

Expressão das metaloproteínas da matriz 2 e 9 na saliva de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica

Expression of matrix metalloproteinases -2 and -9 in saliva from patients with chronic obstructive pulmonary disease

Alecsandra Aparecida dos Santos¹, Carla Malaguti², Simone Dal Corso², Carlos Alberto da Silva³

Estudo desenvolvido nos Laboratórios de Fisiologia do Exercício e de Aplicações Moleculares e Celulares em Reabilitação da Uninove – Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brasil

¹ Fisioterapeuta; mestranda em Ciências da Reabilitação na Uninove

² Profas. Dras. do Laboratório de Fisiologia do Exercício da Uninove

³ Prof. Dr. do Laboratório de Aplicações Moleculares e Celulares em Reabilitação da Uninove

ENDEREÇO PARA
CORRESPONDÊNCIA

Prof. Carlos Alberto Silva
Centro de Pós-Graduação.
Depto. de Ciências da
Reabilitação
Av. Francisco Matarazzo 612
Água Branca
05001-100 São Paulo SP
e-mail: lescovar@uninove.br

O estudo recebeu apoio da
Fapesp – Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo

APRESENTAÇÃO
mar. 2009

ACEITO PARA PUBLICAÇÃO
out. 2009

RESUMO: O aumento da expressão das metaloproteínas da matriz extracelular (MPM) é considerado um importante fator no desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). O presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis de expressão da MPM-2 e MPM-9 na saliva de pacientes com DPOC em comparação com indivíduos saudáveis, verificando a viabilidade de usar a saliva para a caracterização de biomarcadores específicos em DPOC. Foram selecionados pacientes com DPOC (n=16) e controles saudáveis (n=9). Em ambos os grupos foram realizados teste espirométrico e obtidas amostras de saliva de cada indivíduo. Os níveis de MPM-2 e MPM-9 na saliva foram determinados pela técnica *Western blot*. A MPM-2 e a MPM-9 foram significativamente maiores em pacientes com DPOC do que no grupo de indivíduos saudáveis. Foi encontrada moderada correlação negativa entre a concentração de MPM-2 e o volume expiratório forçado no primeiro segundo ($r = -0,582$, $p = 0,014$) em pacientes com DPOC. Estes resultados abrem novas perspectivas para o estudo específico de biomarcadores na saliva para prever e monitorar a obstrução ao fluxo aéreo em pacientes com DPOC.

DESCRIPTORES: Doença pulmonar obstrutiva crônica; Metaloproteinase 2 da matriz; Metaloproteinase 9 da matriz; Saliva

ABSTRACT: The increased expression of matrix metalloproteinases (MMP) is considered a key factor in the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). This study aimed at assessing expression levels of MMP-2 and MMP-9 in saliva from patients with COPD, comparing them to those of healthy subjects, thus assessing the feasibility of characterizing specific biomarkers for COPD. Patients with COPD (n=16) and healthy controls (n=9) were selected; both groups submitted to spirometry and to collection of saliva samples. Saliva levels of MMP-2 and MMP-9 were determined by *Western blot*. MMP-2 and MMP-9 levels were significantly higher in COPD patients than in control subjects. In COPD patients, a moderate, negative correlation was found between MMP-2 concentration and forced expiratory volume at the first second ($r = -0.582$; $p = 0.014$). These findings open new perspectives to study specific biomarkers in saliva to predict and monitor airway obstruction in COPD patients.

KEY WORDS: Matrix metalloproteinase 2; Matrix metalloproteinase 9; Pulmonary disease, chronic obstructive; Saliva

INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma enfermidade respiratória, geralmente causada pela inalação da fumaça de cigarro, resultando em alterações irreversíveis nas vias aéreas e obstrução crônica ao fluxo aéreo. A limitação crônica pulmonar da DPOC é causada pela combinação de bronquiólite obstrutiva com destruição do parênquima pulmonar distal ao bronquíolo terminal (enfisema), dependendo de cada indivíduo¹.

Os efeitos sistêmicos associados à DPOC correspondem à inflamação sistêmica com presença de estresse oxidativo, concentrações anormais de citocinas circulantes e ativação das células inflamatórias². Além disso, inclui a perda progressiva de massa muscular e a presença de várias anomalias bioenergéticas, podendo desencadear caquexia em função do aumento da apoptose e/ou desuso muscular³. Tais efeitos sistêmicos trazem conseqüências clínicas importantes, pois contribuem para a limitação da capacidade física do paciente e o declínio da condição de saúde na DPOC⁴.

Considerando o comprometimento da capacidade pulmonar e sua implicação na DPOC, exploram-se novos horizontes para o estudo fisiopatogênico dessa disfunção, gerando uma mudança do enfoque quase exclusivamente relacionado à função pulmonar para o estudo celular e bioquímico da doença⁵. A DPOC está sendo caracterizada como doença inflamatória associada à intensa degradação dos componentes da matriz extracelular e fibrose tecidual⁶.

Há atualmente um grande interesse no estudo das metaloproteinases da matriz extracelular (MPM), pois várias evidências indicam que essas enzimas contribuem significativamente para o desenvolvimento da DPOC, com a migração de células inflamatórias no pulmão, a remodelagem e destruição do tecido pulmonar⁷. As MPM catalisam componentes proteicos da matriz extracelular produzindo moléculas peptídicas biologicamente ativas, que participam do processo inflamatório envolvido na DPOC⁸⁻¹⁰. A MPM-2 e a MPM-9 pertencem ao grupo das gelatinases, que podem hidrolisar múltiplas moléculas da

matriz extracelular, tais como colágeno tipos I, II, III e IV, elastina e proteoglicanos¹¹. Estas são seletivamente inibidas por inibidores teciduais de metaloproteinases (ITMP), como por exemplo o ITMP-1, um inibidor da atividade catalítica da MPM-9 na proporção de um para um¹². Vários estudos têm demonstrado que os altos níveis de expressão de MPM e ITMP em lavado broncoalveolar e sangue se correlacionam com os parâmetros de avaliação da capacidade pulmonar funcional, reforçando o envolvimento desses componentes proteicos na fisiopatologia da DPOC, participando na remodelagem da matriz extracelular¹¹⁻¹³.

A caracterização dos componentes proteicos ou peptídicos na saliva tem aberto perspectivas para identificar biomarcadores de diferentes alterações morfofisiológicas, configurando uma estratégia de coleta não-invasiva, sendo este um dos benefícios da saliva em relação a outros fluidos biológicos, como soro e plasma¹⁴.

Assim, o presente estudo teve como objetivo correlacionar os parâmetros da prova de função pulmonar e os níveis de expressão da MPM-2 e MPM-9 na saliva de pacientes com DPOC em comparação com indivíduos saudáveis. Se isso for viável, permitirá a utilização da saliva, como fonte de material biológico obtido por coleta não-invasiva, para a caracterização de biomarcadores que poderiam auxiliar ou complementar o diagnóstico da doença.

METODOLOGIA

O estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética da Uninove – Universidade Nove de Julho. Participaram do estudo voluntários saudáveis e indivíduos com DPOC que aguardavam ingresso no Programa de Reabilitação Pulmonar do Ambulatório de Fisioterapia da Associação SOS Família São Geraldo, em Guarulhos, SP.

Foram avaliados 16 pacientes com DPOC moderada ou grave. O diagnóstico da doença foi baseado nos critérios estabelecidos pela Sociedade Americana do Tórax (ATS)¹. 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 participação em programas de reabilitação pulmonar. Para análise comparativa, foi avaliado um grupo controle constituído por nove indivíduos saudáveis, que nunca fumaram, com espirometria normal, sem história de doenças respiratórias, de ambos os sexos, de faixa etária compatível com o grupo DPOC. Todos os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Procedimentos

Inicialmente os indivíduos de ambos os grupos foram submetidos ao teste de função pulmonar por espirômetro (MedGraphics), conforme as diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia¹⁵. Os parâmetros medidos foram: capacidade vital forçada (CVF), volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁), relação VEF₁/CVF, fluxo expiratório forçado (FEF) entre 25 e 75% da CVF e fluxo expiratório forçado máximo (FEF_{máx}). Foi considerada para análise a melhor curva de três manobras. Os resultados foram apresentados em porcentagem do previsto (% prev.).

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

Para avaliação dos níveis de expressão das MPM-2 e MPM-9, o extrato total de proteínas da saliva foi submetido à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. A estimativa da concentração proteica foi feita pelo método de Bradford, utilizando o reagente Protein Assay (Bio Rad Laboratories) e a soroalbumina bovina (BSA Sigma, EUA) como padrão de referência. Todos os demais reagentes e solventes empregados foram

de grau analítico, com pureza superior a 98% v/v. O gel de separação de 10% de poli(acrilamida) foi preparado em tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,8, contendo SDS 0,1%, TEMED 0,01% e persulfato de amônio 0,05%. Após a polimerização desse gel, foi preparado o gel de empacotamento contendo poli(acrilamida) 3% em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, SDS 0,1%, TEMED 0,01% e persulfato de amônio 0,05%. Uma alíquota de 10-15 µl do extrato total de proteínas, contendo 150 µg de proteínas, foi combinada com o tampão desnaturante e redutor, contendo Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,002% e β-mercaptoetanol 4%. As amostras foram aquecidas a 95°C durante 5 minutos e aplicadas no gel. Foi utilizado como tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, contendo glicina 0,18 M, pH 8,3 e SDS 1%. As corridas foram realizadas a 100 V por aproximadamente 2,5 horas à temperatura ambiente. Os padrões de massa molecular utilizados foram: soroalbumina (68 kDa), gamaglobulina (50 kDa e 23,5 kDa), ovoalbumina (43 kDa) e ribonuclease (13,7 kDa).

Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose (*electroblotting*). A membrana foi bloqueada em tampão com Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (TBS) contendo leite em pó desnatado 5% por duas horas à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Após duas lavagens com TBS, contendo Tween20 0,05%, a membrana foi incubada por uma hora com anticorpo para a MPM-2 (Santa Cruz, sc-10736), MPM-9 (Santa Cruz, sc-

10737) ou com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, Biomol1:1000) em TBS. O excesso de anticorpo na membrana foi removido com três lavagens de 10 minutos em TBS, contendo Tween20 0,05%. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho/fosfatase alcalina diluído 1:10000 – Sigma, EUA) por 60 minutos. Novamente a membrana foi submetida a lavagens sucessivas com tampão TBS e, então, revelada com o substrato BCIP 0,4 mM / NBT 0,4 mM.

Após a revelação, a membrana foi digitalizada e as bandas analisadas pelo programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para determinar a densitometria óptica de cada microponto de tonalidade escura na foto. Em cada grupo de indivíduos (DPOC ou controle), determinou-se a somatória das densidades ópticas absolutas de todas as bandas (MPM-2, MPM-9 e GAPDH), para estimar a densidade relativa (%) dividindo-se a densidade absoluta das bandas equivalentes à MPM-2 ou à MPM-9 pela da banda controle GAPDH de cada amostra.

Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade da variância. Correlações entre os níveis de expressão da MPM-2, MPM-9 e os dados espirométricos foram verificadas pelo teste de correlação de Pearson. Para comparações entre os dois grupos foi utilizado o teste t não-pareado. O nível de significância estatística foi $p < 0,05$.

Tabela 1 Características (média ± desvio padrão, exceto quando não foi possível) dos grupos com DPOC e controle e valor de p da comparação entre os grupos

Característica	Grupo DPOC	Grupo controle	p
Número (n de homens)	16 (10 H)	9 (2 H)	
Idade (anos)	71,4±9,47	70,8±10,29	0,897
Tabagista/ ex-tabagista (n)	0 / 16	0 / 0	-
Anos/maço	68,9± 46,5	-	-
Tempo de fumo (anos)	43,4±20,0	-	-
VEF ₁ /CVF (% prev.)	58,06±13,31	107,77±11,09	0,0001
VEF ₁ (% prev.)	52,31±12,45	111,00±17,37	0,0001
CVF (% prev.)	89,43±22,18	102,00±14,52	0,13

DPOC = doença pulmonar obstrutiva crônica; CVF: capacidade vital forçada; % prev. = porcentagem do previsto; VEF₁ = volume expiratório forçado no primeiro segundo

RESULTADOS

A amostra foi composta por 25 indivíduos, 16 do grupo DPOC (10 homens, 6 mulheres) e 9 saudáveis (grupo controle, 2 homens, 7 mulheres), sem diferença significativa das médias das idades entre os grupos. Todos os pacientes do grupo DPOC são ex-tabagistas, tendo fumado por em média 43,4 anos; a relação anos/maço foi de 68,9±46,5. Os indivíduos do grupo controle relataram que nunca fumaram (Tabela 1).

Todos os pacientes do grupo DPOC apresentaram limitação ao fluxo aéreo, sendo a diferença entre os grupos extremamente significativa de VEF₁ e da relação VEF₁/CVF. Entretanto, não houve diferenças significativas de CVF entre os grupos, como mostra a Tabela 1.

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

A análise das correlações indica correlação negativa entre os níveis de expressão da MPM-2 com os parâmetros de obstrução ao fluxo aéreo nos pacientes com DPOC VEF₁ (Figura 2A) e VEF₁/CVF (Figura 2B). Por outro lado,

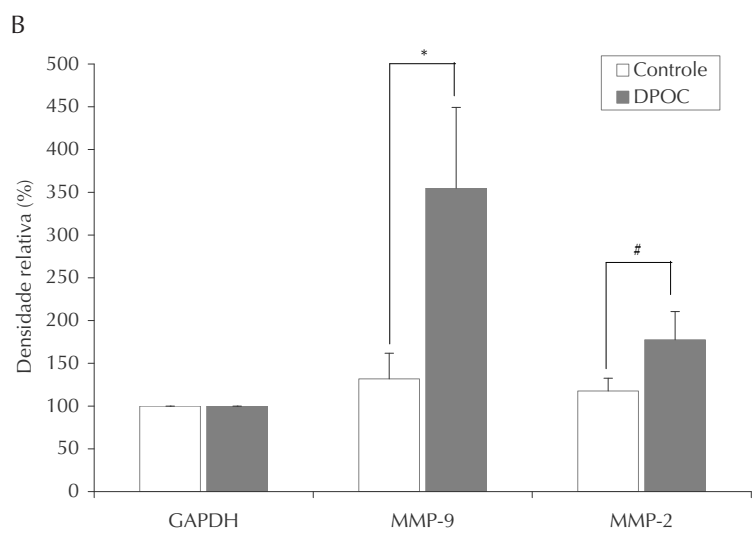
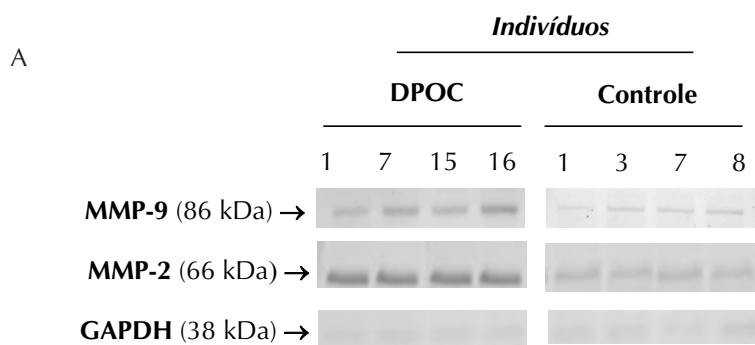


Figura 1 Níveis de expressão das metaloproteínas MMP-2 e MMP-9 na saliva dos grupos DPOC e controle. A = Ilustração, visualização da densidade das bandas de quatro sujeitos do grupo DPOC e quatro do grupo controle. B = densidade média relativa (em %) da MMP-2 e MMP-9 nos dois grupos. O nível inalterado da proteína constitutiva gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) indica que sua aplicação foi igual em todas as amostras de saliva. * $p < 0,05$; DPOC = doença pulmonar obstrutiva crônica

não se detectou correlação entre os níveis de expressão da MMP-9 e os parâmetros de obstrução ao fluxo aéreo.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os biofluidos freqüentemente utilizados para investigar patologias respiratórias incluem sangue, urina, escarro (espontâneo ou induzido) e lavado bronco-alveolar¹⁶. A possibilidade de utilização da saliva como fonte de material biológico tem se tornado extremamente viável por ser um fluido de fácil coleta, manuseio e armazenamento¹⁴. No presente estudo demonstrou-se que os níveis de MMP-2 e MMP-9 nas amostras de saliva foram significativamente maiores nos pacientes com DPOC em relação aos sujeitos saudáveis, tendo-se observado também correlação negativa entre os níveis de expressão da MMP-2 e os parâmetros de obstrução aérea VEF₁ e VEF₁/CVF nos pacientes com DPOC. Como as MPM são extremamente representativas na DPOC⁸⁻¹³, a correlação entre os níveis de expressão da MMP-2 na saliva e os parâmetros de avaliação da capacidade pulmonar funcional indicam fortes perspectivas para a caracterização de biomarcadores, proteicos ou peptídicos específicos, utilizando estratégias experimentais da área de proteômica, como a espectrometria de massas.

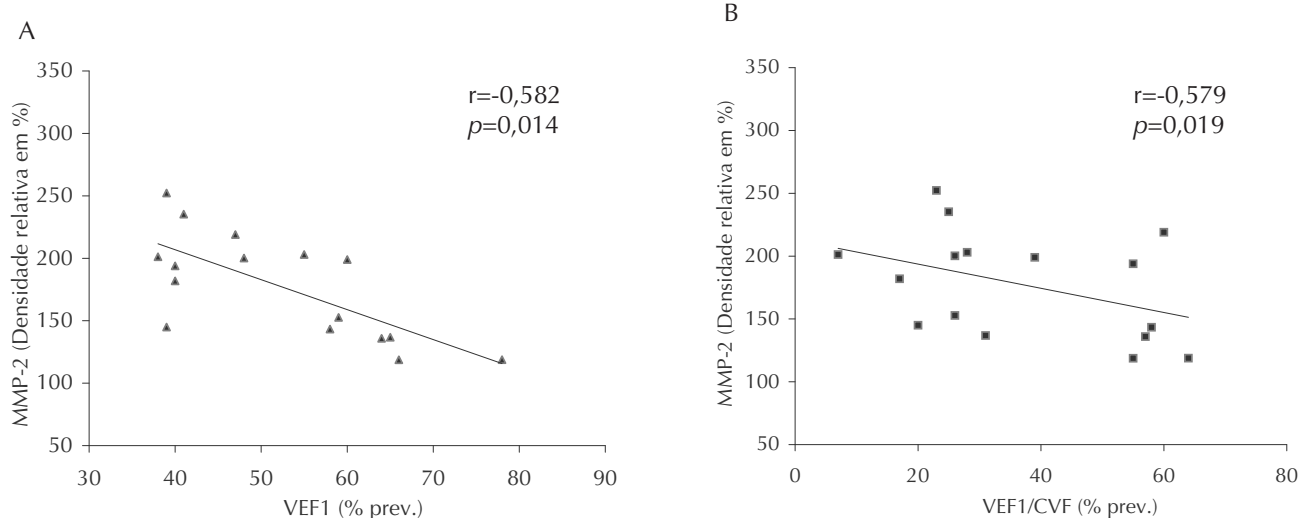


Figura 2 Correlação entre os níveis de expressão da MMP-2 na saliva e os parâmetros de obstrução aérea (A) VEF₁ (% do previsto) e (B) relação VEF₁/CVF (% do previsto) nos pacientes com DPOC
DPOC = doença pulmonar obstrutiva crônica; VEF₁ = volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF = capacidade vital forçada

Já foi relatado que, em comparação com indivíduos saudáveis, os pacientes com DPOC apresentam aumento dos níveis de MPM-1 e MPM-9 no lavado broncoalveolar¹⁷, acentuado aumento na expressão e atividade de MPM-2 e MPM-9 no parênquima pulmonar e no escarro¹⁸. Além disso, no processo inflamatório anormal na DPOC, a atividade das MPM-8 e -9 correlacionam-se ao aumento do número de neutrófilos e ao grau de obstrução ao fluxo aéreo¹⁹. Da mesma forma, os soros de pacientes com DPOC apresentam níveis de expressão e atividade enzimática da MPM-9 mais elevados em relação aos indivíduos saudáveis, em função da gravidade da doença e do processo inflamatório das vias aéreas²⁰. No presente estudo, verificou-se, em consonância com os resultados descritos na literatura, que os níveis de expressão da MPM-2 e MPM-9 foram mais elevados do que em indivíduos saudáveis, complementando as evidências de que a DPOC não está apenas associada às limitações da capacidade pulmonar funcional, mas também ao processo inflamatório sistêmico⁷.

A análise dos níveis de MPM no soro e saliva de indivíduos fumantes e não-fumantes demonstrou que, na saliva, os níveis da forma ativa da MPM-9 foram significativamente menores nos fumantes, mas no soro foi detectada em concentração mais elevada em relação aos não-fumantes²¹. Porém, no presente estudo observou-se que os níveis da MPM-9 na saliva foram significativamente maiores em pacientes com DPOC em comparação ao grupo controle. O fato de os pacientes com DPOC do presente estudo serem ex-tabagistas poderia explicar as diferenças experimentais observadas com relação à expressão da MPM-9 na saliva, pois no estudo anterior foram recrutados indivíduos fumantes e as substâncias presentes no tabaco proporcionariam al-

terações na expressão da MPM-9 desses indivíduos²².

A saliva é secretada por múltiplas glândulas incluindo a parótida, submandibular, sublingual e outras glândulas menores, presentes na mucosa oral²³. Constitui-se basicamente por várias proteínas e peptídeos, produzidos especificamente nas glândulas salivares ou de fonte sistêmica, que desempenham funções biológicas importantes²⁴. Com o avanço tecnológico em genômica, bioinformática e proteômica tem se verificado a presença de marcadores específicos de doenças orais e sistêmicas²⁵, como é o caso da periodontite²⁴ e a síndrome de Sjögren (doença auto-imune sistêmica)²⁵. Embora a DPOC acometa os pulmões, há diversas manifestações sistêmicas relacionadas a essa patologia²⁶. 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^{27,28}.

Alguns estudos caracterizaram marcadores de obstrução aérea no soro de pacientes com DPOC, como os níveis circulantes mais elevados da E-selectina que se correlacionou com o VEF₁ (% prev.)²⁸. Esses dados sugerem fortemente a ativação e recrutamento de neutrófilos na DPOC, pois a E-selectina é um receptor de superfície dessas células²⁸. Como os neutrófilos representam a principal fonte de MPM7, seriam esperados níveis mais elevados de expressão dessas enzimas nos fluidos biológicos. De fato, no presente estudo, verificaram-se níveis mais elevados de expressão da MPM-2 e -9 na saliva em pacientes com DPOC do que em indivíduos saudáveis. Entretanto, nas análises de correlação entre os níveis de expressão dessas enzimas e os parâmetros de obstrução aérea, constatou-se que apenas os níveis

de expressão da MPM-2 apresentaram correlações negativas com VEF₁ e VEF₁/CVF. Esses dados apontam evidências de que a MPM-2 pode estar relacionada às condições de limitação ao fluxo aéreo, conforme demonstrado em um estudo que verificou a correlação negativa dessa gelatinase com o VEF₁ em escarro de pacientes com DPOC²⁹.

Em relação à MPM-9, um estudo prévio observou níveis mais elevados da expressão em pacientes com DPOC, mas também não observou correlações com os parâmetros da prova de função pulmonar ou com níveis de saturação de oxigênio no sangue arterial³⁰. Por outro lado, um estudo que também evidenciou níveis de expressão mais elevados da MPM-9 no plasma de indivíduos com DPOC, quando comparados com grupo controle, detectou correlação negativa dessa enzima com o VEF₁; a porcentagem do previsto para o VEF₁ foi 43,2±16,1, sugerindo que a MPM-9 pode estar mais elevada quanto maior a obstrução ao fluxo aéreo³¹. Desse modo, novos ensaios estão sendo planejados para estudar os níveis de expressão da MPM-9 em relação aos diferentes estágios de desenvolvimento da DPOC, pois verificou-se que o nível de expressão dessa enzima no soro está diretamente relacionado ao alto grau de gravidade da doença²¹.

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

REFERÊNCIAS

- 1 GOLD – Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. s.l.; 2008. Disponível em: <http://www.goldcopd.com>.
- 2 Sauleda J, García-Palmer FJ, González G, Palou A, Agustí AGN. The activity of cytochrome oxidase is increased in circulating lymphocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and chronic arthritis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1):32-5.

Referências (cont.)

- 3 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.
- 4 Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: a statement of the American Thoracic Society and European Respiratory Society. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(4 Pt 2):S1-40.
- 5 Ding L, Quinlan KB, Elliott WM, Hamodat M, Paré PD, Hogg JC, et al. A lung tissue bank for gene expression studies in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*. 2004;1(2):191-204.
- 6 Lagente V, Manoury B, Nénan S, Le Quément C, Martin-Chouly C, Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(10):1521-30.
- 7 Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pauwels RA. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol*. 2005;5(3):257-63.
- 8 O' Reilly PJ, Gaggar A, Blalock JE. Interfering with extracellular matrix degradation to blunt inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8:242-8.
- 9 Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res*. 2001;2(1):10-9.
- 10 Weathington NM, van Houwelingen AH, Noerager BD, Jackson PL, Kraneveld AD, Galin FS, et al. A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat Med*. 2006;12(3):317-23.
- 11 Glader P, Eldh B, Bozinovski S, Andelid K, Sjöstrand M, Malmhäll C, et al. Impact of acute exposure to tobacco smoke on gelatinases in the bronchoalveolar space. *Eur Respir J*. 2008;32:644-50.
- 12 Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R. Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects. *Respir Med*. 2003;97(6):634-9.
- 13 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.
- 14 Soo-Quee D, Choon-Huat KG. The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine. *Occup Environ Med*. 2007;64(3):202-10.
- 15 ATS – American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(5Pt 2):S77-121.
- 16 Cazzola M, MacNee W, Martinez FJ, Rabe KF, Franciosi LG, Barnes PJ, et al. Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers. *Eur Respir J*. 2008;31(2):416-69.
- 17 Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, Fitzgerald MX, et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(1):240-7.
- 18 Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, et al. Sputum metalloproteinase-9 tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(6):1945-50.
- 19 Vernooij JHJ, Lindeman JHN, Jacobs JA, Hanemaaijer R, Wouters EF. Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced sputum from patients with COPD. *Chest*. 2004;126:1802-10.
- 20 Higashimoto Y, Yamagata Y, Iwata T, Okada M, Ishiguchi T, Sato H, et al. Increased serum concentrations of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in COPD patients. *Eur Respir J*. 2005;25(5):885-90.
- 21 Raitio A, Tuomas H, Kokkonen N, Salo T, Sorsa T, Hanemaaijer R, et al. Levels of matrix metalloproteinase-2, -9 and -8 in the skin, serum, and saliva of smokers and non-smokers. *Arch Dermatol Res*. 2005;297:242-8.
- 22 Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics*. 2007;4(4):531-8.
- 23 Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease. *J Am Dent Assoc*. 2006;137(3):322-9.
- 24 Baldini C, Giusti L, Bazzichi L, Lucacchini A, Bombardieri S. Proteomic analysis of the saliva: a clue for understanding primary from secondary Sjögren's syndrome? *Autoimmunity*. 2008;7(3):185-91.
- 25 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.
- 26 Wouters EF. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(1):26-33.
- 27 Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2004;59(7):574-80.

Referências (cont.)

- 28 Riise GC, Larsson S, Löfdahl CG, Andersson BA. Circulating cell adhesion molecules in bronchial lavage and serum in COPD patients with chronic bronchitis. *Eur Respir J.* 1994;7(9):1673-7.
- 29 Chen Y, Chen P, Hanoaka M, Droma Y, Kubo K. Enhanced levels of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-2 correlate with the severity of airflow limitation in stable COPD. *Respirology.* 2008;13:1014-21.
- 30 Boschetto P, Quintavalle S, Zeni E, Lepratti S, Potena A, Ballerin L, et al. Association between markers of emphysema and more severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2006;61:1037-42.
- 31 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(Suppl 6):145-52.