Raquel Annoni

**Composição da matriz extracelular na doença
pulmonar obstrutiva crônica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Thais Mauad

SÃO PAULO

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Annoni, Raquel

Composição da matriz extracelular na doença pulmonar obstrutiva crônica /
Raquel Annoni. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Thais Mauad.

Descritores: 1.Doença pulmonar obstrutiva crônica 2.Matriz extracelular 3.Tecido
elástico 4.Colágenos fibrilares 5.Colágenos não fibrilares 6.Proteoglicanas
7.Glicoproteínas

USP/FM/DBD-057/11

*A meus pais Dirce e Dailor por seu amor
e apoio incondicionais.*

*Ao meu amado Diogenes por me ajudar a
tornar-me hoje melhor do que antes.*

Agradecimentos

À minha orientadora Prof^a Dr^a Thais Mauad, meu profundo agradecimento pela oportunidade de trabalhar neste grupo de pesquisa ao longo destes anos de doutorado. Obrigada pela generosidade em sempre compartilhar seus conhecimentos e experiências conosco, incentivando-nos a tornar-nos melhores cidadãos e pesquisadores.

À Prof^a Dr^a Marisa Dolhnikoff agradeço pelas profícuas sugestões a este trabalho, bem como às críticas bem dosadas que me faziam refletir muito. Essas críticas foram essenciais para amadurecer meu entendimento a respeito do processo científico.

À Sandra e Esmeralda, do laboratório de imuno-histoquímica, pelo enorme trabalho no desenvolvimento das reações imuno-histoquímicas desta tese.

A todos os cirurgiões torácicos e residentes do Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas (HCFMUSP), aos residentes e funcionários do Departamento de Patologia por sua preciosa contribuição na coleta do tecido pulmonar para este trabalho.

A todas as funcionárias do laboratório de histoquímica pela preparação dos blocos e lâminas histológicas necessárias para esta tese.

A todos os amigos do laboratório de Patologia Pulmonar, em especial à Tatiana, por sua imensa generosidade; à Ana Laura, por partilhar comigo toda a trajetória da pós graduação, do início ao fim; à Maína, por seu exemplo de dedicação e perseverança; ao Ruy, pelas calorosas e riquíssimas discussões; à Ellen e à Érika, por seu entusiasmo; ao grande Luiz pela ajuda incondicional em todas as horas; ao George que, mesmo a distância, manteve aceso o espírito acolhedor do grupo; e ao Diogenes por, além de tudo, tornar nossas tardes tão divertidas.

À Karen Yumi Mota Kimoto e Tatiana Lanças pela valiosa colaboração nos primeiros passos deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia, na pessoa do Prof. Dr. Raimundo Soares de Azevedo Neto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior, CAPES, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos os indivíduos submetidos a ressecção pulmonar cirúrgica que gentilmente participaram desta pesquisa tornando-a possível.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Lista de anexos	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	2
1.1.1 Definição e Epidemiologia	2
1.1.2 Etiologia, Fatores de Risco e Classificação	5
1.1.3 Fisiopatologia	8
1.2 Matriz Extracelular	12
1.2.1 Fibras elásticas	14
1.2.2 Colágenos	16
1.2.3. Proteoglicanos	19
1.2.4. Glicoproteínas	23
2. OBJETIVOS	26
3. MÉTODOS	28
3.1 Casuística	29
3.2 Coleta e Processamento do Tecido Pulmonar	30
3.3 Análise Histoquímica	31
3.4 Análise Imunohistoquímica	31
3.5 Análise Morfológica	34
3.6 Análise Estatística	37
4. RESULTADOS	39
4.1 Casuística	40
4.2 Morfometria	41
4.3 Fibras elásticas	42

4.3.1 Comparação da área fracionada de fibras elásticas entre os compartimentos analisados	45
4.4 Fibras Colágenas	46
4.4.1 Comparação da área fracionada de fibras colágenas entre os compartimentos analisados	49
4.5 Proteoglicanos	49
4.5.1 Comparação da área fracionada de proteoglicanos entre os compartimentos analisados	51
4.6 Glicoproteínas	52
4.6.1 Comparação da área fracionada de glicoproteínas entre os compartimentos analisados	56
4.7 Correlações com dados clínicos	56
4.8 Correlações entre VAG, VAP e parênquima pulmonar	61
4.9 Comparação entre tabagistas e ex-tabagistas	62
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	77
7. ANEXOS	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BD	Broncodilatador
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CE	Camada externa
CI	Camada interna
CM	Camada muscular
COL1A1	Gene de colágeno 1 alfa 1
COL3A1	Gene de colágeno 3 alfa 1
CTRL	Grupo controle
CVF	Capacidade vital forçada
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FNO	Grupo de fumantes não-obstruídos
GAG	Glicosaminoglicanos
H&E	Hematoxilina e eosina
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IL-8	Interleucina – 8
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases
PD	Parênquima distal
PP	Parênquima peribrônquico

RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VA	Vias aéreas
VAG	Vias aéreas grandes
VAP	Vias aéreas pequenas
VEF ₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação espirométrica da gravidade da DPOC	8
Tabela 2. Anticorpos primários e processamento utilizado na análise imunohistoquímica	33
Tabela 3. Dados demográficos e clínicos dos grupos estudados	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Demonstração da divisão das camadas das vias aéreas e do parênquima peribrônquico e distal	35
Figura 2. Fotomicrografias das grandes e pequenas vias aéreas, parênquima peribrônquico e distal coradas para marcação de fibras elásticas dos grupos controle, fumantes não obstruídos e DPOC	43
Figura 3. Fotomicrografias das grandes e pequenas vias aéreas coradas para marcação de colágeno I dos grupos controle, fumantes não obstruídos e DPOC	47
Figura 4. Fotomicrografias do parênquima distal corado para marcação de versican dos grupos controle, fumantes não obstruídos e DPOC	50
Figura 5. Fotomicrografias das camadas interna, muscular e externa de pequenas vias aéreas coradas para marcação de fibronectina dos grupos controle, fumantes não obstruídos e DPOC	53
Figura 6. Fotomicrografias da área subepitelial das vias aéreas grandes e da camada interna das vias aéreas pequenas coradas para marcação de tenascina dos grupos controle, fumantes não obstruídos e DPOC	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Área fracionada de fibras elásticas nas camadas interna, muscular e externa das vias aéreas grandes e pequenas e no parênquima peribrônquico e distal dos grupos controle, fumantes não obstruídos e DPOC	44
Gráfico 2. Área fracionada de colágeno I na camada interna das vias aéreas grandes, nas camadas interna, muscular e externa das vias aéreas pequenas dos grupos controle, fumantes não obstruídos e DPOC	48
Gráfico 3. Área fracionada de versicam no parênquima distal dos grupos controle, fumantes não obstruídos e DPOC	51
Gráfico 4. Área fracionada de fibronectina nas camadas interna, muscular e externa das vias aéreas pequenas dos grupos controle, fumantes não obstruídos e DPOC	53
Gráfico 5. Área fracionada de tenascina na área subepitelial das grandes vias aéreas e na camada interna das vias aéreas pequenas dos grupos controle, fumantes não obstruídos e DPOC	55
Gráfico 6. Correlações entre a área fracionada de colágeno I na camada interna das vias aéreas grandes, camadas interna e externa das vias aéreas pequenas e os valores de VEF ₁ dos grupos controle, fumantes não-obstruídos e DPOC	57

Gráfico 7. Correlações entre a área fracionada de fibronectina nas camadas interna, muscular e externa das vias aéreas pequenas e os valores de VEF_1 dos grupos controle, fumantes não-obstruídos e DPOC 59

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq – HCFMUSP)	82
Anexo B. Tabela 4. Área fracionada de fibras elásticas, colágeno I, III e IV nas grandes e pequenas vias aéreas e no parênquima pulmonar nos grupos controle, fumantes não-obstruídos e DPOC	84
Anexo C. Tabela 5. Área fracionada dos proteoglicanos versicam, decorina, biglicano e lumicam nas grandes e pequenas vias aéreas e no parênquima pulmonar nos grupos controle, fumantes não-obstruído e DPOC	86
Anexo D. Tabela 6. Área fracionada de fibronectina e tenascina (fração de área positiva) nas grandes e pequenas vias aéreas e no parênquima pulmonar nos grupos controle (CTRL), fumantes não-obstruídos (FNO) e DPOC	88

RESUMO

Annoni R. *Composição da matriz extracelular na doença pulmonar obstrutiva crônica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é caracterizada por inflamação crônica e alterações estruturais que levam a obstrução das pequenas vias aéreas e destruição do parênquima alveolar. A composição da matriz extracelular (MEC) nos pulmões tem um importante papel em prover e sustentar a arquitetura pulmonar. No entanto, não há uma descrição abrangente da composição da matriz extracelular no trato respiratório de indivíduos portadores de DPOC. No presente estudo investigou-se a composição da MEC das vias aéreas grandes (VAG), pequenas (VAP) e do parênquima pulmonar de pacientes com DPOC. Utilizando imunohistoquímica e análise de imagem analisou-se a área fracionada de fibras elásticas, colágenos I, III e IV, versicam, decorina, biglicano, lumican, fibronectina e tenascina nas VAG, VAP e no parênquima peribrônquico e distal de 26 indivíduos com DPOC e comparou-se à área fracionada nos pulmões de 26 fumantes sem DPOC e 16 indivíduos não fumantes. A área fracionada de fibras elásticas foi significante maior no grupo de fumantes não obstruídos em comparação com os demais grupos, em todos os compartimentos analisados. Houve menor expressão de colágeno I na camada interna das VAG e nas camadas interna, muscular e externa das VAP dos indivíduos com DPOC e na camada externa das VAP dos fumantes não obstruídos quando comparados ao grupo controle. A área fracionada de versicam mostrou-se menor apenas no parênquima distal do grupo DPOC comparado ao grupo controle. O estudo da matriz de glicoproteínas mostrou maior área fracionada de fibronectina nas camadas interna, muscular e externa das VAP dos indivíduos com DPOC comparados aos demais grupos, assim como maior área fracionada de tenascina foi observado na membrana basal das VAG e na camada interna das VAP do grupo DPOC comparados aos controles. Além disso, a composição da MEC correlacionou-se com valores funcionais, como o VEF₁ (% predito). A partir desses resultados, concluímos que a DPOC é caracterizada por complexas alterações nas principais proteínas estruturais nas pequenas e grandes vias aéreas. Tais alterações podem contribuir para a lesão tecidual persistente e com a obstrução ao fluxo aéreo observado na DPOC.

Descritores: Doença pulmonar obstrutiva crônica, matriz extracelular, tecido elástico, colágenos fibrilares, colágenos não fibrilares, proteoglicanas, glicoproteínas.

SUMMARY

Annoni R. *Extracellular matrix composition in chronic obstructive pulmonary disease* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011.

COPD is characterized by chronic inflammation and structural alterations leading to small airway obstruction and to destruction of the lung parenchyma. The extracellular matrix (ECM) composition of the lungs has an important role in determining airway structure. However, there are no comprehensive descriptions of the ECM composition along the respiratory tract in COPD patients. We postulated that the ECM composition in large and small airways and in lung parenchyma of COPD patients differs from that observed in smoking and non-smoking controls. Using immunohistochemistry and image analysis, fractional areas of elastic fibers, type-I, -III and -IV collagen, the proteoglycans versican, decorin, biglycan and lumican; fibronectin and tenascin were quantified in the large (LA) and small airways (SA), in peribronchiolar (PP) and distal parenchyma (DP) of 26 COPD patients and compared to 26 smokers without COPD and 16 non-smoking controls. The fractional area of elastic fibers was higher in non-obstructed smokers than in COPD and non-smoking controls subjects, in all lung compartments. Type-I collagen fractional area was lower in the inner layer of LA and in the inner, muscle and outer layer (OL) of SA of COPD patients and in the OL of SA of non-obstructed smokers when compared to non-smoking controls. The versican fractional area was lower in DP of COPD patients than non-smokers. Fibronectin fractional area was higher in the inner, muscle and outer layer of SA of COPD patients compared to non-smokers. Tenascin fractional area was higher in the subepithelial area of LA and inner layer of SA of COPD when compared to non-smoking controls. Furthermore, ECM composition correlated with FEV₁% predicted. Architectural alterations due to an altered ECM composition in COPD are likely to contribute to the persistent tissue injury and to the airflow obstruction characteristic of this disease.

Descriptors: Chronic obstructive pulmonary disease, extracellular matrix, elastic tissue, fibrillar collagens, non-fibrillar collagens, proteoglycans, glycoproteins.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

1.1.1 Definição e Epidemiologia

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é definida, pelo *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease – GOLD* - (2007), como

Uma doença evitável e tratável, com alguns efeitos extrapulmonares importantes que podem contribuir para o agravamento em alguns pacientes. Seu componente pulmonar é caracterizado por limitação ao fluxo aéreo que não é totalmente reversível. A limitação ao fluxo aéreo geralmente é progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal do pulmão a partículas ou gases nocivos.

A DPOC é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em países de todos os níveis de desenvolvimento econômico e resulta em um impacto social e econômico substancial e crescente (Rabe *et al.*, 2007 e Buist *et al.*, 2008). Segundo Lopez e colaboradores (2006) a DPOC foi a quinta principal causa de morte no mundo em 2001 e estima-se que seja a terceira em 2020.

Na América Latina, dados indicam que a DPOC é um problema de saúde pública muito maior do que descrito previamente (Menezes *et al.*, 2005), com prevalência de 14,3% (18,9% em homens e 11,3% em mulheres) variando de 5,6% na Cidade do México, México, a 27,2% em Montevideu, Uruguai. No Brasil, estima-se que cerca de sete milhões de adultos com mais de 40 anos (15,8%) sejam portadores da DPOC (Menezes *et al.*, 2008). Ao analisar os dados de mortalidade no Brasil, verifica-se que a DPOC assume o primeiro lugar como causa de morte por doenças respiratórias em adultos com taxa de mortalidade de 5,28% no período de setembro de 2009 a agosto de 2010 (Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS)).

Hoogendoorn e colaboradores (2005) desenvolveram um modelo dinâmico de progressão da DPOC na população holandesa, o qual mostrou que dentro de um período de 25 anos (2000-2025) pode ser esperado um aumento de seis pacientes classificados como leves, três moderados, 0,9 graves e 0,8 muito graves por 1000 habitantes. Isto aumentará os custos diretos gastos com cuidados à saúde relacionada à DPOC de 280 para 495 milhões de Euros em 2025, um aumento de quase 80%. Para cada mil habitantes no ano 2025, 2,4 pacientes com DPOC morrerão, comparados com 1,4 pacientes em 2005.

O impacto da DPOC não se limita às taxas de mortalidade, já crescentes mundialmente, mas também a outros fatores relacionados à morbidade desta doença avaliada através do número de visitas ao médico, visitas ao pronto socorro, internações hospitalares, dias de trabalho perdidos

e o número de anos vividos com a disfunção. Entretanto, a DPOC nos seus estágios iniciais (Estágio I: DPOC Leve e Estágio II: DPOC Moderada) geralmente não é reconhecida, diagnosticada ou tratada, e, portanto, pode não ser incluída como diagnóstico no registro médico do paciente (Rabe *et al.*, 2007). No Brasil, no período de setembro de 2009 a agosto de 2010, ocorreram mais de 139 mil internações hospitalares por DPOC, com gastos superiores a 97 milhões de reais e uma média de 5,5 dias de permanência hospitalar por paciente (Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS)).

Dados de morbidade são muito afetados pela acessibilidade de recursos (por exemplo: taxas de internações são altamente dependentes das vagas disponíveis nos hospitais) e, portanto, precisam cuidados nas interpretações e uma clara compreensão dos possíveis vieses inerentes aos dados (Rabe *et al.*, 2007). O estudo PLATINO (2008) demonstrou que apenas 2% dos pacientes com DPOC no Brasil têm diagnóstico formal de DPOC e somente 18% dos casos recebem tratamento para problemas respiratórios. Os autores acreditam que estes índices sejam ainda menores, uma vez que, tal estudo foi realizado nas maiores cidades de cinco países latino-americanos, portanto, locais onde há maior acesso as redes de saúde, e que tal estimativa não possa ser estendida a todo país (Menezes *et al.*, 2008).

1.1.2 Etiologia, Fatores de Risco e Classificação

Nos países desenvolvidos, o tabagismo é a causa mais comum para o desenvolvimento da DPOC, responsável por cerca de 95% dos casos. Entretanto, a medida que a compreensão dos demais fatores de risco aumentou, se tornou evidente a interação genética e ambiental ao hábito de fumar (Barnes *et al.*, 2003).

A etiologia do DPOC é atribuída à inalação de partículas e gases tóxicos inalada durante toda a vida. O tabagismo é a fonte primária de partículas tóxicas e de longe o mais comum dos fatores de risco encontrados na DPOC. Nos Estados Unidos, cerca de 80 a 90% dos casos de DPOC são atribuídos ao hábito de fumar cigarros (Shapiro, 2005). Fumantes de cigarros têm uma prevalência maior de sintomas respiratórios e de anormalidade da função pulmonar, com uma maior diminuição anual do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) e maior índice de mortalidade que os não fumantes (Rabe *et al.*, 2007). Além disso, inúmeros estudos demonstraram que indivíduos expostos a fumaça de cigarro involuntariamente, ou seja, exposição passiva e/ou intra-uterina, têm maior prevalência de desenvolver DPOC na fase adulta do que indivíduos não expostos (Yoshida e Tudor, 2007).

A observação no clássico estudo de Fletcher e Peto (1977) de que uma minoria de fumantes desenvolve a DPOC clinicamente (cerca de 15 a 20%, chegando a 40% no seguimento populacional de 25 anos de Løkke *et*

al., 2006) indicou claramente a existência da interação de outros fatores de risco, como fatores genéticos e ambientais, para o aparecimento da DPOC.

O fator genético mais evidente é a deficiência hereditária grave de alfa-1 antitripsina, um importante inibidor da elastase dos neutrófilos. Tal deficiência causa o desenvolvimento precoce e acelerado de enfisema panlobular associado à diminuição da função pulmonar tanto em fumantes quanto em não fumantes com deficiência grave, embora o tabagismo aumente muito o risco (Rabe *et al.*, 2007). Além da bem estabelecida deficiência genética de alfa-1 antitripsina, estudos recentes compararam a distribuição de variantes genéticas de pacientes com DPOC e controles, sugerindo outros fatores de risco genéticos que predispõem a DPOC. Entretanto, o resultado de tais estudos tem sido inconsistentes e determinantes genéticos, além da alfa-1 antitripsina, não foram definitivamente comprovados (Shapiro e Ingenito, 2005).

As exposições ocupacionais, a poluição doméstica decorrente da queima de biomassa e a poluição do ar ambiental resultante, principalmente, da combustão de combustíveis fósseis também representam importantes fatores de risco para o desenvolvimento da DPOC (Rabe *et al.*, 2007). Sakai e colaboradores (2004) demonstraram redução na contagem de leucócitos circulantes e de citocinas pró-inflamatórias em trabalhadores japoneses que experimentaram um prolongado tempo de redução de material particulado oriundo da atmosfera, quando em expedição do Japão para a Antártica, onde o nível de poluição do ar é cerca de 1% daquela observada no Japão. Interessantemente, os autores observaram que os níveis de leucócitos

circulantes e de citocinas pró-inflamatórias eram maiores nos indivíduos fumantes quando comparados com não fumantes antes da partida do Japão, entretanto tal diferença desapareceu em território antártico. Estes dados suportam a hipótese de que a inflamação pulmonar causada pela poluição ambiental pode contribuir para a lesão pulmonar causada pelo tabagismo no desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica.

Embora a cessação do tabagismo seja a medida mais eficaz para melhorar os sintomas respiratórios apresentados por pacientes com DPOC (Rabe *et al.*, 2007), a DPOC é geralmente progressiva e, uma vez desenvolvida, o processo inflamatório é persistente mesmo após a interrupção do hábito de fumar (Willemse *et al.*, 2005 e Laperre *et al.*, 2006).

O diagnóstico da DPOC é realizado através da história clínica e gasométrica, presença de sintomas, prova de função pulmonar e radiografia de tórax. A espirometria é essencial para o diagnóstico da DPOC e deve ser realizada antes e após a administração de broncodilatador. Os parâmetros mais importantes a serem observados em tal exame são o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1), a capacidade vital forçada (CVF) e a relação entre VEF_1 /CVF. A existência de limitação ao fluxo aéreo é definida pela presença da relação VEF_1 /CVF menor do que 0,7 ou 70% pós broncodilatador (II consenso brasileiro sobre DPOC, 2004).

Uma classificação espirométrica simples é recomendada pelo GOLD (2007) para avaliação da gravidade da DPOC em quatro estágios (tabela 1).

Tabela 1 – Classificação espirométrica da gravidade da DPOC

Estádio I: Leve	$VEF_1/CVF < 0,70$ $VEF_1 \geq 80\%$ do previsto
Estádio II: Moderado	$VEF_1/CVF < 0,70$ $50\% \leq VEF_1 < 80\%$ do previsto
Estádio III: Grave	$VEF_1/CVF < 0,70$ $30\% \leq VEF_1 < 50\%$ do previsto
Estádio IV: Muito Grave	$VEF_1/CVF < 0,70$ $VEF_1 < 30\%$ do previsto $VEF_1 < 50\%$ do previsto com insuficiência respiratória crônica

VEF_1 : Volume expiratório forçado no 1º segundo; CVF: Capacidade vital forçada. Valores baseados em VEF_1 pós-broncodilatador.

1.1.3 Fisiopatologia

A DPOC compreende a bronquite crônica, a bronquiolite obstrutiva com obstrução e fibrose das pequenas vias aéreas (VA) e o enfisema pulmonar, caracterizado pelo aumento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal com destruição do parênquima alveolar, perda da elasticidade pulmonar e fechamento precoce das vias aéreas (Barnes *et al.*, 2003).

A bronquite crônica é caracterizada por hipersecreção de muco associada à falência do aparelho mucociliar, evidenciada por expectoração excessiva, cuja principal fonte é o aumento e hipertrofia das glândulas submucosas presentes nas grandes vias aéreas. A bronquiolite obstrutiva crônica afeta principalmente as pequenas vias aéreas (2 mm de diâmetro ou menores) e resulta de alterações inflamatórias e estruturais (denominadas remodelamento) que incluem o aumento e metaplasia do epitélio brônquico, espessamento da lamina própria, do músculo liso e da camada adventícia. As pequenas vias aéreas são consideradas o principal local anatômico responsável pela limitação ao fluxo aéreo presente na DPOC (Hogg, 2004; Molfino e Jeffery, 2007).

O aumento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal é o resultado da destruição centrilobular do parênquima pulmonar que ocorre em muitos, porém não em todos, casos de DPOC. O enfisema pulmonar contribui para a obstrução ao fluxo aéreo através da diminuição da tração radial do parênquima exercido sobre as vias aéreas e da perda da força de recolhimento elástico do pulmão (Molfino e Jeffery, 2007).

A patogênese do enfisema pulmonar permanece obscura, embora a teoria do desequilíbrio entre proteases e anti-proteases seja amplamente reconhecida. A elastase liberada pelos neutrófilos parece ser a enzima mais fortemente implicada neste processo, porém há evidências de que outras células inflamatórias e enzimas, como os macrófagos, proteinase 3 e metaloproteinases (MMP), estejam envolvidas nesse processo (Hogg, 2004). Entretanto, uma vez que muitos fumantes ou pacientes com doenças

pulmonares inflamatórias não desenvolvem um enfisema significativo, esta hipótese não explica completamente a perda de tecido pulmonar evidenciada no enfisema induzido pelo tabagismo. Recentes estudos propuseram que a destruição alveolar presente em pacientes enfisematosos poderia ser causada por um processo acelerado de apoptose das células epiteliais e endoteliais induzido, principalmente, pelos linfócitos T CD8⁺ (Kasahara *et al.* 2000; Majo *et al.*, 2001).

A inflamação das vias aéreas está presente tanto nas grandes quanto nas pequenas vias aéreas de pacientes com DPOC. O aumento dos linfócitos T CD8⁺ foi descrito nas grandes (O'Shaughnessy *et al.*, 1997) e nas pequenas vias aéreas de pacientes com DPOC (Saetta *et al.*, 1998) e, em ambos os estudos, mostrou uma correlação negativa com o grau de obstrução ao fluxo aéreo medido pelo VEF₁. Em conjunto, estes estudos sugerem que o processo inflamatório presente nas grandes vias aéreas pode refletir a inflamação das pequenas vias aéreas de indivíduos com DPOC e está intimamente ligado a predominância de células CD8⁺. Acredita-se que a principal atividade dos linfócitos T CD8⁺ está relacionada à resolução rápida de infecções agudas virais (Isaacs *et al.*, 1987) e pacientes com DPOC são frequentemente acometidos por essas infecções (Hogg, 2001). É possível que o recrutamento excessivo de linfócitos CD8⁺ ocorra em resposta a repetidas infecções virais em muitos fumantes e que, essa resposta leve a injúria pulmonar em fumantes susceptíveis (O'Shaughnessy *et al.*, 1997).

Grashoff *et al.* (1997) observaram um aumento no número de mastócitos e macrófagos no epitélio de fumantes que desenvolveram DPOC. Os mastócitos podem desempenhar um papel na patogênese da DPOC por meio da indução da produção de colágeno, da proliferação de fibroblastos e da liberação de proteases como a triptase e a quimase. Os macrófagos alveolares secretam inúmeros mediadores inflamatórios, como tumor de necrose tumoral (TNF)- α e interleucina (IL)-8, além de espécies reativas de oxigênio e enzimas elastolíticas, como MMP-2, MMP-9 e MMP-12. Em indivíduos com DPOC, os macrófagos alveolares secretam mais proteínas inflamatórias e têm maior atividade elastolítica do que os macrófagos de fumantes normais (Barnes, *et al.*, 2003).

Embora o quadro inflamatório apareça tanto nas grandes vias aéreas quanto nas pequenas, ainda se questiona se a inflamação nas pequenas vias aéreas é uma extensão das grandes vias aéreas. Dados publicados em fumantes sugerem que há diferença entre o padrão inflamatório das pequenas vias aéreas em relação às grandes VA, com um aumento na densidade de neutrófilos e mastócitos nas pequenas VA (Battaglia *et al.*, 2007). Previamente, propôs-se que o pulmão distal estaria envolvido na mobilização de células imuno-efetoras para dentro das VA, enquanto as grandes VA serviriam de “reservatório” para células imunes, o que contribuiria para inflamação crônica (Miller *et al.*, 2005).

Acredita-se que a inflamação pulmonar crônica induzida pelo tabagismo pode causar injúria tecidual crônica, culminando em uma estrutura anormal das vias aéreas e, em alguns pacientes, em obstrução ao

fluxo expiratório. O processo de remodelamento que afeta as pequenas vias aéreas de pacientes com DPOC, com inflamação crônica, hipersecreção de muco, fibrose nas vias aéreas, hipertrofia do músculo liso e perda dos acoplamentos alveolares (Jeffery, 2001) está relacionado ao grau de obstrução ao fluxo aéreo e à gravidade da doença (Hogg *et al.*, 2004).

1.2 Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC), composta por uma complexa rede de macromoléculas, desempenha um papel essencial na sustentação estrutural do pulmão. Este papel estrutural difere nas três zonas fisiológicas pulmonares: vias aéreas, zona respiratória (áreas de troca gasosa) e zona de transição (bronquíolos respiratórios). Nas vias aéreas de condução, a MEC das rígidas cartilagens (composta principalmente por colágenos e proteoglicanos) e do tecido intersticial sustenta células epiteliais e células musculares lisas adjacentes. Embora a MEC permita alguma mobilidade, essencial para regular o diâmetro das vias aéreas, nesta área é um importante estabilizador das VA, impedindo o colapso das mesmas durante a expiração. Nas zonas respiratórias e de transição, a MEC parece ter um papel mais dinâmico, a fim de adequar as constantes oscilações no volume pulmonar que acompanham a inspiração e a expiração. Sua função no ácino é prover uma estrutura forte, porém expansiva, que suporte a delgada

interface epitélio–capilar presente nos alvéolos pulmonares (McGowan, 1992).

A matriz extracelular desempenha papel importante no desenvolvimento e reparo pulmonar. Os componentes da matriz extracelular também participam de vários processos biológicos como a migração e proliferação celular, balanço hídrico, adesão celular e regulação de fatores inflamatórios (Fernandes *et al.*, 2006).

Os fibroblastos pulmonares são células essenciais no processo de reparação tecidual, uma vez que são as principais responsáveis pela síntese dos componentes da MEC (Zandvoort *et al.*, 2008). Togo e colaboradores (2008) demonstraram, *in vitro*, que fibroblastos de pacientes com DPOC têm menor capacidade de mediar respostas de reparo frente a lesões pulmonares e concluem, portanto, que portadores de DPOC podem não ser capazes de manter funções de reparo teciduais normais, o que contribuiria para o desenvolvimento da doença nestes indivíduos.

Além das alterações nos fibroblastos, que podem levar a distúrbios na composição dos componentes da matriz extracelular, outras células estão implicadas nos eventos responsáveis pelo remodelamento, como as células epiteliais e os mediadores produzidos por células inflamatórias que desempenham importante papel na ativação ou inibição da produção local dos componentes da matriz extracelular (Postma e Timens, 2006).

Uma vez que as propriedades viscoelásticas pulmonares, como elastância e resistência, são determinadas principalmente pelas interações entre as células e os componentes da MEC, alterações nas proteínas da

MEC levam a mudanças nas características biomecânicas do pulmão de indivíduos com DPOC (Suki e Bates, 2008).

Os principais componentes da matriz extracelular pulmonar são as fibras elásticas, colágenos, proteoglicanos (como versican, decorina, biglicano e lumican), bem como glicoproteínas (fibronectina e tenascina) (Fernandes *et al.*, 2006). Embora em muitos estudos a espessura das paredes das vias aéreas, generalizada como “fibrose”, é considerada como um dos principais contribuintes para a limitação irreversível ao fluxo aéreo em pacientes com DPOC, uma caracterização precisa das alterações da matriz extracelular nas vias aéreas destes indivíduos tem sido pouco explorada (James e Wenzel, 2007). Ademais, não se sabe se o padrão de composição da matriz extracelular nas pequenas vias aéreas difere daquele encontrado nas grandes vias aéreas e no parênquima alveolar de pacientes com DPOC.

1.2.1 Fibras elásticas

As fibras elásticas regulam a patência das vias aéreas e o recolhimento elástico pulmonar (Turino, 1985). As fibras elásticas são formadas por dois componentes morfolologicamente distintos: a elastina amorfa e as microfibrilas. Para construir uma fibra funcional, a produção desses componentes deve ocorrer em uma seqüência temporal bem definida

durante o desenvolvimento do tecido pulmonar. A complexidade da composição das fibras elásticas explica porque estas são tão difíceis de reparar quando danificadas. A reconstrução da fibra exige a reexpressão coordenada de todas as moléculas que constituem as fibras elásticas, bem como o “cross-linking” das enzimas envolvidas no processo. Este é um processo ineficiente em tecidos adultos, muitas vezes resultando na produção de uma elastina não polimerizada ou não organizada em uma fibra tridimensional funcional (Shifren *et al.*, 2007).

O papel das fibras elásticas na patogênese da DPOC tem sido extensivamente discutido desde que inúmeros estudos demonstraram, em modelos animais, a associação entre o desenvolvimento de lesões enfisematosas a partir da instilação de enzimas elastolíticas que degradam e destroem as fibras elásticas (Shifren *et al.*, 2007). O rearranjo da arquitetura e a perda da superfície de troca gasosa causada pela degradação das fibras elásticas no enfisema são, geralmente, irreversíveis.

Os estudos que avaliaram o conteúdo de fibras elásticas no parênquima pulmonar de indivíduos com DPOC mostraram diminuição em relação a indivíduos saudáveis (Chrzanowski, *et al.*, 1980; Merrilees *et al.*, 2008). Além da quantidade, a estrutura das fibras elásticas parece estar acometida em pacientes portadores de DPOC. Fukuda e colaboradores (1989) observaram fibras elásticas anormais no pulmão de indivíduos com DPOC quando comparados a indivíduos controles. Indivíduos com enfisema centrilobular apresentavam fibras elásticas rompidas, com lacunas e com depósito de material granular além de acúmulo de pequeno material amorfo

entre os feixes de microfibrilas. Os autores acreditam que a formação de fibras elásticas anormais ocorra em consequência ao processo de dano e reparo contínuo no pulmão de indivíduos com DPOC.

Alguns estudos têm demonstrado alterações das fibras elásticas nas vias aéreas na DPOC. Black e colaboradores (2008) mostraram menor expressão de fibras elásticas nas pequenas vias aéreas de pacientes com DPOC quando comparados a fumantes sem a doença. Entretanto, não se tem informação a respeito do conteúdo das fibras elásticas nas vias aéreas de fumantes com ou sem DPOC quando comparados a indivíduos não-fumantes. Alterações nos níveis de fibras elásticas nas vias aéreas podem ter consequências importantes no recolhimento intrínseco das mesmas.

1.2.2 Colágenos

As fibras colágenas são os elementos da MEC mais abundantes no pulmão, constituindo até 70% do interstício pulmonar (Turino, 1985). Estão presentes em todas as estruturas principais, incluindo as vias aéreas, vasos sanguíneos, o interstício do parênquima pulmonar, e a membrana basal das células epiteliais e endoteliais. Qualquer alteração na estrutura, quantidade ou na geometria de sua distribuição, pode desencadear alterações na função pulmonar (Laurent, 1986).

No pulmão já foram identificados mais de 20 tipos diferentes de colágenos (Suki e Bates, 2008). Os colágenos fibrilares (tipo I, II, III, V e XI) são os colágenos mais abundantes no pulmão e compõem aproximadamente 15 a 20% do peso seco do tecido pulmonar. Tem como função principal conferir força tênsil a todos os componentes distensíveis do pulmão (Dunsmore, 2008). Os colágenos do tipo II e XI estão presentes na cartilagem das grandes vias aéreas e parecem exercer um papel regulador na interação colágeno-proteoglicano. O interstício pulmonar contém principalmente colágeno do tipo I e III cuja importância está na manutenção da arquitetura do pulmão (Suki e Bates, 2008). Estão presentes no interstício alveolar, nos vasos pulmonares, na pleura visceral e no tecido conectivo que circunda a árvore traqueobrônquica. O colágeno IV, principal constituinte das membranas basais, é o colágeno não fibrilar mais abundante no pulmão (Dunsmore, 2008).

Os estudos que analisaram a expressão de colágenos no parênquima pulmonar de portadores de DPOC mostram resultados divergentes. O estudo de Vlahovic e colaboradores (1999), realizado com portadores de DPOC com graus de gravidade e histórias tabágicas diferentes, mostrou perda de parênquima alveolar associado a espessamento intersticial do tecido remanescente, com aumento do conteúdo de elástica e colágeno, corroborando o estudo de Cardoso *et al.* (1993) que também mostrou aumento do colágeno no parênquima de pacientes com DPOC. Mais tarde, Lang e colaboradores (1994) descreveram aumento no conteúdo de colágeno no pulmão de portadores de DPOC quando comparados a

indivíduos não fumantes. Entretanto, quando analisaram apenas os indivíduos com DPOC, os autores observaram que tal aumento estava presente apenas nos portadores de enfisema panacinar; aqueles com enfisema centrilobular não apresentavam diferença na quantidade de colágeno em relação a controles não-fumantes.

Nas vias aéreas, mudanças na quantidade e qualidade das fibras colágenas podem ser importantes determinantes para a obstrução ao fluxo aéreo. Pouca atenção tem sido dada à deposição de colágenos nas vias aéreas de pacientes com DPOC. Entretanto, recentemente, a discussão a respeito dos diferentes tipos de colágenos presentes nas grandes vias aéreas tem mobilizado a comunidade científica. Kranenburg e colaboradores (2006), usando técnicas de análise semi-quantitativas, observaram aumento na expressão de colágenos do tipo I e III na membrana basal subepitelial das grandes VA de indivíduos com DPOC. Outro estudo mais recente documentou o espessamento da membrana basal subepitelial nas vias aéreas grandes de pacientes com DPOC, porém mais associada ao aumento da tenascina em detrimento de colágenos I, III e IV (Liesker *et al.*, 2009). Benayoun e colaboradores (2003) compararam a quantidade de colágeno do tipo III em biópsias de asmáticos graves *versus* DPOC e verificaram um número maior deste colágeno nas VA dos pacientes asmáticos.

1.2.3. Proteoglicanos

Proteoglicanos são macromoléculas compostas por uma proteína central e cadeias laterais de glicosaminoglicanos (GAG). Estão envolvidos na manutenção das propriedades biofísicas dos tecidos, na regulação hídrica, na junção das fibrilas de colágeno e na regulação de algumas citocinas, como fator de crescimento transformador (*transforming growth factor* - TGF)- β . Eles influenciam a migração celular, podem agir como fatores de crescimento e alterar a permeabilidade capilar (Iozzo, 1998).

Os glicosaminoglicanos são polímeros com uma estrutura repetida de dissacarídeos que carregam grupos sulfatos e/ou carboxilas que dominam as propriedades físicas da proteína central à qual estão ligados (Hardingham e Fosang, 1992). Variações no grau e na posição dos grupos sulfatos em cada dissacarídeo que formam os GAG conferem importantes diferenças estruturais a essas moléculas (Faggian *et al.*, 2007). A alta densidade iônica das cadeias de GAG atrai íons eletricamente opostos e o desequilíbrio osmótico causado por uma alta concentração local de íons tira água do entorno, o que mantém a matriz hidratada e influencia diretamente na mecânica dos tecidos (Hardingham e Fosang, 1992).

Os proteoglicanos são classificados de acordo com a composição das cadeias de GAG em: condroitim sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato/heparina e queratam sulfato. Destes, os proteoglicanos condroitim

sulfato são os mais abundantes nos tecidos de mamíferos, os quais incluem: versicam, agrecam, neurocam e brevicam (Hardingham e Fosang, 1992).

Versicam é um proteoglicano expresso na matriz extracelular de vários tecidos atribuindo diversidade as atividades biológicas. O versicam contém dois domínios globulares de proteínas: uma próxima a região amino-terminal (G1), outra próxima a região carboxi-terminal (G3) e uma cadeia de condroitim sulfato que liga as proteínas G1 e G3. No versicam, o número de cadeias de GAG ligadas à proteína central é bastante variado, o que confere a este proteoglicano participação em várias funções, como adesão, migração e proliferação celular (Wu *et al.*, 2005). Através da interação direta ou indireta com células e outras moléculas, o versicam proporciona hidratação e turgor à matriz extracelular influenciando, desta forma, o comportamento viscoelástico dos tecidos (Ludwig, 2007).

O versicam interage com componentes da MEC como o hialuronam, colágeno I, tenascina, fibronectina e quimiocinas (Wu *et al.*, 2005). As múltiplas interações têm papel importante no comportamento das células e dos tecidos. O versicam influencia ainda a junção das fibras da matriz extracelular e controla a fibrilogênese das fibras elásticas (Rahmani *et al.*, 2006). Estas funções são de fundamental importância para o processo de remodelamento da MEC na DPOC.

Decorina, biglicano e lumican pertencem a uma família de pequenos proteoglicanos ricos em leucina. Esses proteoglicanos são capazes de ligar-se as fibras colágenas e interferir com sua estrutura, função e síntese. Estas moléculas também se ligam a diferentes fatores de crescimento, como TGF-

β e fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor* - FGF), influenciando sua biodisponibilidade e modulando sua capacidade de influenciar a proliferação celular e deposição de matriz extracelular (Ludwig, 2007).

Decorina é um pequeno proteoglicano constituído por uma proteína central e uma única cadeia GAG dermatam sulfato ou condroitim sulfato. Decorina liga-se as fibras de colágeno, através da sua proteína central, e parece influenciar a fibrillogênese do colágeno e diâmetro final das fibrilas (Bhide *et al.*, 2005). Além disso, decorina interage com uma variedade de fatores de crescimento, citocinas e moléculas de adesão auxiliando na proliferação celular e na morfogênese dos tecidos (Iozzo e Murdoch, 1996).

O proteoglicano decorina tem a habilidade de ligar-se a TGF- β , uma citocina envolvida nos processos patológicos conhecidos como remodelamento (Fust *et al.*, 2005). A TGF- β parece exercer um controle negativo sobre a síntese de decorina pelos fibroblastos e a decorina, por sua vez, pode inibir a produção desta citocina. Dessa forma, a decorina parece agir como um regulador, com *feedback* negativo, das respostas de reparo mediadas pela TGF- β e vice-versa. Noordhoek e colaboradores (2005) demonstraram que a estimulação de fibroblastos por TGF- β reduziu a produção de decorina por essas células em pacientes portadores de DPOC grave.

O biglicano, outro pequeno proteoglicano rico em leucina, tem duas cadeias de condroitim sulfato ou dermatam sulfato ligadas a proteína central. O biglicano serve como um agonista de diferentes receptores de superfície

celulares dando origem a diversas atividades biológicas (Iozzo e Schaefer, 2010). Assim como decorina, o biglicano também é capaz de ligar-se as fibrilas de colágeno, entretanto, é possível que o biglicano tenha uma preferência por tipos de colágeno distintos do proteoglicano decorina (Roughley *et al.*, 1993). Recentemente, alguns relatos sugerem que o biglicano atue como uma molécula sinalizadora do processo imune inato, interagindo com os receptores *Toll-like* em macrófagos influenciando, assim, as respostas inflamatórias (Schaefer *et al.*, 2005; Babelova *et al.*, 2009).

O lumican também pertence à família de pequenos proteoglicanos ricos em leucina, está presente na matriz extracelular de muitos tecidos e é constituído por cadeias queratam sulfato (Grover *et al.*, 1995). No pulmão, o lumican foi encontrado principalmente na adventícia dos vasos sanguíneos periféricos, parede das vias aéreas e, de forma multifocal, no interstício alveolar. Sua função no pulmão ainda não está bem estabelecida, entretanto acredita-se que, assim como decorina, o lumican possa interagir com as fibrilas de colágeno e desempenhar um papel na regulação da sua estrutura na matriz extracelular (Dolhnikoff *et al.*, 1998).

Alguns estudos abordam a expressão de proteoglicanos no pulmão de indivíduos com DPOC, mostrando aumento na deposição de versican no parênquima pulmonar (Merrilees *et al.*, 2008) e diminuição de decorina e biglicano na área peribrônquica de pacientes com DPOC (van Straaten *et al.*, 1999). Entretanto, a caracterização dos proteoglicanos ao longo da árvore traqueobrônquica de pacientes com DPOC em comparação com indivíduos fumantes e não-fumantes não foi amplamente descrita.

1.2.4. Glicoproteínas

As glicoproteínas são proteínas não filamentosas que regulam a interação entre as células e os componentes da matriz extracelular e interagem com receptores na superfície das células. A distribuição das glicoproteínas varia entre os diferentes tecidos. As proteínas mais comumente encontradas no pulmão humano são fibronectina, tenascina e laminina (Lambropoulou *et al.*, 2009).

A fibronectina é uma glicoproteína de alto peso molecular que circula em forma solúvel no plasma e também é encontrada em forma insolúvel dentro da matriz extracelular (Hocking, 2002). A deposição de fibronectina nas matrizes durante a embriogênese é essencial para a migração celular e subsequente morfogênese dos tecidos. Ao contrário do período embrionário, a expressão de fibronectina após o nascimento é muito restrita. Entretanto, após uma lesão tecidual a expressão de fibronectina tem um aumento exponencial, mediada principalmente por fibroblastos e macrófagos alveolares (Limper e Roman, 1992).

A fibronectina atua em múltiplas funções durante o processo de reparo tecidual. Durante a lesão pulmonar, os fragmentos de fibronectina resultante do aumento da atividade proteolítica são quimiotáticos para monócitos, promovendo o influxo de células inflamatórias para a região acometida. A deposição de fibronectina dentro dos espaços aéreos também parece acarretar a migração de fibroblastos para os alvéolos lesionados.

Acredita-se ainda que a deposição de fibronectina advenha para organizar a subsequente deposição de colágeno na MEC (Limper e Roman, 1992).

Enquanto acredita-se que, na asma, a deposição de fibronectina na camada subepitelial de biópsias endobrônquicas (Roche *et al.*, 1989) esteja relacionada à alteração das propriedades geométricas e biomecânicas das VA (Pare *et al.*, 1997), sabe-se muito menos sobre o papel da fibronectina no remodelamento das VA de pacientes com DPOC. Estudos que objetivaram analisar *in vitro* a produção de fibronectina por fibroblastos (Noordhoek *et al.* 2005) e a expressão de fibronectina no parênquima pulmonar e na região peribrônquica (van Straaten *et al.*, 1999) de pacientes com DPOC leve e grave, falharam em mostrar diferenças entre os grupos estudados.

A tenascina é uma glicoproteína de MEC produzida por células mesenquimais e epiteliais e, assim como a fibronectina, é expressa durante a embriogênese e o reparo tecidual (Lambropoulou *et al.*, 2009). As atividades funcionais previstas para a tenascina estão relacionadas a interações com receptores da superfície celular e com moléculas de adesão e a modulação de outras proteínas da MEC, como fibronectina e proteoglicanos (Jones e Jones, 2000).

A deposição de tenascina na membrana basal de pacientes asmáticos tem sido amplamente descrita, mostrando um papel importante no processo de reparo tecidual na asma (Laitinen *et al.*, 1997). Liesker e colaboradores (2009) descreveram, através de análise semi-quantitativa, a expressão de tenascina na membrana basal reticular das grandes vias aéreas de

pacientes com DPOC comparados a controles fumantes e indivíduos asmáticos. Os autores observaram um aumento no conteúdo de tenascina nas VA dos indivíduos asmáticos e fumantes, sem diferença na membrana basal dos pacientes com DPOC.

Apesar de vários estudos investigarem a expressão de elementos da matriz extracelular separadamente nos pulmões de pacientes com DPOC, uma completa caracterização das proteínas da MEC nas grandes e pequenas vias aéreas e no parênquima pulmonar de pacientes com DPOC comparados a fumantes e não fumantes ainda não foi amplamente sistematizada. É importante definir quais elementos da matriz extracelular estão alterados e se essas diferenças são uniformes em todo o trato respiratório inferior de portadores de DPOC. O melhor entendimento das diferenças estruturais entre grandes vias aéreas, pequenas vias aéreas e parênquima pulmonar pode contribuir para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da DPOC.

Com o intuito de descrever as proteínas da MEC de pacientes com DPOC, foi analisado a área fracionada de fibras elásticas, colágeno I, III e IV, versicam, decorina, biglicano, lumican, fibronectina e tenascina nas grandes e pequenas vias aéreas e nos septos alveolares e comparadas à área fracionada dos pulmões de fumantes que não apresentavam a doença e indivíduos não fumantes.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Descrever a composição das proteínas da matriz extracelular (fibras elásticas, colágeno I, III e IV, versicam, decorina, biglicano, lumican, fibronectina e tenascina) no trato respiratório inferior (vias aéreas grandes e pequenas e parênquima pulmonar) de pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica leve a moderada e compará-la a de indivíduos não fumantes e fumantes sem DPOC.
- Investigar possíveis correlações entre a expressão das proteínas da matriz extracelular e parâmetros clínicos e funcionais.
- Investigar a existência de correlações entre o padrão de composição das proteínas da matriz extracelular nos diferentes compartimentos pulmonares (vias aéreas grandes, pequenas e parênquima pulmonar).

Métodos

3. MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq – HCFMUSP), sob o protocolo número 038/2006 (anexo A). Todos os indivíduos incluídos neste estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

3.1 Casuística

Foram estudados 68 indivíduos submetidos à ressecção pulmonar por tumor primário ou metastático no período de 2001 a 2007. Dados demográficos, história médica, hábito tabágico, medicações e prova de função pulmonar pré broncodilatador (BD) foram obtidos através da revisão de prontuários.

Os indivíduos foram divididos em três grupos de acordo com os seguintes critérios, com base nos hábitos tabágicos e prova de função pulmonar:

Grupo controle (CTRL): indivíduos não tabagistas, sem doença pulmonar prévia e com prova de função pulmonar normal ($VEF_1/CVF > 70\%$, $VEF_1 > 80\%$).

Grupo de fumantes não-obstruídos (FNO): indivíduos tabagistas ou ex-tabagistas (com história de cessação do fumo ≥ 1 mês), sem doença pulmonar prévia e com prova de função normal ($VEF_1/CVF > 70\%$, $VEF_1 > 80\%$).

Grupo DPOC: indivíduos tabagistas ou ex-tabagistas (com história de cessação do fumo ≥ 1 mês), com obstrução na prova de função pulmonar ($VEF_1 / CVF < 70\%$). Dezesesseis pacientes do grupo DPOC apresentavam prova de função pulmonar com valores pós-BD. A reversibilidade dos valores pós-BD foram menores do que 12% em relação à prova pré-BD em todos os indivíduos.

Pacientes com diagnóstico clínico de asma, bronquiectasia, doença pulmonar infecciosa, deficiência de α_1 -antitripsina e doença pulmonar intersticial não foram incluídos.

3.2 Coleta e Processamento do Tecido Pulmonar

Foram coletados dois a quatro fragmentos de tecido pulmonar periférico, e um a dois fragmentos de regiões pulmonares centrais (anéis brônquicos) localizados longe do tumor ao qual o indivíduo foi submetido à ressecção cirúrgica. Em geral, poucos fragmentos de regiões centrais foram considerados úteis para a análise morfológica, uma vez que muitos encontravam-se próximos ao tumor ou às margens cirúrgicas do tumor. Os

fragmentos foram fixados em formaldeído tamponado a 10%, processados rotineiramente e emblocados em parafina. Cortes de 4 µm de tecido pulmonar foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para a análise histológica inicial. Foram excluídos casos que apresentavam doenças fibróticas, tecido neoplásico ou pneumonia pós-estenótica, vistos à microscopia.

3.3 Análise Histoquímica

Para identificação das fibras elásticas, a técnica de Resorcina-Fucsina de Weigert oxidada foi utilizada, como descrita previamente por Mauad *et al.*, 1999.

3.4 Análise Imunohistoquímica

Os anticorpos primários, recuperação antigênica, diluição e origem dos anticorpos utilizados para descrever a matriz extracelular são demonstrados na tabela 2. Para a reação de imunohistoquímica, os cortes foram desparafinados, hidratados e submetidos a uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 40 minutos com o objetivo de inibir a ação de

peroxidase endógena. A seguir foi realizada incubação *overnight* com o anticorpo primário. Como anticorpos secundários foram utilizados o complexo estreptoavidina-biotina (LSAB; DAKO, Glostrup, Dinamarca) para a coloração do colágeno I e fibronectina, e o sistema não-biotinilado Novolink[®] (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) para a coloração dos outros anticorpos primários. Os cortes foram corados com o cromógeno diaminobenzidina por 10 minutos e contra corados com Hematoxilina de Mayer por 1 minuto.

Controles negativos foram realizados com a substituição do anticorpo primário por um anticorpo controle de mesmo isotipo e com a substituição do anticorpo primário por uma solução salina tamponada com fosfato (phosphate buffered saline, PBS).

Tabela 2 - Anticorpos primários e processamento utilizado na análise imunohistoquímica

Anticorpo	Pré-Tratamento	Espécie	Diluição	Clone	Origem
Colágeno I	Citrato	Cabra	1:1500	Policlonal	USBiological EUA
Colágeno III	Tripsina	Camundongo	1:750	III-53	Oncogene & Calbiochem/ Alemanha
Colágeno IV	Citrato	Camundongo	1:20	CIV-22	Dako/ Dinamarca
Versicam	Tripsina	Camundongo	1:1000	2-b-1	Seikagaku/ Japão
Biglicano	Condroitinase	Coelho	1:2000	Policlonal	Doado por Dr Roughley Canadá
Decorina	Condroitinase	Coelho	1:100	Policlonal	Doado por Dr Roughley Canadá
Lumicam	Condroitinase	Coelho	1:2500	Policlonal	Doado por Dr Roughley Canadá
Fibronectina	Citrato	Coelho	1:6000	Policlonal	Dako/ D Dinamarca
Tenascina	Pepsina	Camundongo	1:400	BC-24	Sigma/ EUA

3.5 Análise Morfológica

As vias aéreas cortadas transversalmente foram classificadas de acordo com o perímetro da membrana basal em vias aéreas grandes, VAG, (perímetro da membrana basal $> 6\text{mm}$) e vias aéreas pequenas, VAP, (perímetro da membrana basal $\leq 6\text{mm}$). Foram analisadas duas VAG e três VAP, além do parênquima peribrônquico (PP) e distal (PD) em cada caso (Mauad *et al.*, 2004).

Cada via aérea foi dividida em três camadas: 1) camada interna (CI): localizada entre a membrana basal epitelial, inclusive, e a borda interna do músculo liso; 2) camada muscular (CM): músculo liso propriamente dito; e 3) camada externa (CE): localizada entre a borda externa do músculo liso e os limites externos da via aérea (figura 1).

Figura 1. Demonstração da divisão das camadas das vias aéreas e do parênquima peribrônquico e distal. A: fotomicrografia de uma via área pequena com coloração imunohistoquímica para colágeno I. B: fotomicrografia de um campo de parênquima distal para mesma coloração. CI: camada interna (demarcada pela cor amarela), CM: camada muscular (demarcada pela cor vermelha), CE: camada externa (demarcada pela cor verde), PP: parênquima peribrônquico (demarcada pela cor preta) e, PD: parênquima distal (demarcada pela cor laranja). Nas vias aéreas grandes, foram delineadas as CI, CM e CE da mesma forma como nas vias aéreas pequenas. Barra de escala = 50 μ m.

As medidas das áreas coradas foram realizadas utilizando um analisador de imagens e o software Image-Pro® Plus versão 4.5 para Windows® (Media Cybernetics - Silver Spring MD, USA) instalado em um computador pessoal, conectado a uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico (Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Alemanha).

A positividade de cada reação foi determinada por intervalos de cor (*threshold*). Para definição do limiar de cor, diferentes cortes corados em cada anticorpo (entre 6 e 8 cortes), bem como controles negativos, foram avaliados para se obter o melhor intervalo de positividade entre estes casos

e checados por duas experientes patologistas pulmonares (M. Dolhnikoff e T. Mauad). Para cada reação um padrão de cor foi estabelecido. Estes procedimentos geraram um arquivo contendo o espectro de cor selecionado e este era aplicado posteriormente para todos os casos corados com o mesmo anticorpo (Araujo *et al.*, 2008).

O programa permite ainda a seleção de uma região onde a medida deve ser realizada, denominada área de interesse. Assim, as áreas de interesse foram manualmente determinadas em cada campo, nas camadas interna, muscular e externa de cada via aérea e no parênquima peribrônquico e distal de cada caso, conforme ilustrado na figura 1. Foram medidas as áreas positivamente coradas em 10 campos selecionados aleatoriamente no aumento de 200 vezes em cada camada das vias aéreas grandes e em toda a circunferência das vias aéreas pequenas em cada caso.

No parênquima alveolar a positividade da reação foi medida em duas regiões: 1) parênquima peribrônquico, correspondendo aos acoplamentos alveolares nas pequenas vias aéreas e 2) parênquima distal, correspondendo aos septos alveolares que distavam pelo menos um campo microscópico de 100x das vias aéreas. Foram medidos em cada caso 10 septos alveolares peribrônquicos e 10 septos alveolares distais. A área positiva para uma determinada proteína foi corrigida pela área total da camada ou septo correspondente (área positiva em μm^2 / área total em μm^2) e a área fracionada foi expressa em porcentagem de área positiva. As

medidas foram realizadas por um observador cego para os grupos estudados.

Para a análise da coloração dos anticorpos colágeno IV e tenascina, foi analisado a área subepitelial (definida como uma região 12 μm abaixo da camada epitelial) e a camada muscular das grandes vias aéreas, camada interna e muscular das pequenas vias aéreas e o parênquima peribrônquico e distal. A camada interna e externa das vias aéreas são regiões muito ricas em vasos sanguíneos e estes abundantes em colágeno IV e tenascina em suas paredes. Portanto, para evitar a mensuração do colágeno IV e tenascina nos vasos brônquicos, não foi analisada a camada interna das VAG e a camada externa tanto das VAG quanto das VAP. Como a camada interna das VAP é uma região muito delgada, acredita-se que a mensuração desta camada como um todo analisa, basicamente, a membrana basal epitelial da via aérea.

3.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS 15.0 (SPSS, Chigago, Illinois, EUA). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade da amostra. Foi realizado o teste de One-way Anova ou de Kruskal-Wallis para comparar a área fracionada de cada proteína entre os três grupos estudados, dependendo da distribuição dos

dados. Para discriminar a diferença entre os grupos, utilizou-se o pós-teste de Bonferroni. A fim de determinar as diferenças entre fumantes e ex-fumantes foram utilizados os testes t de Student ou de Mann-Whitney e para estudar a associação entre os dados morfológicos e clínicos bem como história tabágica, idade, e prova de função pulmonar foram utilizados os testes de Pearson e Spearman. As áreas fracionadas dos componentes da MEC foram comparadas entre as grandes e pequenas vias aéreas e entre o parênquima peribrônquico e distal através do teste t pareado. O nível de significância foi estabelecido como $p \leq 0,05$ e os resultados expressos como mediana (intervalo interquartil) ou média $\pm$ DP.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Casuística

As características demográficas e clínicas dos indivíduos estudados estão demonstradas na tabela 3. O gênero dominante no grupo controle foi o sexo feminino, diferentemente dos outros dois grupos. A média de idade do grupo controle foi significativamente menor quando comparado aos grupos de fumantes não obstruídos e DPOC ($p \leq 0,007$). Todos os indivíduos do grupo controle eram não fumantes, no grupo de fumantes não-obstruídos 10 eram tabagistas e 16 ex-tabagistas e no grupo DPOC, 14 indivíduos eram tabagistas e 12 ex-tabagistas. A média de consumo de cigarros no grupo de fumantes não-obstruídos foi de 60 ± 34 anos/maço e de 67 ± 33 anos/maço no grupo DPOC.

As médias dos valores de VEF_1 foram de 108% no grupo controle, 97% no grupo de fumantes não-obstruídos e 65% no grupo DPOC. Como esperado, os valores de VEF_1 e da relação VEF_1/CVF foram menores no grupo DPOC quando comparado aos demais grupos. O uso de corticóides foi incerto em 22 indivíduos. No grupo DPOC cinco (19%) pacientes receberam corticóide inalatório e, em três (11%) indivíduos, a via de administração foi desconhecida.

Tabela 3 - Dados demográficos e clínicos dos grupos estudados

	CTRL	FNO	DPOC
Indivíduos, n (M/F)	16 (4/12)	26 (19/7)	26 (24/2)
Idade (anos)	52±13*	62±8	67±9
Não tabagistas/ Tabagistas/Ex-tabagistas	16/0/0	0/10/16	0/14/12
Tabagismo (anos/maço)	-	60±34	67±33
VEF₁ (% pred)	108,3±16,8	97,2±11,4	65,4±13,8 [#]
VEF₁/CVF %	83,4±7,6	77,5±6,5	58,3±9,8 [#]

Valores expressos em média±DP ou conforme especificado.

CTRL: grupo controle; FNO: grupo de fumantes não-obstruídos; DPOC: grupo DPOC.

F: feminino; M: masculino. *p≤0,007: grupo controle comparado aos outros grupos. #: p≤0,0001: grupo DPOC comparado aos outros grupos.

VEF₁ % pred: volume expiratório forçado no primeiro segundo (% do VEF₁ predito); CVF: capacidade vital forçada.

4.2 Morfometria

Amostras apropriadas de tecido pulmonar, ou seja, aquelas que continham grandes e pequenas vias aéreas cortadas transversalmente foram encontradas em 14 a 26 casos do grupo DPOC, 8 a 26 pacientes do grupo de fumantes não-obstruídos e em 9 a 16 indivíduos do grupo controle, dependendo da proteína analisada. Foram analisadas 46 a 67 (média de 58) vias aéreas grandes e 137 a 157 (média 147) vias aéreas pequenas em

cada anticorpo estudado, perfazendo um total de 578 VAG e 1465 VAP mensuradas.

Os perímetros médios das vias aéreas grandes dos grupos controle, fumantes não-obstruídos e DPOC foram $11,8 \pm 4,6$ mm, $7,4 \pm 1,5$ mm e $11,3 \pm 5,3$ mm ($p=0,39$), respectivamente. Nas vias aéreas pequenas o perímetro médio foi de $1,9 \pm 0,8$ mm no grupo controle, $2,1 \pm 1,0$ mm no grupo de fumantes não-obstruídos e $2,0 \pm 1,4$ mm no grupo DPOC ($P=0,64$). Não houve diferença significativa entre os perímetros das VAG e VAP entre os três grupos estudados.

Os comprimentos totais dos septos alveolares peribrônquicos e distais avaliados foram de 12,8 mm e 17,4 mm no grupo controle, 12,2 mm e 15,7 mm nos fumantes não-obstruídos e 12,9 mm e 17,3 mm no grupo DPOC, sem diferença entre os grupos ($p=0,363$ e $p=0,084$, respectivamente).

4.3 Fibras elásticas

Os dados de área fracionada de fibras elásticas nas VAG, VAP e parênquima pulmonar dos três grupos analisados estão sumarizados na tabela 4, anexo B.

O grupo de fumantes não-obstruídos apresentou maior área fracionada de fibras elásticas em todos os compartimentos analisados em comparação aos outros dois grupos (figura 2).

Figura 2. Fotomicrografias das grandes vias aéreas (A, B e C), pequenas vias aéreas, parênquima peribronquial (D, E e F) e do parênquima distal (G, H e I) coradas para marcação de fibras elásticas dos grupos controle (A, D e G), fumantes não obstruídos (B, E e H) e DPOC (C, F e I). Barra de escala = 50 μ m.

A expressão de fibras elásticas foi maior no grupo de fumantes não obstruídos comparada aos grupos controle e DPOC nas camadas interna ($p < 0,03$), muscular ($p < 0,0001$) e externa ($p < 0,001$) das grandes e pequenas vias aéreas, bem como no parênquima peribronquial ($p < 0,004$) e no parênquima distal ($p < 0,02$). Não houve diferença significativa na área fracionada de fibras elásticas entre os grupos controle e DPOC (gráfico 1).

Gráfico 1. Área fracionada (%) de fibras elásticas nas camadas interna (CI), muscular (CM) e externa (CE) das vias aéreas grandes (A) e das vias aéreas pequenas (B), e no parênquima peribrônquico (PP) e distal (PD) (C) dos grupos controle (▨), fumantes não obstruídos (▩) e DPOC (□). *:p≤0,03; **:p≤0,0001; ***:p≤0,001; #:p≤0,004; ##: p≤0,02, comparado aos demais grupos. Dados apresentados em média e desvio padrão.

4.3.1 Comparação da área fracionada de fibras elásticas entre os compartimentos analisados

No grupo controle a densidade de fibras elásticas foi maior nas camadas interna, muscular e externa ($p < 0,05$, $p < 0,03$ e $p = 0,007$, respectivamente) das pequenas vias aéreas quando comparada à densidade das mesmas camadas das grandes vias aéreas. No grupo de fumantes não obstruídos as camadas interna ($p = 0,008$) e externa ($p < 0,03$) das VAP apresentaram maior expressão de fibras elásticas quando comparadas as VAG. Entre os indivíduos do grupo DPOC, a área fracionada de fibras elásticas foi significante maior nas camadas muscular ($p < 0,03$) e externa

($p < 0.0001$) das VAP do que nas VAG e menor no parênquima distal em comparação ao parênquima peribrônquico ($p < 0,02$; tabela 4).

4.4 Fibras Colágenas

A tabela 4, anexo B, mostra os valores de área fracionada das fibras colágenas (colágeno I, III e IV) nas VAG, VAP e parênquima pulmonar dos três grupos analisados.

A área fracionada de colágeno I foi menor na camada interna das VAG e nas camadas interna e muscular das VAP de indivíduos com DPOC quando comparados a controles ($p = 0,01$, $p = 0,004$, $p = 0,03$, respectivamente). Na camada externa das VAP, a expressão de colágeno I foi menor tanto no grupo DPOC quanto no grupo de fumantes não obstruídos quando comparados ao grupo controle ($p \leq 0,01$; figura 3 e gráfico 2).

Não houve diferença entre os grupos nas áreas fracionadas de colágeno III e IV em nenhum compartimento analisado.

Figura 3. Fotomicrografias das grandes vias aéreas (A, B e C) e das pequenas vias aéreas (D, E e F) coradas para marcação de colágeno I dos grupos controle (A e D), fumantes não obstruídos (B e E) e DPOC (C e F). Barra de escala = 50 μ m.

Gráfico 2. Área fracionada (%) de colágeno I na camada interna (CI) das vias aéreas grandes (A), nas camadas interna (A), muscular (B) e externa (A) das vias aéreas pequenas dos grupos controle (▨), fumantes não obstruídos (▩) e DPOC (□). *: $p=0.01$ comparado ao grupo controle; **: $p=0.004$ comparado ao grupo controle; #: $p\leq 0.01$ comparado aos grupos de fumantes não obstruídos e DPOC; ***: $p=0.03$ comparado ao grupo controle. Dados apresentados em média e desvio padrão (A) ou mediana e intervalo interquartil (B).

4.4.1 Comparação da área fracionada de fibras colágenas entre os compartimentos analisados

A comparação entre os compartimentos nos grupos controle e fumantes não obstruídos mostrou que a área fracionada de colágeno I foi significante maior nas camadas interna ($p=0,05$ e $p\leq 0,03$, respectivamente) e externa ($p=0,006$ e $p=0,008$, respectivamente) das pequenas vias aéreas quando comparado as mesmas camadas das vias aéreas grandes. No grupo DPOC, apenas a camada interna das VAP mostrou maior área fracionada de colágeno I do que as VAG ($p<0.02$).

No grupo DPOC observou-se maior área fracionada de colágeno III no parênquima distal em comparação com o parênquima peribrônquico ($p<0,04$).

Não houve diferenças entre a área fracionada de colágeno IV entre os compartimentos e grupos analisados.

4.5 Proteoglicanos

Houve menor expressão de versicam apenas no parênquima distal de indivíduos do grupo DPOC quando comparados aos controles ($p<0,05$,

figura 5 e gráfico 3). Não houve diferença entre os grupos nos demais compartimentos.

Figura 4. Fotomicrografias do parênquima distal corado para marcação de versican dos grupos controle (A), fumantes não obstruídos (B) e DPOC (C). Barra de escala = 50 μ m.

Na análise dos demais proteoglicanos (decorina, lumican e biglicano) não houve diferença significativa entre os grupos estudados (tabela 6, anexo C).

Gráfico 3. Área fracionada (%) de versicam no parênquima distal dos grupos controle (▨), fumantes não obstruídos (▩) e DPOC (□). *: $p \leq 0,05$, comparado ao grupo controle. Dados apresentados como média e desvio padrão.

4.5.1 Comparação da área fracionada de proteoglicanos entre os compartimentos analisados

Nos grupos controle e DPOC a área fracionada de versicam foi maior na camada externa das pequenas vias aéreas quando comparada a mesma camada das grandes vias aéreas ($p=0,004$, $p=0,001$, respectivamente). O parênquima distal do grupo DPOC mostrou área fracionada de versicam menor do que o parênquima peribrônquico ($p \leq 0,03$).

No grupo controle a área fracionada de decorina foi maior no parênquima peribrônquico do que no distal ($p \leq 0,03$). Nos outros grupos não houve diferença entre os compartimentos quanto a expressão de decorina.

A comparação da área fracionada de biglicano entre os compartimentos não mostrou diferenças significativas em nenhum grupo.

A área fracionada de lumican foi maior apenas na camada externa das VAG em relação às VAP no grupo de fumantes não obstruídos ($p \leq 0,03$).

4.6 Glicoproteínas

A tabela 6, anexo D apresenta os valores de área fracionada de fibronectina e tenascina nas VAG, VAP e parênquima pulmonar dos três grupos analisados.

No grupo DPOC, a área fracionada de fibronectina foi significante maior nas camadas interna, muscular e externa das VAP quando comparado aos grupos controle e fumantes não obstruídos ($p < 0,02$, $p < 0,05$, $p < 0,04$, respectivamente) (figura 5, gráfico 4). Não houve diferença entre os grupos na área fracionada de fibronectina das vias aéreas grandes e do parênquima pulmonar.

Figura 5. Fotomicrografias das camadas interna (CI), muscular (CM) e externa (CE) de pequenas vias aéreas coradas para marcação de fibronectina dos grupos controle (A), fumantes não obstruídos (B) e DPOC (C). Barra de escala = 50 μ m.

Gráfico 4. Área fracionada (%) de fibronectina nas camadas interna (CI), muscular (CM) e externa (CE) das vias aéreas pequenas (VAP) dos grupos controle (▨), fumantes não obstruídos (▩) e DPOC (□).*: $p<0.02$; **: $p<0.05$; #: $p<0.04$, comparado aos grupos controle e fumantes não-obstruídos. Dados apresentados como média e desvio padrão.

A expressão de tenascina foi maior na área subepitelial das VAG ($p<0,02$) e na camada interna das VAP ($P<0,01$) dos indivíduos com DPOC comparado a controles (figura 6, gráfico 5). Na análise da camada muscular das VAG e VAP e do parênquima pulmonar, não houve diferença entre os grupos.

Figura 6. Fotomicrografias da área subepitelial das vias aéreas grandes (A, B e C) e da camada interna (CI) das vias aéreas pequenas (D, E e F) coradas para marcação de tenascina dos grupos controle (A e D), fumantes não obstruídos (B e E) e DPOC (C e F). Barra de escala = 50 μ m.

Gráfico 5. Área fracionada (%) de tenascina na área subepitelial das grandes vias aéreas (VAG) (A) e na camada interna (CI) das vias aéreas pequenas (VAP) (B) dos grupos controle (▨), fumantes não obstruídos (▩) e DPOC (□).*:p<0.02; **: p<0.01, comparado ao grupo controle. Dados apresentados como média e desvio padrão (A) e mediana e intervalo interquartil (B).

4.6.1 Comparação da área fracionada de glicoproteínas entre os compartimentos analisados

A comparação entre os compartimentos no grupo DPOC mostrou que a área fracionada de fibronectina foi significante maior na camada externa das VAP e no parênquima peribrônquico quando comparados a CE das VAG e ao parênquima distal, respectivamente ($p=0,005$ e $p=0,039$).

No grupo de fumantes não obstruídos, apenas o parênquima distal apresentou maior área fracionada de tenascina que o parênquima peribrônquico ($p=0,006$).

4.7 Correlações com dados clínicos

Foram observadas modestas correlações entre o VEF_1 predito e a área fracionada de colágeno I na CI das vias aéreas grandes ($r= 0,43$, $p=0,005$), na CI ($r= 0,29$, $p<0,03$) e na CE ($r= 0,32$, $p<0,02$) das vias aéreas pequenas (gráfico 6). A relação VEF_1/CVF correlacionou-se com a área fracionada de colágeno I na CI das vias aéreas grandes ($r=0,40$, $p=0,01$), nas CI ($r=0,36$, $p=0,005$), CM ($r= 0,28$, $p<0,04$) e CE ($r=0,48$, $P<0,0001$) das vias aéreas pequenas.

Gráfico 6. Correlações entre a área fracionada de colágeno I na camada interna (CI) das vias aéreas grandes (VAG) (A), camadas interna (B) e externa (CE) (C) das vias aéreas pequenas (VAP) e os valores de VEF_1 (% do predito [% pred]) dos grupos controle, fumantes não-obstruídos e DPOC.

A área fracionada de fibronectina nas CI ($r=-0,50$, $p<0,001$), CM ($r=-0,43$, $p=0,001$) e CE ($r=-0,50$, $p<0,001$) das vias aéreas pequenas correlacionou-se negativamente com o VEF₁ predito (gráfico 7), bem como com a relação VEF₁/CVF nas CI ($r=-0,42$, $p=0,001$), CM ($r=-0,40$, $p=0,001$) e CE ($r=-0,45$, $p<0,001$) das pequenas vias aéreas.

Foi observada uma correlação negativa entre relação VEF₁/CVF e a área fracionada de tenascina na área subepitelial das vias aéreas grandes ($r=-0,41$, $p=0,01$).

Correlações positivas foram observadas entre a idade e a área fracionada de fibronectina nas CI ($r=0,34$, $p=0,008$) e CE ($r=0,39$, $p=0,002$) das VAP, e entre a área fracionada de tenascina na área subepitelial das grandes vias aéreas ($r=0,40$, $p=0,01$). Além disso, observaram-se correlações negativas entre a idade e área fracionada de colágeno I na CI ($r=-0,32$, $p=0,01$) e na CE ($r=-0,36$, $p=0,004$) das pequenas vias aéreas.

Não foram observadas correlações entre a carga tabágica e os componentes da matriz extracelular.

Não houve diferenças significativas entre os sexos para a área fracionada de fibras elásticas, colágeno tipo I, vesicam, fibronectina e tenascina entre os grupos.

Gráfico 7. Correlações entre a área fracionada de fibronectina nas camadas interna (CI) (A), muscular (CM) (B) e externa (CE) (C) das vias aéreas pequenas (VAP) e os valores de VEF_1 (% do predito [% pred]) dos grupos controle, fumantes não-obstruídos e DPOC.

4.8 Correlações entre VAG, VAP e parênquima pulmonar

Com o intuito de investigar se o padrão da composição das proteínas da matriz extracelular era semelhante nos diferentes compartimentos pulmonares, testou-se a correlação entre a área fracionada de cada proteína nas vias aéreas grandes, vias aéreas pequenas e no parênquima pulmonar.

No grupo DPOC, a área fracionada de fibras elásticas nas pequenas vias aéreas correlacionou-se positivamente com a área fracionada de fibras elásticas no parênquima pulmonar ($r=0,77$, $p<0,0001$). Correlações positivas foram observadas na área fracionada de versicam entre VAP e VAG ($r=0,61$, $p<0,02$) e entre VAP e o parênquima pulmonar ($r=0,72$, $p<0,0001$). Além disso, foram observadas correlações positivas entre a área fracionada de fibronectina entre VAP e parênquima pulmonar ($r=0,72$, $p<0,0001$). Correlações positivas foram observadas na área fracionada de tenascina entre VAG e o parênquima pulmonar ($r=0,61$ $p<0,02$).

4.9 Comparação entre tabagistas e ex-tabagistas

O tempo de cessação de fumo no grupo de ex-tabagistas teve mediana de 6 (2,25–10) anos. Não houve diferença entre a composição das proteínas da matriz extracelular de tabagistas ativos comparados a ex-tabagistas, independente do grau de obstrução na prova de função pulmonar.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Neste estudo quantificamos a expressão de fibras elásticas, colágenos I, III e IV, versicam, decorina, biglicano, lumican, fibronectina e tenascina nas vias aéreas grandes e pequenas e no parênquima pulmonar de indivíduos portadores de DPOC, de indivíduos fumantes não obstruídos e de indivíduos não fumantes. A expressão de fibras elásticas foi maior no grupo de fumantes não-obstruídos em relação ao grupo DPOC e controle. A área fracionada de colágeno I nas vias aéreas grandes e pequenas e de versicam no parênquima distal foi menor no grupo DPOC comparado ao grupo controle. Também foi demonstrado que a expressão de fibronectina foi maior nas pequenas vias aéreas de pacientes com DPOC em relação a fumantes não obstruídos e não fumantes. A área fracionada de tenascina foi maior na camada subepitelial das grandes vias aéreas e na camada interna das pequenas vias aéreas do grupo DPOC comparado ao controle. Além disso, a área fracionada de proteínas estruturais da matriz extracelular correlacionou-se com a prova de função pulmonar (VEF_1 e VEF_1/CVF). Nossos resultados indicam que a DPOC apresenta complexas alterações nas principais proteínas estruturais tanto nas pequenas quanto nas grandes vias aéreas, que podem contribuir para a lesão tecidual persistente e com a obstrução ao fluxo aéreo observado na DPOC.

No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a descrever, de forma abrangente, inúmeros componentes fibrilares e não-fibrilares da matriz

extracelular em toda a extensão da árvore brônquica e no parênquima proximal e distal de indivíduos portadores de DPOC leve a moderada.

A descoberta da associação entre enfisema pulmonar e deficiência de α_1 -antitripsina, através da instilação de enzimas elastolíticas nos pulmões de animais, com consequente desenvolvimento de enfisema, levou ao reconhecimento que a destruição das fibras elásticas é central na patogênese da DPOC (Shifren e Mecham, 2006). Inúmeros estudos demonstraram a perda de fibras elásticas no parênquima pulmonar de pacientes com DPOC (Chrzanowski *et al.*, 1980; Cardoso *et al.*, 1993). Ademais, Black e colaboradores (2008) examinaram porções distais de tecido pulmonar removidos de pacientes submetidos à ressecção cirúrgica por tumor pulmonar e demonstraram menor expressão de fibras elásticas nas VAP e no parênquima pulmonar de pacientes com DPOC quando comparados a fumantes “saúdáveis”. Além disso, essa redução estava associada a redução do VEF_1 e da relação VEF_1/CVF , o que sugere que a perda de fibras elásticas nas pequenas vias aéreas contribui para a obstrução ao fluxo aéreo característico da DPOC. Nosso estudo corrobora e complementa o trabalho de Black *et al.* (2008) uma vez que demonstramos menor expressão de fibras elásticas no parênquima pulmonar, nas pequenas e nas grandes vias aéreas de indivíduos com DPOC comparados a fumantes não obstruídos. Entretanto, quando comparamos o grupo DPOC com o grupo controle, não encontramos diferenças significativas em relação à área fracionada de fibras elásticas.

Deslee e colaboradores (2009) demonstraram que o pulmão de pacientes com DPOC muito grave expressaram maior quantidade de RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) de elastina. Contudo os autores não observaram aumento na densidade de fibras elásticas em relação ao volume total de pulmão e na quantidade de desmosina, marcador biológico de degradação da elastina. Com esses resultados, os autores sugerem que a maior expressão gênica de elastina não se traduz em um reparo eficiente das fibras elásticas em pacientes com DPOC muito grave. Enquanto fumantes sem DPOC parecem ser capazes de aumentar a área fracionada de fibras elásticas como resposta a lesão relacionada ao tabagismo, os nossos resultados e de Deslee *et al.* (2009) sugerem que o mesmo não aconteça no pulmão de pacientes com DPOC. Interessantemente, Cantor *et al.* (2010) demonstraram em um modelo experimental animal a proliferação de fibras elásticas nas grandes vias aéreas de camundongos expostos a fumaça de cigarro por três meses consecutivos.

Alterações qualitativas das fibras elásticas também têm sido descritas nos pulmões de pacientes enfisematosos e em modelos animais de enfisema pulmonar (Fukuda *et al.*, 1989; Finlay *et al.*, 1996), demonstrando que o processo de lesão e reparo das fibras elásticas pode ser insuficiente para preservar a estrutura alveolar nos indivíduos com DPOC. No presente estudo não se avaliou a ultra-estrutura das fibras elásticas, porém especula-se que as fibras elásticas dos pulmões de pacientes com DPOC apresentem alterações de integridade e organização em comparação com as dos grupos controle e fumantes não-obstruídos. Estudos prévios demonstraram que a

quebra de fibras elásticas pode ocorrer em fumantes com ou sem DPOC, tanto nas vias aéreas pequenas como no parênquima pulmonar (Gottlieb *et al.*, 1996; Boschetto *et al.*, 2006).

Os colágenos I e III são os colágenos fibrilares mais abundantes na matriz extracelular dos pulmões cuja principal função é prover força tênsil a todas as estruturas distensíveis dos pulmões. A análise dos colágenos revelou menor área fracionada de colágeno I na camada interna das VAG, nas camadas interna, muscular e externa das VAP do grupo DPOC e na camada externa das pequenas VA do grupo de fumantes não obstruídos quando comparados aos mesmos compartimentos pulmonares de indivíduos do grupo controle. A análise dos colágenos III e IV não mostrou diferença entre os três grupos estudados. Os resultados da expressão de colágenos no parênquima pulmonar são conflitantes. Enquanto alguns autores demonstraram aumento no conteúdo de colágeno nos septos alveolares de pacientes com DPOC (Lang *et al.*, 1994; Vlahovic *et al.*, 1999), outros não verificaram diferenças entre indivíduos DPOC e controles (van Straaten *et al.*, 1999). Entretanto, poucos estudos têm focado nos diferentes subtipos de colágenos nas vias aéreas de pacientes com DPOC.

Ao analisar o conteúdo de colágeno total, ou seja, utilizando a coloração de Picro-Sirius que marca todos os tipos de colágenos, Hogg e colaboradores (2009) evidenciaram menor conteúdo de colágeno total no tecido bronquiolar de indivíduos com DPOC muito grave quando comparados a controles. Além disso, o declínio de colágeno total foi associado a diminuição da relação entre colágeno I e colágeno III nas

pequenas vias aéreas de pacientes com DPOC muito grave. Enquanto a relação colágeno I/colágeno III era cerca de 1 nos controles, nos indivíduos com DPOC foi de 0,44, indicando que a diminuição de colágeno I sobrepôs-se a de colágeno III nas VAP destes pacientes.

Mais recentemente, o mesmo grupo de autores estudou a expressão gênica de componentes do tecido de reparo no pulmão de portadores de diferentes estágios de DPOC. Gosselink e colaboradores (2010) encontraram menor expressão dos genes de colágeno 1 alfa 1 (COL1A1) e de colágeno 3 alfa 1 (COL3A1) associados a diminuição do VEF₁, no tecido peribronquiolar e nas pequenas vias aéreas, respectivamente. Os autores sugerem que o espessamento das pequenas vias aéreas na DPOC, não pode ser associado à expressão de genes relacionados à fibrogênese. No presente estudo, a área fracionada de colágeno I nas vias aéreas de pacientes com DPOC leve/moderada foi menor do que nos indivíduos controles. Além disso, a correlação entre a área fracionada de colágeno I com a função pulmonar sugere que a perda de colágeno I nas vias aéreas pode contribuir para a obstrução ao fluxo aéreo observado nos portadores de DPOC.

As consequências funcionais do remodelamento das vias aéreas dependem da camada da parede das vias aéreas alterada, assim como da composição e das propriedades mecânicas do material que está alterado (Bai *et al.*, 1994). A camada interna, ou seja, aquela entre a membrana basal epitelial e a borda interna do músculo liso, oferece resistência ao tecido à compressão, a camada de músculo liso é geralmente alterada em doenças

pulmonares caracterizadas por broncoespasmo, e a camada externa, aquela entre a borda externa do músculo liso e os limites externos da via aérea, está diretamente ligada ao parênquima pulmonar e, portanto, crucial para a manutenção da estrutura do tecido pulmonar e para a transmissão de forças elásticas (De Medeiros Matsushita *et al.*, 2005).

A menor expressão de colágeno I na camada interna das VAG e em todos os compartimentos das VAP de pacientes com DPOC, em comparação com o grupo controle, foi observada no presente estudo. A perda de proteínas estruturais das vias aéreas pulmonares, como o colágeno I, pode levar a uma redução da rigidez das vias aéreas, tornando-os mais frouxas e, portanto, mais suscetíveis a forças externas aplicadas durante a expiração normal, o que favoreceria o colapso das mesmas. Além disso, observamos menor área fracionada de colágeno I na camada externa das VA pequenas no grupo de fumantes não obstruídos em comparação com o grupo controle. Uma possível explicação para isso seria que as alterações estruturais na CE das pequenas vias aéreas podem favorecer o desacoplamento do parênquima alveolar com as vias aéreas descrita previamente no pulmão de fumantes sem DPOC (Saetta *et al.*, 1985).

O versicam, um proteoglicano com múltiplas funções tanto no desenvolvimento quanto no reparo tecidual, mostrou-se em menor quantidade apenas no parênquima distal de pacientes com DPOC em comparação ao grupo controle. Um estudo recente demonstrou que, durante o desenvolvimento pulmonar, os níveis de versicam diminuem associados à diminuição do volume de tecido pulmonar e acompanhada por uma

diminuição no volume de tecido hidratado. Essa diminuição precede o aumento do conteúdo de elastina e é essencial para determinar as características estruturais do tecido pulmonar em formação (Faggian *et al.*, 2007). Em indivíduos com DPOC leve e moderada, Merrilees e colaboradores (2008) observaram essa mesma relação entre versicam e fibras elásticas, com aumento de versicam e diminuição da expressão de fibras elásticas no parênquima destes pacientes em comparação com fumantes sem a doença. Entretanto, como este estudo utilizou metodologias diferentes para quantificar a expressão de fibras elásticas (análise quantitativa) e de versicam (análise semi-quantitativa), questiona-se se tais medidas são passíveis de comparação.

Os proteoglicanos decorina, biglicano e lumican desempenham um papel importante na interação das fibrilas de colágeno entre si e com outros componentes da matriz extracelular (Grover *et al.*, 1995). No estudo de van Straaten *et al.* (1999) a expressão de decorina e biglicano na região peribrônquica mostrou-se menor nos pulmões de indivíduos com DPOC grave em relação a indivíduos com DPOC leve, controles e com fibrose pulmonar, entretanto sem alteração na quantidade de colágenos I, III e IV entre os grupos. Em um segundo estudo, Noordhoek e colaboradores (2005) demonstraram, *in vitro*, que a produção de decorina pelos fibroblastos de indivíduos com DPOC grave é maior em situações basais e tem uma regulação negativa mais proeminente quando estimulado com TGF- β comparados a fibroblastos de indivíduos com DPOC leve. A disfunção intrínseca da regulação da produção de decorina por citocinas na DPOC

leve e grave pode ser causada por diferenças nas vias de transdução de sinal intracelular na modulação gênica destas proteínas (Zandvoort *et al.*, 2008). O presente estudo, o primeiro do nosso conhecimento a descrever a expressão destes pequenos proteoglicanos em todo o trato respiratório inferior, demonstrou área fracionada similar de decorina, biglicano e lumican no pulmão de indivíduos com DPOC leve/moderada quando comparados a indivíduos sem a doença, fumantes ou não. É possível que alterações nestes proteoglicanos surjam apenas nas formas mais graves da doença pulmonar obstrutiva crônica.

A detecção de maior expressão de fibronectina nas VAP do grupo DPOC comparados aos demais grupos e de tenascina na área subepitelial das VAG e na camada interna das VAP do grupo DPOC em relação ao grupo controle sugerem que estas glicoproteínas podem contribuir para o remodelamento brônquico da DPOC. A tenascina e a fibronectina desempenham um papel importante na regulação morfológica durante o desenvolvimento pulmonar. Na vida adulta, é sabido que ambas as proteínas podem estar alteradas após lesão e inflamação tecidual a fim de regular a adesão, migração e diferenciação celular (Jones e Jones, 2000). Estudos anteriores demonstraram que a expressão de tenascina está alterada em fumantes “saudáveis” (Amin *et al.*, 2003; Liesker *et al.*, 2009). Nossos dados confirmam que a exposição à fumaça de cigarro pode estar associada a maior expressão de tenascina nas grandes e pequenas vias aéreas, com diferenças significativas no grupo DPOC. Além disso, a tenascina e a fibronectina parecem induzir a expressão e atividade de metaloproteinases,

provavelmente contribuindo para a perpetuação da lesão tecidual na DPOC (Jones e Jones, 2000). A correlação inversa entre a área fracionada de tenascina e fibronectina com a prova de função pulmonar demonstrada neste estudo reforça essas suposições.

Uma vez que biópsias brônquicas de grandes vias aéreas têm sido utilizadas para fins de pesquisas na DPOC (Saetta *et al.*, 1993; Keatings *et al.*, 1996), uma importante questão a ser respondida é se a composição de matriz extracelular é similar nas regiões proximais e no pulmão distal na DPOC. Neste estudo demonstramos diferenças análogas, entre DPOC e controles, na composição de fibras elásticas, colágeno I e tenascina nas vias aéreas grandes e pequenas, o que sugere que o remodelamento da MEC nas vias aéreas grandes é similar ao das vias aéreas pequenas na DPOC. Entretanto, as principais correlações no padrão de composição das proteínas da MEC na DPOC foram encontradas entre as vias aéreas pequenas e o parênquima pulmonar. Especulamos que os mecanismos que regulam a composição da MEC no pulmão distal de pacientes com DPOC podem ser semelhantes nas pequenas vias aéreas e no parênquima pulmonar.

Ao compararmos o grupo de fumantes não-obstruídos com o grupo controle percebemos maior área fracionada de fibras elásticas em todos os compartimentos analisados e menor área fracionada de colágeno I na camada externa das VAP. Em comparação ao grupo DPOC, o grupo de fumantes não-obstruídos também apresentou maior área fracionada de fibras elásticas em todos os compartimentos e menor quantidade de

fibronectina em todas as camadas das VAP. Ao observar os gráficos de área fracionada das proteínas da MEC analisadas neste estudo (exceto das fibras elásticas) fica clara a posição intermediária do grupo de fumantes não-obstruídos, ou seja, o padrão de composição das proteínas da MEC neste grupo é intermediário entre o padrão dos grupos controles e DPOC. Tal observação pode exprimir a influência do tabagismo sobre o remodelamento brônquico que também ocorre nas vias aéreas de fumantes sem DPOC.

A cessação do tabagismo é a única intervenção capaz de reduzir o declínio do VEF_1 e, conseqüentemente, a progressão da DPOC (Willemse *et al.*, 2004). Os pacientes que param de fumar apresentam menos sintomas respiratórios e hiperresponsividade do que aqueles que continuam a fumar (Kanner *et al.*, 1999). No pulmão de pacientes com DPOC, Lapperre e colaboradores (2006) demonstraram que, após longo período de cessação do tabagismo ($\geq 3,5$ anos), o número de linfócitos CD8 diminui e há aumento de células plasmáticas. Como a resposta inflamatória parece influenciar diretamente o remodelamento das proteínas da matriz extracelular, hipotetizamos que o estado tabágico poderia correlacionar-se com a composição da MEC. Ao contrário do que imaginamos, não encontramos diferenças entre a composição das proteínas da MEC de tabagistas e ex-tabagistas tanto no grupo DPOC quanto no grupo de fumantes não-obstruídos. Resultados preliminares de um estudo em andamento, cujo objetivo é estudar o remodelamento da MEC de indivíduos com DPOC após 30 meses de uso de corticosteróides, corroboram nossos achados, uma vez que os autores demonstraram que o conteúdo das proteínas da MEC em

fumantes e ex-fumantes com DPOC não diferem entre si, sugerindo que o tabagismo ativo não afeta o comportamento da MEC em pacientes com DPOC (Kunz *et al.*).

Certamente o presente estudo apresenta limitações. É difícil o acesso ao tecido pulmonar de pacientes com DPOC grave e muito grave, pois tais pacientes raramente são submetidos a ressecções pulmonares cirúrgicas devido ao alto risco de complicações. Os estudos que incluem esse grupo de pacientes geralmente coletam material pulmonar de pacientes submetidos a transplante pulmonar. A comparação entre a composição da matriz extracelular nos pulmões de indivíduos com DPOC leve a moderada e indivíduos com DPOC grave e muito grave poderia contribuir para o melhor entendimento do remodelamento da MEC na progressão da doença.

A pressão de recolhimento elástico dos pulmões parece diminuir com a idade (Janssens *et al.*, 1999). Possíveis explicações para os efeitos do envelhecimento na função pulmonar incidem sobre as alterações no tecido conectivo do pulmão. Verbeken e colaboradores (1992) demonstraram aumento homogêneo dos espaços aéreos, espessamento das paredes alveolares e uma redução do número de vias aéreas periféricas nos pulmões de indivíduos idosos, sem histórico de enfisema. Outra limitação deste estudo foi a idade do grupo controle, significativamente menor do que os demais grupos estudados, o que significa que as alterações da MEC decorrentes da idade não foram controlados. No entanto, ao incluir um grupo de fumantes sem DPOC com igual idade e carga tabágica do grupo DPOC, acreditamos que as diferenças na composição da matriz extracelular

encontradas neste estudo estejam mais relacionadas a doença em si do que a idade, de outro modo, os resultados encontrados no grupo DPOC coincidiriam com aqueles encontrados no grupo fumantes não obstruídos, o que não foi observado.

Embora alguns dos pacientes com DPOC não apresentavam prova de função pulmonar pós-broncodilatador, a DPOC foi diagnosticada por um pneumologista em todos os casos. Esses pacientes não apresentavam história de asma na infância ou adolescência e os sintomas (tosse e/ou dispnéia) iniciaram após longo período de tabagismo. Além disso, os achados histológicos foram compatíveis com DPOC e não foram sugestivos de asma.

Houve uma diferença na proporção de gênero entre os três grupos estudados com predominância de indivíduos do sexo masculino nos grupos de fumantes não obstruídos e DPOC e de indivíduos do sexo feminino no grupo controle. Está bem estabelecido na literatura o fato de que mulheres com DPOC apresentam a mesma perda de função pulmonar apesar da menor carga tabágica quando comparadas aos homens (Han *et al.*, 2007; Camp *et al.*, 2009). Portanto, é possível que a diferença de gêneros entre os grupos analisados possa ter subestimado nossos resultados.

Em resumo, nossos resultados mostram que importantes alterações nas principais proteínas da matriz extracelular ocorrem em todos os compartimentos pulmonares de indivíduos com DPOC leve a moderada. Enquanto alguns componentes da MEC do pulmão de portadores de DPOC estão diminuídos (fibras elásticas, colágeno I e versicam) tanto em

comparação a fumantes quanto não fumantes, outros, envolvidos na regulação da adesão e inflamação celular (fibronectina e tenascina) estão aumentados. A partir desses resultados sugere-se que as alterações da MEC relacionam-se não somente a deterioração da função pulmonar, mas também ao aumento da inflamação e (diretamente através dos efeitos sobre as MMP) da perpetuação da lesão tecidual nos pulmões de pacientes com DPOC leve a moderada.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Os principais componentes da matriz extracelular (fibras elásticas, colágeno I, versicam, fibronectina e tenascina) estavam alterados nos pulmões de pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica leve a moderada.
 - Pacientes com DPOC leve a moderada apresentaram menor área fracionada de fibras elásticas em todo o trato respiratório inferior em comparação a fumantes sem a doença, entretanto, sem diferença quando comparados a controles não fumantes. Fumantes sem DPOC apresentaram maior expressão de fibras elásticas nas vias aéreas grandes e pequenas e no parênquima pulmonar em relação a não fumantes e indivíduos com DPOC.
 - A área fracionada de colágeno I nos pulmões de indivíduos com DPOC leve a moderada foi menor na camada interna das vias aéreas grandes e em todas as camadas das vias aéreas pequenas em relação a indivíduos não fumantes. Fumantes sem DPOC apresentaram menor expressão de colágeno I na camada externa das vias aéreas pequenas comparados a controles não fumantes.

- A expressão de versicam foi menor apenas no parênquima distal de pacientes com DPOC leve a moderada comparados a indivíduos não fumantes.
- Pacientes com DPOC leve a moderada apresentaram maior área fracionada de fibronectina em todas as camadas das vias aéreas pequenas quando comparados a indivíduos fumantes e não fumantes.
- A expressão de tenascina foi maior na área subepitelial das vias aéreas grandes e na camada interna das vias aéreas pequenas de pacientes com DPOC leve a moderada em relação a controles não fumantes.
- A menor expressão de colágeno I, bem como a maior área fracionada de fibronectina e tenascina nas vias aéreas grandes e pequenas foram correlacionadas com o grau de obstrução ao fluxo aéreo de pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica leve a moderada.
- A carga tabágica, sexo e estado tabágico não foram associados às alterações da composição das proteínas da matriz extracelular em pacientes com DPOC leve a moderada.
- A idade dos pacientes com DPOC leve a moderada correlacionou-se positivamente com a área fracionada de fibronectina nas vias aéreas pequenas e de tenascina nas vias aéreas grandes, e negativamente com a expressão de colágeno I nas vias aéreas pequenas.

- As alterações na composição de fibras elásticas e fibronectina foram similares nas vias aéreas pequenas e no parênquima pulmonar de pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica leve a moderada.
- Nos pacientes com DPOC leve a moderada, a expressão de versicam nas vias aéreas pequenas correlacionou-se positivamente com a expressão de versicam nas vias aéreas grandes e no parênquima pulmonar.
- A composição da tenascina nas vias aéreas grandes associou-se à composição no parênquima pulmonar de pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica leve a moderada.

Anexos

7. ANEXOS

Anexo A. Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq – HCFMUSP)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.02.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **038/06**, intitulado: "Análise estrutural da matriz extracelular em pequenas e grandes vias aéreas de pacientes portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)." apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Thaís Mauad**
Pesquisador(a) Executante: **Sra. Karen Yumi Mota Kimotoeira**

CAPPesq, 23 de Fevereiro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
/VCN

Diretoria Clínica Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq.**PARECER****PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 038/06****SESSÃO: 06.05.09**

TÍTULO DA PESQUISA: "Análise estrutural da matriz extracelular em pequenas e grandes vias aéreas de pacientes portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)"

Pesquisador (a) Responsável : Profa. Dra. Thaís Mauad

DEPARTAMENTO: Patologia

DOCUMENTO(S) ANALISADO(S):

- ✓ Carta datada de 12.02.09 – alteração do pesquisador executante de Karen Yumi Mota Kimoto, para Raquel Annoni
- ✓ Adendo ao Projeto: mudança de título para: Análise estrutural da matriz extracelular em pequenas e grandes vias aéreas e no parênquima pulmonar de pacientes portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)
- ✓ Relatório parcial

COMENTÁRIOS:**CONCLUSÃO:**☐ DEVOLVER**XX** CIENTE

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo B. Tabela 4. Área fracionada de fibras elásticas, colágeno I, III e IV (%) nas grandes e pequenas vias aéreas e no parênquima pulmonar dos grupos controle (CTRL), fumantes não-obstruídos (FNO) e DPOC.

	CI-VAG ^o	CM-VAG	CE-VAG	CI-VAP	CM-VAP	CE-VAP	PP	PD	$p^{\Delta\Delta}$
Fibras Elásticas									
CTRL	13,2±7,8	2,7±2,3	4,9±5,3	23,5±13,7*	5,1±4,1 [#]	14,1±11,4 [¶]	10,3±6,3	11,1±8,8	<0,05
FNO	25,1±11,4	11±5,2	15±7,8	37,2±13,9*	18,3±12,6	30,4±13,3 [¶]	22,9±13,9	20,5±12,4	<0,03
DPOC	14,2±7,8	3,1±2,5	3,5±2,6	22,8±13,7	6,6±5,7 [#]	18,1±9,1 [¶]	11±7,8	7,9±5,3 [§]	<0,03
p^{Δ}	<0,03 [□]	<0,0001 [□]	<0,001 [□]	<0,03 [□]	<0,0001 [□]	<0,001 [□]	<0,004 [□]	<0,02 [□]	-
Colágeno I									
CTRL	14,7±11,6	9,5(18)	19±9,8	25,4±17,7*	8,6(14)	34,1±15,8 [¶]	8±4,7	6,7±4,4	≤0,05
FNO	7,8±6,3	2(7)	11±7,7	17,4±12*	4,3(10)	21,7±11,6 [¶]	7,1±6	5,7±4,6	<0,03
DPOC	5,3±5	1,8(5)	12,3±10,4	11±8,6*	3,7(7)	17,6±9,3	5,5±3,1	4,9±3,5	<0,02
p^{Δ}	0,01 [‡]	0,135	0,135	0,004 [‡]	0,03 [‡]	≤0,01 [†]	0,311	0,473	-

Colágeno III									
CTRL	12,3±10,8	2,6(14)	18,7±14,5	8,6(13)	1,9(7)	14,4±12	0,8(3)	1(4)	0,85
FNO	10,9±9,1	1(2)	11,9±13,4	8,6(20)	2(3)	9,9±7,6	0,5(1)	1,7(3)	0,91
DPOC	13±15,8	0,8(12)	13±18,3	3(12)	1,3(6)	10,5±12,1	0,4(4)	1,6(6) [§]	<0,04
p^Δ	0,904	0,678	0,547	0,294	0,710	0,407	0,474	0,782	-
Colágeno IV									
CTRL	1,5(2)	31,6±20	-	1(2)	26,7±14,6	-	24,8±12,8	22,2±11,9	0,44
FNO	2,3(4)	27,6±15,7	-	1(2)	20,6±15,4	-	22,1±16	28,7±15,6	0,46
DPOC	2,1(6)	22,6±13,6	-	2,2(2)	19,8±15,7	-	26,7±13,3	20,6±10,7	0,34
p^Δ	0,597	0,324	-	0,326	0,36	-	0,556	0,137	-

Resultados expressos em média±DP ou mediana (intervalo interquartil). CTRL: grupo controle, FNO: grupo fumante não-obstruído, DPOC: grupo de pacientes com DPOC. CI: camada interna, CM: camada externa, CE: camada externa, VAG: via aérea grande, VAP: via aérea pequena, PP: parênquima peribrônquico, PD: parênquima distal. °: Para colágeno tipo IV esta célula corresponde à análise da área subepitelial. Δ: comparação entre os grupos. ΔΔ: comparação entre VAG e VAP ou entre PP e PD.

⌘	Diferença entre FNO e outros dois grupos	#	Diferença entre CM-VAP e CM-VAG dentro do grupo
‡	Diferença entre DPOC e CTRL	¶	Diferença entre CE-VAP e CE-VAG dentro do grupo
†	Diferença entre CTRL e outros dois grupos	§	Diferença entre PP e PD dentro do grupo analisado
*	Diferença entre CI-VAP e CI-VAG dentro do grupo		

Anexo C. Tabela 5. Área fracionada dos proteoglicanos versicam, decorina, biglicano e lumicam (%) nas grandes e pequenas vias aéreas e no parênquima pulmonar dos grupos controle (CTRL), fumantes não-obstruídos (FNO) e DPOC.

	CI-VAG	CM-VAG	CE-VAG	CI-VAP	CM-VAP	CE-VAP	PP	PD	$p^{\Delta\Delta}$
Versicam									
CTRL	25,9±16,9	7,8±8,6	9,7±6,8	38,6±22	17,6±20,3	25,1±16 [¶]	23,3±17,5	22,2±15,5	<0,005
FNO	27±20,7	14,3±21,6	21,1±17,9	36,1±21,1	13,9±12,8	26,1±16,9	17,1±14,8	13,9±13,5	0,96
DPOC	38,2±18,3	22,7±20,6	20,9±14,4	48,5±16,7	21,5±14,1	34,6±18,2 [¶]	20,8±13,9	10,9±8 [§]	<0,03
p^{Δ}	0,154	0,147	0,134	0,094	0,236	0,155	0,467	<0,05 [‡]	-
Decorina									
CTRL	11,6±13,1	7,2±7,4	19,3±14,9	15±14,1	6,6(10)	17,9±13,4	0,7(4)	4,4(10) [§]	<0,03
FNO	22,5±17,3	9,8±8,3	24,3±17,3	21,2±19,1	9(21)	20,1±15,1	2,8(7)	1,6(3)	0,59
DPOC	15,1±18,2	9±9,6	18,7±18,8	22,8±20,6	7,3(15)	18,6±15	1(3)	1,3(2)	0,92
p^{Δ}	0,296	0,782	0,674	0,442	0,286	0,882	0,444	0,102	-

Biglicano									
CTRL	16,6±18,9	4,7(14)	18,5±15,9	17,1±17,3	7,1(12)	21,8±14,3	9,6±8,4	12,9±12,3	0,56
FNO	18,3±15,3	5,7(8)	16,1±11,6	17,7±15,9	5,7(11)	17,9±14,7	7±6,1	7,7±6,4	0,94
DPOC	22,8±19,5	4,7(25)	17,9±16,1	18,6±20,3	4,9(15)	14,4±13,5	10±12,7	8,7±7,5	0,94
p^Δ	0,659	0,693	0,918	0,965	0,76	0,304	0,590	0,220	-
Lumicam									
CTRL	20,8±18	14,9±13,3	30,7±20,4	20,8±19,2	5,2(16)	21,8±16,4	4(12)	13,6(16)	0,56
FNO	31,9±27,4	16,9±15	37,5±26,8	26±21,2	7,3(16)	21,9±17,8 [¶]	4(7)	6,9(15)	<0,03
DPOC	26,1±19,4	21,2±17,3	30,2±20,2	31,2±22,6	10,1(20)	25,5±16,7	4,9(13)	6,9(7)	0,97
p^Δ	0,475	0,532	0,653	0,338	0,274	0,719	0,870	0,420	-

Resultados expressos em média±DP ou mediana (intervalo interquartil). CTRL: grupo controle, FNO: grupo fumante não-obstruído, DPOC: grupo de pacientes com DPOC. CI: camada interna, CM: camada externa, CE: camada externa, VAG: via aérea grande, VAP: via aérea pequena, PP: parênquima peribrônquico, Distal: parênquima distal. Δ: comparação entre os grupos. ΔΔ: comparação entre VAG e VAP ou entre PP e PD.

‡ Diferença entre grupo DPOC e grupo CTRL

¶ Diferença entre CE-VAP e CE-VAG dentro do grupo analisado

§ Diferença entre PP e PD dentro do grupo analisado

Anexo D. Tabela 6. Área fracionada de fibronectina e tenascina (%) nas grandes e pequenas vias aéreas e no parênquima pulmonar dos grupos controle (CTRL), fumantes não-obstruídos (FNO) e DPOC.

	CI-VAG ^o	CM-VAG	CE-VAG	CI-VAP	CM-VAP	CE-VAP	PP	PD	$p^{\Delta\Delta}$
Fibronectina									
CTRL	9,0±6,6	3,2±3,0	8,4±5,9	6,6±5,5	5,3±5,7	11,1±8,6	20±12,1	26,5±9,9	0,84
FNO	11,4±10,8	5,6±7,4	16,3±16,9	13,4±12,5	6,1±7,2	16,6±12,7	24,8±18,8	28,1±16,4	0,96
DPOC	18,3±14,1	9,6±7,4	17,2±12,3	24,6±15,7	11,3±9,6	26,3±14,5 [¶]	29,8±15,2	25,7±14,8 [§]	<0,04
p^{Δ}	0,136	0,074	0,284	<0,02*	<0,05*	<0,04*	0,240	0,862	-
Tenascina									
CTRL	24,4±25,8	6,6(18)	-	0,45(2)	15,3±14,9	-	3,7(12)	12,1±8,2	0,19
FNO	44,9±31,5	4,6(13)	-	13,9(4)	8,5±9,5	-	2,6(10)	11±10,7 [§]	≤0,006
DPOC	56,2±23,4	8,6(8)	-	25,6(11)	17,8±16,5	-	4,9(10)	10,2±7,4	0,33
p^{Δ}	<0,02 [‡]	0,451	-	<0,01 [‡]	0,075	-	0,646	0,853	-

Resultados expressos em média±DP ou mediana (intervalo interquartil). CTRL: grupo controle, FNO: grupo fumante não-obstruído, DPOC: grupo de pacientes com DPOC. CI: camada interna, CM: camada externa, CE: camada externa, VAG: via aérea grande, VAP: via aérea pequena, PP: parênquima peribrônquico, Distal: parênquima distal. ^o: Para tenascina esta

célula corresponde à análise da área subepitelial. Δ : comparação entre os grupos. $\Delta\Delta$: comparação entre VAG e VAP ou entre PP e PD.

- # Diferença entre DPOC e CTRL
- * Diferença entre DPOC e outros dois grupos (CTRL e FNO)
- ¶ Diferença entre CE-VAP e CE-VAG dentro do grupo analisado
- § Diferença entre PP e PD dentro do grupo analisado

Referências
Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amin K, Ekberg-Jansson A, Löfdahl C-G, Venge P. Relationship between inflammatory cells and structural changes in the lungs of asymptomatic and never smokers: a biopsy study. *Thorax*. 2003;58:135–142.

Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, Mulder A, Gomes HA, Fernezlian SM, James A, Mauad T. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J*. 2008;32:61-69.

Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, Zeng-Brouwers J, Eickelberg O, Young MF, Bruckner P, Pfeilschifter J, Schaefer RM, Gröne HJ, Schaefer L. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *Biol Chem*. 2009;284:24035-24048.

Bai A, Eidelman DH, Hogg JC, James AL, Lambert RK, Ludwig MS, Martin J, McDonald DM, Mitzner WA, Okazawa M, *et al*. Proposed nomenclature for quantifying subdivisions of the bronchial wall. *J Appl Physiol*. 1994;77:1011–1014.

Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003;22:672-688.

Battaglia S, Mauad T, van Schadewijk AM, Vignola AM, Rabe KF, Bellia V, Sterk PJ, Hiemstra PS. Differential distribution of inflammatory cells in large and small airways in smokers. *J Clin Pathol.* 2007;60:907-911.

Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;15:1360-1368.

Bhide VM, Laschinger CA, Arora PD, Lee W, Hakkinen L, Larjava H, Sodek J, McCulloch CA. Collagen phagocytosis by fibroblasts is regulated by decorin. *Biol Chem.* 2005;280:23103-23113.

Black PN, Ching PS, Beaumont B, Ranasinghe S, Taylor G, Merrilees MJ. Changes in elastic fibres in the small airways and alveoli in COPD. *Eur Respir J.* 2008;31:998-1004.

Boschetto P, Quintavalle S, Zeni E, Leprotti S, Potena A, Ballerin L, Papi A, Palladini G, Luisetti M, Annovazzi L, Iadarola P, De Rosa E, Fabbri LM, Mapp CE. Association between markers of emphysema and more severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2006;61:1037-42.

Buist AS, Vollmer WM, McBurnie MA. Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part I. The burden of obstructive lung disease (BOLD) initiative. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12:703-708.

Camp PG, O'Donnell DE, Postma DS. Chronic obstructive pulmonary disease in men and women: myths and reality. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6:535-538.

Cantor JO, Cerreta JM, Ochoa M, Ma S, Liu M, Turino GM. Therapeutic Effects of Hyaluronan on Smoke-induced Elastic Fiber Injury: Does Delayed Treatment Affect Efficacy? *Lung.* In press 2010.

Cardoso WV, Harmanjatinder SS, Hyde DM. Collagen and elastin in human pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147:975-981.

Chrzanowski P, Keller S, Cerreta J, Mandl I, Turino GM. Elastin content of normal and emphysematous lung parenchyma. *Am J Med.* 1980;69:351–359.

De Medeiros Matsushita M, da Silva LF, dos Santos MA, Fernezlian S, Schrumpf JA, Roughley P, Hiemstra PS, Saldiva PH, Mauad T, Dolhnikoff M. Airway proteoglycans are differentially altered in fatal asthma. *J Pathol.* 2005;207:102–110.

Deslee G, Woods JC, Moore CM, Liu L, Conradi SH, Milne M, Gierada DS, Pierce J, Patterson A, Lewit RA, Battaile JT, Holtzman MJ, Hogg JC, Pierce RA. Elastin expression in very severe human COPD. *Eur Respir J*. 2009;34:324-331.

Dolhnikoff M, Morin J, Roughley PJ, Ludwig MS. Expression of lumican in human lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;19:582-587.

Dunsmore SE. Treatment of COPD: a matrix perspective. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2008;3:113-122.

Faggian J, Fosang AJ, Zieba M, Wallace MJ, Hooper SB. Changes in versican and chondroitin sulfate proteoglycans during structural development of the lung. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293:R784-792.

Fernandes DJ, Bonacci JV, Stewart AG. Extracellular matrix, integrins, and mesenchymal cell function in the airways. *Curr Drug Targets*. 2006;7:567-577.

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;149:1405-14015.

Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *British Medical Journal*. 1977;1:1645-1648.

Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Disponível em:

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def> em 16/11/2010.

Fukuda Y, Masuda Y, Ishizaki M, Masugi Y, Ferrans VJ. Morphogenesis of abnormal elastic fibers in lungs of patients with panacinar and centriacinar emphysema. *Hum Pathol*. 1989;20:652-659.

Fust A, LeBellego F, Iozzo RV, Roughley PJ, Ludwig MS. Alterations in lung mechanics in decorin-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288:L159-166.

Gosselink JV, Hayashi S, Elliott WM, Xing L, Chan B, Yang L, Wright C, Sin D, Pare PD, Pierce JA, Pierce RA, Patterson A, Cooper J, Hogg JC. Differential Expression of Tissue Repair Genes in the Pathogenesis of COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181:1329-1335.

Gottlieb DJ, Stone PJ, Sparrow D, Gale ME, Weiss ST, Snider GL, O'Connor GT. Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative Aging Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:1290-5.

Grashoff WF, Sont JK, Sterk PJ, Hiemstra PS, de Boer WI, Stolk J, Han J, van Krieken JM. Chronic obstructive pulmonary disease: role of bronchiolar mast cells and macrophages. *Am J Pathol*. 1997;151:1785-1790.

Grover J, Chen XN, Korenberg JR, Roughley PJ. The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage. *J Biol Chem*. 1995;270:21942-21949.

Han MK, Postma D, Mannino DM, Giardino ND, Buist S, Curtis JL, Martinez FJ. Gender and chronic obstructive pulmonary disease: why it matters. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:1179-1184.

Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J*. 1992;6:861-870.

Hocking DC. Fibronectin Matrix Deposition and Cell Contractility. Implications for Airway Remodeling in Asthma. *Chest*. 2002;122;275S-278S.

Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;24:2645-2653.

Hogg JC, McDonough JE, Gosselink JV, Hayashi S. What drives the peripheral lung-remodeling process in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6:668-672.

Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2004;364:709-721.

Hogg JC. Role of latent viral infections in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:S71-75.

Hoogendoorn M, Rutten-van Molken MP, Hoogenveen RT, van Genugten ML, Buist AS, Wouters EF, Feenstra TL. A dynamic population model of disease progression in COPD. *Eur Respir J*. 2005;26:223-233.

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;116:753–759.

II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica – DPOC. *J Bras Pneumol.* 2004;30(Supl 5).

Iozzo RV, Murdoch AD: Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* 1996;10:598-614.

Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *FEBS Journal.* 2010;277:3864–3875.

Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:609-652.

Isaacs D, Bangham CR, McMichael AJ. Cell-mediated cytotoxic response to respiratory syncytial virus in infants with bronchiolitis. *Lancet.* 1987;2:769-771.

James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. *Eur Respir J*. 2007;30:1420-1441.

Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J*. 1999;13:197-205.

Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:S28-38.

Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Developmental Dynamics*. 2000;218:235–259.

Kanner RE, Connett JE, Williams DE, Buist AS. Effects of randomized assignment to a smoking cessation intervention and changes in smoking habits on respiratory symptoms in smokers with early chronic obstructive pulmonary disease: the Lung Health Study. *Am J Med*. 1999;106:410–416.

Kasahara Y, Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest*. 2000;106:1311-1319.

Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153:530-534.

Kranenburg AR, Willems-Widyastuti A, Moori WJ, Sterk PJ, Alagappan VK, de Boer WI, Sharma HS. Enhanced bronchial expression of extracellular matrix proteins in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Pathol*. 2006;126:725–735.

Kunz LIZ, Strebus J, Budulac SE, Mauad T, Sterk PJ, Postma DS, Timens W, Hiemstra PS, e o grupo de estudo Glucold. Effects of smoking status and inhaled corticosteroids on extracellular matrix proteins in bronchial biopsies of COPD patients. Resumo submetido ao Congresso Anual da Sociedade Americana de Tórax (ATS) a ser realizado em maio de 2011.

Laitinen A, Altraja A, Kampe M, Lindem M, Virtanen I, Laitinen LA. Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:951-958.

Lambropoulou M, Limberis V, Koutlaki N, Simopoulou M, Ntanovasilis D, Vadoros GP, Tatsidou P, Kekou I, Koutsikogianni I, Papadopoulos N. Differential expression of tenascin-C in the developing human lung: an immunohistochemical study. *Clin Exp Med.* 2009;9:333-338.

Lang MR, Fiaux GW, Gillooly M, Stewart JA, Hulmes DJ, Lamb D. Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. *Thorax.* 1994;49:319-326.

Lapperre TS, Postma DS, Gosman MM, Snoeck-Stroband JB, ten Hacken NH, Hiemstra PS, Timens W, Sterk PJ, Mauad T. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. *Thorax.* 2006;61:115-121.

Laurent GJ. Lung collagen: more than scaffolding. *Thorax* 1986; 41: 418-428.

Liesker JJ, Ten Hacken NH, Zeinstra-Smith M, Rutgers SR, Postma DS, Timens W. Reticular basement membrane in asthma and COPD: similar thickness, yet different composition. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2009;4:127-135.

Limper AH, Roman J. Fibronectin. A versatile matrix protein with roles in thoracic development, repair and infection. *Chest.* 1992;101:1663-1673.

Løkke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax*. 2006;61:935-939.

Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, Schmid V, Buist S. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J*. 2006;27:397-412.

Ludwig MS. Proteoglycans and pathophysiology. *J Appl Physiol*. 2007;103:735-736.

Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J*. 2001;17:946–953.

Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FD, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fibre content in distal lung in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:857-862.

Mauad T, Xavier ACG, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Elastosis and fragmentation of fibers of the elastic system in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:968-975.

McGowan SE. Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. *FASEB J*. 1992;6:2895-2904.

Menezes AM, Perez-Padilla R, Hallal PC, Jardim JR, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, Pertuze J, Montes de Oca M, Tálamo C; PLATINO Team. Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part II. Burden of chronic obstructive lung disease in Latin America: the PLATINO study. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008;12:709-712.

Menezes AM, Perez-Padilla R, Jardim JR, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, Montes de Oca M, Talamo C, Hallal PC, Victora CG; PLATINO Team. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*. 2005;366:1875-1881.

Merrilees MJ, Ching PS, Beaumont B, Hinek A, Wight TN, Black PN. Changes in elastin, elastin binding protein and versican in alveoli in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2008;9:41.

Miller LA, Hurst SD, Coffman RL, Tyler NK, Stovall MY, Chou DL, Putney LF, Gershwin LJ, Schelegle ES, Plopper CG, Hyde DM. Airway generation-specific differences in the spatial distribution of immune cells and cytokines in allergen-challenged rhesus monkeys. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:894-906.

Molfino NA, Jeffery PK. Chronic obstructive pulmonary disease: histopathology, inflammation and potential therapies. *Pulm Pharmacol Ther.* 2007;20:462-472.

Noordhoek JA, Postma DS, Chong LL, Menkema L, Kauffman HF, Timens W, van Straaten JF, van der Geld YM. Different modulation of decorin production by lung fibroblasts from patients with mild and severe emphysema. *COPD.* 2005;2:17-25.

O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155:852-857.

Pare PD, Roberts CR, Bai TR, and Wiggs BJ. The functional consequences of airway remodelling in asthma. *Mondabli Arch Chest Dis.* 1997;52:589–596.

Postma DS, Timens W. Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3:434-439.

Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:532-555.

Rahmani M, Wong BW, Ang L, Cheung CC, Carthy JM, Walinski H, McManus BM. Versican: signaling to transcriptional control pathways. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84:77-92.

Roche WR, Williams JH, Beasley R, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989;1:520-524.

Roughley PJ, White RJ, Magny MC, Liu J, Pearce RH, Mort JS. Non-proteoglycan forms of biglycan increase with age in human articular cartilage. *Biochem J*. 1993;295:421-426.

Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Ferrarresso A, Drigo R, Potena A, Ciaccia A, Fabbri LM. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147:301-306.

Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:822–826.

Saetta M, Ghezzi H, Kim WD, King M, Angus GE, Wang NS, Cosio MG. Loss of alveolar attachments in smokers. A morphometric correlate of lung function impairment. *Am Rev Respir Dis.* 1985;132:894-900.

Sakai M, Sato Y, Sato S, Ihara S, Onizuka M, Sakakibara Y, Takahashi H. Effect of relocating to areas of reduced atmospheric particulate matter levels on the human circulating leukocyte count. *J Appl Physiol.* 2004;97:1774-1780.

Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Götte M, Malle E, Schaefer RM, Gröne HJ. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest.* 2005;115:2223-2233.

Shapiro SD. COPD unwound. *N Engl J Med.* 2005;352:2016-2019.

Shifren A, Durmowicz AG, Knutsen RH, Hirano E, Mecham RP. Elastin protein levels are a vital modifier affecting normal lung development and susceptibility to emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292:L778-787.

Shifren A, Mecham RP. The stumbling block in lung repair of emphysema: elastic fiber assembly. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:428-433.

Suki B, Bates JH. Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008;163:33-43.

Togo S, Holz O, Liu X, Sugiura H, Kamio K, Wang X, Kawasaki S, Ahn Y, Fredriksson K, Skold CM, Mueller KC, Branscheid D, Welker L, Watz H, Magnussen H, Rennard SI. Lung fibroblast repair functions in patients with chronic obstructive pulmonary disease are altered by multiple mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:248-260.

Turino, G. M. The lung parenchyma: a dynamic matrix. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132:1324-1334.

van Straaten JF, Coers W, Noordhoek JA, Huitema S, Flipsen JT, Kauffman HF, Timens W, Postma DS. Proteoglycan changes in the extracellular matrix of lung tissue from patients with pulmonary emphysema. *Mod Pathol*. 1999;12:697–705.

Verbeken EK, Cauberghe M, Mertens I, Clement J, Lauweryns JM, Van de Woestijne KP. The senile lung. Comparison with normal and emphysematous lungs. 1. Structural aspects. *Chest*. 1992;101:793-799.

Vlahovic G, Russell ML, Mercer RR and Crapo JD. Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:2086-2092.

Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Postma DS, Timens W. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J*. 2005;26:835-845.

Willemse BWM, Postma DS, Timens W, ten Hacken NHT. The impact of smoking cessation on respiratory symptoms, lung function, airway hyperresponsiveness and inflammation. *Eur Respir J*. 2004;23:464–476.

Wu YJ, La Pierre DP, Wu J, Yee AJ, Yang BB. The interaction of versican with its binding partners. *Cell Res.* 2005;15:483-494.

Yoshida T, Tuder RM. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol Rev.* 2007;87:1047-1082.

Zandvoort A, Postma DS, Jonker MR, Noordhoek JA, Vos JT, Timens W. Smad gene expression in pulmonary fibroblasts: indications for defective ECM repair in COPD. *Respir Res.* 2008;9:83.