

Análise da degradação da matriz extracelular na urina de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica

Analysis of degradation of extracellular matrix in urine of patients with chronic obstructive pulmonary disease

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; Carlos Alberto da Silva⁵

¹Educadora Física e aluna do programa de mestrado em Ciências da Reabilitação – Uninove. São Paulo, SP – Brasil

²Aluna de iniciação científica e graduação em Fisioterapia – Uninove. São Paulo, SP – Brasil

³Fisioterapeuta e mestre em Ciências da Reabilitação – Uninove. São Paulo, SP – Brasil

⁴Professora doutora, Laboratório de Fisiologia do Exercício – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

⁵Professor doutor, Laboratório de Aplicações Moleculares e Celulares em Reabilitação – Uninove. São Paulo, SP – Brasil

Endereço para correspondência

Carlos Alberto da Silva
Centro de Pós-Graduação. Departamento de Ciências da Reabilitação.
Mestrado em Ciências da Reabilitação.
Av. Francisco Matarazzo, 612 – Água Branca
05001-100 – São Paulo, SP [Brasil]
Fone: 55 11 36659325.
lescovar@uninove.br

Resumo

Objetivos: Analisar os níveis de degradação da matriz extracelular (MEC) na urina de pacientes com DPOC e suas correlações com o prova de função pulmonar. **Método:** 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 VEF₁ 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 pulmonary. **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 nocivas¹. 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 exercício². 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 tecidual⁵. Tem sido proposto que várias proteases quebram componentes do tecido conjuntivo proporcionando o equilíbrio entre proteases e antiproteases endógenas, e protegendo contra os efeitos lesivos mediados por estas proteases⁶. 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 cisteíno-proteinases (catepsinas) e serino-proteinases (elastases)^{8,9}. A elastina, proteína elástica presente no parênquima pulmonar, também é um dos importantes alvos para proteases, levando à perda da elasticidade em pacientes com DPOC⁶. 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 DPOC¹⁰ e macrófagos alveolares de fumantes¹¹. Da mesma forma, os níveis de expressão da elastase de neutrófilo também são maiores em DPOC¹².

Normalmente, o excesso de proteases é inibido por antiproteases endógenas como a $\alpha 1$ -antitripsina (principal inibidor da elastase-2), a cistatina C (inibidor das catepsinas) e os TIMPs, inibidores endógenos das MMPs, já descrito anteriormente. Entretanto, este balanço protease/antiprotease estaria alterado em indivíduos fumantes, enfisematosos ou com outras doenças respiratórias, favorecendo a atividade proteolítica, com consequente degradação tecidual e exacerbação da doença⁸.

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 teve 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 portadores 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 compara-

tiva, 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 Tisiologia¹⁸. 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. 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 literatura²⁰. Resumidamente, as amostras de urina foram centrifugadas a 10000 × 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 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 centrifugadas a 10000 × 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 100µL /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 óptica 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).

Tabela 1: Características dos pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis (Controle)

Características da população			
	DPOC Média ± DP	Controle Média ± DP	Valor (p)
Indivíduos (n)	20	10	–
Idade (anos)	71,10 ± 9,17	70,80 ± 9,72	0,91
Homens	13	4	–
Tabagistas	0	0	–
Ex-tabagistas	20	0	–
Maços/anos	48,53 ± 21,09	–	–
Tempo de fumo	52,07 ± 41,03.	–	–

Dados estão expressos como média e desvio padrão (DP), exceto quando não foi possível. DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica.

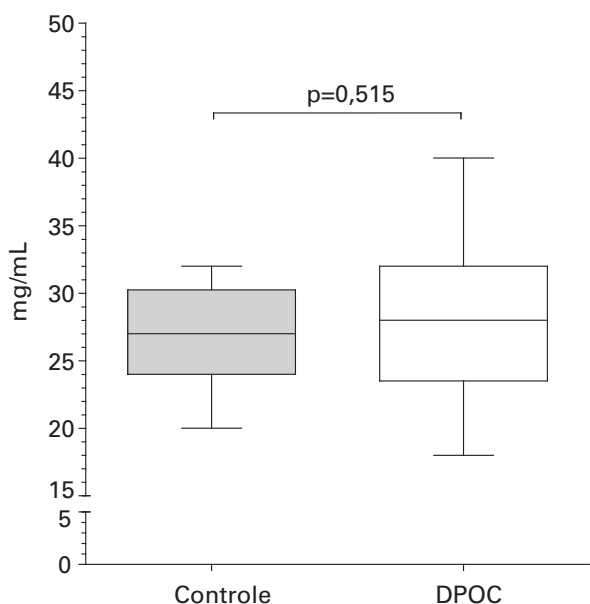
Todos os pacientes do grupo DPOC apresentaram limitação ao fluxo aéreo, sendo a diferença entre os grupos extremamente significativa para o VEF₁ e para a relação VEF₁/CVF. Entretanto, não houve diferenças entre os grupos para a CVF (%prev.) e no IMC entre os grupos estudados (Tabela 2).

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).

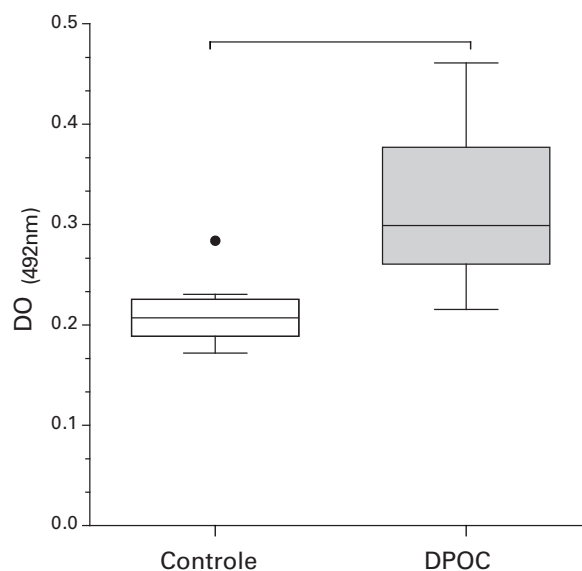
Tabela 2: Avaliação clínica dos pacientes com DPOC e saudáveis (Controle)

Parâmetros clínicos da população estudada			
	DPOC Média ± DP	Controle Média ± DP	Valor (p)
Indivíduos (n)	20	10	–
VEF ₁ /CVF (% prev.)	47,40 ± 12,38	81,60 ± 7,66	0,001*
VEF ₁ (% 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

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; *: $p < 0,05$.

**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.

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 (VEF₁) nos pacientes com DPOC (Figura 2). Por outro lado, não se observou correlação nos parâmetros VEF₁/CVF ($r = -0,531$, $p = 0,149$) e CVF ($r = -0,390$, $p = 0,867$).

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

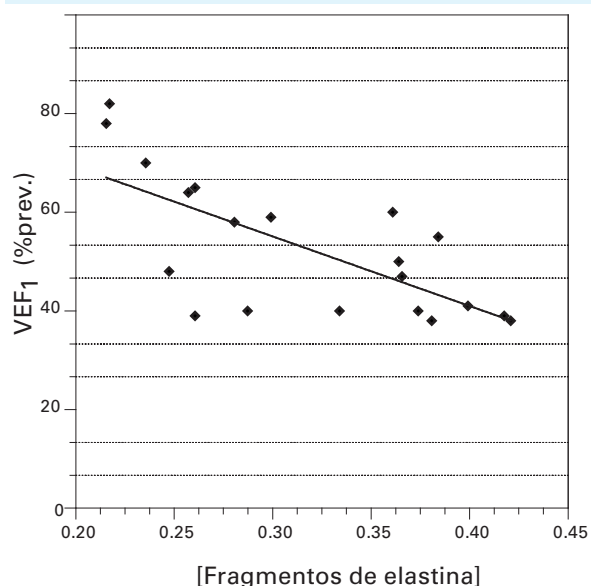


Figura 3: Relação entre o grau de obstrução aérea VEF₁ (% prev.) e a concentração dos fragmentos de degradação da elastina na urina e os parâmetros de obstrução aérea VEF₁ (% prev.) em pacientes com DPOC. As análises de correlação de *Pearson* indicaram que a concentração dos fragmentos de elastina está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

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 VEF₁ 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 tecido²⁴. Houghton et al. demonstrou que a ação enzimática da MMP-12 produz fragmentos peptídicos a partir da degradação da elastina, quimiotáticos para monócitos e macrófagos²¹. A elastina é uma proteína da MEC extremamente representativa no tecido pulmonar²⁵. A presença dos seus produtos de degradação aumentados na urina de pa-

cientes 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 biológicos²⁶. Com isso, a caracterização dos produtos de hidrólise da MEC na urina poderia ser eficientemente analisada por espectrometria de massas diferencial²⁷, 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 experimentais²⁸ ou clínicas nas amostras de pacientes²⁹. 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 tempo⁷. Sendo assim, o monitoramento dos níveis de hidroxiprolina na urina tem sido efetivos no diagnóstico e tratamento de doenças como tumores, osteoporose, osteomalácia, raquitismo, doença de Paget, hiperparatireoidismo primário e secundário³⁰. Porém, há relatos de que essa metodologia não é tão sensível e precisa para avaliar a degradação do colágeno em pacientes com DPOC²⁰. 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.²³ caracterizou um peptídeo biologicamente ativo, com sequência 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. 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 saudáveis³¹. 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 MMPs³², 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 VEF₁ e VEF₁/CVF³¹.

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^{31,32,33}, indicam que as estratégias de avaliação, como por exemplo, o índice BODE³⁴, teste da caminhada dos 6 minutos³⁵, teste do degrau³⁶, 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

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-analyse 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. 32 Efetividade da reabilitação pulmonar como tratamento coadjuvante da doença pulmonar obstrutiva crônica. *J. Pneumologia* vol.28 no.2, São Paulo Mar./Apr)
34. 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.
35. 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
36. 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.

