

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE**

**PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**JULIANA GERUNDA BASSO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES E  
SERINOPROTEINASES NA SALIVA DE PACIENTES COM DOENÇA  
PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA.**

**SÃO PAULO**

**2009**

**JULIANA GERUNDA BASSO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES E  
SERINOPROTEINASES NA SALIVA DE PACIENTES COM DOENÇA  
PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA.**

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**

**2009**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Basso, Juliana Gerunda.

Caracterização da atividade de metaloproteinases e serinoproteinases na saliva de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).  
São Paulo: 2009.

f.61

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Silva

1. Doença pulmonar obstrutiva crônica. 2. Metaloproteinases  
3. Serinoproteinases e saliva. I. Silva, Carlos Alberto.

CDU 616.24

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Celso e Fátima, sempre me ajudando me incentivando, me mostrando o quanto sou capaz.*

*À minha irmã Maira, amiga e companheira em todas as horas.*

*Ao meu irmão, Áiri pelo apoio.*

*A minha querida irmã Kauane, por trazer alegria em minha vida e me ajudar a continuar apesar de todas as dificuldades.*

*Ao meu esposo José Eduardo, por todo carinho atenção, ajuda, e por ter me dado um filho(a) que com certeza será também a alegria de nosso viver.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a Deus, sem a permissão dele tudo isso não seria possível.*

*Ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Alberto Silva, pela ajuda e apoio. Pelo incentivo, e sem dúvida pela confiança depositada em mim desde o começo. Agradeço do fundo do meu coração.*

*Às Professoras Doutoras Carla Malagutí e Simone Dal Corso, por me ajudarem nas etapas deste trabalho, e que foram essenciais para o término deste.*

*À Dra. Fernanda C.V. Portaro, do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, pelo apoio na realização dos ensaios de cinética enzimática e pelas sugestões na discussão dos resultados.*

# SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	<b>vi</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>ix</b>
<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) .....	2
1.2 Enzimas proteolíticas na DPOC.....	5
<b>2 ESTUDO</b> .....	<b>9</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>37</b>
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>39</b>
<b>5 APÊNDICES</b> .....	<b>45</b>
5.1 Termo de consentimento para participação em pesquisa clínica.....	46
5.2 Formulários de avaliação clínica.....	48
<b>6 ANEXOS</b> .....	<b>50</b>
6.1 Parecer do CoEP .....	51
6.2 Certificado de Aprovação – CoEP .....	54
6.3 Participação em outros estudos.....	55

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade dos componentes enzimáticos da saliva e as possíveis correlações com os parâmetros de avaliação clínica em pacientes com DPOC. A amostra foi composta por 30 indivíduos, sendo 20 indivíduos do grupo DPOC e 10 do grupo saudável. Os parâmetros clínicos de cada indivíduo foram obtidos por espirometria e teste da caminhada dos 6 minutos. A atividade enzimática (AE) nas amostras individuais de saliva de cada indivíduo foi avaliada *in vitro*, utilizando substratos fluorescentes com apagamento intramolecular e inibidores da atividade metaloproteinases (EDTA) e serinoproteinases (PMSF). Não se observou diferenças significantes entre os pacientes com DPOC e saudáveis com relação a AE total ou inibição de metaloproteinases e serinoproteinases na saliva. As análises de correlações entre as variáveis da avaliação clínica do grupo DPOC e os ensaios de AE, demonstraram que o FEV<sub>1</sub> apresentou correlação negativa em relação a AE total ( $p=0,03$ ,  $r=-0,473$ ) e a inibição de metaloproteinases ( $p=0,02$ ,  $r=-0,498$ ). Não se observou correlações entre os parâmetros avaliados no grupo controle. Esses resultados abrem novas perspectivas para os estudos de cinética enzimática na saliva, utilizando substratos específicos para as enzimas mais representativas durante a progressão da DPOC.

**Palavras-chave:** Doença pulmonar obstrutiva crônica; Metaloproteinases; Serinoproteinases e saliva.

## ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the activity of enzymatic components of saliva and possible correlations with clinical parameters in patients with COPD. The sample consisted of 30 individuals, 20 individuals with COPD and 10 controls. The clinical parameters of each individual were obtained by spirometry and 6 minute walk distance. Enzyme activity (EA) in saliva samples from each individual was evaluated *in vitro* using fluorescent substrates and synthetic inhibitors of metalloproteinases (EDTA) and serine proteinases (PMSF). There was no significant difference between patients with COPD and healthy relationship with the AE or total inhibition of metalloproteinases and serine proteinases in saliva. Analysis of correlations between variables Person of the clinical evaluation of COPD and the AE tests showed that the FEV<sub>1</sub> correlated negatively to total EA ( $p=0.03$ ,  $r =-0.473$ ) and inhibition of metalloproteinases ( $p=0.02$ ,  $r =-0.498$ ). There was no correlation between the parameters evaluated in the control group. These results open perspectives for studies of enzyme kinetics in saliva, using specific substrates for enzymes most representative during the progression of COPD.

**Word-key:** Pulmonary illness obstrutiva chronicle; Metaloproteinases; Serinoproteinases and saliva.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>		<b>Página</b>
Contextualização		
<b>1</b>	Propriedade pró-inflamatória da MMP-12.	<b>6</b>
Estudo		
<b>1</b>	Representação dos ensaios de padronização da AE em relação a concentração protéica das amostras 1 e 2 (pacientes com DPOC) e 28 e 29 (pacientes saudáveis).	<b>33</b>
<b>2</b>	Avaliação da AE na saliva de pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis (Controle).	<b>34</b>
<b>3</b>	Efeitos inibitórios da AE na saliva de pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis (Controle) pelo EDTA e PMSF.	<b>35</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
Estudo	
<b>1</b> Características dos pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis (Controle).	31
<b>2</b> Avaliação clínica dos pacientes com DPOC e saudáveis (Controle).	32
<b>3</b> Relação entre os parâmetros de avaliação clínica, espirometria e TC6' e a AE na ausência ou presença de inibidores de metaloproteinases e serinoproteinases (EDTA e PMSF, respectivamente).	36

## **1 CONTEXTUALIZAÇÃO**

---

## **1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)**

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 bronquite obstrutiva e destruição do parênquima pulmonar distal ao bronquíolo terminal dependendo de cada indivíduo [1]. A exposição à fumaça de cigarro é o principal fator de risco para DPOC como dito anteriormente, sendo a cessação do tabagismo importante medida tanto para a prevenção quanto para o tratamento da doença. Poluição ambiental, predisposição genética, exposição a poluentes químicos e ocupacionais, alterações no crescimento e desenvolvimento pulmonar, estresse oxidativo, estado socioeconômico, nutrição, infecções respiratórias, comorbidades e idade; também podem desencadear a doença [2].

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 [3]. 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 de células musculares e/ou desuso

muscular [4]. Tais efeitos sistêmicos possuem consequências clínicas importantes, pois contribuem com a limitação da capacidade física do paciente e o declínio da condição de saúde na DPOC [5].

A DPOC é mundialmente responsável pelo alto índice de mortalidade e morbidade, porém há variações na prevalência da doença entre os países [6]. No Brasil, o perfil epidemiológico da doença ainda não está definido, mas um estudo realizado na grande São Paulo evidenciou a prevalência total da DPOC de 15,8 % da população total, correlacionando-se positivamente com a idade [7].

Um dos maiores comprometimentos da DPOC é a hiperinsulfilação, que é caracterizada por um aumento da resistência ao fluxo aéreo, causando um aprisionamento de ar nos pulmões, provocando alterações na parede torácica e desvantagem entre a musculatura respiratória, conhecida como dispnéia ou desconforto respiratório, uma das sensações mais descritas por pacientes com DPOC [8,9]. Assim, com o intuito de 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 [8].

O diagnóstico da DPOC consiste na análise dos sintomas apresentados e fatores de risco à espirometria [10]. A relação entre volume expiratório forçado no primeiro segundo e capacidade vital forçada

(VEF<sub>1</sub>/CVF) inferior a 70%, pós- broncodilatador confirma a limitação ao fluxo aéreo [10].

Como dito, a DPOC apresenta comprometimentos sistêmicos e não restritos apenas ao pulmão, por isso para uma avaliação completa de um indivíduo com DPOC, há necessidade de serem realizados testes de avaliação da intolerância ao exercício. As limitações físicas funcionais contribuem significativamente para o prejuízo das atividades físicas basais, tais como mobilidade e força muscular. Portanto, 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 [11].

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 [12]. A DPOC é caracterizada como doença inflamatória associada à intensa degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) e fibrose tecidual [13].

## 1.2 Enzimas proteolíticas na DPOC

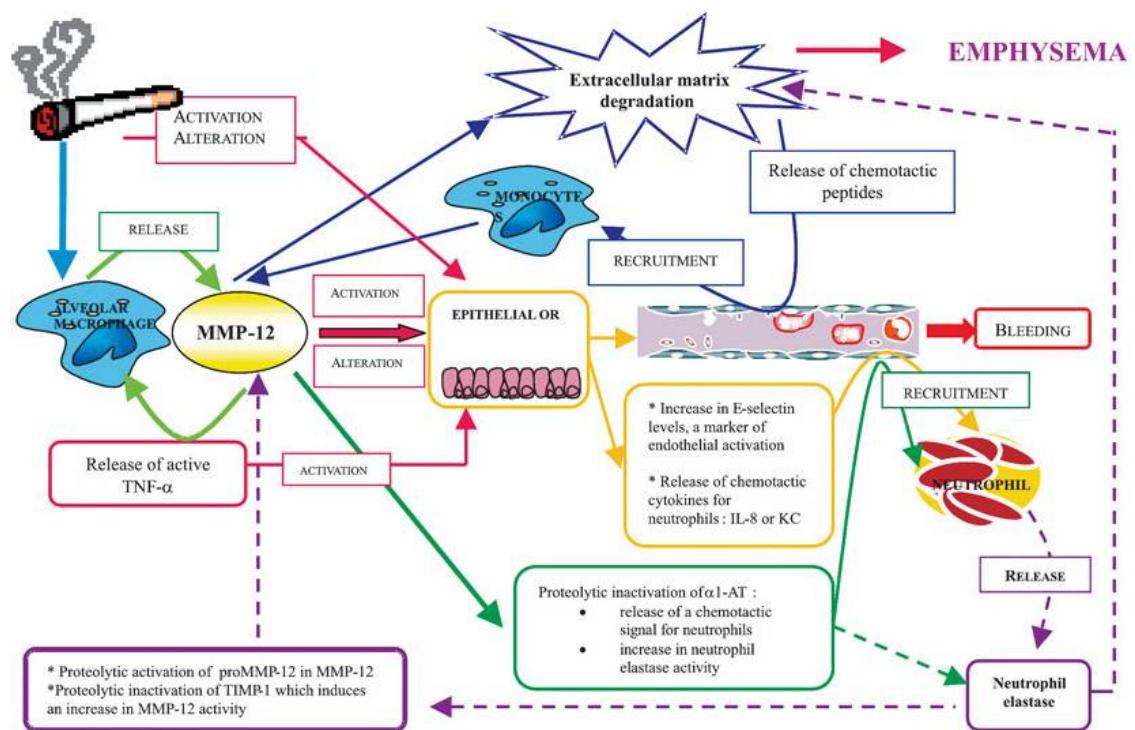
As metaloproteinases da matriz extracelular, conhecidas como MMPs são um dos grupos de enzimas proteolíticas que podem contribuir significativamente para o desenvolvimento da DPOC, como a migração de células inflamatórias no pulmão, a remodelagem e a destruição do tecido pulmonar [14,15]. As MMPs são também conhecidas como matrixinas, e pertencem a uma família de proteases extracelulares responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular (MEC) durante a remodelagem do tecido [15,16]. Estas são sintetizadas como pro - enzimas secretadas ou de membrana que após o processamento, ou seja, clivagem de um pro-peptídeo na porção N-terminal adquire a forma ativa [17].

As MMPs catalisam componentes protéicos da MEC produzindo moléculas peptídicas biologicamente ativas, como os peptídeos quimiotáticos [18], que participam do processo inflamatório envolvido na DPOC, como por exemplo a MMP-12 (Figura 1) [19]. Estas são inibidas seletivamente por inibidores teciduais de metaloproteinases, conhecidos como TIMPs [20]. Weathington et al. caracterizaram um peptídeo biologicamente ativo, com seqüência de aminoácidos N-acetyl Pro-Gly-Pro (PGP), derivado da hidrólise do colágeno em pacientes com DPOC, que induz quimiotaxia de neutrófilos pela via de interação com os receptores CXCR1 e CXCR2 [18].

O N-acetyl-PGP foi recentemente associado à inflamação crônica das vias aéreas na DPOC, pois seus níveis no lavado broncoalveolar são

significativamente mais elevados em relação aos indivíduos saudáveis [21].

Vários estudos têm demonstrado altos níveis de expressão da MMPs e TIMPs, principalmente MMP-9 e TIMP-1, em lavado broncoalveolar de pacientes portadores de DPOC e asmáticos participando na remodelagem da matriz extracelular e no processo inflamatório [22,23]. Apesar disso, outros grupos enzimáticos são descritos, como as cisteínoproteinases (catepsinas) e serinoproteinases (elastases) [22].



**Figura 1.** Propriedade pró-inflamatória da MMP-12 [19].

Além dos testes clínicos de campo, há uma forte tendência para a busca de estratégias alternativas de avaliação terapêutica em pacientes portadores de diferentes disfunções, como por exemplo, a identificação de biomarcadores específicos. Durante a resposta asmática, por exemplo, a ativação de mastócitos é mediada por imunoglobulinas do tipo E (IgE) que proporcionam a liberação de mediadores e citocinas, como a prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) e a busca por marcadores específicos de ativação de mastócitos tem sido objeto de estudo de vários grupos. Estudo realizado em 2004 identificou na urina de indivíduos com asma brônquica causada por alergênicos, o metabólito 11 $\beta$ -PGF<sub>2</sub> derivado da PGD<sub>2</sub>, como um provável indicador da ativação de mastócitos e, possivelmente, indicador da asma brônquica [24]. Por outro lado, a caracterização dos componentes da saliva tem aberto perspectivas para a identificação de biomarcadores de diferentes alterações morfofisiológicas [25], pois a coleta de saliva é um método não-invasor apresenta muitas vantagens com relação a outros fluídos biológicos, como por exemplo, soro ou plasma [26].

A saliva é secretada por múltiplas glândulas salivares, incluindo parótida, submandibular, sublingual e, outras glândulas menores presentes na mucosa oral [27]. Constitui-se basicamente por proteínas e peptídeos produzidos especificamente nas glândulas salivares ou de fonte sistêmica que desempenham funções biológicas importantes [28].

Com o avanço tecnológico em genômica, bioinformática e proteômica verificou-se a presença de marcadores específicos de doenças orais e

sistêmicas [29], como é o caso da periodontite e a Síndrome de Sjögren – doença auto-imune sistêmica [29].

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 [30,31,32]. Recente estudo, realizado pelo nosso grupo, 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 (Santos et al., 2009 – *in press* [33]). Dessa forma, estes dados abrem perspectivas para o desenvolvimento de estudos utilizando a saliva, como fonte de material biológico para a identificação e a caracterização de possíveis marcadores protéicos e/ou peptídicos específicos da DPOC.



**Título: CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES  
E SERINOPROTEINASES NA SALIVA DE PACIENTES COM DOENÇA  
PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC).**

Title: Characterization of metalloproteinases and serinoproteinases activity in saliva of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Juliana Gerunda Basso<sup>1</sup>, Cássia Ísis Teixeira Farias<sup>2</sup>, Alecsandra Aparecida dos Santos<sup>3</sup>, Carla Malaguti<sup>4</sup>, Simone Dal Corso<sup>4</sup> Fernanda C. V Portaro<sup>5</sup> e Carlos Alberto da Silva<sup>6</sup>

1. Fisioterapeuta e aluna do programa de mestrado em Ciências da Reabilitação, Uninove, São Paulo, Brasil.
2. Aluna de iniciação científica e graduação em Fisioterapia, Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brasil.
3. Fisioterapeuta e mestre em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho.
4. Professora doutora, Laboratório de Fisiologia do Exercício, Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brasil.
5. Pesquisadora do Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.
6. Professor doutor, Laboratório de Aplicações Moleculares e Celulares em Reabilitação, Universidade Nove de Julho.

Estudo desenvolvido na Universidade Nove de Julho no Laboratório de Fisiologia do Exercício e Laboratório Aplicações Moleculares e Celulares em Reabilitação.

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: Avaliar a atividade dos componentes enzimáticos da saliva e as possíveis correlações com os parâmetros de avaliação clínica em pacientes com DPOC.

Métodos: A amostra foi composta por 30 indivíduos, sendo 20 indivíduos do grupo DPOC e 10 do grupo controle. Os parâmetros clínicos de cada indivíduo foram obtidos por espirometria e teste da caminhada dos 6 minutos. A atividade enzimática (AE) nas amostras de saliva de cada indivíduo foi avaliada *in vitro*, utilizando substratos fluorescentes com apagamento intramolecular e inibidores sintéticos de metaloproteinases (EDTA) e serinoproteinases (PMSF). Resultados: Não se observou diferenças significantes entre os pacientes com DPOC e saudáveis com relação a AE total ou inibição de metaloproteinases e serinoproteinases na saliva. As análises de correlações entre as variáveis da avaliação clínica do grupo DPOC e os ensaios de AE, demonstraram que o VEF1 apresentou correlação negativa em relação a AE total ( $p=0,03$ ,  $r=-0,473$ ) e a inibição de metaloproteinases ( $p=0,02$ ,  $r=-0,498$ ). Não se observou correlações entre os parâmetros avaliados no grupo controle. Conclusão: Esses resultados abrem perspectivas para os estudos de cinética enzimática na saliva, utilizando substratos específicos para as enzimas mais representativas durante a progressão da DPOC.

**Palavras- chave:** DPOC, enzimas proteolíticas, saliva.

## ABSTRACT

**Objectives:** Evaluate the activity of enzymatic components of saliva and possible correlations with clinical parameters in patients with COPD **Methods:** The sample consisted of 30 individuals, 20 individuals with COPD and 10 healthy. The clinical parameters of each individual were obtained by spirometry and 6 minute walk distance. Enzyme activity (EA) in saliva samples from each individual was evaluated *in vitro* using fluorescent substrates and synthetic inhibitors of metalloproteinases (EDTA) and serineproteinases (PMSF). **Results:** There was no significant difference between patients with COPD and healthy relationship with the AE or total inhibition of metalloproteinases and serine proteinases in saliva. Correlations analysis between variables Person of the clinical evaluation of COPD and the AE tests showed that the FEV1 correlated negatively to total EA ( $p = 0.03$ ,  $r = -0.473$ ) and inhibition of metalloproteinases ( $p = 0.02$ ,  $r = -0.498$ ). There was no correlation between the parameters evaluated in the control group. **Conclusion:** These results open perspectives for studies of enzyme kinetics in saliva, using specific substrates for enzymes most representative during the progression of COPD.

**Keywords:** COPD, proteolytic enzymes, saliva.

## INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença pulmonar crônica, geralmente causada pela inalação da fumaça de cigarro, resultando alterações irreversíveis nas vias aéreas (Celli *et al.*, 1995). O paciente portador de DPOC diminui sua atividade física global devido à redução da função pulmonar, que é traduzida por dispnéia e a percepção de cansaço ao realizar qualquer forma de esforço físico. O progressivo descondicionamento físico associado à inatividade dá início a um círculo vicioso, em que a piora da dispnéia se associa a esforços físicos cada vez menores, com grave comprometimento da qualidade de vida (Celli & Barnes, 2007).

A inflamação sistêmica e a disfunção muscular esquelética também caracterizam os efeitos sistêmicos da DPOC. A evidência de inflamação sistêmica inclui presença de estresse oxidativo sistêmico, concentrações alteradas de citocinas circulantes e ativação das células inflamatórias (Sauleda *et al.*, 2000). A disfunção muscular esquelética inclui a perda progressiva de massa muscular e a presença de várias anomalias bioenergéticas. Tais efeitos sistêmicos possuem consequências clínicas importantes, pois contribuem para a limitação da capacidade física do paciente e, dessa forma, para o declínio da condição de saúde na DPOC (American Thoracic Society, 1999).

Considerando o comprometimento da capacidade pulmonar e suas implicações na DPOC observam-se a exploração de novos horizontes para o seu estudo fisiopatogênico, permitindo uma mudança do enfoque quase exclusivamente

relacionado à função pulmonar para o estudo celular e bioquímico da doença (Hogg *et al.*, 2004). A DPOC vem sendo caracterizada como doença inflamatória associada à intensa degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) e fibrose tecidual (Abboud *et al.*, 2008; Lagente *et al.*, 2005).

As metaloproteinases da MEC (MMPs) contribuem para o desenvolvimento da DPOC, proporcionando a migração de células inflamatórias no pulmão, a remodelagem e destruição do tecido pulmonar (Demedts *et al.*, 2005; Russel *et al.*, 2002a). As MMPs ou também conhecidas como matrixinas, e pertencem a uma família proteases extracelulares responsáveis pela degradação de componentes da MEC durante a remodelagem do tecido (Parks & Shapiro, 2001). Estas são sintetizadas como pro - enzimas secretadas ou de membrana que após o processamento, ou seja, clivagem de um pro-peptídeo na porção N-terminal adquire a forma ativa (Parks & Shapiro, 2001). As MMPs catalisam componentes protéicos da MEC produzindo moléculas peptídicas biologicamente ativas que participam do processo inflamatório envolvido na DPOC (Weathington *et al.*, 2006).

Essas enzimas são seletivamente inibidas por inibidores teciduais de metaloproteinases, conhecidos como TIMPs (Cataldo *et al.*, 2000; Beeh *et al.*, 2003).

Além das metaloproteinases, outros grupos de enzimas proteolíticas também são descritos na patogênese da DPOC, como as cisteinoproteinases (catepsinas) e serinoproteinases (elastases) (Barnes, 2004; Chapman & Guo-Ping Shi, 2000). O papel das catepsinas na DPOC ainda é desconhecido, porém foi observado o aumento nos níveis de expressão da catepsina L em lavado broncoalveolar de pacientes portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (Takeyabu *et al.*, 1998) e também macrófagos alveolares entre os indivíduos que eram fumantes

(Russel *et al.*, 2002b). Da mesma forma, os níveis de expressão da elastase de neutrófilo (elastase-2) também é maior em DPOC (Betsuyasku *et al.*, 2000).

Além dos testes clínicos de campo para a avaliação do grau de comprometimento da capacidade pulmonar funcional em pacientes com DPOC, há uma forte tendência para a busca de estratégias alternativas de avaliação terapêutica em pacientes portadores de diferentes disfunções, visando a identificação de biomarcadores específicos. Com isso, 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 e oferece vantagens com relação a outros fluídos biológicos, como por exemplo, soro ou plasma (Soo-Quee *et al.*, 2007). Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade enzimática (AE) das metaloproteinases e serinoproteinases na saliva de pacientes com DPOC e suas correlações com os parâmetros da prova de função pulmonar.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética da instituição (protocolo número 209821/08). Voluntários com DPOC que aguardavam ingresso no Programa de Reabilitação Pulmonar do Ambulatório de Fisioterapia (grupo DPOC) e indivíduos saudáveis, provenientes da Associação SOS família São Geraldo (grupo controle), participaram desse estudo. O diagnóstico da doença foi baseado nos critérios estabelecidos pela Sociedade Americana do Tórax (ATS). Os pacientes apresentavam doença estável, sugerida por ausência de modificação nas medicações nas últimas quatro semanas. Indivíduos com doença cardíaca isquêmica, intervenção

cirúrgica recente ou a participação em programas de reabilitação pulmonar foram excluídos. O grupo controle foi constituído por indivíduos saudáveis, que nunca fumaram, com espirometria normal, sem história de doenças respiratórias, de ambos os gêneros e com faixa etária compatível com o grupo DPOC, para fins de análise comparativa. Todos os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

### **Avaliação da prova de função pulmonar**

Os indivíduos de ambos os grupos foram submetidos ao teste de função pulmonar através do espirômetro da marca MedGraphics®, conforme as diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Os parâmetros 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.) foram mensurados. Considerou-se a melhor curva de três manobras nesses testes e os resultados foram apresentados em porcentagem do previsto (% prev.).

Ainda, foram submetidos à avaliação de desempenho, de acordo com o protocolo do Teste da caminhada de seis minutos (TC6').

Dois testes foram realizados no mesmo dia, com intervalo de 1 hora entre ambos, sendo registrado o maior valor para análise. O teste foi desenvolvido em um corredor com 30 metros, marcado a cada metro. A cada minuto foi dado estímulo verbal e padronizado pelo examinador conforme guia da Sociedade Americana do Tórax (ATS). Foram mensuradas, no repouso e ao final do teste, a freqüência cardíaca, freqüência respiratória, saturação de oxigênio pelo oxímetro de pulso,

pressão arterial e escores para sensação de dispnéia e fadiga de membros inferiores, através da escala modificada de percepção de esforço de Borg. O trabalho metabólico foi calculado pela distância percorrida (m) em seis minutos.

### **Coleta e processamento das amostras de saliva**

As amostras foram coletadas entre 8h as 11h30 da manhã para minimizar os efeitos da variação diurna de acordo com os dados descritos na literatura (Hu *et al.*, 2007). As amostras foram coletadas (~5 ml) diretamente em tubos apropriados (SALIVETTE®) e centrifugadas ( $946 \times g$ ) a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Após, foram transferidas com o auxílio de uma pipeta para um tubo de microcentrifuga e novamente centrifugadas ( $10000 \times g$ ) a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Os sobrenadantes foram reservados em novo tubo e armazenados em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

A dosagem de proteínas de cada amostra foi realizada pelo método de Bradford (Pierce Biotechnology, Inc., EUA). A soroalbumina bovina (BSA – Calbiochem, EUA) foi usada como padrão de referência. A leitura das amostras foi feita em leitor de placas de ELISA (Multiskan EX, Labsystems, Finlândia) e a absorbância determinada no comprimento de onda de 540 nm.

## Análise da AE utilizando substratos fluorescentes com apagamento intramolecular de fluorescência

Os ensaios de AE foram realizados em espectrofluorofotômetro (Victor 3, Perkin Elmer, MA, USA), utilizando placas de 96 poços, ajustado para leitura de excitação e emissão 320 e 420 nm, respectivamente. A temperatura da reação foi mantida a 37°C em compartimento termoestabilizado, sob agitação, com o consumo de substrato inferior a 10% (velocidades iniciais de hidrólise). As reações foram padronizadas utilizando dois substratos diferentes (Abz-FRSSRQ-EDDnp e Abz-GGFLTSQ-EDDnp) para identificar o substrato mais adequado em relação à atividade de hidrólise. Ainda, foi realizado outro teste para determinar a quantidade protéica a ser utilizada em todos os ensaios enzimáticos.

Os ensaios foram realizados incubando-se diferentes concentrações de proteínas para cada amostra em tampão PBS (NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1mM, KCl 2,7 mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,2) com os dois substratos para o volume final de 100 µL. Em cada poço foi adicionado o substrato em um canto e no outro a amostra. Por último, o tampão foi adicionado no meio do poço, para facilitar a homogeneização dos componentes da reação. Em seguida, o aumento da fluorescência foi monitorado no espectrofluorofotômetro e os respectivos valores de unidade de fluorescência (UF) foram quantificados a cada um minuto.

Para avaliar atividade das diferenças de metaloproteinases e serinoproteinases nas amostras, os ensaios de cinética foram delineados com a utilização de inibidores comerciais sítio-dirigidos, EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), respectivamente. Esses ensaios foram padronizados com a adição de diferentes concentrações de cada inibidor. Todas as análises cinéticas foram realizadas em triplicata. Os valores foram expressos em atividade

específica dividindo-se o valor da velocidade de hidrólise do substrato (fluorescência por minuto) pela concentração de proteína utilizada no experimento (UF/min/μg).

### **Análise estatística**

A distribuição paramétrica obtida na avaliação clínica foi sumarizada por média e desvio padrão (DP). Para comparações entre os dois grupos utilizamos o Teste-t Student não pareado. A análise de variância foi utilizada para comparações intergrupos e as diferenças quando identificadas utilizou-se o teste *post hoc* Tukey. Correlações entre a AE e dados espirométricos foram avaliados a partir do teste de Correlação de *Pearson*. O nível de significância estatística foi de  $p<0,05$

## **RESULTADOS**

### **Características da população estudada**

A população estudada foi composta por 30 indivíduos, sendo 20 indivíduos do grupo DPOC (13 homens) e 10 indivíduos (4 homens) do grupo controle, sem diferenças entre os ambos os grupos (Tabela 1). Todos os pacientes avaliados no grupo DPOC eram ex-tabagistas e no grupo controle não houve relatos de tabagismo. O tempo de fumo no grupo DPOC foi avaliado em  $48,53 \pm 21,09$  anos e a relação anos/maço foi de  $52,07 \pm 41,03$  (Tabela1).

Todos os pacientes do grupo DPOC apresentaram limitação ao fluxo aéreo (moderada a grave), sendo a diferença entre os grupos altamente significante para o VEF<sub>1</sub> e para a relação VEF<sub>1</sub>/CVF. Entretanto, não houve diferenças entre os grupos para a CVF (%prev.) e no IMC entre os grupos estudados (Tabela 2). No TC6'

verificou-se que os pacientes com DPOC apresentaram a média da distância percorrida inferior em relação aos indivíduos saudáveis ( $p<0,05$ ).

### **Padronização dos ensaios de AE com as amostras de saliva**

Inicialmente, realizou-se um teste para verificar as possíveis interferências do tampão PBS nos ensaios enzimáticos. Dessa forma, garantir que o aumento da fluorescência fosse apenas pela ação das enzimas presentes nas amostras. Nesses ensaios verificou-se que UF da mistura contendo a mesma quantidade dos substratos e do tampão PBS não sofreu alterações com o passar do tempo, indicando que o tampão não interferiu na estabilidade molecular para emissão da fluorescência (dados não demonstrados).

A figura 1 representa as curvas de hidrólise do substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp (Figura 1A) e Abz-GGFLTSQ-EDDnp (Figura 1B), utilizando a concentrações protéicas de 5  $\mu$ g das amostras de saliva de dois pacientes com DPOC e dois saudáveis. Observou-se que a concentração de 5  $\mu$ g de cada amostra proporcionou a hidrólise do substrato pelo aumento da emissão da fluorescência sem o consumo total do substrato em nenhum dos casos, ou seja, inferior a 10%. Esses ensaios demonstraram a correlação linear entre os pontos com o aumento da fluorescência para todas as amostras testadas, indicando que a concentração de 5  $\mu$ g foi a mais adequada. Por outro lado, a análise de hidrólise com o substrato Abz-GGFLTSQ-EDDnp demonstrou que o incremento na fluorescência não foi observado, indicando que as proteases presentes nas amostras de saliva não reconheceram esta seqüência como substrato putativo (Figura 1B). Sendo assim, o

substrato selecionado para realizar todos os ensaios foi o Abz-FRSSRQ-EDDnp na concentração de 5 $\mu$ M com 5 $\mu$ g (Figura 1A).

### **Análise da AE nas amostras de saliva**

Esses ensaios foram realizados com 30 amostras de saliva de indivíduos, sendo 20 de indivíduos do grupo DPOC e 10 indivíduos ao grupo controle. A análise dos valores de atividade específica encontradas entre os grupos DPOC e saudáveis apresentou a média de 144,15 UF/min/ $\mu$ g e 143,14 UF/min/ $\mu$ g, respectivamente. Ao comparar os valores de AE apresentada pelos dois grupos não se observou diferenças estatisticamente significantes (Figura 2).

### **Ensaios de cinética enzimática com inibidores sítio-dirigidos: EDTA e PMSF**

As diferentes concentrações de EDTA testadas (50, 100 e 200 mM) causaram redução da AE das amostras, mas verificou-se que a concentração de 200 mM foi a mais efetiva (dados não demonstrados).

Os ensaios com PMSF também foram padronizados da mesma forma que os ensaios realizados com o EDTA. Esses ensaios foram realizados com quatro concentrações diferentes de PMSF que variaram de 10 a 0,5 mM com o tempo variando de 15 a 30 minutos e a pré-incubação sendo realizada a 37°C ou a temperatura ambiente.

Verificou-se que a concentração de PMSF 0,5 mM em tampão PBS por 15 minutos a temperatura ambiente com 5 $\mu$ g de proteína e 5  $\mu$ M do substrato Abz-

FRSSRQ-EDDnp foi a condição mais favorável para realizar esses os ensaios de inibição (dados não demonstrados).

Nesses ensaios verificou-se redução da AE de metaloproteinases nos grupos DPOC e saudáveis, mas as diferenças não foram estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 3). Por outro lado, o PMSF inibiu significativamente a AE de serinoproteinases nos dois grupos ( $p<0,05$ ) em relação à atividade total. As médias de inibição por PMSF entre os dois grupos foram 64,74% para o grupo DPOC e 61,50% para o grupo controle (Figura3). Além disso, nas análises de correlações entre as variáveis da avaliação clínica da população e os ensaios de AE, demonstrou que o FEV<sub>1</sub> apresentou correlação negativa em relação a AE total e a inibição de metaloproteinases na saliva de indivíduos com DPOC (Tabela 3). Por outro lado, não se observou correlações entre os parâmetros avaliados no grupo controle (Tabela 3).

## DISCUSSÃO

As enzimas proteolíticas são encontradas ubliquamente em todos os tecidos e fluídos biológicos dos seres vivos e participam do ciclo de vida das proteínas e peptídeos. A clivagem proteolítica nas ligações peptídicas é uma das mais freqüentes

e importantes modificações enzimáticas (Neurath, 1989). A utilização de peptídeos sintéticos tem adquirido cada vez mais importância por serem utilizados em estudos de estrutura e função de enzimas proteolíticas e receptores, desenvolvimento de inibidores peptídicos ou superagonistas de alta seletividade, obtenção de polipeptídeos ativos (ocitocina, LHRH), entre outros (Rawlings *et al.*, 2008).

Os substratos com apagamento intramolecular de fluorescência utilizados nesse estudo apresentam no amino grupo N-terminal do peptídeo o radical fluorescente ácido *orto*-aminobenzóico (Abz) e no grupo carboxila terminal o apagador da fluorescência N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina (EDDnp), que permitem o monitoramento direto, em espectrofluorímetro, da velocidade de hidrólise dos substratos (Chagas *et al.*, 1995). Enquanto a cadeia peptídica estiver íntegra e estes dois grupos estiverem relativamente próximos, a fluorescência do composto será baixa. A partir do momento em que estes grupos são afastados, por exemplo, por uma clivagem enzimática em algum ponto da cadeia, a transferência de energia de um grupo ao outro deixa de ocorrer e a fluorescência da solução aumenta significativamente (Chagas *et al.*, 1995).

Como se trata de um aumento proporcional ao número de moléculas peptídicas clivadas, o índice de variação de fluorescência da solução é uma medida direta da velocidade de hidrólise que pode ser utilizado para determinação das constantes cinéticas desta interação enzima-substrato. Dessa forma, considerando a eficácia de avaliação da AE utilizando substratos com fluorescência apagada intramolecularmente, selecionou-se essa estratégia para avaliar a AE total de dois grandes grupos enzimáticos (metaloproteinases e serinoproteinases) na saliva de pacientes com DPOC e saudáveis. Nesses ensaios foram estabelecidas as condições experimentais para determinar a atividade proteolítica utilizando substratos

fluorescentes e inibidores sítio-dirigidos, como o EDTA e PMSF, com o objetivo de avaliar os níveis enzimáticos relativos às proteases das classes das metaloproteinases e serinoproteinases.

O substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp foi inicialmente desenhado para estudos de calicreínas teciduais sendo análogo ao cininogênio na porção C-terminal que contém a bradicinina (Chagas *et al.*, 1991). Por outro lado, este substrato demonstrou ser amplamente hidrolisado por outras serinoproteinases da família da quimotripsina/tripsina, incluindo trombina e plasmina. Há relatos também de que este substrato é hidrolisado por várias metaloproteinases e cisteínoproteases (Rawlings *et al.*, 2008). Apesar desse substrato ser considerado universal para o estudo da AE total, o substrato Abz-GGFLTSQ-EDDnp também foi testado nas mesmas amostras de saliva, por ser mais específico para o grupo das metaloproteinases (Rawlings *et al.*, 2008). Porém, este substrato que é análogo às cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da hemoglobina, não demonstrou ser hidrolisado pelas peptidases da saliva e, portanto, o peptídeo Abz-FRSSRQ-EDDnp foi selecionado para avaliar a AE de metaloproteinases e serinoproteinases.

Nos indivíduos saudáveis, as diferentes metaloproteinases desempenham suas funções dentro de um equilíbrio rígido entre ativação, em geral pelo processamento proteolítico de zimógenos por serinoproteinases, e inibição seletiva pelos diferentes TIMPs. Acredita-se que um desequilíbrio entre ativação e inibição, em favor da ativação destas enzimas, desempenhe um papel importante no estabelecimento de patologias (Hoekstra *et al.*, 2001).

Na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, têm se observado altos níveis de expressão das MMPs no lavado broncoalveolar e no soro, que catalisam componentes protéicos da MEC, acentuando o processo inflamatório (Weathington

*et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2000; Lemjabbar *et al.*, 1999). Lowrey *et al* (2008) verificaram que o aumento dos níveis de expressão da MMP-9 não reflete a AE total no lavado broncoalveolar de pacientes com DPOC. Da mesma forma, no presente estudo não se observou diferenças com relação AE total na saliva de pacientes com DPOC em relação ao controle, sugerindo que a análise deve ser realizada com substratos específicos para os diferentes grupos enzimáticos que participam da degradação do tecido pulmonar.

Nosso grupo demonstrou que o aumento dos níveis de expressão da MMP-2 na saliva em pacientes com DPOC se correlacionou negativamente com os parâmetros VEF<sub>1</sub> e VEF<sub>1</sub>/CVF de obstrução aérea (Santos *et al.*, 2009 – *in press*). Com isso, os níveis de MMPs elevados no grupo DPOC pode não refletir a AE total na saliva, pois essas enzimas poderiam ser inibidas pelo TIMP-1, que estariam também aumentados nos pacientes com DPOC, como já descrito na literatura (Cataldo *et al.*, 2000; Beeh *et al.*, 2003).

Apesar de não identificar diferenças entre o grupo controle e DPOC, as análises de correlações entre os parâmetros de avaliação clínica e os ensaios de cinética enzimática, indicaram que os níveis de AE total e a inibição de metaloproteinases pelo EDTA, se correlacionaram negativamente com o parâmetro da prova de função pulmonar VEF<sub>1</sub> somente no grupo DPOC. Esses resultados levantam indícios de que quanto maior for o grau comprometimento na DPOC, menor é o desempenho na avaliação da capacidade funcional pulmonar associado ao aumento da atividade de metaloproteinases na saliva desses indivíduos.

As cisteínoproteinases (catepsinas) e serinoproteinases (elastases) também têm sido relatadas na patogênese da DPOC (Barnes, 2004; Chapman & Guo-Ping Shi, 2000; Takeyabu *et al.*, 1998; Russel *et al.*, 2002). Por outro lado, nos ensaios de

inibição com PMSF, como observado nos ensaios com EDTA, a AE de serinoproteinases nos pacientes com DPOC não foi significante entre os grupos estudados, mas observou-se a redução estatisticamente significante ( $p<0,001$ ) em relação a AE total no grupo DPOC e controle, sugerindo que as serinoproteinases são mais ativas em relação às metaloproteinases.

Relatou-se ainda, a grande variabilidade da atividade entre as amostras nos dois grupos experimentais, sendo que nos pacientes com DPOC foi superior em relação ao grupo de indivíduos saudáveis. Antes de realizar a coleta de saliva, fisioterapeutas e enfermeiros da Clínica de Reabilitação Pulmonar foram devidamente treinados. Os indivíduos foram orientados para realizar a coleta de saliva e, em seguida, realizaram as manobras necessárias para a avaliação clínica e identificação do grau de comprometimento da disfunção. Durante o procedimento de coleta da saliva foi relatado que os pacientes com DPOC apresentaram dificuldades de salivação para obter o volume desejado de amostra. Vale ressaltar, que não foram identificados relatos na literatura de que pacientes com DPOC possuem dificuldades de salivação e merece investigações futuras para identificar sua associação com os aspectos fisiopatológicos da doença.

A estratégia de coleta foi padronizada de acordo com os protocolos amplamente utilizados, assim como, as condições de armazenamento e quantificação protéica das amostras. Os procedimentos de coleta e condições de armazenamento não explicariam, provavelmente, as variações observadas nos ensaios de cinética enzimática, pois tem sido observado que a atividade gelatinolítica das amostras por ensaios de zimografia, não apresentaram diferenças entre as amostras recentemente coletadas e as que foram congeladas e descongeladas (comunicação pessoal).

Entretanto, um fator que explicaria essa variação poderia ser a própria variabilidade natural intra-específica de cada indivíduo.

Em síntese, os resultados apresentados nesse estudo indicam que a análise de cinética enzimática utilizando substratos fluorescentes pode não ser uma estratégia eficaz para avaliar a atividade de metaloproteinases e serinoproteinases na saliva, utilizando inibidores comerciais como PMSF e EDTA. Entretanto, as análises de correlações entre os parâmetros de avaliação clínica e os ensaios de cinética enzimática demonstraram que o nível de atividade de metaloproteinases na saliva parece estar associado ao grau de comprometimento da capacidade funcional pulmonar em indivíduos com DPOC. Esses resultados abrem perspectivas para caracterização das enzimas proteolíticas mais representativas na fisiopatologia da DPOC, utilizando substratos específicos para essas enzimas.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro na realização desse estudo (processo no. 08/53688-1). À Juliana Eugenio Ribeiro e Camila Camarão Esteves pelos serviços prestados na secretaria do programa de mestrado em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho, UNINOVE.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152(5 Pt 2):S77-121.

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

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;97(6):634-9.

Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Miyamoto K, Kawakami Y. Decline in FEV1 in community-based older volunteers with higher levels of neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid. *Respiration.* 2000;67:261-7.

Cataldo D, Munaut C, Noël A, Frankenne F, Bartsch P, Foidart JM et al. MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000;123(3):259-67.

Celli BR, Barnes PJ. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2007;29(6):1224-38.

Celli BR. Pulmonary rehabilitation in patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152:861-4.

Chagas JR, Juliano L, Prado ES. Intramolecularly quenched fluorogenic tetratpeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. *Anal Biochem.* 1991;192(2):419-25.

Chagas JR, Portaro FCV, Hirata IY, Almeida PC, Juliano MA, Juliano L et al. Determinants of the unusual cleavage specificity of lysyl-bradykinin-releasing kallikreins *Biochem J.* 1995;306:63-9.

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

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

Hoekstra R, Eskens FA, Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. *Oncologist*. 2001;6(5):415-27.

Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;24;350(26):2645-53.

Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics*. 2007;4(4):531-8.

Kang MJ, Oh YM, Lee JC. Lung matrix metalloproteinase-9 correlates with cigarette smoking and obstruction of airflow. *Journal of Korean Medical Science*. 2003;18:821-827.

Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN. Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1157-61.

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):1521-30.

Lee YC, Lee HB, Rhee YK, Song CH. The involvement of matrix metalloproteinase-9 in airway inflammation of patients with acute asthma. *Clin Exp Allergy*. 2001;31:1623-30.

Lemjabbar H, Gosset P, Lamblin C, Tillie I, Hartmann D, Wallaert B et al. Contribution of 92 kDa gelatinase/type IV collagenase in bronchial inflammation during status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1298-307.

Lowrey GE, Henderson N, Blakey JD, Corne JM, Johnson JR. MMP-9 protein level does not reflect overall MMP activity in the airways of patients with COPD. *Resp Med*. 2008;102:845-51.

Neurath, H. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem Sci*. 1989;14(7):268-71.

Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res*. 2001;2(1):10-9.

Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:320-5.

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.* 2002a;2:602-9.

Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, Fitzgerald M, and Barnes PJ (2002b) Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002b:283:867-873.

Santos AA, Malaguti C, Corso SD, Silva CA. Expressão das metaloproteinases da matriz 2 e 9 na saliva de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. *Fisioterapia e Pesquisa.* 2009;16(4):*in press*.

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;161(1):32-5.

Soo-Quee D, Choon-Huat KG. The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine. *Occup Environ Med.* 2007;64(3):202-10.

Takeyabu K, Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Tanino M, Miyamoto Ket al. Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Eur Respir J.* 1998;12:1033-9.

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; 12(3):317-23.

**Tabela 1. Características dos pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis (Controle).** Dados estão expressos como média e desvio padrão (DP), exceto quando não foi possível. DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica.

**Características da população**

	<b>DPOC</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>(p)</b>
	Média ± DP	Média ± DP	
<b>Indivíduos (n)</b>	20	10	-
<b>Idade (anos)</b>	$71,10 \pm 9,17$	$70,80 \pm 9,72$	0,91
<b>Homens</b>	13	4	-
<b>Tabagistas</b>	0	0	-
<b>Ex-tabagistas</b>	20	0	-
<b>Anos/maço</b>	$48,53 \pm 21,09$	-	-
<b>Tempo de fumo (anos)</b>	$52,07 \pm 41,03$	-	-

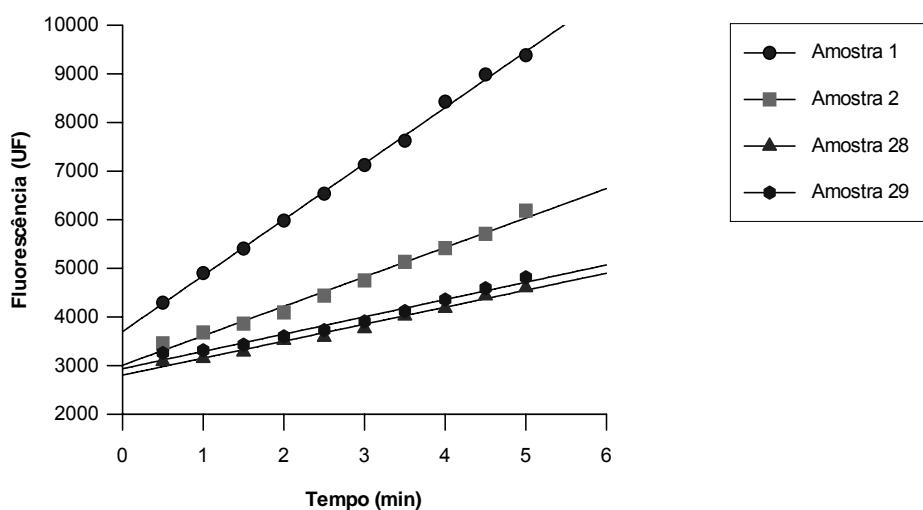
**Tabela 2. Avaliação clínica dos pacientes com DPOC e saudáveis (Controle).**

Dados foram expressos como média e desvio padrão, exceto quando não foi possível. As análises estatísticas foram realizadas com o Teste t não pareado. DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica; VEF<sub>1</sub>: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF: Capacidade vital forçada; % prev.: % do previsto;; \*p<0,05.

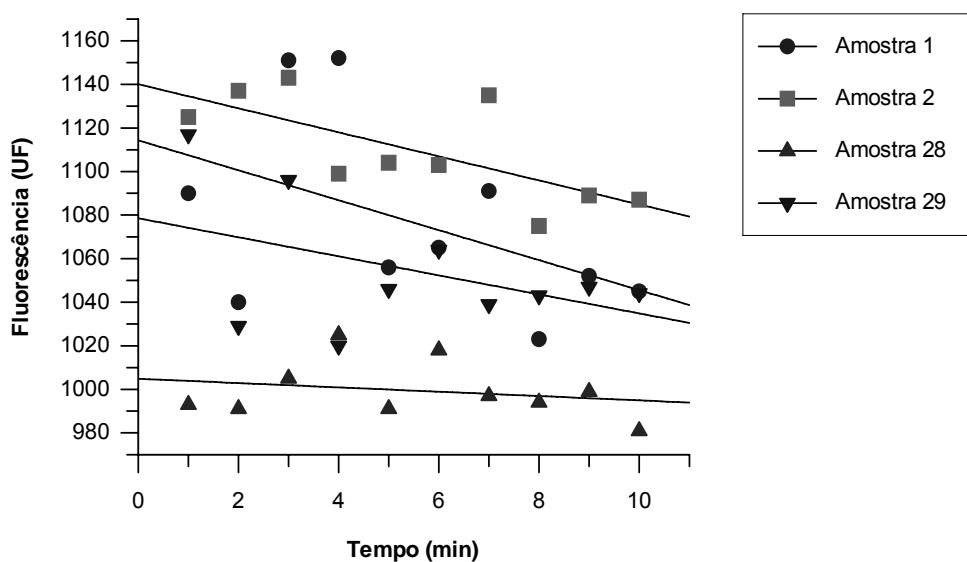
**Parâmetros clínicos da população estudada**

<b>Indivíduos (n)</b>	<b>DPOC</b> Média ± DP	<b>CONTROLE</b> Média ± DP	<b>Valor (p)</b>
	20	10	
<b>VEF<sub>1</sub>/CVF(% prev.)</b>	47,40 ± 12,38	81,60 ± 7,66	<b>0,001*</b>
<b>VEF<sub>1</sub>(% prev.)</b>	52,55 ± 13,94	115,70 ± 18,68	<b>0,001*</b>
<b>CVF(% prev.)</b>	88,85 ± 4,51	102,6 ± 4,33	0,063
<b>TC6'</b>	454,7 ± 98,75	552, ± 142	<b>0,029</b>
<b>IMC</b>	25,93 ± 4,56	27,67 ± 3,83	ns

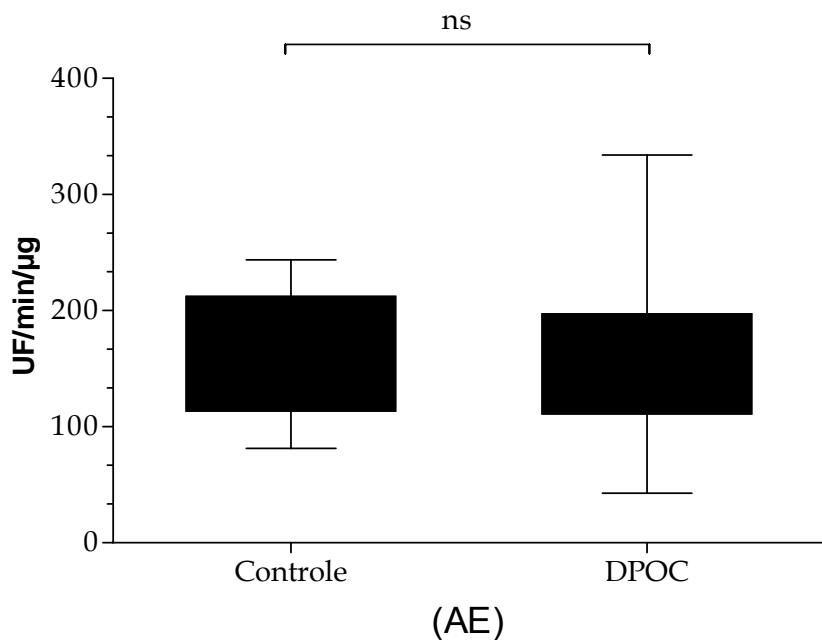
A



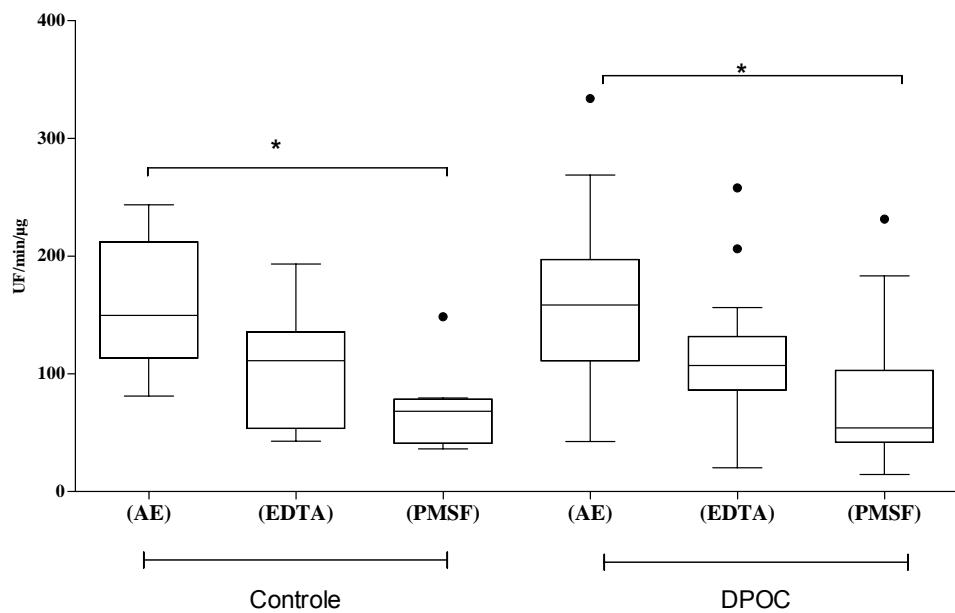
B



**Figura 1. Representação dos ensaios de padronização da AE em relação a concentração protéica das amostras 1 e 2 (pacientes com DPOC) e 28 e 29 (indivíduos saudáveis). Os ensaios foram realizados com 5 µg de proteína de cada amostra e 5 µM do substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp (A) ou Abz-GGFLTSQ-EDDnp (B). DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica.**



**Figura 2. Avaliação da AE na saliva de pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis (Controle).** Os ensaios foram realizados com 5 $\mu$ g de proteínas de cada amostra e 5  $\mu$ M do substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp. Os resultados foram expressos como mediana e desvio padrão (DP). DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica; ns: não significativo.



**Figura 3. Efeitos inibitórios da AE na saliva de pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis (Controle) pelo EDTA e PMSF.** Os ensaios foram realizados com 5 $\mu$ g de proteínas de cada amostra, 5  $\mu$ M do substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp e EDTA 200 mM ou PMSF 0,5 mM. Os resultados foram expressos como mediana e desvio padrão (DP). DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica; \*p<0,05.

### Análises de correlação.

Parâmetros	AE		EDTA		PMSF		
	Controle	DPOC	Controle	DPOC	Controle	DPOC	
<b>VEF<sub>1</sub></b>	<i>p</i>	0,70	<b>0,03*</b>	0,71	<b>0,02*</b>	0,81	0,58
	<i>r</i>	(0,136)	<b>(-0,473)</b>	(-0,132)	<b>(-0,498)</b>	(0,085)	(-0,129)
<b>VEF<sub>1</sub>/CVF</b>	<i>p</i>	0,63	0,22	0,64	0,46	0,17	0,70
	<i>r</i>	(0,172)	(-0,473)	(0,166)	(0,173)	(-0,468)	(0,908)
<b>CVF</b>	<i>p</i>	0,15	0,15	0,74	0,15	0,23	0,22
	<i>r</i>	(0,488)	(-0,335)	(0,185)	(-0,330)	(0,411)	(-0,282)
<b>TC6'</b>	<i>p</i>	0,85	0,43	0,47	0,40	0,95	0,47
	<i>r</i>	(-0,067)	(-0,189)	(-0,225)	(-0,195)	(-0,019)	(0,170)

**Tabela 3. Relação entre os parâmetros de avaliação clínica, espirometria e TC6' e a AE na ausência ou presença de inibidores de metaloproteinases e serinoproteinases (EDTA e PMSF, respectivamente).** As análises de correlação de Pearson indicaram que a AE e a inibição de metaloproteinases estão negativamente relacionada com o grau de obstrução aérea, VEF<sub>1</sub>. VEF<sub>1</sub>: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF: Capacidade vital forçada; r: coeficiente de correlação; \**p*<0,05

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

No presente estudo foram estabelecidas as condições experimentais para determinar a atividade proteolítica utilizando substratos fluorescentes Abz-FRSSRQ-EDDnp e inibidores sítios-dirigidos, como o EDTA e PMSF, com o objetivo de avaliar os níveis enzimáticos relativos às proteases das classes das metaloproteinases e serinoproteinases. Entretanto, não se observou diferenças significantes entre os pacientes com DPOC e saudáveis com relação a AE total ou inibição de metaloproteinases e serinoproteinases na saliva. Por outro lado, as análises de correlações entre as variáveis da avaliação clínica do grupo DPOC e os ensaios de AE, demonstraram que o FEV1 apresentou correlação negativa em relação a AE total ( $p=0,03$ ,  $r=-0,473$ ) e a inibição de metaloproteinases ( $p=0,02$ ,  $r=-0,498$ ). Assim, os resultados apresentados nesse estudo indicam que a análise de cinética enzimática utilizando substratos fluorescentes inespecíficos e inibidores comerciais pode não ser uma estratégia eficaz para avaliar a atividade de metaloproteinases e serinoproteinases na saliva. Entretanto, há indícios de que o nível da atividade de metaloproteinases na saliva parece estar associado ao grau de comprometimento da capacidade funcional pulmonar em indivíduos com DPOC. Esses resultados abrem perspectivas para caracterização das enzimas proteolíticas na saliva, mais representativas na fisiopatologia da DPOC, utilizando substratos específicos para os diferentes tipos enzimáticos.

#### **4 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. 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.
3. 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;161(1):32-5.
4. Agustí AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J**. 2003;21(2):347-60.
5. 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;159(4 Pt 2):S1-40.
6. Fabbri LM, Luppi F, Beghé B, Rabe KF. Update in chronic obstructive pulmonary disease 2005. **Am J Crit Care Med**. 2006; 173:1056-65.
7. Menezes AMB, Jardim JR, Pérez- Padilla R, Camelier A, Rosa F, Nascimento O, Hallal PC, Latino team. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO study in São Paulo, Brazil. **Cad Saude Publica**. 2005;21(5):1565-73.

8. 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;101:2113-8.
9. 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.
10. Cazzola M, Donner CF, Hanania NA. One hundred years of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Respir Med.** 2007;101:1049-65.
11. 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;176 (6):532-55.
12. 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.
13. Lagente V., B. Manoury, S. Nénan, C. Le Quément, C. Martin-Chouly and E. Boichot. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 2005;38:1521-30.
14. Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pauwels RA. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. **Curr Opin Pharmacol.** 2005;5(3):257-63.

15. Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2008;12(4):361-7.
16. Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. **Respir Res.** 2001;2(1):10-9.
17. Reilly PJ, Gaggar A, Blalock JE. Interfering with extracellular matrix degradation to blunt inflammation. **Curr Opin Pharmacol.** 2008;8:242-48.
18. Weathington NM, van Houwelingen AH, Noerager BD, Jackson PL, Kraneveld AD, Galin FS, Folkerts G, Nijkamp FP, Blalock JE. A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. **Nat Med.** 2006;12(3):317-23.
19. Nénan S, Boichot E, Lagente V, Bertrand CP. Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator? **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2005; 100;167-72.
20. Cataldo D, Munaut C, Noël A, Franken F, Bartsch P, Foidart JM, Louis R. MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Int Arch Allergy Immunol.** 2000;123(3):259-67.
- 21 O'Reilly P, Jackson PL, Noerager B, Parker S. N- $\alpha$ -PGP and PGP, potential biomarkers and therapeutic targets for COPD. **Respir Res.** 2009; 10(38):1-8.
22. Lee YC, Lee HB, Rhee YK, Song CH. The involvement of matrix metalloproteinase-9 in airway inflammation of patients with acute asthma. **Clin Exp Allergy.** 2001; 31:1623-30.

23. Brajer B, Batura-Gabryel H, Nowicka A, Kuznar-Kaminska B, Szczepanik A. Concentration of matrix metalloproteinase-9 in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and a degree of airway obstruction and disease progression. **Physiol Pharmacol.** 2008;59(6):145-52.
24. Bochenek G, Nizankowska E, Gielicz A, Swierczynska M, Szczeklik A.. Plasma 9alpha,11beta-PGF2, a PGD2 metabolite, as a sensitive marker of mast cell activation by allergen in bronchial asthma. **Thorax.** 2004;59(6):459-64.
25. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. **Expert Rev Proteomics** 2007; 4(4):531-8.
26. Soo-Quee D, Choon-Huat Koh G The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine. **Occup Environ Med.** 2007; 64(3):202-10.
27. 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.
28. 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):185-91.
29. Yigla M, Berkovich Y, Nagler RM. Oxidative stress indices in COPD-Broncho-alveolar lavage and salivary analysis. **Arch Oral Biol.** 2007;52(1):36-43.
30. Wouters EF. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. **Proc Am Thorac Soc.** 2005; 2(1):26-33.

31. 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.
32. 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; 7(9):1673-7.
33. Santos AA, Carla Malaguti C, Corso SD, Silva CA. Expressão das metaloproteinases da matriz 2 e 9 na saliva de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. **Fisioterapia e Pesquisa** 2009; 16(4):*in press*.

## **5 APÊNDICES**

---

---

## 6.1. Termo de Consentimento para Participação em Pesquisa Clínica:

**Título do projeto de pesquisa: CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA SALIVA DE PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC) E SUA CORRELAÇÃO CLÍNICO-FUNCIONAL PELA PROVA DE FUNÇÃO PULMONAR**

Essas informações estão sendo fornecidas pela fisioterapeuta Juliana Gerunda Basso (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 e expressão das MMPs na saliva de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). 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 Juliana Gerunda Basso, 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 da prova de função pulmonar".

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 Juliana Gerunda Basso

## 6.2. Formulários de Avaliação Clínica

### **FICHA DE TRIAGEM**

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### **1) IDENTIFICAÇÃO**

NOME:			
IDADE:	SEXO:	<input type="checkbox"/>	M
<input type="checkbox"/> branca	<input type="checkbox"/> negra	<input type="checkbox"/> amarela	<input type="checkbox"/> vermelha
NACIONALIDADE:	NATURALIDADE:		
ENDEREÇO:			
CIDADE:	UF:		
PROFISSÃO:			
ESCOLARIDADE:			
NÃO ALFABETIZADO <input type="checkbox"/>			
1º GRAU	<input type="checkbox"/>	COMPLETO	<input type="checkbox"/>
INCOMPLETO			
ACOMPANHANTE:			
FONE CONTATO:			

#### **2) HISTÓRIA TABAGICA**

<input type="checkbox"/> NÃO TABAGISTA	____ MAÇOS POR ____ ANOS
<input type="checkbox"/> TABAGISTA	____ MAÇÕS POR DIA
<input type="checkbox"/> EX-TABAGISTA	FUMA HA ____ MESES

CONVIVENCIA COM FUMANTES:	<input type="checkbox"/>	SIM	<input type="checkbox"/>	NÃO
---------------------------	--------------------------	-----	--------------------------	-----

**HMP:**

**HMA:**

---

---

---

---

---

## **MEDICAÇÃO EM USO:**

<b>NOME</b>	<b>INDICAÇÃO</b>	<b>DOSE</b>

## DIAGNOSTICO:

## ASSINATURA DO PACIENTE

### ASSINATURA DO AVALIADOR

---

---

**6 ANEXOS**

## 6.1 Parecer do CoEP



Comitê de Ética em Pesquisa – CoEP – UNINOVE  
Av. Francisco Matarazzo, 612 – Prédio C – Térreo  
comitedeetica@uninove.br

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

**Titulo 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.

**Critérios 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

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 inócuia, desistência, indenização, resarcimento, 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

## 6.2 Certificado de Aprovação - CoEP



### 6.3 Participação em outros estudos

Artigo original

# Análise da qualidade de vida em parkinsonianos e sua correlação com o domínio ADL (Atividade de Vida Diária) da escala UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale)

Quality of life analysis in parkinsonism and its correlation with the ADL domain (Activity of Daily Living) of scale UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale)

**Juliana G. Basso<sup>(1)</sup>; Gladys A. Ribeiro Dias<sup>(2)</sup>; Reinaldo G. Cianci<sup>(1)</sup>; Simone Dal Corso<sup>(3)</sup>; Carlos A. Silva<sup>(4)</sup>**  
Estudo desenvolvido na Faculdade Marechal Rondon e Associação Brasil Parkinson.

**Resumo:** A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem crônica e neurodegenerativa que compromete o desempenho das atividades diárias dos pacientes e em diferentes aspectos da qualidade de vida (QV). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar as correlações entre o domínio Atividades da Vida Diária (AVD) da escala UPDRS e os domínios físico, psicológico, relações sociais e meio ambiente do questionário WHOQOL-BREF (World Health Organization Quality of Life Instrument). Trata-se de um estudo transversal incluindo 21 pacientes com diagnóstico médico de DP e que recebiam atendimento multiprofissional. Cada indivíduo foi entrevistado com dois instrumentos de avaliação: um para mensurar a QV (WHOQOL-BREF); e outro contendo somente as questões do domínio AVD (UPDRS). A análise geral das medianas e sua distribuição em todos os domínios indicaram que a população apresentou QV boa ou satisfatória e o grau de comprometimento com relação ao domínio AVD, leve a moderado. Análises de correlações de Pearson indicaram que o domínio AVD apresentou correlação negativa e significante com os domínios físico e psicológico do WHOQOL-BREF ( $p<0,023$ ;  $p<0,005$ , respectivamente), mas não se observou correlações entre os domínios social ( $r=-0,383$ ;  $p=0,08$ ) e ambiente ( $r=-0,49$ ;  $p=0,19$ ). Em síntese, o estudo demonstrou que a amostra estudada apresentou QV boa ou satisfatória, provavelmente em função do programa efetivo de atividades multiprofissionais, além dos efeitos da medicação. Assim como, as correlações entre os instrumentos demonstraram que quanto melhor as condições físicas e psicológicas, menor é o comprometimento das atividades diárias dos pacientes com DP, sugerindo que o instrumento domínio-específico (AVD) do UPDRS poderia ser utilizado para a avaliação da efetividade dos programas de reabilitação para proporcionar melhorias na QV desses pacientes e dos cuidadores.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson, qualidade de vida, UPDRS, WHOQOL-BREF.

**Abstract:** The Parkinson's disease (PD) is a chronic and neurodegenerative disorder that affects the performance of daily activities of patients and in different aspects of quality of life (QOL). Therefore, the purpose of this study was to evaluate the correlations between the field UPDRS Activity of Daily Living (ADL) scale and the physical, psychological, social relationships and environment areas of the WHOQOL-BREF questionnaire. This is a cross sectional

\* Artigo recebido em 17 de junho de 2009 e aprovado em 24 de julho de 2009.

<sup>1</sup> Alunos do programa de mestrado em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Docente da Faculdade Marechal Rondon nas disciplinas de Anatomia e Neurologia, São Roque, Brasil.

<sup>3</sup> Professora doutora do Laboratório de Fisiologia do Exercício do mestrado em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brasil.

<sup>4</sup> Professor doutor do Laboratório de Aplicações Moleculares e Celulares do mestrado em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brasil.

#### Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Carlos Alberto Silva. Centro de Pós-Graduação. Departamento de Ciências da Reabilitação. Mestrado em Ciências da Reabilitação. Av. Francisco Matarazzo, 612 – Água Branca. CEP 05001-100. Fone: 55 11 36659325. E-mail: [lescovar@uninove.br](mailto:lescovar@uninove.br)

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

study including 21 patients with diagnosis of PD and who received multiprofessional care. Each person was interviewed with two instruments of assessment: one to measure the QOL (WHOQOL-BREF - *World Health Organization Quality of Life Instrument*), and another containing only the issues of field ADL (UPDRS). The general analysis of median and its distribution in all areas indicated that the population had QOL, good or satisfactory, and the degree of commitment to the field ADL, mild to moderate. Analysis of Pearson correlations indicated that the area ADL showed a negative and significant correlation with the physical and psychological domains of WHOQOL-BREF ( $p < 0.023$ ,  $p < 0.005$ , respectively), but there was no correlation between the social ( $r = -0.383$ ,  $p = 0.08$ ) and environment ( $r = -0.49$ ,  $p = 0.19$ ). In summary, the study showed that the sample showed good or satisfactory QOL, probably due to the effective multidisciplinary program activities, and the effects of the medication. So as the correlations between the instruments showed that the better the physical and psychological conditions, the lower the commitment of the daily activities of patients with PD, suggesting that the instrument-specific area (ADL) of the UPDRS may be used for assessing the effectiveness programs of rehabilitation to provide improvements in the QOL of patients and caregivers.

**Keywords:** Parkinson's disease, quality of life, UPDRS, WHOQOL-BREF.

## INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem crônica e degenerativa, caracterizada pela perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos dos centros motores do Sistema Nervoso Central<sup>(1)</sup>. Essa doença apresenta sintomas como tremor, rigidez e bradicinesia, fala disartrofônica, com articulação das palavras dificultada e voz baixa, escrita micrográfica, hiper-salivação, seborréia facial muito frequente, dificuldades urinárias, hipotensão arterial ortostática e depressão<sup>(2)</sup>. Esses sintomas, associados à progressão da doença, têm impacto negativo no desempenho das atividades de vida diária, comprometem o estado emocional e social não só do portador de DP, mas de seus familiares, o que repercute em pior qualidade de vida (QV)<sup>(3)</sup>.

Por ser uma doença progressiva e incapacitante, um dos principais objetivos dos tratamentos farmacológico e não farmacológico é minimizar a piora na qualidade de vida. Portanto, torna-se fundamental o uso de instrumentos (escalas clínicas) que avaliem, não apenas a condição clínica geral do paciente, mas suas funções motora e mental e o impacto dessas disfunções na qualidade de vida dos parkinsonianos<sup>(4)</sup>.

A qualidade de vida pode ser avaliada por instrumentos genéricos ou específicos. Os instrumentos genéricos podem ser utilizados

para diferentes doenças ou para comparar a QV de um grupo de pacientes com a da população saudável. Os específicos são aqueles desenvolvidos especialmente para determinada doença, sendo mais sensíveis para detectar o impacto da doença na qualidade de vida, pois se utilizam dos sintomas comuns à doença para avaliar o impacto desta no estado de saúde do paciente. Independente de serem genéricos ou específicos, os instrumentos são questionários auto-aplicáveis, possibilitando que o paciente julgue sua qualidade de vida relacionada à saúde<sup>(5)</sup>.

O questionário WHOQOL-BREF (*World Health Organization Quality of Life Instrument*) é um instrumento genérico de avaliação da QV. Tem duas versões correspondendo a uma versão abreviada composta por 26 questões que obtiveram melhores desempenhos psicométricos extraídas do WHOQOL-100. É composto por quatro domínios (físico, psicológico, relações sociais e meio ambiente), sendo duas gerais de QV e as outras representam cada uma das 24 facetas que compõem o questionário<sup>(6)</sup>. No caso da DP, a *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson), conhecida como UPDRS, é um dos instrumentos específicos amplamente utilizados para avaliar sinais e sintomas em determinadas atividades dos parkinsonianos<sup>(7-9)</sup>. A UPDRS é organizada em 42

questões distribuídas em quatro domínios: atividade mental, comportamento e humor, atividades de vida diária (AVD), exploração motora e complicações da terapia medicamentosa. A pontuação em cada questão varia de 0 a 4, sendo com relação ao comprometimento: 0- ausência; 1- leve; 2- moderado, 3- grave, e, 4- severo<sup>(9)</sup>.

Indivíduos com DP apresentam redução na qualidade de vida (QV) pelo impacto que a doença desencadeia nas questões emocionais, econômicas e no cotidiano do próprio indivíduo ou dos seus familiares<sup>(3)</sup>. Nesse contexto, a contribuição da fisioterapia tem sido de grande importância para proporcionar melhorias da mobilidade, fortalecimento muscular, equilíbrio e aptidão física<sup>(10,11)</sup>, proporcionando benefícios significativos na QV de indivíduos com DP<sup>(12)</sup>. Dessa forma, os instrumentos de avaliação da DP e QV têm sido empregados para verificar a efetividade dos programas de reabilitação antes e após intervenção terapêutica em pacientes com DP<sup>(13)</sup>. Sendo assim, levando-se em consideração que o comprometimento do desempenho nas atividades do dia-a-dia pode comprometer os diferentes aspectos da qualidade de vida, o presente estudo teve o objetivo de avaliar as correlações do domínio AVD da escala UPDRS com os domínios físico, psicológico, relações sociais e meio ambiente do questionário WHOQOL-BREF.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado na Associação Brasil Parkinson, na cidade de São Paulo e em uma clínica de Fisioterapia de uma instituição privada de ensino superior. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Instituição (protocolo nº 049/07).

### **Critérios de inclusão e Critérios de exclusão**

Vinte e um indivíduos com DP foram incluídos neste estudo, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Os pacientes recebiam regularmente tratamento medicamentoso. Foram excluídos os indivíduos que apresentaram alteração cognitiva, física ou psicológica grave que os impediou de responder às perguntas dos questionários.

### **Delineamento da pesquisa**

Este é um estudo transversal que consistiu da aplicação do questionário WHOQOL-BREF e das questões referentes ao domínio AVD da escala UPDRS. Ambos foram aplicados sem controle de tempo para não gerar respostas apressadas, permitindo o completo preenchimento. As questões do domínio AVD da escala UPDRS foram aplicadas aos pacientes e, com dúvidas ao responder, os responsáveis da pesquisa refaziam a pergunta de forma dinâmica e mais objetiva, até que o paciente pudesse compreender para responder. Os dados relacionados à QV pelo WHOQOL-BREF foram obtidos de acordo com o algoritmo construído e padronizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Este algoritmo considera o número de questões respondidas em cada um dos domínios do instrumento e padroniza as escalas para que esses, em todos os domínios, variem de 0 a 100 pontos (menos para o mais favorável). Os valores das três questões (Q3, Q4, Q26) formuladas na direção oposta (quanto maior o escore mais des-

favorável a situação) são invertidos pelo algoritmo para a composição final do escore. Os dados do domínio AVD foram avaliados de acordo com a somatória da pontuação em cada questão (0 a 4 pontos), sendo com relação ao comprometimento: 0- ausência; 1- leve; 2- moderado, 3- grave, e 4- severo.

### **Análise Estatística**

A análise dos dados foi realizada por meio do software SPSS versão 10.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e Microsoft Excel. Os dados obtidos em cada domínio (Físico, Psicológico, Relações Sociais, Relações com o Meio Ambiente) do questionário WHOQOL-BREF e o domínio AVD da escala UPDRS foram analisados por mediana dos escores totais e seus respectivos valores mínimos e máximos. A estatística descritiva foi realizada para as variáveis propostas pelo software SPSS. O coeficiente de Correlação de Pearson foi utilizado para analisar a correlação entre os domínios do questionário WHOQOL-BREF e do AVD da escala UPDRS. O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

A maioria da amostra foi constituída pelo gênero masculino ( $n = 14$ ), sendo a média de idade da amostra total de  $70,6 \pm 6$  anos. A análise do histórico de cada paciente indicou que a população estudada apresentava diagnóstico de DP e com tratamento farmacológico controlado, a base de Levedopa, sob supervisão médica. Sendo assim, participaram desse estudo apenas pacientes que estavam em estado "on" da doença, ou seja, todos estavam sob efeito de medicamento controlado. Outro aspecto relevante da amostra é que todos os indivíduos estavam inseridos em um protocolo de atendimento fisioterapêutico convencional (atividades de alongamento, fortalecimento, treino de marcha, treino de

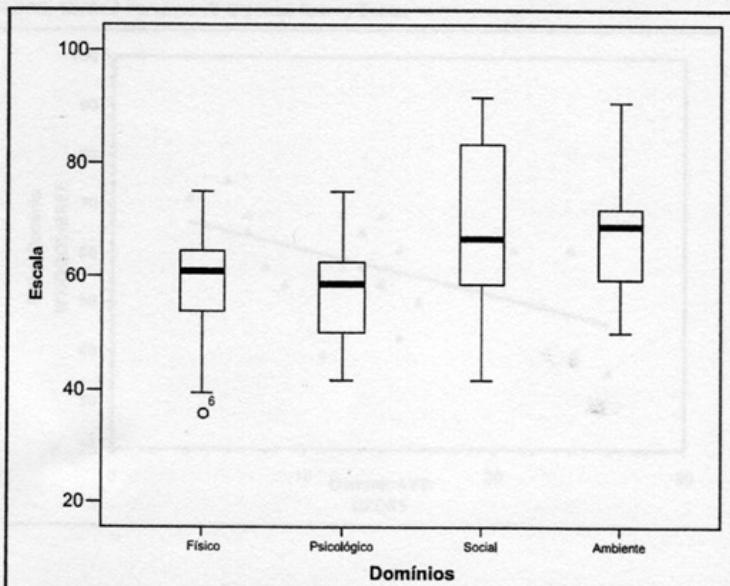
equilíbrio e treino da coordenação motora), assim como, recebiam atendimentos periódicos de psicólogos e incentivo social por pessoas treinadas em oferecer aulas de pintura, costura, dança, dentre outros.

A análise dos dados com relação à percepção de QV indicou que 57,14% dos entrevistados relataram boa, 9,53% muito boa, 19,05% nem ruim nem boa (regular) e 14,28% declararam que a mesma é ruim. Além disso, de acordo com a condição de saúde atual, 42,84% dos entrevistados apontaram como satisfeitos ou muito satisfeitos, 28,58% nem satisfeitos nem insatisfeitos (regular) e 28,58% declararam insatisfeitos (dados não ilustrados). Como ilustra a Figura 1, a análise do instrumento WHOQOL-BREF indicou que os domínios social e ambiente apresentaram escores maiores em relação aos domínios psicológico e físico. Entretanto, considerando que a escala de 0 a 100 corresponde à condição menos para o mais favorável em relação à QV, respectivamente, a análise geral das medianas e sua distribuição em todos os domínios indicou que a população apresentou QV satisfatória (Figura 1).

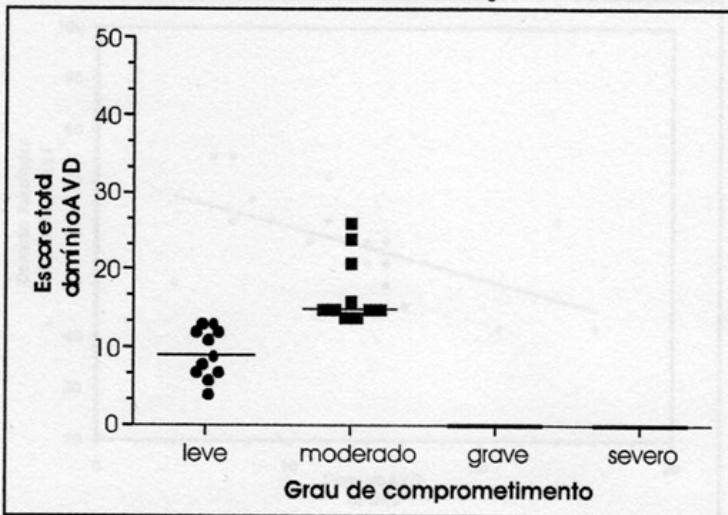
A análise das questões do domínio AVD foi realizada após somatória total do escore 0 a 4 pontos, sendo a pontuação máxima 52 e a mínima 0. Verificou-se que a população apresentou comprometimento leve a moderado com relação ao domínio AVD, pois a somatória dos pontos em cada questão (0 a 4) não foi superior a 30 pontos (Figura 2). Na amostra estudada, não houve indivíduos que relatassem comprometimento grave ou severo no domínio AVD.

Com a finalidade de analisar a correlação entre os domínios de QV do WHOQOL-BREF e o domínio AVD da escala UPDRS foi realizada a análise de correlação linear de

**Figura 1.** Percepção da QV nos domínios físico, psicológico, social e meio ambiente do instrumento de avaliação WHOQOL-BREF. QV, qualidade de vida; WHOQOL-BREF, World Health Organization Quality of Life Instrument.



**Figura 2.** Caracterização dos pacientes com DP de acordo com o grau de comprometimento para o domínio AVD da escala UPDRS. DP, Doença de Parkinson; AVD, atividade de vida diária; UPDRS, Unified Parkinson's Disease Rating Scale.



Pearson. O domínio AVD da escala UPDRS apresentou correlação negativa e significante com os domínios físico e psicológico do WHOQOL-BREF ( $r = -0,49$  e  $r = -0,58$ , respectivamente) (Figura 3 e 4). Por outro lado, não se observou correlações entre o domínio AVD da escala UPDRS e os domínios social ( $r = -0,383$ ;  $p = 0,08$ ) e ambiente ( $r = -0,49$ ;  $p = 0,19$ ).

## DISCUSSÃO

A proporção de idosos com 60 anos ou mais vem crescendo no Brasil, assim como na maior parte do mundo, alargando progressivamente o ápice da pirâmide populacional. A maior sobrevida da população produz prevalência de incapacidades desencadeadoras de dependência física e psíquica, comprometendo a autonomia dos

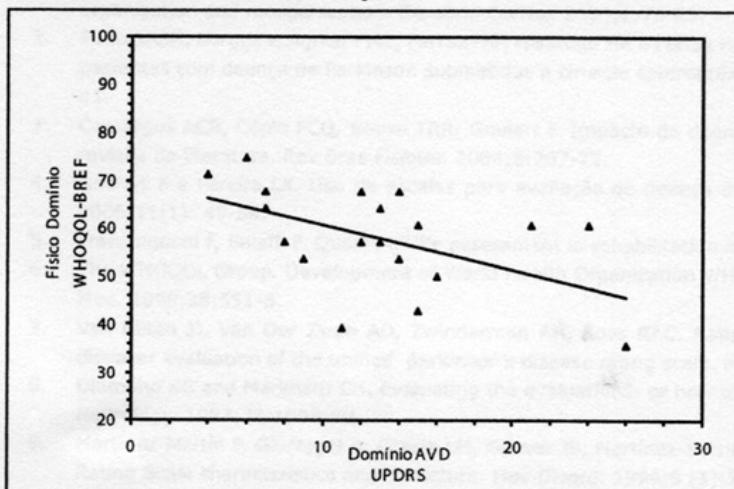
idosos e, consequentemente, piorando sua satisfação com a própria saúde (14).

Como a DP geralmente atinge a população idosa, alguns estudos tem demonstrado o quanto a evolução da doença compromete a QV do paciente (15-18). No presente estudo, foi possível demonstrar que o domínio AVD do instrumento UPDRS se correlacionou negativamente com os domínios físico e psicológico do instrumento WHOQOL-BREF em um grupo de indivíduos com DP da Associação Brasil Parkinson.

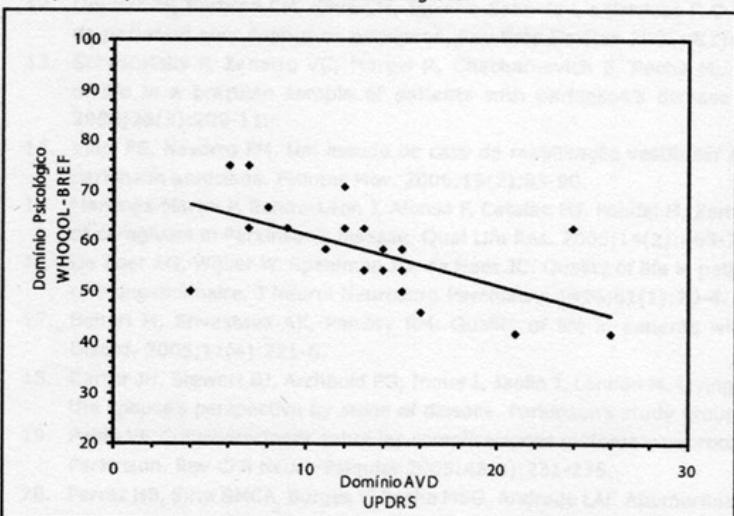
O domínio AVD da escala UPDRS contém 13 questões sobre fala, salivação, deglutição, escrita, atividade de cortar alimentos, vestir-se, higiene, virar na cama e ajustar os lençóis, frequência de quedas, congelamento ao andar, marcha, tremor e queixas sensoriais como dormências (9). Assim, os dados apresentados sugerem que as questões do domínio AVD estão relacionadas às questões dos domínios físico e psicológico do questionário da QV, ou seja, quanto mais favoráveis forem as condições físicas e psicológicas, menor é o comprometimento da AVD dos pacientes com DP.

Vale ressaltar que o tratamento farmacológico em pacientes com DP é de fundamental importância, por exemplo, a levodopa, um fármaco amplamente utilizado que estimula os núcleos dopamínergicos (19). Por outro lado, existem relatos que o uso prolongado deste medicamento desencadeia flutuações motoras como discinesias e fenômenos "on-off", sendo necessárias alterações da dosagem por recomendação médica (20). Além do tratamento, o fato dos indivíduos entrevistados receberem atendimento fisioterapêutico, psicológico e incentivo às diversas atividades sociais, explicaria o motivo da maioria da população estudada apresentar comprometimento leve a moderado em relação ao domínio

**Figura 3.** Correlação entre o domínio físico do questionário WHOQOL-BREF e o total dos escores para o domínio AVD da escala UPDRS ( $r = -0,49$ ;  $p < 0,023$ ). WHOQOL-BREF, World Health Organization Quality of Life Instrument; AVD, atividade de vida diária; UPDRS, Unified Parkinson's Disease Rating Scale.



**Figura 4.** Correlação entre o domínio psicológico do questionário WHOQOL-BREF e o total dos escores para o domínio AVD da escala UPDRS ( $r = -0,58$ ;  $p < 0,005$ ). WHOQOL-BREF, World Health Organization Quality of Life Instrument; AVD, atividade de vida diária; UPDRS, Unified Parkinson's Disease Rating Scale.



AVD. Assim, pode-se sugerir que o atendimento multiprofissional e as condições de tratamento estão relacionados com o aumento do bem estar e saúde atual dos pacientes, pois mais de 50% da população estudada declarou que estavam satisfeitos com a QV, de acordo com dados obtidos no instrumento de avaliação WHOQOL-BREF utilizado

no estudo.

Vários estudos têm demonstrado que a intervenção fisioterapêutica associada ao desempenho funcional contribui na melhoria do bem-estar dos pacientes com DP<sup>(10)</sup>. A análise do desempenho funcional de parkinsonianos nos estágios inicial e intermediário da doença demonstrou que a redução

do desempenho funcional compromete a QV desde fases iniciais da doença<sup>(21)</sup>. Outro estudo realizado em 2005 para avaliar o impacto de um programa de fortalecimento muscular e condicionamento aeróbico de parkinsonianos demonstrou significativa contribuição na AVD e atividade motora, consequentemente, na QV<sup>(12)</sup>. Da mesma forma, o estudo realizado com 16 pacientes com DP, de ambos os sexos, demonstrou que o treinamento de 20 sessões de treino de marcha com pistas visuais, mais fisioterapia convencional, proporcionou aumento da velocidade da marcha, comprimento do passo e cadência, além da melhora no equilíbrio e independência nas atividades funcionais em comparação ao grupo controle em que realizou treinamento convencional<sup>(22)</sup>.

Com isso, a maior contribuição do presente estudo é que os resultados levantam indícios de que a avaliação do domínio AVD poderia refletir as condições da QV dos parkinsonianos, pelo menos em relação aos aspectos físicos e psicológicos. Dessa forma, esse instrumento domínio-específico (AVD) do UPDRS poderia ser utilizado para a avaliação da efetividade dos programas de reabilitação em pacientes com DP, desenvolvida por uma equipe multidisciplinar de profissionais da área da Saúde, buscando alternativas para proporcionar melhorias na QV desses pacientes e dos cuidadores.

## CONCLUSÃO

Em síntese, o estudo demonstrou que a amostra estudada apresentou QV boa ou satisfatória, provavelmente em função do programa efetivo de atividades multiprofissionais, além dos efeitos da medicação. Além disso, as correlações entre os instrumentos nos permitem afirmar que quanto melhor as condições físicas e psicológicas, menor é o comprometimento da AVD nos pacientes com DP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goerendt IK, Lawrence A D and Brooks DJ. Reward processing in health and parkinson's disease: neural organization and reorganization. *Cerebral Cortex*. 2004;1:73-80.
2. Pinto RASR, Borges V, Aguiar PMC, Ferraz FAP, Hisatugo MK e Ferraz HB. Avaliação das atividades da vida diária dos pacientes com doença de Parkinson submetidos a cirurgia estereotáxica. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 2002;60(2B):435-41.
3. Camargos ACR, Cópia FCQ, Sousa TRR, Goulart F. Impacto da doença de parkinson na qualidade de vida: uma revisão de literatura. *Rev Bras Fisioter*. 2004;8:267-72.
4. Goulart F e Pereira LX. Uso de escalas para avaliação de doença de parkinson em fisioterapia. *Fisioter Pesqu*. 2005;11(1): 49-56.
5. Franchignoni F, Salaffi F. Quality of life assessment in rehabilitation medicine. *Eur Med Phys*. 2003;39:191-8.
6. The WHOQOL Group. Development of World Health Organization WHOQOL-B: quality of life assessment. *Psychol Med*. 1998;28:551-8.
7. Van Hilten JJ, Van Der Zwan AD, Zwinderman AH, Roos RAC. Rating impairment and disability in parkinson's disease: evaluation of the unified parkinson's disease rating scale. *Mov Disord*. 1994;9(1):84-8.
8. Diamond SG and Markham CH. Evaluating the evaluations: or how to weigh the scales of parkinsonian disability. *Neurology*. 1983;33:1098-99.
9. Martínez-Martín P, Gil-Nagel A, Gracia LM, Gómez JB, Martínez-Sarriés J, Bermejo F. Unified Parkinson's Disease Rating Scale characteristics and structure. *Mov Disord*. 1994;9 (1):76-83.
10. Kuopio A, Marttila RJ, Helenius H, Toivonen M, Rinne UK. The quality of life in parkinson's disease. *Mov Disord*. 2000;15(2):216-23.
11. Sánchez-Arias MDR, Silveira CRA, Caetano MJD, Pieruccini-Faria F, Gobbi LTB, Stella F. Preditores espaço-temporais do andar para testes de capacidade funcional em pacientes com doença de Parkinson *Rev Bras Fisioter*. 2008;12(5) 359-65
12. Goulart RP, Barbosa CM, Silva CM, Teixeira-Salmela L e Cardoso F. O impacto de um programa de atividade física de pacientes com doença de parkinson. *Rev Bras Fisioter*. 2005;9(1):49-55.
13. Schestatsky P, Zanatto VC, Margis R, Chachamovich E, Reche M., Gomes RB, Fricke D, Rieder CRM. Quality of life in a brazilian sample of patients with parkinson's disease and their caregivers. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006;28(3):209-11.
14. Volpi FS, Navarro FM. Um estudo de caso da reabilitação vestibular em pacientes idosos com vppb e doença de parkinson associada. *Fisioter Mov*. 2006;19(2):83-90.
15. Martinez-Martin P, Benito-Leon J, Alonso F, Catalan MJ, Pondal M, Zamarbide I, Tobias A, de Pedro J. Quality of life of caregivers in Parkinson's disease. *Qual Life Res*. 2005;14(2):463-72.
16. De Boer AG, Wijker W, Speelman JD, de Haes JC. Quality of life in patients with Parkinson's disease: development of a questionnaire. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1996;61(1):70-4.
17. Behari M, Srivastava AK, Pandey RM. Quality of life in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2005;11(4):221-6.
18. Carter JH, Stewart BJ, Archbold PG, Inoue I, Jaglin J, Lannon M. Living with a person who has Parkinson's disease: the spouse's perspective by stage of disease. *Parkinson's study group*. *Mov Disord*. 1998;13(1):20-8.
19. Pablo VF. Consideraciones sobre las complicaciones motoras y neurotoxicidad de la levodopa en la enfermedad de Parkinson. *Rev Chil Neuro-Psiquiatr* 2005;43(3):231-235.
20. Ferraz HB, Silva SMCA, Borges V, Rocha MSG, Andrade LAF. Apomorfina: uma alternativa no controle das flutuações motoras na doença de parkinson. *Arq Neuropsiquiatr*. 1995;53:245-251.
21. Goulart F, Santos CC, Teixeira-Salmela LF, Cardoso F. Análise do desempenho funcional em pacientes portadores de doença de Parkinson. *Acta Fisiátr*. 2004;11(1):12-16.
22. Dias NP, Fraga, DA, Cacho EWA, Oberg TD. Treino de marcha com pistas visuais no paciente com doença de Parkinson. *Fisioter Mov*. 2005;8(4):43-51.