bem estabelecido, mas um estudo

realizado na Grande São Paulo evidenciou uma prevalência total da DPOC de 15,8 %, correlacionando-se positivamente com a idade<sup>5</sup>.

Pacientes com DPOC freqüentemente apresentam aumento da resistência ao fluxo aéreo, bem como aprisionamento de ar e hiperinsuflação pulmonar<sup>6</sup>. A hiperinsuflação altera a parede torácica, colocando os músculos respiratórios em desvantagem mecânica, o que aumenta o drive respiratório e a sensação de dispnéia<sup>7</sup>. Neste sentido, para prevenir a sensação de dispnéia, estes pacientes reduzem suas atividades de vida diária, o que contribui para o isolamento social, desenvolvimento de ansiedade e depressão, ocasionando piora do condicionamento físico e da qualidade de vida<sup>7</sup>.

O diagnóstico da doença consiste da associação de sintomas e fatores de risco à espirometria<sup>8</sup>. A relação entre volume expiratório forçado no primeiro segundo e capacidade vital forçada ( $VEF_1/CVF$ ) inferior a 0,7, pós-broncodilatador confirma a limitação ao fluxo aéreo<sup>8</sup>. A avaliação completa de um paciente com DPOC deve incluir além da espirometria, que é uma medida fisiológica da função pulmonar, a avaliação da intolerância ao exercício. As limitações físicas funcionais contribuem significativamente para o prejuízo das atividades físicas basais, tais como mobilidade e força muscular<sup>9</sup>. Deste modo, os testes de avaliação da capacidade ao exercício permitem verificar o grau de disfunção, a sobrevida, a presença de hipoxemia induzida pelo exercício, como também a efetividade de um tratamento<sup>10</sup>.

Existem vários métodos descritos para avaliação da capacidade física dos pacientes com DPOC. O teste incremental máximo no ciclo ergômetro é recomendado para avaliar o pico de consumo máximo de oxigênio, e é considerado como o melhor teste para avaliação da capacidade ao exercício em pacientes com DPOC<sup>11</sup>. No entanto, testes de exercício cardiopulmonar no ciclo ergômetro possuem limitações para o uso na prática clínica, tanto pelo alto custo e tecnologia quanto por exigir do paciente uma atividade menos familiar, do que, por exemplo, o caminhar<sup>10</sup>. Como alternativa para este teste, há o teste de caminhada dos seis minutos (TC6) e o teste do degrau (TD). Ambos possuem baixo custo, são de fácil aplicabilidade e estimam a capacidade funcional.

O TC6 foi instituído na prática clínica no início dos anos oitenta para avaliar funcionalmente portadores de DPOC, sendo uma adaptação do teste de caminhada dos 12 minutos<sup>12</sup>. Este teste é realizado em um corredor plano, com no mínimo 30 metros, sendo avaliada a distância percorrida durante seis minutos. Os indivíduos são orientados a andar o mais rápido possível, podendo parar se necessário, e usar oxigênio. Em 2002, a Sociedade Americana do Tórax (ATS), publicou um guia com as recomendações necessárias para padronizar a realização deste teste<sup>13</sup>. Embora o TC6 seja de execução simples, seguir as recomendações da ATS, principalmente no que se refere à familiarização e a utilização de frases padronizadas de incentivo, contribui para que o paciente não perca a motivação ou tenha um desempenho submáximo<sup>14</sup>.

O TD possibilita a avaliação da tolerância ao exercício, do risco para complicações pós-operatórias e do esforço relacionado à hipoxemia<sup>15</sup>. Este teste não necessita de um amplo espaço físico, sendo uma vantagem em relação ao TC6, para a sua realização é necessário um degrau com 20 centímetros de altura, sendo o paciente orientado a subir e descer o degrau o mais rápido possível, por um período determinado, freqüentemente seis minutos<sup>16</sup>. Os parâmetros de avaliação e as recomendações respeitam os mesmos critérios da ATS para a realização do TC6<sup>15</sup>. O trabalho contra a gravidade e o uso de grupos musculares não utilizados com freqüência nas atividades de vida diária, contribuem para o aumento das demandas metabólicas e ventilatórias, sendo freqüentemente atingidos os limites máximos<sup>15</sup>. Deste modo, o TD pode se correlacionar com a tolerância máxima ao exercício<sup>15</sup>.

Como exposto anteriormente, a DPOC é uma doença com comprometimento sistêmico, em 2004 Celli e colaboradores<sup>17</sup>, desenvolveram o índice BODE, considerando que o uso exclusivo do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) para prever a gravidade da doença, não refletia as alterações sistêmicas. O índice BODE consiste na avaliação integrada de quatro parâmetros: massa corporal, avaliada pelo índice de massa corporal (IMC); obstrução ao fluxo aéreo, verificada pelo VEF<sub>1</sub>, dispnéia, avaliada através da escala de dispnéia do *Medical Research Council* (MRC); e a avaliação da capacidade ao exercício, através da distância percorrida no TC6. Cada variável é atribuída em uma escala de 0 a 3, com exceção do IMC que apresenta uma escala de 0 a 1. A soma das

variáveis corresponde a uma pontuação do índice BODE de 1 a 10, em que 10 há pior gravidade e maior risco de morte<sup>17</sup>.

Recentemente, Cardoso e colaboradores<sup>18</sup> realizaram um estudo sobre o índice BODE em que a proposta foi substituir TC6 pela avaliação do consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$  máximo), pois este é considerado mais adequado para avaliação da capacidade ao exercício, em detrimento do TC6 que é um teste submáximo, dependente da motivação do paciente. Os autores relataram excelente correlação entre o índice BODE convencional e o índice BODE modificado. Entretanto, o trabalho de Cardoso e colaboradores<sup>18</sup>, não verificou a mortalidade, sendo este um importante aspecto do índice BODE. Tal fato motivou a investigação de Cote e colaboradores<sup>20</sup> a comparar o índice BODE e o índice BODE modificado, como marcador de mortalidade para DPOC. Este estudo evidenciou que a utilização do índice BODE, inicialmente proposto, utilizando o TC6 para avaliar a capacidade ao exercício, em pacientes com DPOC grave, é um melhor parâmetro de mortalidade do que o índice BODE que utiliza o  $VO_2$  máximo, o que sustenta a incorporação de testes simples na avaliação de pacientes com DPOC<sup>19</sup>.

## **1.2 O papel das enzimas proteolíticas na DPOC**

A DPOC é caracterizada pelo processo inflamatório envolvendo a participação de neutrófilos, macrófagos, linfócitos T  $CD8^+$ , que liberam mediadores inflamatórios que interagem com células estruturais na via aérea e parênquima pulmonar<sup>20</sup>. Embora células inflamatórias como macrófagos e

neutrófilos estejam implicadas na patogênese da doença, medicamentos antiinflamatórios como corticosteróides, amplamente empregados em outras patologias, são incapazes de alterar a progressão da DPOC<sup>21</sup>. Desta forma, observa-se claramente que o mecanismo patológico da doença precisa ser mais bem elucidado<sup>22</sup>.

Os aspectos fisiopatológicos da DPOC incluem o desequilíbrio entre o sistema protease- antiprotease, alterações da atividade oxidante – antioxidante e inflamação crônica da via aérea, processos estes que levam à destruição progressiva e reparo anormal da matriz extracelular (MEC)<sup>23</sup>. A hipótese do desequilíbrio protease- antiprotease tem dominado as teorias sobre a fisiopatologia da doença desde que se constatou que indivíduos com deficiência hereditária da proteína alfa 1- antitripsina têm maior risco para o desenvolvimento da DPOC<sup>24</sup>.

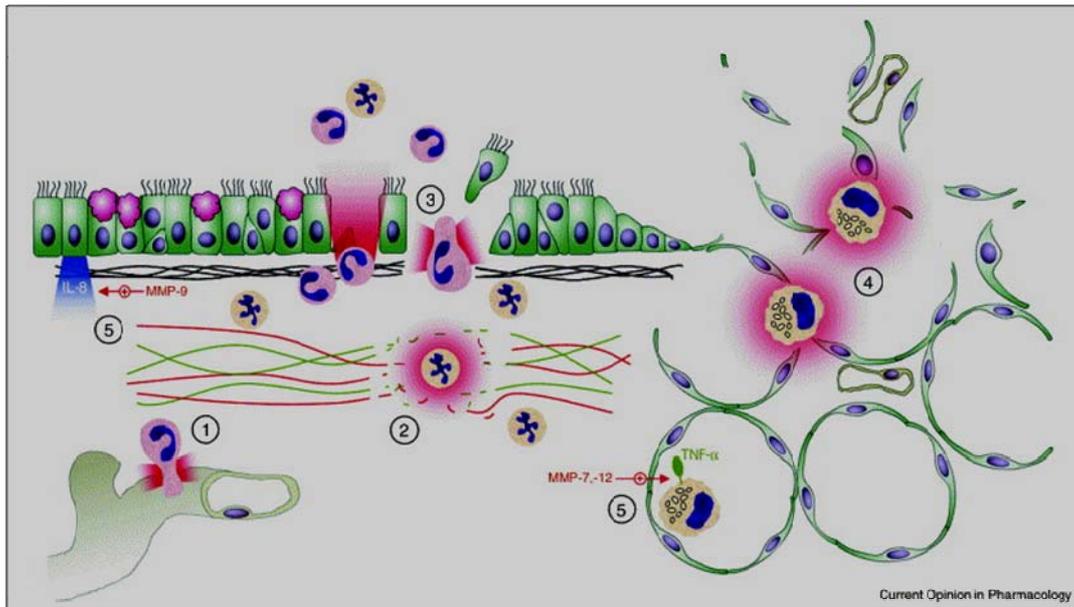
Atualmente, existe um grande interesse no estudo das metaloproteinases da matriz, também conhecidas como MMPs ou matrixinas, pois várias evidências indicam que estas enzimas contribuem significativamente para o desenvolvimento da DPOC, uma vez que estimulam a migração de células inflamatórias no pulmão, a remodelagem e destruição do tecido pulmonar<sup>25</sup> (ver figura 1).

Além das metaloproteinases, outros grupos de enzimas proteolíticas estão descritos na patogênese da DPOC, como as cisteíno-proteinases (catepsinas) e serino-proteinases (elastases)<sup>26 e 27</sup>. A elastina, proteína elástica presente no parênquima pulmonar, também é um dos importantes

alvos para proteases, levando à perda da elasticidade em pacientes com enfisema<sup>28</sup>. O papel das catepsinas na DPOC ainda é desconhecido, entretanto, tem se detectado o aumento dos níveis de expressão da catepsina L e S em lavado broncoalveolar de pacientes portadores de DPOC<sup>29</sup> e, em macrófagos alveolares de fumantes<sup>30</sup>. Da mesma forma, os níveis de expressão da elastase de neutrófilo (elastase-2) também são maiores em DPOC<sup>31</sup>, o que contribui para o prejuízo do recuo elástico do pulmonar.

### **1.3 As metaloproteinases na DPOC**

As metaloproteinases são enzimas que constituem uma família de 25 endopeptidases em ratos, e 24 em humanos, sendo que o primeiro membro foi descoberto em 1961 durante a metamorfose da pele do rabo de um anfíbio, e o último membro, epilisina (MMP-28), foi descoberto somente há quarenta anos<sup>32</sup>. Inicialmente, as MMPs foram classificadas conforme o substrato específico, por exemplo: colagenase (MMP-1, -8 e -13), gelatinase (MMP-2 e -9), estromelisina (MMP-3, -10 e -11), matrilisina (MMP-7), macrófago elastase (MMP-12) e MMPs tipo membrana (MMP14, -15, -16 e -17)<sup>32</sup>. Entretanto, com a caracterização de novas MMPs, adotou-se uma seqüência numérica baseada na ordem do descobrimento<sup>32 e 33</sup>.



**Figura 1. Aspectos Gerais do possível envolvimento das MMPs na fisiopatologia da asma e da DPOC<sup>25</sup>.** MMPs contribuem com o extravasamento de células inflamatórias do sangue para o interstício (1). A degradação dos componentes da MEC (2) estimula a migração de células inflamatórias como células dendríticas, neutrófilos para o epitélio (3). O aumento da expressão e liberação de MMPs permite a destruição do tecido pulmonar saudável (4). As MMPs também aumentam a quimiotaxia da interleucina-8 (IL-8), enquanto que, as MMPs -7 e -12 podem ativar o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) na superfície de macrófagos (5).

As MMPs são produzidas por células estromais, por neutrófilos e macrófagos alveolares<sup>34</sup>, que estão associadas a inúmeras funções biológicas, como: degradação dos componentes de matriz e remodelamento de tecidos; liberação de citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas; modulação da mobilidade e migração celular<sup>35</sup>. Estas proteases são sintetizadas como pro-enzimas secretadas ou de membrana que após o processamento, ou seja, clivagem de um pro-peptídeo na porção N-terminal adquirem a forma ativa<sup>36</sup>.

A atividade das MMPs nos pulmões é um processo altamente regulado em nível de transcrição gênica, por ativação proteolítica de pro-enzimas inativas e pelos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs)<sup>24</sup>. Embora a função de cada MMP esteja relacionada com o substrato específico, todas as MMPs degradam proteínas da matriz extracelular, contém zinco no centro ativo, precisam de cálcio para sua estabilidade e têm função somente em pH neutro<sup>33</sup>. Exceto as MMPs tipo membrana, todas as MMPs são secretadas como pro- formas inativas que são ativadas no espaço extracelular.

Existem fortes evidências do envolvimento das MMPs -1, -2, -8, -9 e 12 em patologias pulmonares, sendo que há relatos do aumento destas enzimas no tecido pulmonar, lavado broncoalveolar e escarro de pacientes com DPOC<sup>30 e 37</sup>. A MMP-2 pertence à mesma família de gelatinases que a MMP-9, porém tem sido menos estudada em pacientes com DPOC. A MMP-2 é expressa por células estruturais, como células endoteliais e células de

músculo liso, locais onde existem muitos tipos celulares infiltrando o tecido pulmonar em pacientes com DPOC<sup>38</sup>.

Um estudo que avaliou 43 pacientes com DPOC e os comparou com dois grupos controles, ambos compostos por indivíduos com função pulmonar normal, sendo um grupo composto por 12 indivíduos tabagistas e outro composto por 10 indivíduos que nunca fumaram, constatou através da análise do escarro induzido, a correlação negativa da MMP-2 com o VEF<sub>1</sub>, demonstrando que esta enzima tem importante função na limitação ao fluxo aéreo<sup>39</sup>. O resultado deste estudo corrobora com o trabalho de Baraldo e colaboradores<sup>38</sup>, em que se demonstrou, através da análise de tecido pulmonar, a correlação negativa da expressão da MMP-2 com a relação VEF<sub>1</sub>/CVF, sugerindo que esta MMP pode ser um importante mediador dos mecanismos que desencadeiam o remodelamento e a inflamação do tecido pulmonar em pacientes com DPOC<sup>38</sup>.

A MMP-9 tem sido foco de interesse de muitos estudos, os quais relatam o aumento desta MMP em pacientes com DPOC<sup>30, 34 e 40</sup>. Há evidências da elevação da MMP-9 em lavado broncoalveolar, como também a elevação desta MMP e do TIMP-1 em escarro de portadores de DPOC<sup>41</sup>. Esta enzima é amplamente produzida por neutrófilos, com acúmulo preferencialmente no lúmen da via aérea, e assim como a MMP-2 degrada colágeno, elastina e outras proteínas da matriz extracelular de macrófagos<sup>42</sup>.

## ***2 RELEVÂNCIA DO PRESENTE ESTUDO***

---

---

Além dos testes clínicos, como o índice BODE, há uma forte tendência na busca de estratégias alternativas de avaliação em pacientes com diferentes disfunções, como por exemplo, na DPOC. Atualmente, um grande número de estudos tem sido realizado com intuito de avaliar a eficácia das estratégias de avaliação, assim como, a efetividade dos programas de Reabilitação Pulmonar no tratamento do paciente com DPOC<sup>43 e 44</sup>. Por outro lado, essas estratégias geram resultados controversos que podem inviabilizar a avaliação do paciente e até, a efetividade do programa de reabilitação.

Neste sentido, o estudo e a identificação de marcadores biológicos de doenças, protéicos ou peptídicos, que representem a avaliação de pacientes com DPOC tornou-se foco de estudo por grupos altamente capacitados nessa área de conhecimento. Com isso, a caracterização dos componentes da saliva abre perspectivas para a identificação de biomarcadores de diferentes alterações morfofisiológicas, de uma forma não invasiva.

A saliva é secretada por múltiplas glândulas salivares incluindo parótida, submandibular, sublingual e, outras glândulas menores presentes na mucosa oral<sup>45</sup>. É constituída por várias proteínas e peptídeos, produzidas especificamente nas glândulas salivares ou de fonte sistêmica que desempenham funções biológicas importantes<sup>46</sup>. Com o avanço tecnológico em genômica, bioinformática e proteômica têm se verificado a presença de marcadores específicos de doenças orais e sistêmicas<sup>48</sup>, como é o caso da periodontite<sup>47</sup> e a Síndrome de Sjögren (doença auto-imune sistêmica)<sup>49</sup>.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo correlacionar os parâmetros analisados na prova de função pulmonar com os níveis de expressão de metaloproteinases na saliva de pacientes com DPOC em comparação com indivíduos saudáveis. Desta forma, verificar a viabilidade de utilização da saliva, como fonte de material biológico não-invasivo, para a caracterização de possíveis biomarcadores que poderiam auxiliar ou complementar o diagnóstico da doença.



**Título: ANÁLISE DA VIABILIDADE DE UTILIZAÇÃO DA SALIVA COMO FONTE DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA O ESTUDO DE BIOMARCADORES NA DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC)**

Title: Feasibility analysis of utilization of saliva as a biological material source for the study of biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)

Alecsandra Aparecida dos Santos<sup>1</sup>, Carla Malaguti<sup>2</sup>, Simone Dal Corso<sup>2</sup> e Carlos Alberto Silva<sup>3</sup>.

1. Fisioterapeuta e aluna do programa de mestrado em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho;
2. Professora doutora, Laboratório de Fisiologia do Exercício, Universidade Nove de Julho;
3. Professor doutor, Laboratório de Aplicações Moleculares e Celulares em Reabilitação, Universidade Nove de Julho.

Correspondência:

**Prof. Dr. Carlos Alberto Silva**

Centro de Pós-Graduação

Departamento de Ciências da Reabilitação

Mestrado em Ciências da Reabilitação

Av. Francisco Matarazzo, 612

Fone: 55 11 36659325

Contato: [lescovar@uninove.br](mailto:lescovar@uninove.br)

## RESUMO

**Objetivos:** O aumento da expressão das metaloproteinases da matriz (MMPs) é considerado um importante fator no desenvolvimento da DPOC. Nós realizamos este estudo para quantificar a expressão da MMP-2 e MMP-9 na saliva de pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis, e para avaliar a viabilidade dos componentes da saliva como fonte de material biológico para o estudo de biomarcadores em DPOC. **Métodos:** Foram selecionados pacientes com DPOC (n=16) e controles saudáveis (n=9). Em ambos os grupos foram realizados teste espirométrico e obtidas amostras de saliva de cada indivíduo. Os níveis de MMP-2 e MMP-9 na saliva foram determinados por Western Blot. **Resultados:** A MMP-2 e a MMP-9 foram significativamente maiores em pacientes com DPOC do que no grupo de indivíduos saudáveis. A concentração de MMP-2 foi correlacionada negativamente com o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) (r= -0,582, p= 0,014) em pacientes com DPOC. **Conclusão:** Os atuais achados abrem novas perspectivas para o estudo específico de biomarcadores na saliva para prever e monitorar a obstrução ao fluxo aéreo em pacientes com DPOC.

**Palavras- chave:** DPOC, metaloproteinase 2 da matriz, metaloproteinase 9 da matriz e saliva

## ABSTRACT

**Objectives:** The increased expression of matrix metalloproteinases (MMPs) is considered to be a key factor in the development of COPD. We performed this study to quantify the expression of MMP-2 and MMP-9 in saliva of COPD patients and healthy controls, and to evaluate feasibility of saliva compounds as a biological material source for the study of biomarkers in COPD. **Methods:** COPD patients (n=16) and healthy controls (n=9) were selected. In the both group spirometry test was performed and saliva samples were obtained from each subject. The saliva levels of MMP-2 and MMP-9 were determined by Western Blot. **Results:** MMP-2 and MMP-9 were significantly higher in COPD patients than in control subjects. MMP-2 concentration was correlated negatively with forced expiratory volume in one second (FEV<sub>1</sub>) (r= -0,582; p= 0,014) in COPD patients. **Conclusion:** The current findings open new perspectives to study specific biomarkers in saliva to predict and monitor airway obstruction in COPD patients.

**Keywords:** COPD, matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9 and saliva

## INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma enfermidade respiratória, geralmente causada pela inalação da fumaça de cigarro, resultando em alterações irreversíveis nas vias aéreas e obstrução crônica ao fluxo aéreo. A limitação crônica pulmonar da DPOC é causada pela combinação da bronquiolite obstrutiva e destruição do parênquima pulmonar distal ao bronquíolo terminal (enfisema) dependendo de cada indivíduo<sup>1</sup>.

Os efeitos sistêmicos associados à DPOC correspondem à inflamação sistêmica com presença de estresse oxidativo, concentrações anormais de citocinas circulantes e ativação das células inflamatórias<sup>2</sup>. Além disso, inclui a perda progressiva de massa muscular e a presença de várias anomalias bioenergéticas, podendo desencadear caquexia em função do aumento da apoptose e/ou desuso muscular<sup>3</sup>. Tais efeitos sistêmicos possuem conseqüências clínicas importantes, pois contribuem com a limitação da capacidade física do paciente e o declínio da condição de saúde na DPOC<sup>4</sup>.

Considerando o comprometimento da capacidade pulmonar e sua implicação na DPOC observa-se a exploração de novos horizontes para o estudo fisiopatogênico desta disfunção, permitindo a mudança do enfoque quase exclusivamente relacionado à função pulmonar para o estudo celular e bioquímico da doença<sup>5</sup>. A DPOC está sendo caracterizada como doença inflamatória associada à intensa degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) e fibrose tecidual<sup>6</sup>.

Atualmente, existe um grande interesse no estudo das metaloproteinases (MMPs) da MEC, pois várias evidências indicam que estas enzimas contribuem significativamente para o desenvolvimento da DPOC, com a migração de células

inflamatórias no pulmão, a remodelagem e destruição do tecido pulmonar<sup>7</sup>. As MMPs pertencem à família de metaloenzimas zinco-dependentes, que podem ser identificadas e subdivididas em colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, macrófago elastase, e MMPs tipo membrana, de acordo com a estrutura molecular e especificidade do substrato<sup>8</sup>. Estas proteases são sintetizadas como pro-enzimas secretadas ou de membrana que após o processamento, ou seja, clivagem de um pro-peptídeo na porção N-terminal, adquirem a forma ativa<sup>9</sup>. As MMPs catalisam componentes protéicos da MEC produzindo moléculas peptídicas biologicamente ativas que participam do processo inflamatório envolvido na DPOC<sup>10</sup>. A MMP- 2 e a MMP-9 pertencem ao grupo das gelatinases, que podem hidrolisar múltiplas moléculas da MEC, tais como colágeno tipos I, II, III e IV, elastina e proteoglicanos<sup>11</sup>. Estas são seletivamente inibidas por TIMPs, inibidores teciduais de metaloproteinasas, como por exemplo, o TIMP-1, um inibidor da atividade catalítica da MMP-9 na proporção 1:1<sup>12</sup>. Vários estudos têm demonstrado altos níveis de expressão das MMPs e TIMPs, principalmente a MMP-9 e TIMP-1, em lavado broncoalveolar de pacientes com DPOC e asmáticos participando na remodelagem da MEC <sup>13</sup>.

A caracterização dos componentes protéicos ou peptídicos na saliva tem aberto perspectivas para a identificação de biomarcadores de diferentes alterações morfofisiológicas, uma vez que é uma estratégia de coleta não-invasiva, sendo um dos benefícios em relação aos outros fluídos biológicos como o soro e plasma<sup>14</sup>. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo correlacionar os parâmetros analisados na prova de função pulmonar com os níveis de expressão da MMP-2 e MMP-9 na saliva de pacientes com DPOC em comparação aos indivíduos saudáveis. Desta forma, verificar a viabilidade de utilização da saliva, como fonte de material

biológico não-invasivo, para a caracterização de possíveis biomarcadores que poderiam auxiliar ou complementar o diagnóstico da doença.

## **CASUÍSTICA E MÉTODO**

### **Indivíduos**

Este estudo foi realizado na Universidade Nove de Julho (UNINOVE), após ser aprovado pelo comitê de ética da instituição (protocolo número 209812/08), nos Laboratórios de Fisiologia do Exercício e Aplicações Moleculares e Celulares em Reabilitação da UNINOVE. Participaram deste estudo, voluntários, portadores de DPOC que aguardavam ingresso no Programa de Reabilitação Pulmonar do Ambulatório de Fisioterapia e, indivíduos saudáveis, provenientes da Associação SOS família São Geraldo, localizada à Rua Pedro Ângelo Janitelli, 72- Ponte Grande, Guarulhos - SP.

Foram avaliados 16 pacientes com DPOC moderada ou grave. O diagnóstico da doença foi baseado nos critérios estabelecidos pela Sociedade Americana do Tórax (ATS). Todos os pacientes estavam com doença estável, sugerida por ausência de modificação nas medicações nas últimas quatro semanas. Os critérios de exclusão foram: indivíduos com doença cardíaca isquêmica, intervenção cirúrgica recente ou a participação em programas de reabilitação pulmonar. Para análise comparativa, avaliamos um grupo controle constituído por nove de indivíduos saudáveis, que nunca fumaram, com espirometria normal, sem história de doenças respiratórias, de ambos os gêneros, com faixa etária compatível com o grupo DPOC. Todos os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

## **Prova de função pulmonar**

Inicialmente os indivíduos de ambos os grupos foram submetidos ao teste de função pulmonar através do espirômetro da marca MedGraphics<sup>®</sup>, conforme as diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Os parâmetros medidos foram: Capacidade Vital Forçada (CVF), Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>), relação VEF<sub>1</sub>/CVF, Fluxo Expiratório Forçado entre 25-75% da CVF (FEF 25-75 %) e Fluxo Expiratório Forçado Máximo (FEF Max.). Consideramos a melhor curva de três manobras, os resultados foram apresentados em porcentagem do previsto (% prev.).

As amostras de saliva foram coletadas entre 8h e 11h30 da manhã para minimizar os efeitos da variação diurna dos indivíduos do grupo DPOC e controle. As amostras de saliva (2 a 5 ml) foram coletadas diretamente em tubos de polipropileno e transferidas com o auxílio de uma pipeta para um tubo de microcentrífuga da marca eppendorf<sup>®</sup>. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (10000×g) a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi reservado e armazenado em freezer -70°C até o momento da análise.

## **Avaliação dos níveis de expressão das MMP- 2 e MMP- 9**

O extrato total de proteínas da saliva foi submetido à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, conforme protocolo previamente estabelecido<sup>15</sup>. A estimativa da concentração protéica foi realizada pelo método de Bradford, utilizando o reagente *Protein Assay* (Bio Rad Laboratories) e a soroalbumina bovina (BSA-Sigma) como padrão de referência. O gel de separação de 10% de poliactilamida foi preparado em

em tampão Tris-HCl 0,4 M pH 8,8, contendo SDS 0,1%, TEMED 0,01% e persulfato de amônio 0,05%. Após a polimerização desse gel, foi preparado o gel de empacotamento contendo poliacrilamida 3% em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, SDS 0,1%, TEMED 0,01% e persulfato de amônio 0,05%. Uma alíquota de 10-15 µl do extrato total de proteínas, contendo 150 µg de proteínas, foi combinada com o tampão desnaturante e redutor, contendo Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,002% e β-mercaptoetanol 4%. As amostras foram aquecidas a 95°C durante 5 minutos e aplicadas no gel. Foi utilizado como tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, contendo glicina 0,18 M, pH 8,3 e SDS 1%. As corridas foram realizadas a 100 V por aproximadamente 2,5 horas a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram transferidas por *eletroblotting* para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada em tampão com Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH7,5 (TBS) contendo leite em pó desnatado 5% por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação lenta. Após duas lavagens com TBS, contendo Tween20 0,05%, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo para a MMP-2, MMP-9 ou GAPDH (BIOMOL®1:1000) em TBS. O excesso de anticorpo na membrana foi removido com três lavagens de 10 minutos em TBS, contendo Tween20 0,05%. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho/fosfatase alcalina diluído 1:5000) por 60 minutos. Novamente a membrana foi submetida a lavagens sucessivas com tampão TBS e então, revelada com o substrato BCIP 0,4 mM / NBT 0,4 mM. Os padrões de massa molecular utilizados foram: soro albumina (68 kDa), gama-globulina (50 kDa e 23,5 kDa), ovo albumina (43 kDa) e ribonuclease (13,7 kDa).

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O teste de Kolmogorov- Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade da variância. Correlações entre os níveis de expressão da MMP-2, MMP-9 e dados espirométricos foram avaliados através do teste de Correlação de Pearson. Para comparações entre os dois grupos utilizamos o Teste-t não pareado. O nível de significância estatística foi  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

As características dos indivíduos com DPOC e saudáveis estão apresentadas na tabela 1. A amostra foi composta por 25 indivíduos, 16 indivíduos correspondem ao grupo DPOC e 9 indivíduos ao grupo controle, com média de idade não significativa entre os grupos. Quanto ao gênero, no grupo DPOC, 10 indivíduos são homens e no grupo controle 2 indivíduos são homens. Entre os pacientes avaliados no grupo DPOC todos são ex- tabagistas. O tempo de fumo no grupo DPOC foi avaliado em  $43,43 \pm 19,99$  anos e a relação maços/anos foi de  $68,93 \pm 46,75$ . Os indivíduos do grupo controle relataram que nunca fumaram.

Todos os pacientes do grupo DPOC apresentaram limitação ao fluxo aéreo, sendo a diferença entre os grupos extremamente significativa para o  $VEF_1$  e para a relação  $VEF_1/CVF$ . Entretanto, não houve diferenças significativas entre os grupos para a CVF, conforme mostra a tabela 1.

Os níveis de expressão das MMPs foram avaliados pela técnica de Western Blot, seguida da análise por densidade relativa das bandas correspondentes às

amostras de saliva dos indivíduos com DPOC e controle (Figura 1). Como esperado, identificou-se apenas uma banda com peso molecular de 66 kDa (forma ativa da enzima) nos ensaios de Western Blot utilizando o anticorpo primário anti-MMP-2 nos grupos DPOC e controle (Figura 1A). Da mesma maneira, detectou-se predominantemente a forma ativa da MMP-9 com o peso molecular de 86 kDa (dados não demonstrados). As análises das densidades ópticas das bandas correspondentes a MMP-2 indicaram que os níveis de expressão da MMP-2 foram significativamente maiores nas amostras de saliva do grupo DPOC em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, a expressão da MMP - 9 também foi detectada em níveis mais elevados nos pacientes com DPOC ( $p < 0,001$ ) (Figura 1B). A análise da proteína constitutiva GAPDH (38 kDa) indicou que aplicação da quantidade de proteína no gel SDS-PAGE foi igual em todas as amostras de saliva, pois os níveis de expressão não foram significativos entre os grupos DPOC e controle.

As análises de correlação de Pearson, indicaram correlação negativa entre os níveis de expressão da MMP-2 com os parâmetros de obstrução ao fluxo aéreo nos pacientes com DPOC,  $VEF_1$  ( $r = -0,513$ ,  $p = 0,042$ ) (Figura 2) e  $VEF_1/CVF$  ( $r = -0,579$ ,  $p = 0,019$ ) (dados não demonstrados). Por outro lado, não se detectou correlação entre os níveis de expressão da MMP-9 e os parâmetros de obstrução ao fluxo aéreo.

## **DISCUSSÃO**

O presente estudo demonstrou que os níveis de MMP-2 e MMP-9 nas amostras de saliva foram significativamente maiores nos pacientes com DPOC em relação aos sujeitos saudáveis, assim como, observou-se a correlação negativa entre

os níveis de expressão da MMP-2 e os parâmetros de obstrução aérea, VEF<sub>1</sub> e VEF<sub>1</sub>/CVF, nos pacientes com DPOC. Os dados apresentados contribuem com a viabilidade de utilização da saliva, como fonte de material biológico, para o futuro estudo de biomarcadores específicos da DPOC.

Os biofluidos freqüentemente utilizados para investigar patologias respiratórias incluem sangue, urina, escarro (espontâneo ou induzido) e lavado bronco-alveolar<sup>16</sup>. Desta forma, a possibilidade de utilização da saliva como fonte de material biológico tem se tornado extremamente viável por ser um fluido biológico de fácil coleta, manuseio e armazenamento<sup>14</sup>. Como as MMPs são extremamente representativas na DPOC, as MMPs -2 e -9 foram selecionadas para avaliar seus níveis de expressão na saliva e as possíveis correlações com os parâmetros de avaliação clínica na DPOC. Neste sentido, verificar a viabilidade de utilização da saliva como fonte de material biológico para o estudo de biomarcadores proteolíticos, utilizando estratégias experimentais mais eficazes e específicas, como a espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS), para a identificação de moléculas exclusivas da saliva de pacientes com DPOC.

O envolvimento das MMPs é considerado importante na patogênese da DPOC e tem sido bem caracterizado na literatura<sup>7</sup>. Quando comparados com indivíduos saudáveis, os pacientes com DPOC apresentam aumento dos níveis de MMP-1 e MMP-9 no lavado broncoalveolar<sup>17</sup>, acentuado aumento na expressão e atividade de MMP-2 e MMP-9 no parênquima pulmonar e no escarro<sup>18</sup>. Em relação ao processo inflamatório anormal na DPOC, a atividade das MMPs -8 e -9 em pacientes com DPOC correlaciona-se com o aumento do número de neutrófilos e ao grau de obstrução ao fluxo aéreo<sup>19</sup>. Além disso, tem sido relatado que os soros de pacientes com DPOC apresentam níveis de expressão e atividade enzimática da

MMP-9 mais elevados em relação aos indivíduos saudáveis, em função da gravidade da doença e do processo inflamatório das vias aéreas<sup>20</sup>. Da mesma forma, verificou-se que os níveis de expressão da MMP-2 e MMP-9 foram mais elevados em relação aos indivíduos saudáveis e, complementam as evidências de que a DPOC não está apenas associada às limitações da capacidade pulmonar funcional, mas também ao processo inflamatório sistêmico<sup>7</sup>.

A análise dos níveis de MMPs no soro e saliva de indivíduos fumantes e não-fumantes, demonstrou que na saliva, os níveis da forma ativa da MMP-9 (86 kDa) foram significativamente menores nos fumantes, mas no soro foi detectada em concentração mais elevada em relação aos não-fumantes<sup>21</sup>. Porém, no presente estudo observou-se que os níveis da MMP-9 na saliva foram significativamente maiores em pacientes com DPOC em comparação ao grupo controle. O fato dos pacientes com DPOC do presente estudo serem ex-tabagistas poderia explicar as diferenças experimentais observadas com relação à expressão da MMP-9 na saliva, pois no estudo anterior ao nosso foram recrutados indivíduos fumantes e as substâncias presentes no tabaco proporcionariam alterações na expressão da MMP-9 destes indivíduos<sup>22</sup>.

A saliva é secretada por múltiplas glândulas salivares incluindo parótida, submandibular, sublingual e, outras glândulas menores presentes na mucosa oral<sup>23</sup>. Constitui-se basicamente por várias proteínas e peptídeos, produzidos especificamente nas glândulas salivares ou de fonte sistêmica que desempenham funções biológicas importantes<sup>24</sup>. Com o avanço tecnológico em genômica, bioinformática e proteômica têm se verificado a presença de marcadores específicos de doenças orais e sistêmicas<sup>25</sup>, como é o caso da periodontite<sup>24</sup> e a Síndrome de Sjögren – doença auto-imune sistêmica<sup>25</sup>. Embora a DPOC acometa os pulmões, há

diversas manifestações sistêmicas relacionadas a esta patologia<sup>26</sup>. Além da inflamação presente nas vias aéreas, há evidências de inflamação sistêmica nos pacientes com DPOC, mas a relação entre inflamação local e sistêmica ainda é desconhecida<sup>27 e 28</sup>.

Alguns estudos têm caracterizado marcadores de obstrução aérea no soro de pacientes com DPOC, como os níveis circulantes mais elevados da E-selectina que se correlacionou com o VEF<sub>1</sub> (% prev.)<sup>28</sup>. Estes dados sugeriram fortemente a ativação e recrutamento de neutrófilos na DPOC, pois a E-selectina é um receptor de superfície destas células<sup>28</sup>. Como os neutrófilos representam a principal fonte de MMPs<sup>7</sup>, seria esperado níveis mais elevados de expressão destas enzimas nos fluidos biológicos. De fato, no presente estudo, verificou-se o aumento dos níveis de expressão da MMP-2 e -9 na saliva em pacientes com DPOC em relação aos indivíduos saudáveis. Entretanto, nas análises de correlação entre os níveis de expressão destas enzimas e os parâmetros de obstrução aérea, constatou-se que apenas os níveis de expressão da MMP-2 apresentaram correlações negativas com VEF<sub>1</sub> (% prev.) e VEF<sub>1</sub>/CVF (% prev.). Estes dados apontam evidências de que a MMP-2 pode estar relacionada às condições de limitação ao fluxo aéreo conforme demonstrado em um estudo que verificou a correlação negativa desta gelatinase com o VEF<sub>1</sub>, em escarro de pacientes com DPOC<sup>29</sup>

Em relação à MMP-9, um estudo prévio também observou os níveis mais elevados da expressão em pacientes com DPOC, mas também não observou correlações com os parâmetros da prova de função pulmonar ou com níveis de saturação de oxigênio no sangue arterial<sup>30</sup>. Deste modo, novos ensaios estão sendo planejados para estudar os níveis de expressão da MMP-9 em relação aos diferentes estágios de desenvolvimento da DPOC, pois se tem verificado que o nível de

expressão desta enzima no soro está diretamente relacionado com o alto grau de gravidade da doença<sup>21</sup>.

Em síntese, o presente estudo demonstrou que o aumento dos níveis de expressão da MMP-2 na saliva está relacionado com o grau de obstrução aérea em pacientes com DPOC por estar associada às disfunções sistêmicas. Assim, estes dados abrem perspectivas para o desenvolvimento de futuros estudos utilizando a saliva, como fonte de material biológico para a identificação e caracterização de possíveis marcadores protéicos e/ou peptídicos específicos da DPOC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. J Bras Pneumol. 2004; 30 Suppl 5: S1-S42.
2. Sauleda J, García-Palmer FJ, González G, Palou A, Agustí AGN. The activity of cytochrome oxidase is increased in circulating lymphocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and chronic arthritis. Am J Respir Crit Care Med. 2000 Jan; 161 (1):32-5.
3. Agustí AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J. 2003 Feb; 21(2):347-60.
4. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. A statement of the American Thoracic Society and European Respiratory Society. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Apr;159(4 Pt 2):S1-40. Review.
5. Ding L, Quinlan KB, Elliott WM, Hamodat M, Paré PD, Hogg JC et al. A lung tissue bank for gene expression studies in chronic obstructive pulmonary disease. COPD. 2004; 1 (2): 191-204.
6. Lagente V, Manoury B, Nénan S, Le Quément C, Martin-Chouly C, Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airwayinflammation and remodeling. Braz J Med Biol Res. 2005 Oct;38(10):1521-30.
7. Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pauwels RA. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. Curr Opin Pharmacol. 2005 Jun;5(3):257-63.

8. O' Reilly PJ, Gaggar A, Blalock JE. Interfering with extracellular matrix degradation to blunt inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2008; 8: 242-248.
9. Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res*. 2001;2(1): 10-9.
10. Weathington NM, van Houwelingen AH, Noerager BD, Jackson PL, Kraneveld AD, Galin FS et al. A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat Med*. 2006 Mar; 12(3):317-23.
11. Glader P, Eldh B, Bozinovski S, Andelid K, Sjöstrand M, Malmhäll C et al. Impact of acute exposure to tobacco smoke on gelatinases in the bronchoalveolar space. *Eur Respir J* 2008; 32: 644-650.
12. Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R. Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects. *Respir Med*. 2003 Jun;97(6):634-639.
13. Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN. Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge, *Am J Respir Crit Care Med* 162 (2000): 1157–1161.
14. Soo-Quee D, Choon-Huat KG. The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine. *Occup Environ Med*. 2007 Mar;64(3):202-10.
15. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Nov;152(5 Pt 2):S77-121.

15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
16. Cazzola M, MacNee W, Martinez FJ, Rabe KF, Franciosi LG, Barnes PJ et al. Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers. *Eur Respir J*. 2008 Feb;31(2):416-69.
17. Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Jul;156(1):240-7.
18. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V et al. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Dec;158(6):1945-50.
19. Vernooy JHJ, Lindeman JHN, Jacobs JA, Hanemaaijer R, Wouters EF. Increased Activity of Matrix Metalloproteinase-8 and Matrix Metalloproteinase-9 in Induced Sputum From Patients With COPD. *Chest* 2004; 126: 1802-1810.
20. Higashimoto Y, Yamagata Y, Iwata T, Okada M, Ishiguchi T, Sato H et al. Increased serum concentrations of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in COPD patients. *Eur Respir J*. 2005 May;25(5):885-90.
21. Raitio A, Tuomas H, Kokkonen N, Salo T, Sorsa T, Hanemaaijer R et al. Levels of matrix metalloproteinase-2,-9 and -8 in the skin, serum, and saliva of smokers and non-smokers. *Arch Dermatol Res*. 2005; 297: 242-248.

22. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics*. 2007 Aug; 4(4):531-8.
23. Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease. *J Am Dent Assoc*. 2006; 137(3): 322-329.
24. Baldini C, Giusti L, Bazzichi L, Lucacchini A, Bombardieri S. Proteomic analysis of the saliva: A clue for understanding primary from secondary Sjögren's syndrome? *Autoimmunity*. 2008; 7 (3): 185-191.
25. Yigla M, Berkovich Y, Nagler RM. Oxidative stress indices in COPD-Bronchoalveolar lavage and salivary analysis. *Arch Oral Biol*. 2007 Jan;52(1):36-43.
26. Wouters EF. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005; 2(1):26-33.
27. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2004; 59(7):574-80.
28. Riise GC, Larsson S, Löfdahl CG, Andersson BA. Circulating cell adhesion molecules in bronchial lavage and serum in COPD patients with chronic bronchitis. *Eur Respir J*. 1994 Sep;7(9):1673-7.
29. Chen Y, Chen P, Hanoaka M, Droma Y, Kubo K. Enhanced levels of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-2 correlate with the severity of airflow limitation in stable COPD. *Respirology*. 2008; 13: 1014-1021.

30. Boschetto P, Quintavalle S, Zeni E, Leprotti S, Potena A, Ballerin L et al. Association between markers of emphysema and more severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2006; 61:1037–1042

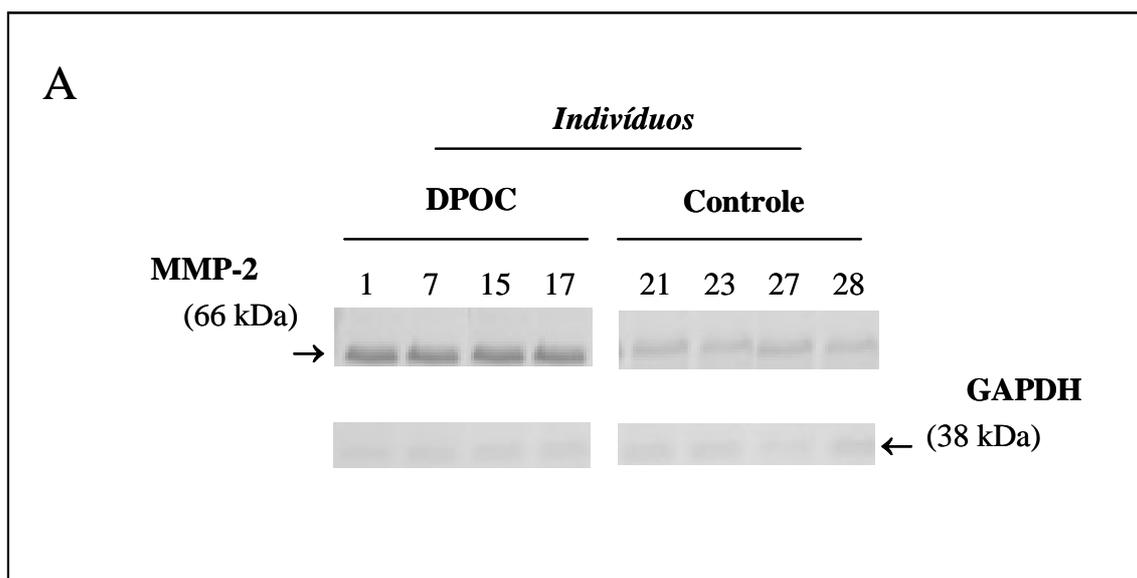
## LEGENDAS DAS FIGURAS E TABELAS

**Figura 1.** Análise dos níveis de expressão de proteína da MMP-2 na saliva de pacientes com DPOC e controle. (A) Representação da análise dos níveis de expressão da MMP-2 e GAPDH por *Western Blot* dos pacientes com DPOC (no. 1, 7, 15 e 17 e controle (no. 1, 3, 7 e 8). Observar que os níveis de expressão não variam para a GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (B) Densidade relativa das bandas em porcentagem obtida no *Western blot* com as amostras de saliva. Observar que os níveis de expressão de proteína MMPs -2 e -9 foram mais elevados em comparação ao grupo controle. DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica.

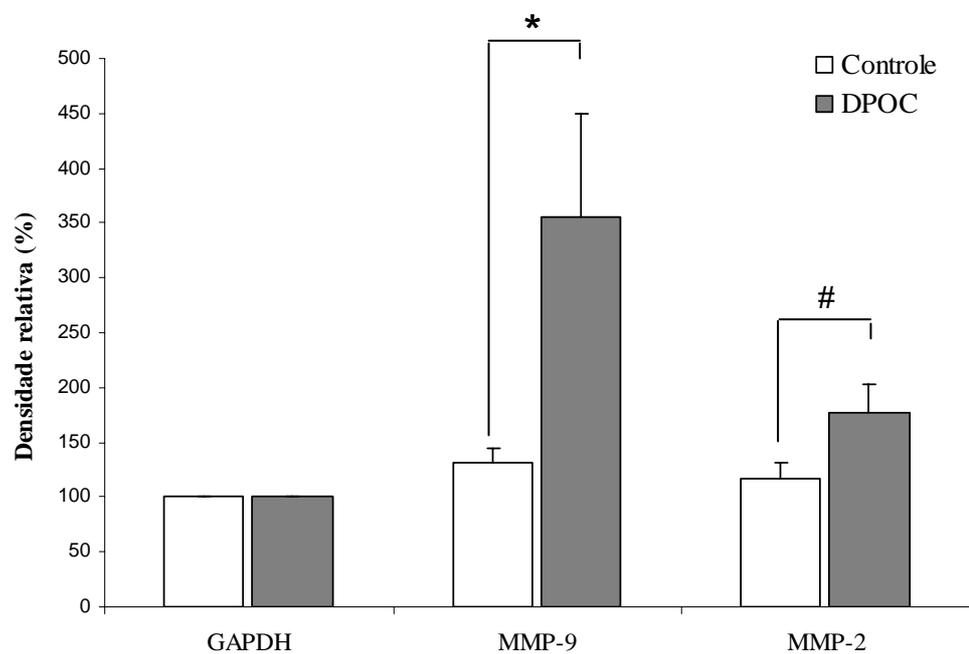
**Figura 2.** Relação entre os níveis de expressão da MMP-2 na saliva e os parâmetros de obstrução aérea VEF<sub>1</sub> (% prev.) em pacientes com DPOC. As análises de correlação de *Pearson* indicaram que os níveis de expressão da MMP-2 está relacionado negativamente com o grau de obstrução aérea, VEF<sub>1</sub> ( $r=-0,513$ ,  $p=0,042$ ).

**Tabela 1.** Características da população estudada, indivíduos com DPOC e saudáveis. Dados estão expressos como média e desvio padrão (DP). DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica.

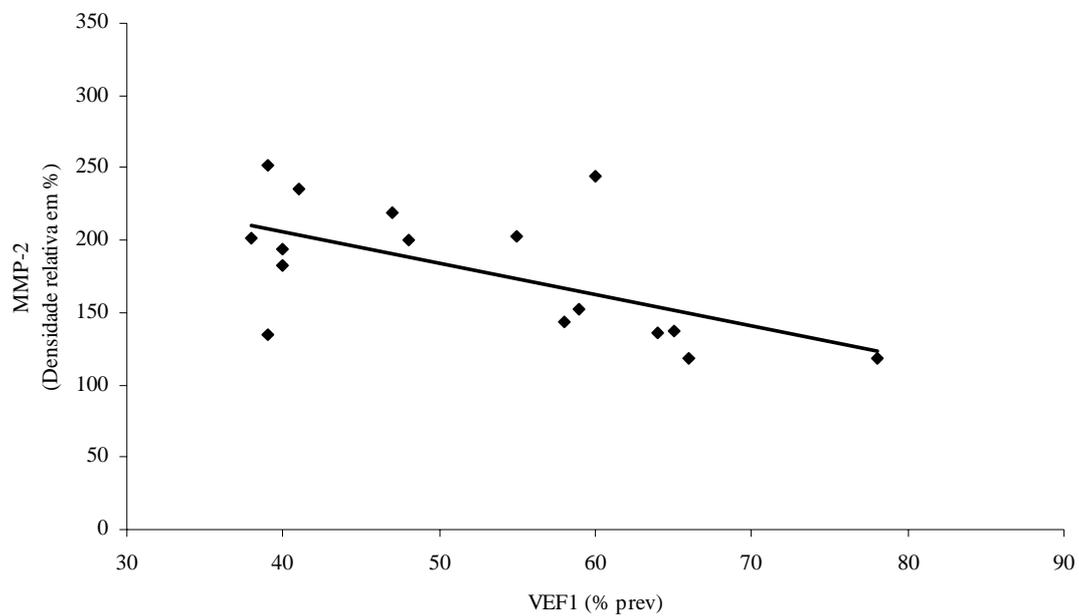
Figura 1.



**B**



**Figura 2.**



**Tabela 1.**

<b>CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO</b>			
	<b>GRUPOS</b>		<b>Valor (p)</b>
	<b>DPOC</b>	<b>Saudáveis</b>	
<b>Indivíduos (n)</b>	16	9	-
<b>Idade (anos)</b>	71,35 ± 9,47	70,78 ± 10,29	<b>0,897</b>
<b>Homens</b>	10	2	-
<b>Tabagistas</b>	0	0	-
<b>Ex-tabagistas</b>	16	0	-
<b>Maços/anos</b>	68,93 ± 46,45	-	-
<b>Tempo de fumo</b>	43,43 ± 19,99	-	-
<b>VEF<sub>1</sub>/CVF (% prev.)</b>	58,06 ± 13,31	107,77 ± 11,09	<b>0,0001*</b>
<b>VEF<sub>1</sub> (% prev.)</b>	52,31 ± 12,45	111 ± 17,37	<b>0,0001*</b>
<b>CVF (% prev.)</b>	89,43 ± 22,18	102 ± 14,52	<b>0,13</b>

Dados estão expressos em média ± desvio padrão, exceto quando não foi possível.

DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; CVF: capacidade vital forçada; % prev.: percentagem do previsto; VEF<sub>1</sub>: volume expiratório forçado no primeiro segundo.

\* p<0,05 (Teste t não pareado).



O presente estudo demonstrou que o aumento dos níveis de expressão da MMP-2 na saliva está relacionado com o grau de obstrução aérea em pacientes com DPOC por estar associada às disfunções sistêmicas. A análise dos níveis de expressão das MMPs- 2 e -9 na saliva de pacientes com DPOC são significativamente maiores quando comparados com indivíduos saudáveis, e que a elevação da MMP- 2 se correlacionou negativamente com a obstrução ao fluxo aéreo no grupo DPOC. Estes dados são condizentes com estudos de outros materiais biológicos melhor estabelecidos na DPOC. Neste sentido, abrem-se perspectivas para o desenvolvimento de futuros estudos utilizando a saliva, como fonte de material biológico, através de técnicas experimentais mais eficazes e específicas, como a espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS), para a identificação de moléculas exclusivas da saliva de pacientes com DPOC. E assim, complementar as estratégias de avaliação clínica na área da reabilitação pulmonar, uma vez que tal ferramenta auxiliaria a validação de protocolos de exercício para portadores de DPOC, e, sobretudo, contribuiria para melhor compreender esta patologia com alto impacto socioeconômico.

**5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

1. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukini Y, Jenkins C, Rodriguez- Roisin R, van Weel C, Zielinski J; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. **Am J Respir Crit Care Med.** 2007 Sep 15; 176 (6): 532-55.
2. Cote CG, Celli BR. Pulmonary rehabilitation and BODE index in COPD. **Eur Respir J.** 2005; 26: 630-636.
3. La Rocca G, Anzalone R, Magno F, Farina F, Cappello F, Zummo G. Cigarette smoke exposure inhibits extracellular MMP-2 (gelatinase A) activity in human lung fibroblasts. **Respir Res.** 2007; 8: 23.
4. Fabbri LM, Luppi F, Beghé B, Rabe KF. Update in chronic obstructive pulmonary disease 2005. **Am J Crit Care Med.** 2006; 173: 1056- 1065.
5. Menezes AMB, Jardim JR, Pérez- Padilla R, Camelier A, Rosa F, Nascimento O, Hallal PC, Platino team. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO study in São Paulo, Brazil. **Cad Saude Publica.** 2005; 21 (5): 1565-1573.
6. Izumizali M, Satake M, Takahashi H, Sugawara K, Shioya T, Homma I. Effects of inspiratory muscle thixotropy on 6-min walk distance in COPD. **Respir Med.** 2008; 102: 970-977.
7. Paulin E, Yamaguti WPS, Chammas MC, Shibao S, Stelmach R, Cukier A, Carvalho CRF. Influence of diaphragmatic mobility on

- exercise tolerance and dyspnea in patients with COPD. **Respir Med.** 2007; 101: 2113-2118.
8. Cazzola M, Donner CF, Hanania NA. One hundred years of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Respir Med.** 2007; 101: 1049-1065.
  9. Eisner MD, Blanc PD, Yelin EH, Sidney S, Katz PP, Ackerson, L, Lathon P, Tolstykh I, Omachi T, Byl N, Iribarren, C. COPD as a systemic disease: impact on physical functional limitations. **Am J Med.** 2008; 121(9): 789-796.
  10. Brown CD, Wise RA. Field tests of exercise in COPD: the six minute walk test and shuttle walk test. **COPD.** 2007; 4: 217-223.
  11. Zainuldim MR, Knoke D, Mackey MG, Luxton N, Alison JA. Prescribing cycle training intensity from the six-minute walk test for patients with COPD. **BMC Pulm Med.** 2007; 7: 9.
  12. Butland RJ, Pang J, Gross ER, Woodcock AA, Geddes DM. Two-, six, and 12-minute walking tests in respiratory disease. **Br Med J (Clin Res Ed).** 1982 May 29;284(6329):1607-8.
  13. American Thoracic Society. ATS Statement: guidelines for six-minute walk test. **Am J Resp Crit Care Med.** 2002; 166:111-117.
  14. Troosters T, Vilaro J, Rabino Vich R, Casas A, Barbera JA, Roisin RR, Roca J. Physiological responses to the 6-min walk test in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J.** 2002; 20 (3): 564-569.

15. Dal Corso S, Duarte SR, Neder JA, Malaguti C, Fuccio MB, de Castro Pereira CA, Nery LE. A step test to assess exercise related oxygen desaturation in interstitial lung disease. **Eur Respir J.** 2007; 29: 330- 336
16. Machado NC, Natali V, Squassoni SD, Santana VTS, Baldim AC, Fiss E, Selestrin CC. Estudo comparativo entre os resultados do teste de caminhada dos seis minutos e do teste do degrau dos seis minutos em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. **Arq Med ABC.** 2007; 32 (supl.2): S47- S50.
17. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, Pinto Plata V, Cabral HJ. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. **N Engl J Med.** 2004 Mar 4;350(10):1005-12.
18. Cardoso F, Tufanin AT, Colucci M, Nascimento O, Jardim JR. Replacement of the 6-min walk test with maximal oxygen consumption in the BODE Index applied to patients with COPD. **Chest.** 2007; 132: 477-482.
19. Cote CG, Pinto-Plata VM, Marin JM, Nekach H, Dordelly LJ, Celli BR. The modified BODE index: validation with mortality in COPD. **Eur Respir J.** 2008 Nov;32(5):1269-74. Epub 2008 Jun 25
20. Saetta M. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med.** 1999 Nov;160(5 Pt 2):S17-20.

21. Snell N, Newbold P. The clinical utility of biomarkers in asthma and COPD. **Curr Opin Pharmacol.** 2008; 8: 222-235.

**Referências Bibliográficas**

22. O'Reilly PJ, Gaggar A, Blalock JE. Interfering with extracellular matrix degradation to blunt inflammation. **Curr Opin Pharmacol.** 2008; 8: 242-248.

23. Pinto-Plata V, Toso J, Lee K, Park D, Bilello J, Mullerova H, De Souza MM, Vessey R, Celli B. Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters. **Thorax.** 2007;62 (7):595-601.

24. Lowrey GE, Henderson N, Blakey JD, Corne JM, Johnson SR. MMP-9 protein level does not reflect overall MMP activity in the airways of patients with COPD. **Respir Med.** 2008; 102: 845-851.

25. Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pauwels RA. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. **Curr Opin Pharmacol.** 2005 Jun;5(3):257-63.

26. Chapman HA Jr, Shi GP. Protease injury in the development of COPD: Thomas A. Neff Lecture. **Chest.** 2000 May;117(5 Suppl 1):295S-9S.

27. Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2008 Apr;12(4):361-7.

28. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. **Pharmacol Rev.** 2004 Dec;56(4):515-48.

29. Takeyabu K, Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Tanino M, Miyamoto K, Kawakami Y. Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar

- lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. **Eur Respir J.** 1998 Nov;12(5):1033-9.
30. Russel REK, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 2002; 2: 602-609.
31. Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Miyamoto K, Kawakami Y. Decline in FEV(1) in community-based older volunteers with higher levels of neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid. **Respiration.** 2000;67(3):261-7.
32. Greenlee KJ, Werb Z, Kheradnand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious and multifaceted. **Physiol Rev.** 2007; 87: 69-89.
33. Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. **Exp Lung Res.** 2005; 31: 599-621.
34. Mercer PF, Shute JK, Bhowmik A, Donaldson GC, Wedzicha JA, Warner JA. MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. **Respir Res.** 2005; 6: 151-159.
35. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 2001;17:463-516.
36. Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. **Respir Res.** 2001; 2(1):10-9.

37. Finlay GA, Russel KJ, McMahon KJ, D'arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM. Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. **Thorax**. 1997; 52: 502-506.
38. Baraldo S, Bazzan E, Zanin ME, Turato *Referências Bibliográficas* i A, Miniatti M, Fabbri LM, Zuin R, Saetta M. Matrix metalloproteinase-2 protein in lung periphery is related to COPD progression. **Chest**. 2007; 132 (6): 1733- 1740. 44
39. Chen Y, Chen P, Hanaoka M, Droma Y, Kubo K. Enhanced levels of prostaglandin E<sub>2</sub> and matrix metalloproteinase-2 correlate with the severity of airflow limitation in stable COPD. **Respirology**. 2008; 13: 1014-1021.
40. Lagente V, Manoury B, Nénan S, Le Quément C, Martin-Chouly C, Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. **Braz J Med Biol Res**. 2005; 38 (10): 1521-1530.
41. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, Mautino G, D'accardi P, Bousquet J, Bonsignore G. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. **Am J Respir Crit Care Med**. 1998 Dec;158(6):1945-50.
42. Glader P, Eldh B, Bozinovski S, Andelid K, Sjöstrand M, Malmhäll C, Anderson GP, Riise GC, Qvarfordt I, Lindén A. Impact of acute exposure to

tobacco smoke on gelatinases in the bronchoalveolar space. **Eur Respir J.** 2008; 32: 644-650.

43.Lanone S, Zheng T, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Ma B, Chen O, Homer RJ, Wang J, Rabach LA, Rabach ME, Shipley JM, Shapiro SD, Senior RM, Elias JA. Overlapping and enzyme-specific contributions of

matrix metalloproteinases-9 and 12 in **Referências Bibliográficas** and remodeling. **Braz J Med Biol Res.** 2002; 110:463-474.

45

44.McGlone S, Venn A, Walters EH, Wood-Baker R. Physical activity, spirometry and quality-of-life in chronic obstructive pulmonary disease. **COPD.** 2006 Jun;3(2):83-8.

45.Rodrigues SL, Viegas CAA,Lima T. Efetividade da reabilitação pulmonar como tratamento coadjuvante da doença pulmonar obstrutiva crônica. **J Bras Pneumol.** 2002; 28 (2): 65-70.

46.Hu S, Arellano M, Boontheung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, Elashoff D, Wei R, Loo JA, Wong DT. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. **Clin Cancer Res.** 2008 Oct 1;14(19):6246-52.

47.Miller CS, Berger JR, Mootoor Y, Avdiushko SA, Zhu H, Kryscio RJ. High prevalence of multiple human herpesviruses in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. **J Clin Microbiol.** 2006 Jul;44(7):2409-15.

48.Streckfus CF, Dubinsky WP.Proteomic analysis of saliva for cancer diagnosis. **Expert Rev Proteomics.** 2007 Jun;4(3):329-32.

49. Baldini C, Giusti L, Bazzichi L, Lucacchini A, Bombardieri S. Proteomic analysis of the saliva: a clue for understanding primary from secondary Sjögren's syndrome? **Autoimmun Rev.** 2008;Jan;7(3):185-91.

***Referências Bibliográficas***



## Pontuação do índice BODE

Variável	0	1	2	3
VEF <sub>1</sub> (% previsto)	≥65	50-64	36-49	≤35
MRC	0-1	2	3	4
TC6	≥350	250-349	150-249	<149
IMC kg/m <sup>2</sup>	>21	≤21		

## Parecer do Comitê de Ética



Comitê de Ética em Pesquisa – CoEP – UNINOVE  
Av. Francisco Matarazzo, 612 – Prédio C – Térreo  
[comitedeetica@uninove.br](mailto:comitedeetica@uninove.br)

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº número da folha de rosto 209812/08

Título do Projeto: **Caracterização enzimática da saliva de pacientes portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e sua correlação clínico-funcional pelo índice BODE.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

Aluno: Alecsandra Aparecida dos Santos  
Curso: Fisioterapia

**Objetivo:** Identificar e avaliar possivelmente biomarcadores enzimáticos na saliva de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) que participarão do Programa de Reabilitação Pulmonar no Ambulatório de Fisioterapia do Centro Universitário Nove de Julho e correlacioná-los com o índice BODE.

**Método:** Participarão deste estudo, voluntários, portadores de DPOC que aguardam ingresso no Programa de Reabilitação Pulmonar no Ambulatório de Fisioterapia da Universidade Nove de Julho – UNINOVE/Memorial da América Latina e indivíduos saudáveis, provenientes da Associação S.O.S. família São Geraldo, localizada à Rua Pedro Ângelo Janitelli, 72- Ponte Grande Guarulhos - SP. Inicialmente, os pacientes responderão a uma ficha de triagem e ao questionário de atividade física basal de Baecke, a fim de correlacionar dados específicos da população estudada com os resultados dos testes e verificar se preenchem os requisitos dos critérios de inclusão, que serão: assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, indivíduos com DPOC moderada à grave ( $VEF_1 < 60\%$  do previsto) e doença estável, sugerida por ausência de modificação na medicação nas últimas 4 semanas. Por outro lado, serão excluídos do estudo, pacientes com doença cardíaca isquêmica, cirurgias recentes, participação em programa de reabilitação pulmonar, doenças neuro-musculares, exacerbação clínica nos últimos 30 dias ou outras doenças limitantes que possam prejudicar a realização dos testes. Para análise comparativa, incluiremos no estudo um grupo controle, que deverá ter o seguinte perfil: indivíduos com espirometria normal, sedentários, faixa etária entre 40 e 85 anos e permissão para realização do estudo. Os critérios de exclusão serão os mesmos descritos para o grupo DPOC além da presença desta doença.

**Crítérios de participação dos sujeitos (recrutamento, critérios de inclusão/exclusão, interrupção da pesquisa):** critérios de inclusão, que serão: assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, indivíduos com DPOC moderada à grave ( $VEF_1 < 60\%$  do previsto) e doença estável, sugerida por ausência de modificação na medicação nas últimas 4 semanas. Por outro lado, serão excluídos do estudo, pacientes com doença cardíaca isquêmica, cirurgias recentes, participação em programa de reabilitação pulmonar, doenças neuro-musculares, exacerbação clínica nos últimos 30 dias ou outras doenças limitantes que possam prejudicar a realização dos teste.

**Identificação dos riscos e possíveis benefícios aos sujeitos:** Não há despesas, ou riscos pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, assim como não há compensação financeira relacionada a sua participação.

**Pertinência e valor científico do estudo proposto;** o estudo e a identificação de marcadores biológicos de doenças, protéicos ou peptídicos, que representem a avaliação de pacientes portadores de DPOC tornou-se foco de estudo por grupos altamente capacitados nessa área de conhecimento. Além disso, a caracterização dos componentes da saliva tem aberto perspectivas para a identificação de biomarcadores de diferentes alterações morfofisiológicas, pois a coleta de saliva é um método não invasivo, tem várias vantagens com relação a outros fluidos biológicos, como por exemplo, urina, soro

## Parecer do Comitê de Ética

ou plasma (SOO-QUEE col., 2007). Assim, o monitoramento dessas possíveis moléculas auxiliaria as estratégias de avaliação e intervenção terapêutica na DPOC.

**Adequação da metodologia aos objetivos perseguidos;** A metodologia se encontra adequada aos objetivos propostos.

**Grau de vulnerabilidade dos sujeitos e medidas protetoras propostas;** Não se aplica

**Avaliação do binômio risco-benefício;** Não se aplica a riscos.

### **Relação com o sujeito e/ instituição:**

**Identificação dos responsáveis pelo atendimento, acompanhamento e recebimento dos sujeitos encaminhados, quando for o caso:** Essas informações estão sendo fornecidas pela fisioterapeuta Alecsandra A. dos Santos (aluna do mestrado em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho) e pelo Prof. Dr. Carlos A. Silva, para sua participação voluntária neste estudo, que visa correlacionar a atividade enzimática das MMPs na saliva de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) antes de ingressarem no Programa de Reabilitação Pulmonar. Esta pesquisa contribuirá para avaliação da DPOC a partir da identificação de moléculas indicadoras da disfunção, presentes na saliva, permitindo melhor avaliar a efetividade dos programas de reabilitação.

Em qualquer etapa deste estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis para o esclarecimento de suas dúvidas quanto aos procedimentos realizados. Os pesquisadores assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando. Os principais responsáveis são os pesquisadores Prof. Dr. Carlos A. Silva e a fisioterapeuta Alecsandra A. dos Santos, os quais podem ser encontrados nos telefones: 3665-9000 ou 9104-0992.

**Garantia dos direitos fundamentais do sujeito de pesquisa (informação, privacidade, recusa inócua, desistência, indenização, ressarcimento, continuidade do atendimento, informação dos resultados, acesso ao pesquisador e CEP etc);** Em qualquer etapa deste estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis para o esclarecimento de suas dúvidas quanto aos procedimentos realizados. Os pesquisadores assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando. É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento deste estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento.

**Tratamento adequado dos dados e materiais biológicos;** Não se aplica

### **Termo de consentimento livre e esclarecido:**

**Concisão e objetividade:** correlacionar a atividade enzimática das MMPs na saliva de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) antes de ingressarem no Programa de Reabilitação Pulmonar

**Linguagem adequada ao nível sociocultural dos sujeitos de pesquisa;** Se aplica.

**Descrição suficiente dos procedimentos:** O ambulatório de fisioterapia da Universidade Nove de Julho tem como um dos objetivos a assistência à saúde, com um programa de reabilitação pulmonar para pacientes com doença pulmonar crônica, e também de fazer pesquisa.

Ao entrar em nosso estudo, você será avaliado, realizando inicialmente uma entrevista, para coletarmos seus dados pessoais, hábitos de vida, medicações que utiliza e a história de sua doença. Após esta entrevista, você será levado para uma sala onde iremos pesá-lo e medi-lo, em seguida, você realizará uma avaliação do ponto de vista respiratório. Você deverá soprar e puxar o ar com toda a força num aparelho através de um bucal para medir a sua capacidade pulmonar. Para avaliarmos sua capacidade física, você realizará o teste da caminhada dos seis minutos. Neste exame você deverá andar o mais rápido possível, sem correr, em um corredor plano, com 30 metros. Uma fisioterapeuta irá medir seu batimento cardíaco, quantas vezes você está respirando em um minuto, a pressão arterial e o oxigênio, antes, durante e ao final do teste (através de um aparelho posicionado em seu dedo indicador). Durante o teste você vai sentir um aumento na capacidade de respirar e poderá sentir

cansaço nas pernas. Estes sintomas vão melhorando e desaparecem depois que o teste termina. A última etapa da avaliação é a coleta da saliva. Para coletar a saliva você será orientado a realizar um enxágüe na boca, com água, e em seguida deverá acumular saliva na boca e cuspir em um tubo apropriado para o exame. Tal procedimento não causa quaisquer riscos ou desconforto.

**Identificação dos riscos e desconfortos esperados** Os voluntários não serão submetidos a riscos durante o período experimental, pois não utilizaremos nenhum tipo de atividade, que comprometa a segurança dos voluntários.

**Explicitação das garantias acima referidas;** Os pesquisadores asseguram a privacidade dos voluntários quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

**Apresentado a este Comitê para análise ética, segundo normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (10/10/96), foi considerado:**

**Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.**

*Aprovado com sugestões, devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas.*

Com pendência (Descrever a metodologia, Rever o Termo de consentimento livre e esclarecido ), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

Reprovado.

São Paulo, 04 de Agosto de 2008.



---

Prof. Dra. Daniela Ap. Biasotto-Gonzalez  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa  
Universidade Nove de Julho



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CoEP

Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA SALIVA DE PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA E SUAS CORRELAÇÕES CLÍNICO-FUNCIONAIS PELO ÍNDICE BODE, sob a responsabilidade de ALECSANDRA APARECIDA DOS SANTOS está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde M/S, de 10/10/96, tendo sido APROVADO pelo Comitê de Ética em Pesquisa - UNINOVE.

São Paulo, 27 de Agosto de 2008.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Daniela Ap. Biasotto-Gonzalez", is written over a faint circular stamp.

Profa. Dra. Daniela Ap. Biasotto-Gonzalez  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

Termo de Consentimento para Participação em Pesquisa Clínica:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA SALIVA DE PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC) E SUAS CORRELAÇÕES CLÍNICO-FUNCIONAIS PELO ÍNDICE BODE**

Essas informações estão sendo fornecidas pela fisioterapeuta Alecsandra A. dos Santos (aluna do mestrado em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho) e pelo Prof. Dr. Carlos A. Silva, para sua participação voluntária neste estudo, que visa correlacionar a atividade enzimática das MMPs na saliva de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) antes de ingressarem no Programa de Reabilitação Pulmonar. Esta pesquisa contribuirá para avaliação da DPOC a partir da identificação de moléculas indicadoras da disfunção, presentes na saliva, permitindo melhor avaliar a efetividade dos programas de reabilitação.

- I- O ambulatório de fisioterapia da Universidade Nove de Julho tem como um dos objetivos a assistência à saúde, com um programa de reabilitação pulmonar para pacientes com doença pulmonar crônica, e também de fazer pesquisa.
- II- Ao entrar em nosso estudo, você será avaliado, realizando inicialmente uma entrevista, para coletarmos seus dados pessoais, hábitos de vida, medicações que utiliza e a história de sua doença. Após esta entrevista, você será levado para uma sala onde iremos pesá-lo e medi-lo, em seguida, você realizará uma avaliação do ponto de vista respiratório. Você deverá soprar e puxar o ar com toda a força num aparelho através de um bucal para medir a sua capacidade pulmonar. Para avaliarmos sua capacidade física, você realizará o teste da caminhada dos seis minutos. Neste exame você deverá andar o mais rápido possível, sem correr, em um corredor plano, com 30 metros. Uma fisioterapeuta irá medir seu batimento cardíaco, quantas vezes você está respirando em um minuto, a pressão arterial e o oxigênio, antes, durante e ao final do teste (através de um aparelho posicionado em seu dedo indicador). Durante o teste você vai sentir um aumento na capacidade de respirar e poderá sentir cansaço nas pernas. Estes sintomas vão melhorando e desaparecem depois que o teste termina. A última etapa da avaliação é a coleta da saliva. Para coletar a saliva você será orientado a realizar um enxágüe na

boca, com água, e em seguida deverá acumular saliva na boca e cuspir em um tubo apropriado para o exame. Tal procedimento não causa quaisquer riscos ou desconforto.

- III- Os dados destas avaliações serão analisados e utilizados para estudos/pesquisa, não sendo divulgada a sua identificação.
- IV- Em qualquer etapa deste estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis para o esclarecimento de suas dúvidas quanto aos procedimentos realizados. Os pesquisadores assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando. Os principais responsáveis são os pesquisadores Prof. Dr. Carlos A. Silva e a fisioterapeuta Alecsandra A. dos Santos, os quais podem ser encontrados nos telefones: 3665-9000 ou 9104-0992.
- V- É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento deste estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento.
- VI- Os dados obtidos em suas avaliações serão mantidos em sigilo, isto é, em segredo.
- VII- Os resultados obtidos, tanto positivos quanto negativos, serão discutidos com você.
- VIII- Não haverá despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação, incluindo despesas com eventuais deslocamentos.
- IX- A pesquisa será desenvolvida no Ambulatório de Fisioterapia da Universidade Nove de Julho - UNINOVE/ Memorial da América Latina, localizada à Avenida Doutor Adolfo Pinto, 109. São Paulo-SP.
- X- **CONSENTIMENTO PÓS - INFORMAÇÃO:**

Eu \_\_\_\_\_, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “ Caracterização enzimática da saliva de pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e sua correlação clínico-funcional pelo índice BODE”.

Eu discuti com a fisioterapeuta Alecsandra A. dos Santos sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os

propósitos do trabalho, os exames que serão realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos constantes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante a realização do mesmo, sem penalidades prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

\_\_\_\_\_

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

Assinatura do (a) paciente/ representante legal

\_\_\_\_\_

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

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive, de forma apropriada e voluntária, o Consentimento Livre e Esclarecido do (a) paciente \_\_\_\_\_ ou do seu representante legal Sr (a) \_\_\_\_\_ para a participação dele (a) neste estudo.

---

Prof. Dr. Carlos A. Silva/ Ft. Alecsandra A. dos Santos