

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

REGINA HELENA MARINHO

**Análise da degradação da matriz extracelular (mec) pulmonar na urina de
pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (dpoc).**

São Paulo, SP

2009

REGINA HELENA MARINHO

**ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR PULMONAR
(MEC) NA URINA DE PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA
CRÔNICA (DPOC).**

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

Orientador: Professor Dr. Carlos Alberto Silva

São Paulo, SP

2009

Ficha Catalográfica

Marinho, Regina Helena.

Análise da degradação da matriz extracelular (MEC) na urina de
pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)
f.46

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho, 2009
Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Silva

1. Doença pulmonar obstrutiva crônica. 2. Degradação da matriz
extracelular. 3. Elastina. 4. Colágeno.

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Maria exemplo de dedicação e amor incondicional.

Ao meu pai, Lourenço (in memoriam) pelos momentos de intensa ternura que passamos juntos.

Aos meus filhos, Camila, Ana Carolina e Caio, razão da minha existência, que souberam compreender a minha falta de tempo. Nunca estamos distantes ou sozinhos, quando somos unidos pelo amor, pela verdade e virtude.

Ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Alberto Silva, que tornou possível a realização deste trabalho, numa verdadeira reconstrução do conhecimento.

Aos pacientes, objetivo maior de toda atividade científica.

AGRADECIMENTOS

Cel Pm Álvaro Batista Camilo, Comandante Geral da Polícia Militar do Estado de São Paulo, a quem tenho imensa admiração e respeito.

Cel Pm José Carlos Queiroz, Diretor de Saúde da Polícia Militar de São Paulo, pelo apoio a pesquisa

Cel Res PM João Cláudio Valério, pela confiança, pelo apoio, por me ensinar a direcionar os pensamentos de forma construtiva e produtiva em favor do outro.

A Universidade Nove de Julho pela bolsa de estudos concedida e oportunidade de crescimento profissional.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp)

Prof^a Dr^a Simone Del Corso

Prof^a Dr^a Carla Malagutti

Prof^a Sandra Kalil Bussadori, pelo apoio e pela oportunidade de desenvolvimento da pesquisa

Prof^a. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

Prof Dr Luis Vicente Franco de Oliveira

Prof^a Claudia Santos Oliveira

Alunas da iniciação científica, Renata Salani e Cássia Ísis

Ao aluno Bruno do Laboratório, pela predisposição em sempre nos auxiliar com as amostras

A Juliana Eugenio Ribeiro e Camila Camarão Esteves secretárias do Programa de Mestrado pelo carinho e atenção

ÍNDICE

Dedicatória.....	<i>iii</i>
Agradecimentos	<i>iv</i>
Índice.....	<i>v</i>
Resumo	<i>vi</i>
Abstract.....	<i>vii</i>
Lista de Abreviaturas.....	<i>viii</i>
Lista de tabelas e figuras.....	<i>x</i>
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais da DPOC	2
1.2 Proteases e antiproteases na DPOC	5
1.3 Ação das enzimas sobre a degradação da MEC	8
2. ARTIGO	10
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
5. ANEXOS	42

RESUMO

Objetivos: Analisar os níveis de degradação da matriz extracelular (MEC) na urina de pacientes com DPOC e suas correlações com a prova de função pulmonar. **Métodos:** pacientes com DPOC (n=20) e indivíduos saudáveis (n=10) foram selecionados e submetidos à prova de função pulmonar por teste espirométrico. A degradação da MEC foi avaliada nas amostras de urina do grupo DPOC e controle por duas estratégias: dosagem de hidroxiprolina, para avaliar a degradação do colágeno; e, determinação da concentração dos fragmentos de elastina por ELISA, utilizando anticorpos anti-elastina. **Resultados:** A diferença entre a concentração dos níveis de hidroxiprolina não foi diferente em comparação ao grupo controle. Entretanto, observou-se que a concentração dos fragmentos de elastina em pacientes com DPOC foi extremamente significativa ($p=0,002$) em relação ao grupo controle e se correlacionou negativamente com o parâmetro VEF_1 da prova de função pulmonar. **Conclusão:** Esses resultados abrem perspectivas para a caracterização dos produtos de degradação da MEC por espectrometria de massas (MALDI-TOF/LC-MS/MS), uma tecnologia altamente específica e sensível para a determinação das seqüências de aminoácidos de peptídeos de interesse.

Descritores: DPOC, degradação da matriz extracelular, elastina, colágeno.

ABSTRACT

Objectives: To analyze the levels of degradation of extracellular matrix (ECM) in the urine in patients with COPD and their correlation with pulmonary function.

Methods: patients with COPD (n = 20) and healthy controls (n = 10) were selected and submitted the pulmonary function testing by spirometry. The degradation of ECM was assessed in urine samples in the group with COPD and control of two strategies: determination of hydroxyproline, to evaluate collagen degradation, and detection and determination of the concentration of elastin fragments by ELISA using anti-elastin.

Results: The difference between the concentration levels of hydroxyproline in urine of patients with COPD was not different compared to the control group. However, it was observed that the concentration of elastin fragments in the urine of patients with COPD was highly significant ($p=0.002$) and correlated negatively with FEV₁ parameter of pulmonary function tests. **Conclusion:** This results open perspectives for the characterization of degradation products of ECM by mass spectrometry (MALDI-TOF/LC-MS/MS), a technology highly specific and sensitive for the determination of amino acid sequences of peptides of interest.

Key words: COPD, degradation of extracellular matrix, elastin, collagen

Lista de Abreviaturas

BSA - Soro Albumina Bovina

BODE – índice de prognóstico mortalidade para DPOC (B = *body*; O = *obstructive*; D = *dyspnea*; E = *effort*)

Borg D - Escala de esforço percebido para dispnéia

cm - Centímetros

CVF - Capacidade vital forçada

DP - Desvio padrão

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica

ELISA - Enzyme linked Immuno Sorbent Assay – Ensaio imunoenzimático

FC - Frequência cardíaca

FC máx - Frequência cardíaca máxima

f - Frequência respiratória

IMC - Índice de massa corpórea

Kg - Kilograma

min - Minutos

mL - Mililitro

µg - Microgramas

µL - Microlitros

mg/mL - Miligrama por mililitro

MEC - Matrix extracelular

MMPs - Metaloproteinases

PA - Pressão arterial

PGP - Prolina-Glicina-Prolina

PBS - Phosphate buffered saline - Tampão fosfato-salino

Rep -Repouso

TC6 -Teste da caminhada de seis minutos

TD -Teste do degrau

VEF1 - Volume expiratório forçado no primeiro segundo

VEF1/ CVF - Relação do volume expiratório forçado no primeiro segundo pela capacidade vital forçada

VO2 - Consumo de oxigênio

VO2 máx - Consumo máximo de oxigênio

TIMPs - Tissue Inhibitors of Metalloproteinases – Inibidores teciduais de metaloproteinases

% - Percentual

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Características dos pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis	30
Tabela 2. Avaliação clínica dos pacientes com DPOC e saudáveis (Controle).....	31
Figura1. Concentração de hidroxiprolina na urina de pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis.....	32
Figura 2. Concentração de fragmentos de elastina na urina de pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis	33
Figura 3. Relação entre o grau de obstrução aérea VEF ₁ (% prev.) e a concentração dos fragmentos de degradação da elastina na urina e os parâmetros de obstrução aérea VEF ₁ (% prev.) em pacientes com DPOC.....	34

1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A DPOC é caracterizada pela obstrução ao fluxo aéreo, não totalmente reversível em decorrência da resposta inflamatória dos pulmões a partículas ou gases nocivos [1]. O comprometimento não é apenas dos pulmões, pois com a progressão da doença, alguns pacientes desenvolvem manifestações sistêmicas, tais como: limitações ao exercício, disfunção dos músculos periféricos, desnutrição e internações freqüentes por exacerbação [2]. Um dos principais sintomas destes pacientes é a dispnéia, e seu aparecimento está ligado à interação de um conjunto de alterações fisiopatológicas, que levam ao desequilíbrio entre a capacidade dos músculos respiratórios e o aumento da carga mecânica imposta à respiração [3].

O diagnóstico da DPOC consiste da associação de sintomas e fatores de risco à espirometria. Este método é aceito como imprescindível para o diagnóstico da DPOC [4]. A relação entre volume expiratório forçado no primeiro segundo e capacidade vital forçada (VEF1/CVF) inferior a 70% confirma o diagnóstico de DPOC [5,6].

A espirometria (do latim spirare = respirar + metrum = medida) é a medida do ar que entra e sai dos pulmões.

Pode ser realizada durante respiração lenta ou durante manobras expiratórias forçadas.

A espirometria é um teste que auxilia na prevenção e permite o diagnóstico e a quantificação dos distúrbios ventilatórios. Deve ser parte integrante da

avaliação de pacientes com sintomas respiratórios ou doença respiratória conhecida. É um exame peculiar em medicina, posto que exige a compreensão e colaboração do paciente, equipamentos exatos e emprego de técnicas padronizadas aplicadas por pessoal especialmente treinado.

Os valores obtidos devem ser comparados a valores previstos adequados para a população avaliada. Sua interpretação deve ser feita à luz dos dados clínicos e epidemiológicos.

Permite medir o volume de ar inspirado e expirado e os fluxos respiratórios, sendo especialmente útil a análise dos dados derivados da manobra expiratória forçada.

A capacidade pulmonar total (CPT) é a quantidade de ar nos pulmões após uma inspiração máxima.

A quantidade de ar que permanece nos pulmões após a exalação máxima é o volume residual (VR). A CPT e o VR não podem ser medidos por espirometria. O volume eliminado em manobra expiratória forçada desde a CPT até o VR é a capacidade vital forçada (CVF). A capacidade vital pode também ser medida lentamente (CV), durante expiração partindo da CPT ou durante a inspiração, a partir do VR. O volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) é a quantidade de ar eliminada no primeiro segundo da manobra expiratória forçada. É a medida de função pulmonar mais útil clinicamente.

Os resultados espirométricos devem ser expressos em gráficos de volume-tempo e fluxo. A CVF é o teste de função pulmonar mais importante porque num dado indivíduo, durante a expiração, existe um limite para o fluxo máximo que pode ser atingido em qualquer volume pulmonar. Como esta curva define um limite para o fluxo, ela é

altamente reprodutível num dado indivíduo e, mais importante, o fluxo máximo é muito sensível na maioria das doenças comuns que afeta o pulmão. [7]

Considerando o comprometimento da capacidade pulmonar e suas implicações na DPOC observam-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 [1]. A DPOC é caracterizada como doença inflamatória associada à intensa degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) e fibrose tecidual [8].

1.2 Proteases e antiproteases na DPOC

O pulmão na presença de substâncias tóxicas, mais frequentemente relacionados ao tabagismo, reage por meio da resposta inflamatória, caracterizada pelo recrutamento de células, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos, e liberação de substâncias oxidativas, antioxidativas e mediadores imunológicos, que interferem na função e estrutura do parênquima pulmonar e das vias respiratórias. Com isso, esse processo promove o remodelamento tanto do parênquima quanto das vias aéreas [1,9,10].

O papel dessas células inflamatórias na alteração estrutural causada pela doença ainda não está totalmente esclarecido. Em algumas circunstâncias, como na infecção ou por fumo, os neutrófilos migram em grande quantidade para o pulmão, liberando enzimas para preservar o tecido pulmonar. Assim, substâncias neutrofílicas são liberadas em grande quantidade, atuando nos sítios específicos de sua interação enzimática, ou seja, degradando os componentes protéicos da MEC como substratos (Figura 1) [10,11].

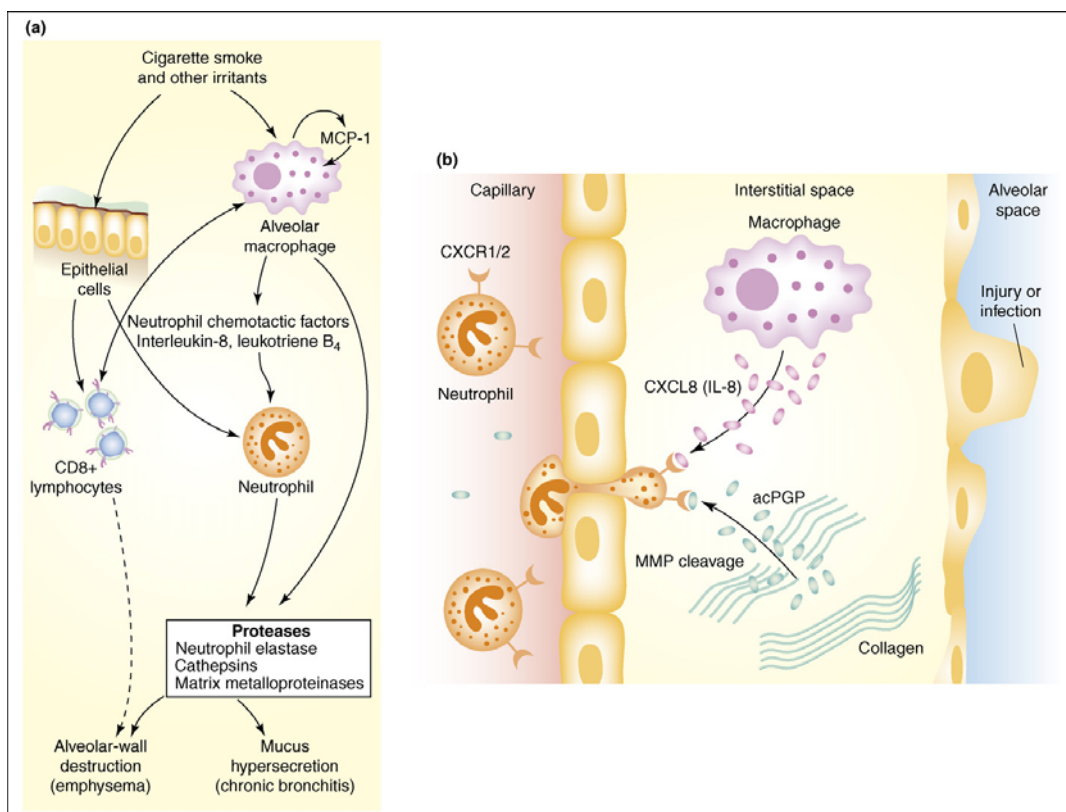


Figura 1. Ação das células inflamatórias na alteração estrutural causada pela DPOC . Gert Folkerts, et all, 2008 [12].

A elastase lisossomal neutrofílica é a principal enzima que degrada a elastina, componente da estrutura das fibras elásticas. Em condições normais, a atividade proteolítica é prevenida e restaurada pelas antiproteases [13,14,15]. Este fato tem estimulado alguns pesquisadores a estabelecerem modelos de enfisema com altas concentrações de elastase ou com deficiência de alfa-1 antitripsina [15,16]. No entanto, a correlação entre estes modelos inflamatórios e as alterações estruturais por eles produzidas não é simples e direta. Nem todos os tabagistas com alto número de neutrófilos nas vias aéreas desenvolvem enfisema, sugerindo que os neutrófilos não sejam as únicas células a participarem desse processo.

Linfócitos T, especialmente CD8⁺, têm sido encontrados nos alvéolos e nas paredes bronquiolares dos pacientes com DPOC [9,16]. Embora estas células apresentem participação direta na proteção contra vírus e parasitas, ainda não está estabelecido suas correlações com as alterações nas fibras elásticas [17]. O desequilíbrio de proteases e antiproteases como modelo de desenvolvimento da DPOC ainda não foi plenamente estabelecido no enfisema pulmonar, sem a deficiência hereditária de alfa-1 antitripsina. Modelos experimentais de enfisema utilizam quantidades elevadas de enzimas proteolíticas, que mais mimetizam a deficiência da alfa-1 antitripsina [14,16].

As MMPs, também conhecidas como matrixinas, pertencem a uma família de proteases extracelulares sendo responsáveis pela degradação da MEC durante a remodelagem do tecido [18]. Estas são sintetizadas como pró-enzimas secretadas ou de membrana que após o processamento (clivagem de um pró-peptídeo na porção N-terminal), adquire a forma ativa [18]. Essas enzimas hidrolisam componentes protéicos da MEC produzindo moléculas peptídicas biologicamente ativas que participam do processo inflamatório envolvido na DPOC [19] e, são seletivamente inibidas por inibidores teciduais de metaloproteinases, conhecidos como TIMPs. O TIMP-1, por exemplo, é descrito como inibidor da atividade catalítica da MMP-9 na proporção 1:1 [20,21]. Vários estudos têm demonstrado altos níveis de expressão das MMPs e TIMPs, principalmente a MMP-9 e TIMP-1, em lavado broncoalveolar de pacientes portadores de DPOC e asmáticos, participando na remodelagem da MEC [22,23,24].

1.3. Ação das enzimas sobre a degradação da MEC

A degradação das estruturas do tecido pulmonar está relacionada à hidrólise de fibras colágenas e elásticas presentes na MEC em pacientes com DPOC [25]. Assim, os níveis de degradação da elastina (fragmentos de elastina) e colágeno (hidroxiprolina) têm sido utilizados como marcador biológico, para acompanhar a progressão da DPOC [26,27]. A dosagem de hidroxiprolina em fluidos ou em tecidos biológicos é utilizada para avaliar os níveis de degradação do colágeno em análises experimentais [28] ou em análises clínicas nas amostras de pacientes [29]. A efetividade dos procedimentos da reabilitação pulmonar como tratamento da DPOC tem sido foco de estudo por vários grupos, com o intuito de analisar a eficácia dos programas de reabilitação pulmonar [30,31,32]. Por outro lado, as estratégias de avaliação da capacidade pulmonar funcional, como por exemplo, o índice BODE, teste da caminhada dos 6 minutos, entre outros, podem gerar resultados controversos, uma vez que o condicionamento físico de cada paciente em função do grau de obstrução aérea ou pelo estilo de vida podem inviabilizar a avaliação dos programas de reabilitação pulmonar. Sendo assim, a identificação de marcadores biológico peptídicos, específicos da DPOC, poderia ser uma estratégia para auxiliar na avaliação da efetividade dos programas de reabilitação pulmonar, estabelecendo seus níveis quantitativos antes e após a intervenção terapêutica em pacientes com DPOC.

Vários são os indícios de que a DPOC está associada à degradação dos componentes da MEC no tecido pulmonar pela ação das enzimas proteolíticas.

Assim como, já existem relatos de que esses produtos de degradação são encontrados no líquido bronco-alveolar e na corrente sanguínea de pacientes com DPOC [25]. Sendo assim, a identificação dessas moléculas em fluidos biológicos em que as estratégias de coleta sejam não-invasivas, como a urina, abre possibilidades de estudo para o entendimento do mecanismo que distingue a fase aguda da crônica durante a inflamação e na avaliação da efetividade dos programas de reabilitação, antes e após intervenção terapêutica.

2 ARTIGO

ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR PULMONAR (MEC) NA URINA DE PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC)

Title: ANALYSIS OF DEGRADATION OF EXTRACELLULAR MATRIX (ECM) IN URINE OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (COPD)

Título condensado: Marcadores de degradação do tecido pulmonar na urina em DPOC

Regina Helena Marinho¹, Renata Salani², Alecsandra Aparecida dos Santos³, Carla Malaguti⁴, Simone Dal Corso⁴ e Carlos Alberto da Silva⁵

1. Educadora Física e aluna do programa de mestrado em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho;
2. Aluna de iniciação científica e graduação em Fisioterapia, Universidade Nove de Julho;
3. Fisioterapeuta e mestre em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho.
4. Professora doutora, Laboratório de Fisiologia do Exercício, Universidade Nove de Julho;
5. Professor doutor, Laboratório de Aplicações Moleculares e Celulares em Reabilitação, Universidade Nove de Julho.

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

O estudo foi desenvolvido após aprovação do comitê de ética da instituição (protocolo número 209812/08).

RESUMO

Objetivos: Analisar os níveis de degradação da matriz extracelular (MEC) na urina de pacientes com DPOC e suas correlações com a prova de função pulmonar. **Métodos:** pacientes com DPOC (n=20) e indivíduos saudáveis (n=10) foram selecionados e submetidos à prova de função pulmonar por teste espirométrico. A degradação da MEC foi avaliada nas amostras de urina do grupo DPOC e controle por duas estratégias: dosagem de hidroxiprolina, para avaliar a degradação do colágeno; e, determinação da concentração dos fragmentos de elastina por ELISA, utilizando anticorpos anti-elastina. **Resultados:** A diferença entre a concentração dos níveis de hidroxiprolina não foi diferente em comparação ao grupo controle. Entretanto, observou-se que a concentração dos fragmentos de elastina em pacientes com DPOC foi extremamente significativa ($p=0,002$) em relação ao grupo controle e se correlacionou negativamente com o parâmetro VEF_1 da prova de função pulmonar. **Conclusão:** Esses resultados abrem perspectivas para a caracterização dos produtos de degradação da MEC por espectrometria de massas (MALDI-TOF/LC-MS/MS), uma tecnologia altamente específica e sensível para a determinação das seqüências de aminoácidos de peptídeos de interesse.

Descritores: DPOC, degradação da matriz extracelular, elastina, colágeno.

ABSTRACT

Objectives: To analyze the levels of degradation of extracellular matrix (ECM) in the urine in patients with COPD and their correlation with pulmonary function. **Methods:** patients with COPD (n = 20) and healthy controls (n = 10) were selected and submitted the pulmonary function testing by spirometry. The degradation of ECM was assessed in urine samples in the group with COPD and control of two strategies: determination of hydroxyproline, to evaluate collagen degradation, and detection and determination of the concentration of elastin fragments by ELISA using anti-elastin. **Results:** The difference between the concentration levels of hydroxyproline in urine of patients with COPD was not different compared to the control group. However, it was observed that the concentration of elastin fragments in the urine of patients with COPD was highly significant (p=0.002) and correlated negatively with FEV₁ parameter of pulmonary function tests. **Conclusion:** This results open perspectives for the characterization of degradation products of ECM by mass spectrometry (MALDI-TOF/LC-MS/MS), a technology highly specific and sensitive for the determination of amino acid sequences of peptides of interest.

Key words: COPD, degradation of extracellular matrix, elastin, collagen

INTRODUÇÃO

A DPOC é caracterizada pela obstrução ao fluxo aéreo, não totalmente reversível em decorrência da resposta inflamatória dos pulmões na presença de substâncias nocivas [1]. O comprometimento não é limitado apenas aos pulmões, pois com a progressão da doença surgem interações frequentes por exacerbação e manifestações sistêmicas que se exteriorizam na disfunção dos músculos periféricos resultando na piora dos sintomas e limitação ao exercício [2]. O diagnóstico da DPOC consiste na história clínica, associação de sintomas e presença de distúrbio ventilatório obstrutivo na espirometria, evidenciado pela relação entre volume expiratório forçado no primeiro segundo e capacidade vital forçada (VEF_1/CVF) inferior a 70% [3,4].

A DPOC é caracterizada como doença inflamatória associada à intensa degradação dos componentes da MEC e fibrose tecidual [5]. Tem sido proposto que várias proteases hidrolisam componentes do tecido conjuntivo proporcionando o equilíbrio entre proteases e antiproteases endógenas, e protegendo contra os efeitos lesivos mediados por estas proteases [6]. As metaloproteinases da matriz extracelular (MEC), conhecidas como MMPs, contribuem com migração de células inflamatórias no pulmão, na remodelagem e destruição do tecido pulmonar na DPOC [7,5].

Além das metaloproteinases, outros grupos de proteases são descritas na patogênese da DPOC, como as cisteínoproteinases (catepsinas) e serinoproteinases (elastases) [8,9]. A elastina, proteína elástica presente no parênquima pulmonar, também é um dos importantes alvos para proteases, sendo que sua clivagem leva à perda da elasticidade em pacientes com DPOC [6]. O papel das catepsinas na DPOC ainda é desconhecido, porém, tem se detectado

o aumento dos níveis de expressão da catepsina L e S em lavado broncoalveolar de pacientes portadores de DPOC [10] e macrófagos alveolares de fumantes [11]. Da mesma forma, os níveis de expressão da elastase de neutrófilo também são maiores em DPOC [12].

Normalmente, o excesso de proteases é inibido por antiproteases endógenas como a α 1-antitripsina (principal inibidor da elastase-2), a cistatina C (inibidor das catepsinas) e os TIMPs, inibidores endógenos das MMPs. Entretanto, este balanço protease/antiprotease estaria alterado em indivíduos fumantes, enfisematosos ou com outras doenças respiratórias, favorecendo a atividade proteolítica, com conseqüente degradação tecidual e exacerbação da doença [8].

A degradação das estruturas do tecido pulmonar está relacionada à hidrólise de fibras colágenas e elásticas presentes na MEC em pacientes com DPOC [13,14]. Com isso, os níveis de degradação da elastina e colágeno têm sido utilizados como marcadores biológicos para acompanhar a progressão da DPOC [15,16]. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo analisar os níveis de hidroxiprolina, indicador de degradação do colágeno, e dos produtos de degradação da elastina na urina de pacientes com DPOC e suas possíveis correlações com os parâmetros de função pulmonar.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética da instituição (protocolo número 209821/08). Participaram deste estudo, voluntários com DPOC que aguardavam ingresso no Programa de Reabilitação Pulmonar do Ambulatório de Fisioterapia e indivíduos saudáveis, provenientes da Associação SOS família São Geraldo, localizada à Rua Pedro Ângelo Janitelli, 72- Ponte Grande, Guarulhos - SP.

O diagnóstico da doença foi baseado nos critérios estabelecidos pela Sociedade Americana do Tórax (ATS) [17]. Todos os pacientes estavam com doença estável, sugerida por ausência de modificação nas medicações nas últimas quatro semanas. Os critérios de exclusão foram: indivíduos com doença cardíaca isquêmica, intervenção cirúrgica recente ou a participação em programas de reabilitação pulmonar. Para análise comparativa, foi avaliado um grupo controle constituído por indivíduos saudáveis, que nunca fumaram, com espirometria normal, sem história de doenças respiratórias, de ambos os gêneros, com faixa etária compatível com o grupo DPOC. Todos os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Avaliação clínica da população - prova de função pulmonar

O equipamento utilizado para o teste espirométrico foi o CPFS/D USB (Medical Graphics Corporation[®], St. Paul, Mo. USA). Todos os indivíduos realizaram a manobra de capacidade vital forçada (CVF), que consistiu em inspiração profunda seguida de expiração forçada para CVF mantida até que o indivíduo não a tolerasse mais ou até que

fossem atingidos os critérios de aceitação propostos pelas Diretrizes para Testes de Função Pulmonar da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia [18] . Somente o grupo com DPOC realizou a espirometria após 15-20 minutos da administração de 400 µg de salbutamol. Nas manobras espirométricas forçadas, obtêm-se os gráficos de fluxo – volume e volume – tempo, além das variáveis: CVF, volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁) e relação VEF₁/CVF. Consideramos para as análises a melhor curva de três manobras reproduzíveis. No presente estudo, foram utilizados os previstos da população brasileira, sugeridos por Pereira *et al.* [19]

Coleta e processamento das amostras de urina

As amostras de urina foram coletadas entre 8h e 11h30 da manhã para minimizar os efeitos da variação diurna.(30) As amostras de urina (em torno de 100 mL) foram coletadas em frascos coletores universais de material biológico. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 × g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e armazenado a -70°C até o momento da análise.

Avaliação dos níveis de hidroxiprolina

A hidroxiprolina foi quantificada como parâmetro de degradação do colágeno de acordo com o método descrito na literatura [20]. Resumidamente, as amostras de urina foram centrifugadas a 10000 x g durante 10 minutos e aquecida a 67°C por 10 min. Vinte microlitros do sobrenadante foram misturados levemente com 2 mL de hidróxido de sódio

3N seguido de autoclavagem a 121°C por 15 min. Cloramina T (4,5 mL/amostra) foi adicionada na mistura. Em seguida, as amostras foram oxidadas em temperatura ambiente por 20 min e foram cuidadosamente misturadas com 5 mL de reagente de Ehrlich (H₂SO₄ 6,8%; p-dimetilaminobenzaldeído 30% em etanol) recentemente preparada. A solução foi incubada durante 20 minutos a 65°C. A absorbância de cada amostra foi avaliada em 550 nm. A determinação da dosagem de hidroxiprolina foi determinada em mg/mL a utilizando como parâmetro de referência a curva padrão de hidroxiprolina (Sigma).

Análise dos níveis dos fragmentos de elastina na urina

A urina dos indivíduos com DPOC e saudáveis (5 mL) foram submetidas a pré-purificação em micro-coluna de fase reversa Sep-pak C18 (Waters), previamente equilibrada com solvente A (H₂O/TFA 0,1%) para retirada de sal contido nas amostras e obtenção da fração peptídica da urina. As amostras foram eluídas com 60% de solvente B (90% AcN /10% solvente A). Após liofilização, as amostras foram ressuspensas em 100 µL de água deionizada e centrifugados a 10000 x g por 5 minutos antes de serem utilizadas nos ensaios imunoenzimático (ELISA, *Enzyme linked Immuno Sorbent Assay*).

Placas PolySorp (NUNC), de 96 poços, foram sensibilizadas com 10 µL de cada amostra em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, por 18 horas a 37°C, em um volume final de 100 µL. Em seguida, as placas foram incubadas com 100 µL/poço de solução bloqueadora contendo BSA (soro albumina bovina) 1% em PBS (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8,1mM, KCl 2,7 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,2), por 1 h a temperatura ambiente. Após 3 lavagens sucessivas com PBS acrescido de Tween 20 0,05%, foram adicionados 100

μL /poço de solução contendo os anticorpos anti-elastina (Santa cruz, sc-166352) (diluídos 1:500), seguido de incubação por 1,5 h a temperatura ambiente.

Após a remoção dos soros com sucessivas lavagens (3 vezes), adicionou-se 100 μL /poço de solução PBS/BSA 1%, contendo o conjugado anti-IgG de camundongo com peroxidase (Santa cruz, sc-2005) diluído 1:1000. Em seguida, adicionou-se 100 μL /poço de solução cromógena [0,4 mg/mL de OPD (Ortho-Phenylenediamine) em solução tampão citrato 0,1M e fosfato 0,2 M, pH 5,0. Transcorridos 10 min, adicionou-se 50 μL /poço de solução HCl 0,1N para interromper a reação. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra analisada. A densidade ótica foi analisada em leitor de ELISA (ELISA Multiskan – Labsystems), a 492 nm.

Análise Estatística

O teste de Kolmogorov- Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade da variância. As variáveis da prova de função pulmonar, os níveis de hidroxiprolina e fragmentos de elastina foram sumarizados por média e desvio padrão (DP). Correlações entre os níveis de hidroxiprolina e elastina e os dados espirométricos foram avaliados através do teste de Correlação de Pearson. Para comparações entre os dois grupos utilizamos o Teste-t Student não pareado. O nível de significância estatística foi superior a $p < 0,05$.

RESULTADOS

A população estudada foi composta por 30 indivíduos, sendo 20 indivíduos do grupo DPOC e 10 indivíduos do grupo controle, com média de idade não significativa entre os ambos os grupos. Quanto ao gênero, no grupo DPOC, 13 indivíduos são homens e 4 no grupo controle. Entre os pacientes avaliados no grupo DPOC todos são 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 maços/anos foi de $52,07 \pm 41,03$ (Tabela1).

INSERIR TABELA 1 AQUI

Todos os pacientes do grupo DPOC apresentaram limitação ao fluxo aéreo, sendo a diferença entre os grupos extremamente significativa para o VEF_1 e para a relação VEF_1/CVF . Entretanto, não houve diferenças entre os grupos para a CVF (%prev.) e no IMC entre os grupos estudados (Tabela 2).

INSERIR TABELA 2 AQUI

A degradação dos principais componentes da MEC foi avaliada nas amostras de urina no grupo com DPOC e controle por duas estratégias: dosagem de hidroxiprolina, para avaliar a degradação do colágeno; e, detecção e determinação da concentração dos fragmentos de elastina por ELISA, utilizando anticorpos anti-elastina. A diferença entre a concentração dos níveis de hidroxiprolina na urina de pacientes com DPOC não foi

diferente em comparação ao grupo controle (Figura 1). Entretanto, observou-se que a concentração dos fragmentos de elastina na urina de pacientes com DPOC foi extremamente significativa ($p=0,002$) em relação aos indivíduos do grupo controle (Figura 2).

INSERIR FIGURA 1 AQUI

As análises de correlação de Pearson indicaram correlação negativa entre a concentração dos fragmentos de elastina na urina e o parâmetro de obstrução ao fluxo aéreo (VEF_1) nos pacientes com DPOC (Figura 2). Por outro lado, não se observou correlação nos parâmetros VEF_1/CVF ($r= -0,531$, $p= 0,149$) e CVF ($r= -0,390$, $p= 0,867$)

INSERIR FIGURA 2 AQUI

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O processo inflamatório no pulmão de pacientes com DPOC está associado à degradação dos componentes da MEC e a liberação de peptídeos quimiotáticos que atuam sobre células inflamatórias [21, 22, 23]. Seria esperado que o aumento dos produtos de degradação dos componentes da MEC estaria relacionado ao grau de comprometimento da DPOC. De fato, a maior contribuição do presente estudo foi demonstrar que os níveis dos fragmentos de elastina na urina de pacientes com DPOC encontram-se mais elevados em relação à população de indivíduos saudáveis. Ainda, verificou-se que esses níveis se correlacionaram negativamente com o parâmetro VEF_1 de obstrução aérea nos pacientes

com DPOC, levantando indícios de que a identificação e caracterização dos produtos de degradação da MEC poderiam ser analisados na urina.

As MMPs, também conhecidas como matrixinas, pertencem a uma família das proteases extracelulares, sendo um dos grupos enzimáticos responsáveis pela degradação da MEC durante a remodelagem do tecido [24]. Houghton et al. demonstraram que a ação enzimática da MMP-12 produz fragmentos peptídicos a partir da degradação da elastina, quimiotáticos para monócitos e macrófagos [21]. A elastina é uma proteína da MEC extremamente representativa no tecido pulmonar [25]. A presença dos seus produtos de degradação aumentados na urina de pacientes com DPOC e sua correlação com o VEF₁, abrem fortes perspectivas para a caracterização dos produtos peptídicos a partir da degradação elastina ou outras proteínas da MEC, utilizando estratégias experimentais mais específicas da área de proteômica, como a espectrometria de massas por MALDI-TOF/MS.

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que possibilita a interpretação da estrutura molecular de diferentes substâncias. O resultado da análise, o espectro de massas, pode ser usado como impressão digital da substância de forma qualitativa e quantitativa a partir de diferentes materiais biológicos [26]. Com isso, a caracterização dos produtos de hidrólise da MEC na urina poderia ser eficientemente analisada por espectrometria de massas diferencial [27] em que os perfis de massas do grupo DPOC são comparados com o grupo controle e os espectros específicos da DPOC são identificados.

A dosagem de hidroxiprolina em fluidos ou em tecidos biológicos já é amplamente utilizada para avaliar os níveis de degradação do colágeno em análises experimentais [28] ou clínicas nas amostras de pacientes [29]. A análise desses marcadores oferece muitas vantagens na prática clínica, desde que sejam não-invasivo, pois podem ser realizadas

muitas vezes e detectam alterações nesses níveis em um curto espaço de tempo [7]. Sendo assim, o monitoramento dos níveis de hidroxiprolina na urina tem sido efetivos no diagnóstico e tratamento de doenças como tumores, osteoporose, osteomalásea, raquitismo, doença de Paget, hiperparatireodismo primário e secundário [30]. Porém, há relatos de que essa metodologia não é tão sensível e precisa para avaliar a degradação do colágeno em pacientes com DPOC [20]. De fato, no presente estudo a análise dos níveis de hidroxiprolina na urina de pacientes com DPOC não apresentou diferenças significantes em relação aos indivíduos saudáveis. Por outro lado, 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 [23]. O N-acetyl-PGP foi recentemente associado à inflamação crônica das vias aéreas na DPOC, pois seus níveis séricos são significativamente mais elevados em relação aos indivíduos saudáveis [31]. Assim, considerando a estabilidade molecular desse peptídeo e o seu aumento nos níveis séricos, sugerem a hipótese de que essas moléculas seriam excretadas pela via urinária e poderiam ser quantificadas na urina.

Além disso, outros marcadores de obstrução aérea no soro de pacientes com DPOC vêm sendo caracterizados, como os níveis circulantes mais elevados da E-selectina que se correlacionou com o VEF₁ (% prev.) [29]. Estes dados sugeriram fortemente a ativação e recrutamento de neutrófilos na DPOC, pois a E-selectina é um receptor de superfície destas células. Como os neutrófilos representam a principal fonte de MMPs [32], seria esperado níveis mais elevados de expressão destas enzimas nos fluidos biológicos. Nosso grupo demonstrou recentemente, que o aumento dos níveis de expressão da MMP-2 na saliva em

pacientes com DPOC se correlacionou negativamente com os parâmetros de obstrução aérea, com VEF_1 e VEF_1/CVF [33].

A efetividade de intervenções como os programas de reabilitação pulmonar, oxigenoterapia, terapias ergogênicas e nutricionais no tratamento da DPOC tem sido objeto de estudo por vários grupos. Entretanto, os estudos relacionados à análise da eficácia desses programas DPOC [32,33,34] indicam que as estratégias de avaliação, como por exemplo, o índice BODE [35], teste da caminhada dos 6 minutos [36], teste do degrau [37], entre outros, podem gerar resultados controversos que inviabilizariam a avaliação da efetividade desses programas. Sendo assim, a identificação de marcadores biológicos peptídicos, produtos da degradação da MEC e específico da DPOC poderiam ser utilizados na avaliação da efetividade dos programas de reabilitação pulmonar, por meio da análise dos níveis quantitativos dessas moléculas, antes e após a intervenção terapêutica, em pacientes com DPOC.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro na realização desse estudo. 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

1. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. **The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease.** N Engl J Med. 2004 Jun 24;350(26):2645-53.
2. Cote CG and Celli BR. **Predictors of mortality in chronic obstructive pulmonary disease.** Clin Chest Med. 2007 Sep;28(3):515-24
3. Opasich C, Pinna GD, Mazza A et al. **Six-minute walking performance in patients with moderate-to-severe heart failure: is it a useful indicator in clinical practice?** Eur Heart J 2001; 22: 488-96.
4. Sullivan MJ, Hawthorne MH. **Exercise intolerance in patients with chronic heart failure.** Prog Cardiovasc Dis 1995; 38: 1-22.
5. 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: 1521-1530.
6. Barnes, J. **Mediators of chronic obstructive pulmonary disease.** Pharmacol Rev. 2004 Dec;56(4):515-48. Review.
7. Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pauwels RA. **Matrix metalloproteinases in asthma and COPD.** Curr Opin Pharmacol. 2005 Jun;5(3):257-63)
8. Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. **The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema.** Int J Tuberc Lung Dis. 2008 Apr;12(4):361-7.
9. Chapman HA Jr and Shi GP. **Protease injury in the development of COPD:** Thomas A. Neff Lecture. Chest. 2000 May;117(5 Suppl 1):295S-9S.

10. Takeyabu K, Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Tanino M, Miyamoto K, and Kawakami Y (1998) **Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema**. *Eur Respir J* 12:1033–1039.
11. 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* 283:L867–L873.
12. Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Miyamoto K, and Kawakami Y (2000) **Decline in FEV1 in community-based older volunteers with higher levels of neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid**. *Respiration* 67:261–267.
13. Keller S, Mandl I, **Quantitative differences between normal and emphysematous human lung elastin**, in: C. Mittmann (Ed.), **Pulmonary Emphysema and Proteolysis**, Academic Press, New York, 1974, pp. 251–259.
14. Cardoso WV, Sekhon HS, Hyde DM, Thurlbek WM. **Collagen and elastin in human pulmonary emphysema**, *Am. Rev. Respir. Dis.* 147 (1993) 975–981.
15. Schriver EE, Davidson JM, Sutcliffe MC, Swindell BB, Bernard GR. **Comparison of elastin peptide concentration in body fluids from healthy volunteers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease**, *Am. Rev. Respir. Dis.* 145 (1992) 762–766.
16. Frette C, Jacob MP, Defouilly C, Atassi C, Kauffmann F, Pham QT, Bignon J. **Lack of a relationship of elastin peptide level to emphysema assessed by CT scan**, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153 (1996) 1544–1547.

17. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro sobre Tuberculose: **Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004**. J Bras Pneumol. 2004;30 Suppl 1:S1-S4.
18. American Thoracic Society; European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: **standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency**. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168(7):818-900.
19. Pereira CB, SP; Simões, JG, Pereira, FWJ; Gerstler, JG; Nakatami, J. **Valores de Referência para a Espirometria em uma Amostra da População Brasileira Adulta**. J Pneumol 1992; 18:10-22.
- 20. Cocci F, Miniati M, Monti S, Cavarra E, Gambelli F, Battolla L, Lucattelli M, Lungarella G. Urinary desmosine excretion is inversely correlated with the extent of emphysema in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Int J Biochem Cell Biol. 2002 Jun;34(6):594-604.**
21. Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, Kobayashi DK, Kelley DG, Marconcini LA, Mecham RP, Senior RM, Shapiro SD. **Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema**. J Clin Invest. 2006 Mar;116(3):753-9. Epub 2006 Feb 9.
22. Senior RM, Griffin GL, Mecham RP. **Chemotactic activity of elastin-derived peptides**. J Clin Invest. 1980 Oct;66(4):859-62.
23. 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 Mar; 12 (3), 317-323. Epub 2006 Feb 12.

24. Parks W.C. and Shapiro S.D. **Matrix metalloproteinases in lung biology**, Respir Res 2 (2001), pp. 10–19.
25. J Bras Pneumol. **Avaliação quantitativa das fibras elásticas na doença pulmonar obstrutiva crônica**, 2007;33(5):502-509 509
26. Finlay GA, O'Donnell MD, O'Connor CM, Hayes JP, FitzGerald MX. **Elastin and collagen remodeling in emphysema. A scanning electron microscopy study**. Am J Pathol. 1996;149(4):1405-15.
27. Carvalho , P. C. *et al.* **Marcadores séricos e espectrometria de massa no diagnóstico do câncer** • J Bras Patol Med Lab • v. 42 • n. 6 • p. 431-436 • dezembro 2006
28. Mikko M, Fredriksson K, Wahlström J, Eriksson P, Grunewald J, Sköld CM. **Human T cells stimulate fibroblast-mediated degradation of extracellular matrix in vitro**. Clinical and Experimental Immunology (2007), 151: 317–325
29. Buttery, JE Stuart S, Gee DJ. **Urine Hydroxyproline: A Potential Error in Quantification and a Proposed Procedure for its Measurement**. Pathology (1991), 23, 77-79.
30. VIEIRA, José Gilberto H. **Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática**. Arq Bras Endocrinol Metab . 1999, vol.43, n.6, pp. 415-422. ISSN 0004-2730.
31. Lacasse Y, Wong E, Guyatt GH, King D, Cook DJ, Goldstein R. **Meta-analyze of respiratory rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease**. Lancet 1996; 348:1115-9;
32. McGlone S, Venn A, Walters EH, Wood-Baker R. **Physical activity, spirometry and quality-of-life in chronic obstructive pulmonary disease**. 2006 Jun;3(2):83-8.;

33. Santos et al., **Análise da viabilidade de utilização da saliva como fonte de material biológico para o estudo de biomarcadores na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)**, 2009
34. Rodrigues, SL, Viegas, CAA, Lima, T. 32 **Efetividade da reabilitação pulmonar como tratamento coadjuvante da doença pulmonar obstrutiva crônica**. J. Pneumologia vol.28 no.2, São Paulo Mar./Apr)
35. Lisboa B C, Barría P P, Yáñez V J, Aguirre Z M, Díaz P O., **Six minutes walk for the assessment of patients with chronic obstructive pulmonary disease**, Rev Med Chil. 2008 Aug;136(8):1056-64. Epub 2008 Oct 7. Review. Spanish.
36. Faganello MM, Tanni SE, Sanchez FF, Pelegrino NR, Lucheta PA, Godoy I., **BODE Index and GOLD Staging as Predictors of 1-Year Exacerbation Risk in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.**, Am J Med Sci. 2009 Nov 18
37. Buckley JP, Sim J, Eston RG, Hession R, Fox R. **Reliability and validity of measures taken during the Chester step test to predict aerobic power and to prescribe aerobic exercise**, Br J Sports Med. 2004 Apr;38(2):197-205.

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

	DPOC	CONTROLE	Valor (p)
	Média ± DP	Média ± DP	
Indivíduos (n)	20	10	-
Idade (anos)	71,10 ± 9,17	70,80 ± 9,72	-
Homens	13	4	-
Tabagistas	0	0	-
Ex-tabagistas	20	0	-
Anos/maço	48,53 ± 21,09	-	-
Tempo de fumo (anos)	52,07 ± 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; VEF₁: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF: Capacidade vital forçada; % prev.: porcentagem do previsto; *: p<0,05.

Parâmetros clínicos da população estudada

	DPOC	CONTROLE	Valor (p)
	Média ± DP	Média ± DP	
Indivíduos (n)	20	10	-
VEF₁/CVF (% prev.)	47,40 ± 12,38	81,60 ± 7,66	0,001*
VEF₁ (% prev.)	52,55 ± 13,94	115,70 ± 18,68	0,001*
CVF (% prev.)	88,85 ± 4,51	102,6 ± 4,33	0,063
IMC	25,93 ± 4,56	27,67 ± 3,83	ns

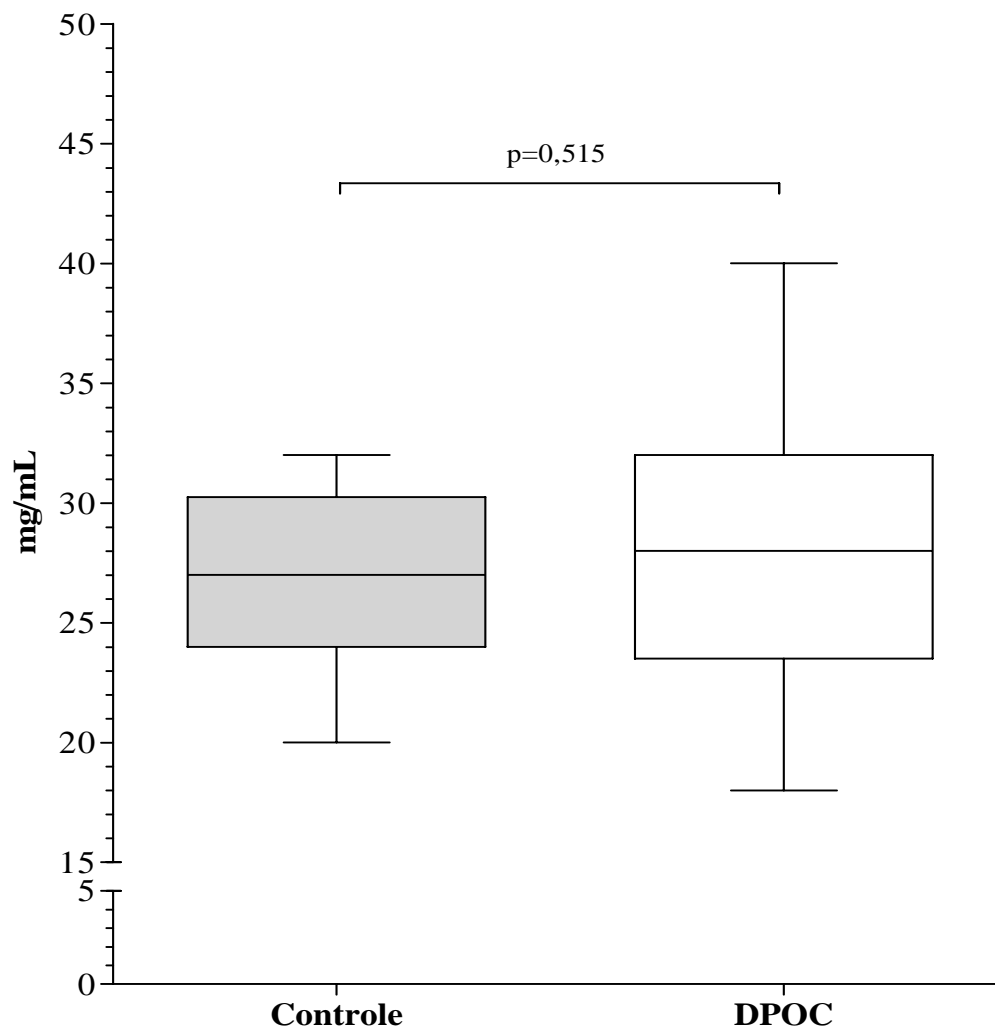


Figura 1. Concentração de hidroxiprolina na urina de pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis. Os ensaios foram realizados de acordo método descrito por Cocci *et al* [26] e as amostras analisadas em duplicata. Dados foram expressos em média e pontos máximo e mínimo; DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica; A análise estatística do Teste t não pareado indicou que não houve diferenças significantes entre os grupos ($p > 0,05$).

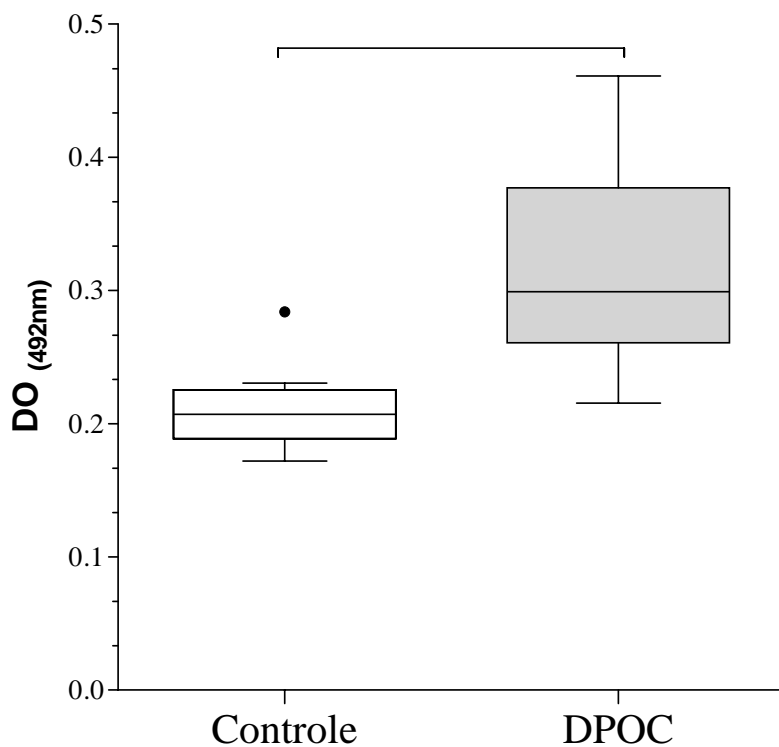


Figura 2. Concentração de fragmentos de elastina na urina de pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis. Os ensaios foram realizados pelo método de ELISA, utilizando anticorpos anti-elastina. As amostras foram analisadas em triplicata. Dados estão expressos em mediana com os valores máximo e mínimo de cada grupo. A análise estatística do Teste t não pareado apontou diferenças significantes entre os grupos ($p > 0,05$). DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica.

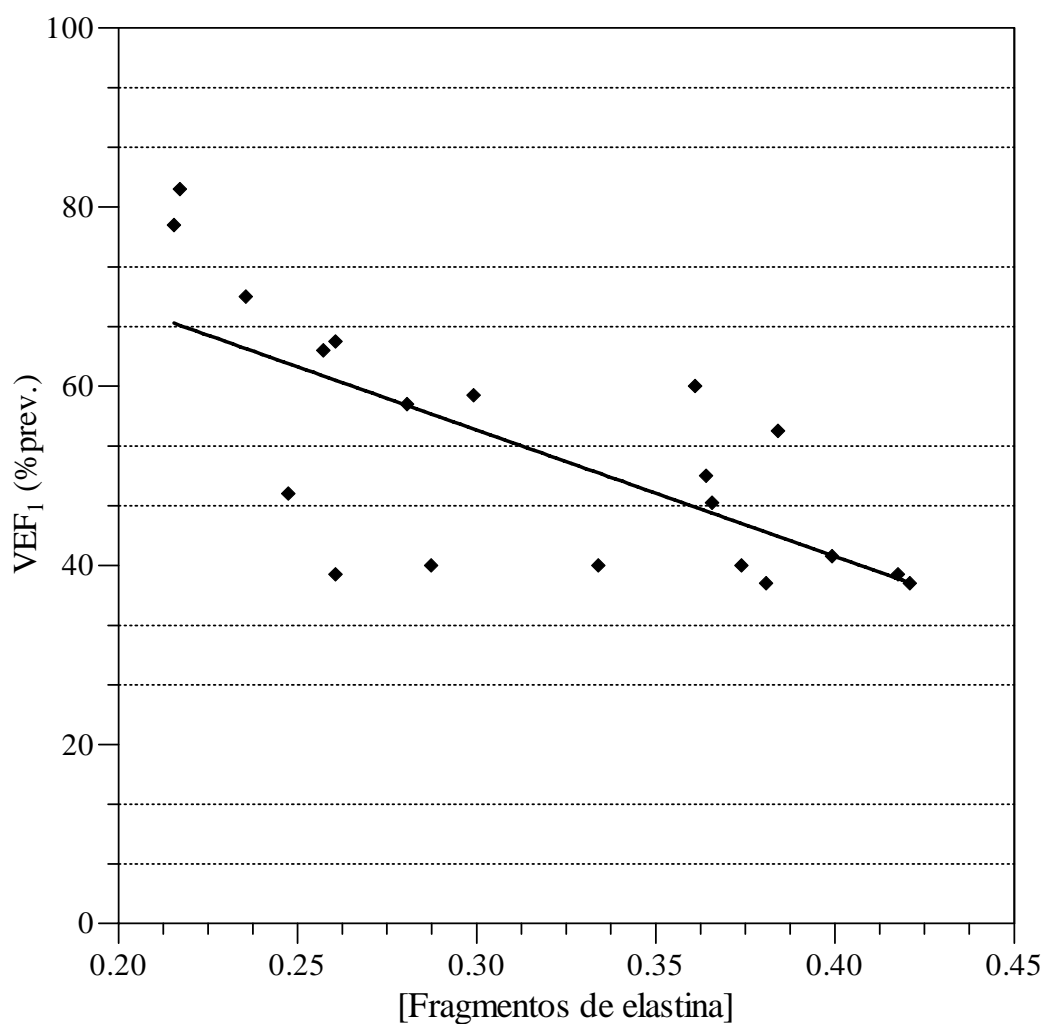


Figura 3. Relação entre o grau de obstrução aérea VEF₁ (% prev.) e a concentração dos fragmentos de degradação da elastina na urina e os parâmetros de obstrução aérea VEF₁ (% prev.) em pacientes com DPOC. As análises de correlação de *Pearson* indicaram que a concentração dos fragmentos de elastina está relacionada negativamente com o grau de obstrução aérea, VEF₁ ($r=-0,6986$, $p=0,0006$).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maior contribuição do presente estudo foi demonstrar que os níveis dos fragmentos de elastina na urina de pacientes com DPOC encontram-se mais elevados em relação à população de indivíduos saudáveis. Verificou-se ainda, que esses níveis se correlacionaram negativamente com o parâmetro VEF₁ de obstrução aérea nos pacientes com DPOC. Considerando que o processo inflamatório no pulmão de pacientes com DPOC está associado à degradação dos componentes da MEC e a liberação de peptídeos quimiotáticos que atuam sobre células inflamatórias, os resultados apresentados levantam fortes indícios de que a identificação e caracterização dos produtos de degradação da MEC podem ser analisados na urina.

Por outro lado, a diferença entre a concentração dos níveis de hidroxiprolina, indicador da degradação de colágeno, na urina de pacientes com DPOC não foi diferente em comparação ao grupo controle, provavelmente, por não ser uma metodologia tão sensível para avaliar a degradação do colágeno em DPOC com grau leve e moderado. Entretanto, há relatos de que o peptídeo N-acetyl Pro-Gly-Pro (PGP), derivado da hidrólise do colágeno em pacientes com DPOC, induz quimiotaxia de neutrófilos pela via de interação com os receptores CXCR1 e CXCR2

Assim, os resultados apresentados nesse estudo abrem perspectivas para a caracterização dos produtos de degradação da MEC por espectrometria de massas (MALDI-TOF/LC-MS/MS), uma tecnologia altamente específica e sensível para a determinação das seqüências de aminoácidos de peptídeos de interesse.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. **The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease.** N Engl J Med. 2004 Jun 24;350(26):2645-53.
2. Cote CG and Celli BR. **Predictors of mortality in chronic obstructive pulmonary disease.** Clin Chest Med. 2007 Sep;28(3):515-24.
3. Celli BR and Barnes PJ. **Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.** Eur Respir J. 2007 Jun;29(6):1224-38.
4. Glone Mc S, Venn A, Walters EH, Wood-Baker R. **Physical activity, spirometry and quality-of-life in chronic obstructive pulmonary disease.** 2006 Jun;3(2):83-8.
5. Opasich C, Pinna GD, Mazza A et al. **Six-minute walking performance in patients with moderate-to-severe heart failure: is it a useful indicator in clinical practice?** Eur Heart J 2001; 22: 488-96.
6. Sullivan MJ, Hawthorne MH. **Exercise intolerance in patients with chronic heart failure.** Prog Cardiovasc Dis 1995; 38: 1-22.
7. Carlos Alberto de Castro Pereira, **Espirometria**, J Pneumol, 28(Supl 3) – outubro de 2002
8. 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: 1521-1530.
9. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. **Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease.** Thorax. 2002;57(10):847-52.
10. GOLD -**Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease Executive Summary**, Global

Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD Updated 2005 [cited 2006 Nov 19].

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

12. Gert Folkerts, Aletta D. Kraneveld and Frans P. Nijkamp, 2008.

13. O'Donnell RA, Peebles C, Ward JA, Daraker A, Angco G, Broberg P, et al. **Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD.** Thorax. 2004;59(10):837-42.

14. Fabbri LM, Romagnoli M, Corbetta L, Casoni G, Busljetic K, Turato G, et al. **Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease.** Am J Respir Crit Care Med. 2003;167(3):418-24.

15. Fehrenbach H. **Animal models of chronic obstructive pulmonary disease: some critical remarks.** Pathobiology. 2002-2003;70(5):277-83.

16. Corteling R, Wyss D, Trifilieff A. **In vivo models of lung neutrophil activation. Comparison of mice and hamsters.** BMC Pharmacol. 2002;2:1.

17. Abusriwil H, Stockley RA. Alpha-1-antitrypsin replacement therapy: current status. Curr Opin Pulm Med. 2006; 12(2):125-31.

18. . Parks W.C. and Shapiro S.D. Matrix metalloproteinases in lung biology, Respir Res 2 (2001), pp. 10–19.

19 J Bras Pneumol. **Avaliação quantitativa das fibras elásticas na doença pulmonar obstrutiva crônica,** 2007;33(5):502-509

20. Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R. **Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloprotease-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects.** Respir Med. 2003 Jun;97(6):634-9

21. 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 Mar; 12 (3), 317-323. Epub 2006 Feb 1215.
22. Cataldo D, Munaut C, Noël A, Frankenne 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 Nov;123 (3):259-67.
23. Kelly E.A., W.W. Busse and N.N. Jarjour, **Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge,** Am J Respir Crit Care Med 162 (2000), pp. 1157–1161.
24. Lee Y.C., H.B. Lee, Y.K. Rhee and C.H. Song, **The involvement of matrix metalloproteinase-9 in airway inflammation of patients with acute asthma,** Clin Exp Allergy 31 (2001), pp. 1623–1630.
25. Lemjabbar H., P. Gosset, C. Lamblin, I. Tillie, D. Hartmann and B. Wallaert et al., **Contribution of 92 kDa gelatinase/type IV collagenase in bronchial inflammation during status asthmaticus,** Am J Respir Crit Care Med 159 (1999), pp. 1298–1307.
26. Cocci F, Miniati M, Monti S, Cavarra E, Gambelli F, Battolla L, Lucattelli M, Lungarella G. **Urinary desmosine excretion is inversely correlated with the extent of emphysema in patients with chronic obstructive pulmonary disease.** Int J Biochem Cell Biol. 2002 Jun;34(6):594-604.
27. Schriver EE, Davidson JM, Sutcliffe MC, Swindell BB, Bernard GR. **Comparison of elastin peptide concentration in body fluids from healthy volunteers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease,** Am. Rev. Respir. Dis. 145 (1992) 762–766.

28. Frette C, Jacob MP, Defouilly C, Atassi C, Kauffmann F, Pham QT, Bignon J. **Lack of a relationship of elastin peptide level to emphysema assessed by CT scan**, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153 (1996) 1544–1547.
29. Mikko M, Fredriksson K, Wahlström J, Eriksson P, Grunewald J, Sköld CM. **Human T cells stimulate fibroblast-mediated degradation of extracellular matrix in vitro**. Clinical and Experimental Immunology (2007), 151: 317–325.
30. Buttery, JE Stuart S, Gee DJ. Urine Hydroxyproline: **A Potential Error in Quantification and a Proposed Procedure for its Measurement**. Pathology (1991), 23, 77-79.
31. Lacasse Y, Wong E, Guyatt GH, King D, Cook DJ, Goldstein R. **Meta-analyze of respiratory rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease**. Lancet 1996; 348:1115-9;
32. McGlone S, Venn A, Walters EH, Wood-Baker R. **Physical activity, spirometry and quality-of-life in chronic obstructive pulmonary disease**. 2006 Jun;3(2):83-8.;
33. Rodrigues SL, Viegas CAA, Lima T. **Efetividade da reabilitação pulmonar como tratamento coadjuvante da doença pulmonar obstrutiva crônica**. J. Pneumologia vol.28 no.2, São Paulo Mar./Apr).

Parecer do Comitê de Ética



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CoEP

Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado **ANÁLISE DOS PRODUTOS PEPTÍDICOS DE HIDRÓLISE DOS COMPONENTES DA MATRIX EXTRACELULAR (MEC) NA URINA DE PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBBSTRUTIVA CRÔNICA** sob responsabilidade de **CARLOS ALBERTO DA SILVA** está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde M/S, de 10/10/96, tendo sido **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Pesquisa - UNINOVE.

São Paulo, 16 de Fevereiro de 2009.

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

Anexo 1

Termo de Consentimento para Participação em Pesquisa Clínica

Nome do Voluntário: _____

Endereço: _____

Telefone para contato: _____ Cidade: _____ CEP: _____

E-mail: _____

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas pelos alunos do mestrado e iniciação científica em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho e o coordenador do projeto Prof. Dr. Carlos A. Silva, objetivando firmar acordo escrito mediante o qual, o voluntário da pesquisa autoriza sua participação com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

1. Título do Trabalho Experimental: **“Análise dos produtos peptídicos de hidrólise dos componentes da matriz extracelular (MEC) na urina de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)”**.

2. **Objetivo:** Caracterizar os produtos peptídicos específicos de hidrólise da matriz extracelular na urina de pacientes com DPOC.

3. **Justificativa:** O estudo e a caracterização da degradação dos componentes orgânicos da matriz extracelular para o entendimento do mecanismo que distingue a fase aguda da crônica durante a inflamação observada em pacientes com DPOC.

4. **Procedimentos da Fase Experimental:** Indivíduos voluntários (n=15) com DPOC do Ambulatório de Fisioterapia e saudáveis (n=15) da Clínica de Odontologia da Universidade Nove de Julho serão recrutados e, submetidos ao teste de prova de função pulmonar por espirometria. As amostras de urina serão coletadas, processadas e analisadas por espectrometria de massas para obtenção dos perfis peptídicos de hidrólise, seguida de análise comparativa entre o grupo DPOC e saudáveis para a identificação dos produtos específicos da DPOC.

6. **Informações:** O voluntário tem garantia que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos benéficos e outros assuntos relacionados com pesquisa. Também os pesquisadores supracitados assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando.

7. **Retirada do Consentimento:** O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.

8. **Aspecto Legal:** Elaborados de acordo com as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisa envolvendo seres humanos atendendo à Resolução n.º 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério de Saúde – Brasília – DF.

9. **Garantia do Sigilo:** Os pesquisadores asseguram a privacidade dos voluntários quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

10. **Formas de Ressarcimento das Despesas decorrentes da Participação na Pesquisa:** Não serão ressarcidas despesas com eventuais deslocamentos.

12. **Local da Pesquisa:** A pesquisa será desenvolvida no Ambulatório de Fisioterapia da Universidade Nove de Julho – UNINOVE/Memorial da América Latina, localizada à Av. Francisco Matarazzo, 612, CEP 05001-100, São Paulo – SP.

12. **Telefones dos Pesquisadores para Contato:** Prof. Dr. Carlos A. Silva - (011) 97868141.

13. Consentimento Pós-Informação:

Eu, _____, após leitura e compreensão deste termo de informação e consentimento, entendo que minha participação é voluntária, e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejuízo algum. Confirmando que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo no meio científico.

* Não assine este termo se ainda tiver alguma dúvida a respeito.

São Paulo, de de 2008.

Nome (por extenso): _____

Assinatura: _____

1ª via: Instituição

2ª via: Voluntário

Anexo 2

Formulários de Avaliação

FICHA DE TRIAGEM

DATA: ___/___/___

1) IDENTIFICAÇÃO	
NOME:	
IDADE:	SEXO: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F
ETNIA: <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 <input type="checkbox"/>
ACOMPANHANTE:	
FONE CONTATO:	

2) HISTÓRIA TABAGISTA	
<input type="checkbox"/> NÃO TABAGISTA	_____ MAÇOS POR _____ ANOS
<input type="checkbox"/> TABAGISTA	_____ MAÇOS POR DIA
<input type="checkbox"/> EX-TABAGISTA	FUMA HÁ _____ MESES

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