



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE
MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM
MEDICINA**

MARIANA MANUEL MOTA CUNHA MOURA

***O PAPEL DOS BIOMARCADORES NA DOENÇA
PULMONAR OBSTRUTIVA CRÓNICA***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE PNEUMOLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
MESTRE CLÁUDIA CHAVES LOUREIRO
PROFESSOR DOUTOR CARLOS ROBALO CORDEIRO**

FEVEREIRO - 2012

O PAPEL DOS BIOMARCADORES NA DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÓNICA

Mariana Manuel Mota Cunha Moura¹

Orientadora: Mestre Cláudia Chaves Loureiro^{1,2}

Co-orientador: Professor Doutor Carlos Robalo Cordeiro^{1,2}

¹Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

²Serviço de Pneumologia, Hospitais da Universidade de Coimbra, Portugal

mianamoura@hotmail.com

Agradecimentos

A realização desta tese de mestrado, ainda que apresentada em nome individual, baseia-se na sinergia de muitos factores, para ela contribuindo a colaboração de um amplo conjunto de pessoas que, a título científico ou por incentivo pessoal, me apoiaram.

Assim sendo, quero aqui expressar os meus sinceros agradecimentos à Dra. Cláudia Chaves Loureiro, orientadora desta tese, pelo seu apoio, competência e rigor, e disponibilidade demonstrada. Do mesmo modo, agradeço a simpatia do Professor Doutor Carlos Robalo Cordeiro por ser o co-orientador deste trabalho.

À minha família e ao Francisco, pelo carinho, incentivo e paciência que têm para comigo, ajudando-me mais uma vez a concretizar uma etapa importante da minha vida.

ÍNDICE

Página

Agradecimentos

Índice

Lista de abreviaturas.....	3
Resumo.....	5
Palavras-chave.....	6
Abstract.....	7
Keywords.....	8
I. Introdução	
I.1) DPOC: definição.....	9
I.2) Epidemiologia, impacto e factores de risco na DPOC.....	10
I.3) História natural e rebate orgânico da DPOC.....	11
I.4) Diagnóstico e conduta adoptadas actualmente na DPOC.....	14
I.5) O papel dos biomarcadores na DPOC.....	17
II. Objectivos.....	20
III. Material e Métodos.....	21
IV. Desenvolvimento	
IV.1) Patogenia e Fisiopatologia da DPOC: Mecanismos celulares e moleculares envolvidos.....	22
IV.2) Recurso a amostras biológicas para a identificação de biomarcadores.....	34
IV.3) Biomarcadores e sua utilidade clínica na DPOC: na fisiopatologia, monitorização (controlo/exacerbações) e terapêutica.....	48
V. Conclusões.....	73
Referências Bibliográficas.....	75

Lista de abreviaturas

DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

FEV₁: Volume expiratório forçado no primeiro segundo

CVF: Capacidade vital forçada

UCI: Unidade de Cuidados Intensivos

LBA: Lavado bronco-alveolar

CRE: Condensado respiratório exalado

α 1-AT: Alfa1-antitripsina

IL-6: Interleucina-6

IL-8: Interleucina-8

IL-1 β : Interleucina-1 β

TNF- α : Factor de necrose tumoral alfa

PCR: Proteína C reactiva

MCP-1: Peptídeo quimiotáctico monocítico-1

LTB₄: Leucotrieno B₄

MPM: Metaloproteinases da matriz

GRO- α : Oncoproteína-alfa relacionada com o crescimento

ENA-78/CXCL5: Epithelial neutrophil activating protein of 78 kDa

TGF- β : transforming growth factor beta

MDA: 4-hidroxi-2-nonenal e malondialdeído

INF- γ : Interferão gama

PCE: Proteína catiónica eosinofílica

MPO: Mieloperoxidase

SP-D: Surfactante pulmonar-D

SP-A: Surfactante pulmonar-A

TIMP-1: Inibidor tecidual das metaloproteinases-1

HNL: Lipocalina neutrofílica humana

ET-1: Endotelina-1

H₂O₂: Peróxido de hidrogénio

FeNO: Fração de óxido nítrico exalado

CO: Monóxido de carbono

DI: isodesmosina

PCT: Procalcitonina

CC-16: Células Clara secretoras de proteína 16

OPG: Osteoprotegerina

NAC: N-acetilcisteína

PGP: Prolina-glicina-prolina

AAS: Amilóide A sérica

pro-ADM: pro-adrenomedulina

BNP: Peptídeo natriurético tipo B

Resumo

Estima-se que a Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC) se torne na terceira principal causa de morte em 2020. Dados recentes apontam para uma prevalência de 14,2%. Perante a inexistência de um tratamento eficaz, torna-se indispensável encontrar biomarcadores que se relacionem com a biopatologia desta doença, permitindo a sua melhor abordagem e monitorização. Identificar biomarcadores que indiquem a eficácia dos fármacos nos componentes do processo inflamatório, e assim descobrir um novo e adequado tratamento, é fundamental para travar o impacto sócio-económico e a morbimortalidade desta patologia.

Com este trabalho de revisão pretende-se estudar os biomarcadores disponíveis, a sua relação com parâmetros clínicos, nomeadamente, o grau de progressão da doença, as alterações dos valores laboratoriais, a co-existência de hábitos tabágicos ou de comorbilidades e o valor preditivo nas exacerbações. Espera-se que o estudo aprofundado nesta área possa ter importância no conhecimento do rebate sistémico desta patologia inflamatória crónica e que, num futuro próximo, os biomarcadores se tornem úteis na prática clínica, no que refere ao diagnóstico, terapêutica e prognóstico da DPOC.

Este trabalho foi elaborado segundo um levantamento equilibrado dos desenvolvimentos mais recentes sobre a importância dos biomarcadores na DPOC, não só pela lacuna científica no que diz respeito aos seus papéis na referida doença, mas também pela actualidade e emergência desta temática. Deste modo, foi feita uma pesquisa alargada na PubMed, com o termo “biomarkers in COPD”. Para melhor compreensão da fisiopatologia, foi realizada uma pesquisa com os termos “pathophysiology”, “imunopathogenesis” e “exacerbation”. Adicionalmente, foi realizada uma pesquisa na direcção electrónica da Sociedade Portuguesa de Pneumologia recorrendo, através desta, a revistas médicas disponíveis.

O papel dos biomarcadores na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Como modo de conclusão deste trabalho refere-se que, apesar do esforço farmacêutico e biotecnológico e de ensaios clínicos realizados, poucos são os biomarcadores usados rotineiramente na clínica. Além disso, os já identificados através da análise de amostras biológicas, permanecem longe de validação, isto é, de significado clínico. A realização de mais estudos clínicos e o recurso à proteômica vão permitir avançar nesta área, identificando-se novos e robustos biomarcadores, validando os já existentes.

Palavras-chave: DPOC, biomarcador, biofluidos, diagnóstico, monitorização, terapêutica, prognóstico, exacerbação.

Abstract

Recently was estimated that Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) will become the third main cause of death in 2020. Recent data point to a predominance of 14,2%. As there is no effective treatment, urges the need to find biomarkers related with the biopathology of this disease, allowing better surveillance and approach. Identify biomarkers that indicate the efficiency of drugs in the inflammatory process components, in order to achieve a better treatment, is crucial to stop both the social-economical and morbimortality impact of this disease.

The goal with this review is to study the available biomarkers, their relation with several parameters as clinical ones, disease progression rate, alterations of laboratorial values, co-existence of tobacco habits or any kind of comorbidity and the predictive value on exacerbations. It is expected that deep study in this subject may be relevant on understanding the systemic modifications of this chronic inflammatory pathology and that, in a near future, biomarkers become useful in clinical practice when it comes to diagnostic, treatment and prognosis of COPD.

This theory was elaborated after a balanced gathering of the most recent developments on how important biomarkers are in COPD, not just because of the scientific gap referring to their role in the disease, but also because of it is an emergent and current thematic. A large PubMed research was made with the words “biomarkers in COPD”. To better understand the physiopathology, a research was made using the words “pathophysiology”. “imunopathogenesis” and “exacerbation”. Additionally, we ran the “Sociedade Portuguesa de Pneumologia” website for medical available magazines.

Concluding, despite the pharmaceutical and biotechnological effort and the many clinical studies, only a few biomarkers are currently used in clinical practice. Besides that, those

which have been identified by biological samples analysis, are far from validation and this means they still don't have clinical significance. More clinical studies and proteomic use may allow new advances in this area, identifying new and useful biomarkers and validating the existing ones.

Keywords: COPD, biomarker, biofluids, diagnosis, monitoring, therapeutic, prognosis, exacerbation.

I. INTRODUÇÃO

I.1) DPOC: definição

Existem diversas definições que tentam caracterizar a DPOC. Contudo, a definição recomendada pela *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)* é a mais consensual e a universalmente aceite: “A DPOC é uma doença comum, evitável e tratável, caracterizada pela limitação persistente ao fluxo aéreo que é usualmente progressiva e associada a um aumento da resposta inflamatória crónica das vias aéreas e dos pulmões a partículas nocivas ou gases. As exacerbações e as comorbilidades contribuem para a severidade da doença.”. De realçar que, embora muitas definições valorizem os termos “enfisema” e “bronquite crónica”, o projecto GOLD não os inclui na sua definição, salientando que enfisema, ou destruição e dilatação dos alvéolos pulmonares, é uma palavra de uso incorrecto na clínica, que traduz uma das anormalidades estruturais que ocorrem na DPOC. Já a bronquite crónica, caracterizada pela presença de tosse e expectoração durante pelo menos três meses em cada um de dois anos consecutivos, permanece como um termo útil clínica e epidemiologicamente (Vestbo J. et al, 2011).

I.2) Epidemiologia, impacto e factores de risco da DPOC

O seu impacto global é enorme, afectando mundialmente mais de 600 milhões de pessoas, sendo responsável por 3 milhões de mortes anualmente (Sin, D. e Vestbo J., 2009).

Segundo dados da *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), nos Estados Unidos da América, em indivíduos com idade compreendida entre os 25-75 anos, a DPOC leve tem uma prevalência de 6,9% enquanto a moderada de 6,6% (Celli, B.R, 2004).

Através de informações do Programa Nacional de Prevenção e Controlo da DPOC pode-se afirmar que é uma patologia responsável por uma elevada frequência de consultas médicas e de serviços de urgência, assim como por um significativo número de internamentos hospitalares, frequentemente prolongados, além de contribuir para o consumo de fármacos e de oxigenoterapia e ventiloterapia domiciliárias de longa duração (Bárbara C. et al, 2005). Dados decorrentes do estudo “The burden of obstructive lung disease study” (BOLD) apontam para a prevalência em Portugal, nos adultos activos, de aproximadamente 14,2% da população, aumentando com a idade (Bárbara C. et al, 2010). Apesar de mais elevada no sexo masculino, a prevalência nas mulheres está a aumentar, decorrendo do aumento da prevalência de hábitos tabágicos neste sexo. De facto, o consumo de tabaco, para além de ser o factor de risco mais importante, continua a contribuir para a elevada prevalência da doença em Portugal. Tais factos colocam a DPOC como um dos problemas de saúde pública de maior magnitude, sendo previsível que constitua uma das principais causas de morte no termo das primeiras décadas do século XXI (Bárbara C. et al, 2005).

Estimativas da GOLD sugerem que, até ao ano 2020, a DPOC passará da sexta para a terceira causa mais comum de morte no mundo inteiro (Vestbo J. et al, 2011).

O tabagismo é o principal factor de risco, existindo uma relação causal entre a intensidade do tabagismo e a redução da função pulmonar, o que justifica as taxas de

prevalência mais altas da DPOC com o aumento da idade. Embora esta relação esteja definitivamente comprovada, e ainda que o número de maços-ano de tabagismo seja o factor preditivo mais significativo do volume expiratório forçado no primeiro segundo (FEV₁), segundo Fauci et al (2008) “apenas 15% da variabilidade deste parâmetro ventilatório pode ser explicado pelo número de maços-ano”. Tal sugere que outros factores genéticos e/ou ambientais contribuam para o impacto do fumo na manifestação da obstrução do fluxo aéreo.

Outros dois factores de risco estabelecidos são a hiperreactividade da via aérea e a deficiência grave de α 1-antitripsina (α 1-AT). Esta enzima tem a capacidade de inibir a elastase neutrofílica que, quando activa, destrói o parênquima pulmonar através da hidrólise das fibras de elastina. Deste modo, na ausência ou em níveis reduzidos da α 1-AT, a elastase neutrofílica encontra-se activa, promovendo a destruição do parênquima pulmonar e, conseqüentemente, limitação ao fluxo aéreo. Como prováveis factores de risco, pode referir-se a exposição passiva ao fumo do cigarro, a exposição ocupacional e a poluição ambiental, apontando-se uma forte relação entre a DPOC e o fumo da combustão de biomassas (Fauci A. et al, 2008).

I.3) História natural e rebate orgânico da DPOC

É uma patologia de evolução progressiva, variando de doente para doente, sendo agravada pela contínua exposição aos factores de risco, principalmente ao fumo de cigarro. Deste modo, cessando este contacto, mesmo que haja uma limitação significativa ao fluxo aéreo, pode haver uma melhoria na função pulmonar assim como um abrandamento no desenvolvimento da doença, podendo levar mesmo a um término da progressão (Vestbo J. et al, 2011). Contudo, um estudo estatístico revela que apenas 15 a 20% dos fumadores

desenvolvem DPOC clinicamente significativa, subestimando o número de vítimas causado por esta patologia (Celli, B.R, 2004).

Apesar da principal característica que identifica a DPOC ser a limitação crónica ao fluxo aéreo não totalmente reversível, há evidências crescentes de que seja uma doença complexa, sistémica, afectando outros locais do organismo, não se restringindo apenas aos pulmões. Essa obstrução ao fluxo aéreo, além de afectar as trocas gasosas, vai ter impacto também a nível da função cardíaca, originando deste modo consequências sistémicas (Agustí, A.G et al, 2003). Adicionalmente, sendo a DPOC uma patologia inflamatória, os mediadores inflamatórios envolvidos na sua patogenia, ao permanecer na circulação vão conduzir a manifestações sistémicas, tais como, anormalidades nutricionais, como perda de peso e disfunção do músculo esquelético, que são efeitos extra-pulmonares bem reconhecidos da DPOC, tendo também os doentes um risco elevado para a ocorrência de enfarte do miocárdio, angina, osteoporose, infecção respiratória, fracturas ósseas, depressão, distúrbio do sono como apneia, anemia e glaucoma (Van Weel C. e Schellevis F.G, 2006). Barnes P.J e Celli B.R (2009) acrescentam também, como manifestações sistémicas e comorbilidades, a caquexia, o carcinoma pulmonar, a hipertensão pulmonar, a insuficiência cardíaca congestiva, a Diabetes Mellitus e a síndrome metabólica (Barnes P.J e Celli B.R, 2009).

Para além destes efeitos sistémicos importantes, que levam a condições de comorbilidade, o facto de a DPOC se desenvolver com mais frequência em doentes de meia-idade e/ou fumadores, e sendo estes possíveis portadores de outras patologias relacionadas com o envelhecimento e/ou tabagismo, há um aumento da probabilidade de a DPOC se apresentar concomitantemente com outras morbilidades (Soriano J.B et al, 2005).

Existem duas maneiras distintas de relacionar a DPOC com as suas manifestações sistémicas e comorbilidades associadas. Por um lado, estas resultam da libertação sistémica de mediadores decorrentes da inflamação e reparação pulmonares subjacentes a esta patologia

(figura 1). Por outro lado, as manifestações pulmonares da DPOC são uma das formas de expressão do estado inflamatório sistémico, no qual há também comprometimento de outros componentes do organismo. Ambas as visões estão correctas, contudo implicam terapêuticas diferentes, sendo no primeiro caso centrada nos pulmões, enquanto no segundo dirigida ao estado inflamatório sistémico (Barnes P.J e Celli B.R, 2009).

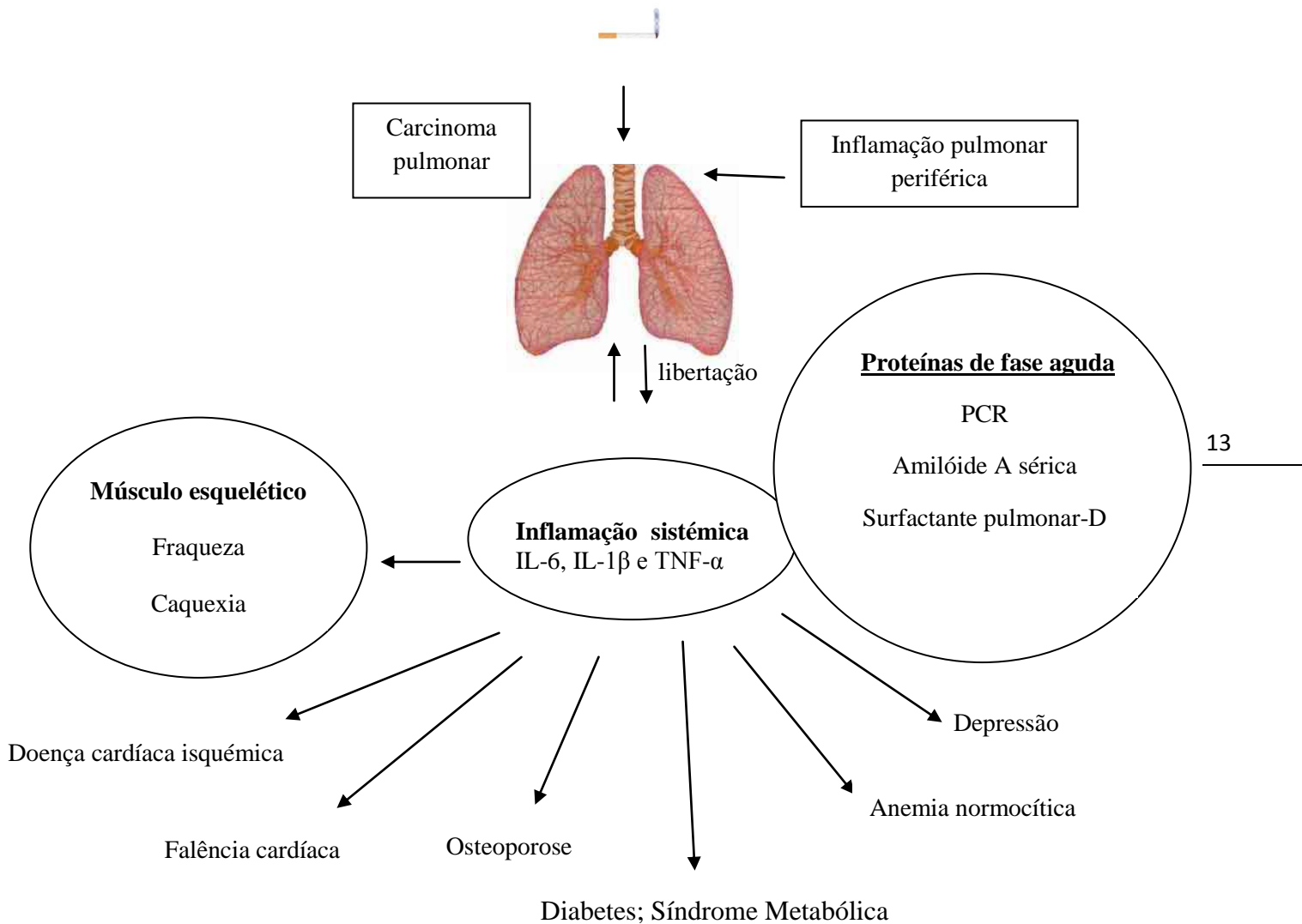


Figura 1 – Efeitos sistémicos e comorbilidades na DPOC (Adaptado de Barnes P.J e Celli B.R, 2009). A inflamação pulmonar periférica pode causar a libertação de citocinas, como a interleucina 6 (IL-6), a interleucina-1 β (IL-1 β) e o factor de necrose tumoral alfa

(TNF- α), para a circulação sistémica, que conduz a um aumento das proteínas de fase aguda, como a proteína C reactiva (PCR). A inflamação sistémica pode, então, levar a atrofia do músculo esquelético e a caquexia e pode iniciar e/ou agravar as condições de co-morbilidade. A inflamação sistémica pode também acelerar a progressão para carcinoma pulmonar. Uma visão alternativa é que a inflamação sistémica provoca várias doenças inflamatórias, incluindo a DPOC.

Deste modo, na avaliação de um doente com DPOC, tem de se ter em conta as comorbilidades que possam existir, pois estas, para além de prejudicarem a qualidade de vida do doente, aumentam a gravidade da doença, elevando assim a necessidade de internamentos hospitalares e, conseqüentemente, os custos de saúde. Reforçando o citado, a DPOC tem que ser tratada com cuidado e atenção especial, assim como as comorbilidades, visto estas complicarem a sua evolução e tratamento (Barnes P.J e Celli B.R, 2009).

I.4) Diagnóstico e conduta adoptadas actualmente na DPOC

Em qualquer doente que se apresente com sintomas de tosse crónica e produtiva, dispneia ou história de exposição a factores de risco para a doença, deve ser considerado o diagnóstico de DPOC. Porém, este diagnóstico clínico dever ser confirmado pela espirometria (Celli, B.R, 2004).

No projecto GOLD recomenda-se uma classificação espirométrica simples de gravidade da doença em quatro estádios (quadro 1). De notar que, a presença de valor pós-broncodilatador da relação $FEV_1/CVF < 0,70$ e $FEV_1 < 80\%$ do previsto confirma a presença de limitação ao fluxo aéreo que não é totalmente reversível (Vestbo J. et al, 2011).

GOLD 1: leve	$FEV_1/CVF < 0,70$; $FEV_1 \geq 80\%$ do previsto
GOLD 2: moderado	$FEV_1/CVF < 0,70$; $50\% \leq FEV_1 < 80\%$ do previsto
GOLD 3: grave	$FEV_1/CVF < 0,70$; $30\% \leq FEV_1 < 50\%$ do previsto
GOLD 4: muito grave	$FEV_1/CVF < 0,70$; $FEV_1 < 30\%$ do previsto

Quadro 1. Classificação espirométrica da gravidade da DPOC baseada no FEV_1 pós-broncodilatador (*Adaptado de Vestbo J. et al, 2011*). FEV_1 ; CVF: capacidade vital forçada.

Embora a espirometria não avalie globalmente o impacto da DPOC na saúde do doente, ela permanece como o método-padrão para diagnosticar a doença e monitorizar a sua progressão. Portanto, é a medida acessível melhor padronizada, a mais reprodutível e a mais objectiva para a limitação ao fluxo aéreo (Vestbo J. et al, 2011).

O FEV_1 é usado, actualmente, como biomarcador da severidade da doença, pouco se relacionando com a sintomatologia. Devido à existência de estudos alargados, à sua fiabilidade e prolongado uso na clínica, o declínio do FEV_1 tem sido associado à história natural e factores implicados na DPOC (Vestbo, J. e Rennard, M.D, 2010). Porém, devido à fraca relação com a dispneia e outros sintomas, esta medida da função pulmonar não é adequada nem para descrever o impacto da DPOC nem para avaliar a eficácia das intervenções terapêuticas (Jones P.W e Agusti, A.G.N, 2006).

Do mesmo modo, ele não é um substituto ideal para ensaios a curto-prazo de fármacos pois não fornece informações sobre a actividade da doença ou o processo patológico subjacente, não separa os diferentes fenótipos da DPOC, não é específico da DPOC e é relativamente insensível às terapias que prolongam a sobrevida conhecida (Sin D. e Vestbo J.,

2009). Daí a necessidade de novos marcadores que permitam uma avaliação mais completa e clinicamente relevante desta doença (Jones P.W e Agusti, A.G.N, 2006). Neste sentido, actualmente estão em andamento estudos em larga escala para identificar novos biomarcadores na DPOC (Sin D. e Vestbo J., 2009).

Nos doentes fumadores, a cessação tabágica é muito importante, tendo um grande impacto na história natural da doença. O tratamento farmacológico corrente da DPOC baseia-se no recurso a broncodilatadores e a glucocorticóides inalados. Como outras terapêuticas farmacológicas podem-se referir: as vacinas anti-influenza e anti-pneumocócica; a terapia com α 1-AT, que pode ser útil em doentes jovens com défice hereditário severo desta enzima e enfisema, contudo, é um tratamento dispendioso, não disponível em muitos países e não indicado em doentes sem este défice enzimático; antibióticos; mucolíticos e agentes anti-oxidantes; imunomoduladores; anti-tússicos; vasodilatadores e narcóticos. A reabilitação pulmonar, a oxigenoterapia, a ventilação não-invasiva e a cirurgia são outras opções terapêuticas. Infelizmente, nenhum dos fármacos existentes se mostra capaz de modificar o declínio a longo prazo da função pulmonar, que é a principal característica desta doença (Vestbo J. et al, 2011). De acordo com Sin D. e Vestbo J. (2009), são poucas, ou mesmo inexistentes, as terapêuticas farmacológicas que prolongam a sobrevida na DPOC (Sin D. e Vestbo J., 2009).

Contudo, o mundo farmacêutico e as indústrias biotecnológicas, têm se esforçado para encontrar alternativas mais eficazes e seguras. Esta observação vai de acordo ao publicado no jornal *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* no artigo *The role of biomarkers in respiratory disease* publicado pela Elsevier (2010). O mesmo artigo, afirma que um dos problemas face a este desenvolvimento é a “habilidade para prever com exactidão o curso da inflamação nestes doentes usando técnicas não invasivas e a falta de biomarcadores válidos para avaliar o efeito dos fármacos na progressão da doença”.

I.5) O papel dos biomarcadores na DPOC

A *National Institutes of Health* (NIH) define biomarcador como uma “característica que é objectivamente medida e avaliada como um indicador do processo biológico normal, do processo patogénico ou de respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica” (Sin D. e Vestbo J., 2009). Deste modo, os biomarcadores são considerados ferramentas-chave para:

1. Definir populações que obtêm maior benefício com um fármaco (farmacogenética);
2. Melhorar o desenvolvimento de fármacos (farmacocinética);
3. Prever o curso da doença (para justificar tratamentos mais intensos ou prolongados) (diagnóstico e prognóstico);
4. Monitorizar os efeitos da terapêutica (farmacodinâmica);
5. Prever resultados clínicos (parâmetros de substituição);
6. Monitorizar reacções adversas (biomarcadores seguros);
7. Identificar novos caminhos biológicos envolvidos na patologia da DPOC e identificar novos tratamentos (Cazzola M. e Novelli G., 2010).

Um biomarcador ideal deve indicar um processo-chave fisiopatológico relativamente à doença; distinguir um fenótipo particular; ser sensível a alterações na actividade da doença, assim como, a mudanças na patofisiologia induzidas pelo tratamento; responder dentro de um período de tempo que precede a mudança no estado clínico permitindo intervenções preventivas; ser facilmente mensurável, minimamente invasivo, reproduzível e válido (Taylor D.R, Pavord I.D, 2008).

No estudo dos biomarcadores, Sin D. e Vestbo J. (2009) propõem cinco pontos-chave na avaliação da sua validade na DPOC:

1. Há uma forte plausibilidade biológica em termos do seu papel na patogênese da doença?
2. Há uma forte, consistente e independente associação entre o biomarcador e a DPOC?
3. Há uma forte e independente associação entre o biomarcador e os resultados clínicos como a mortalidade e a hospitalização?
4. Há evidências de ensaios clínicos randomizados em que o biomarcador é modificável por intervenções?
5. Há evidências de ensaios clínicos randomizados em que mudanças no status do biomarcador resultam em alterações importantes e aceitas, nos resultados clínicos (por exemplo: mortalidade, exacerbações, saúde, taxa de mudança do FEV₁)? (Sin D. e Vestbo J., 2009)

A validação de um biomarcador envolve três fases: 1) demonstrar uma relação entre a frequência/amplitude do marcador e os resultados clínicos; 2) Fase I/II do ensaio que tem de revelar efeitos no biomarcador com o tratamento instituído, isto é, têm de existir efeitos terapêuticos com uma dose-dependente no marcador em estudo; e 3) verificar que as alterações no marcador relacionadas com o tratamento se associam com mudanças positivas nos resultados clínicos. A validação estabelece-se quando o biomarcador é aplicável a todos os estádios da doença, assim como, a todas as intervenções (Jones P.W e Agustí, A.G.N, 2006).

A medição dos biomarcadores pode ter as seguintes aplicações na DPOC: avaliar o estado de inflamação e daí concluir se estamos perante uma doença estável ou perante uma exacerbação; avaliar a sua utilidade na monitorização da doença, nomeadamente na predição

de futuras exacerbações e, do mesmo modo, juntamente com a sintomatologia, identificar a sua etiologia como o grau de severidade; monitorizar e avaliar a evolução da doença, relacionando os níveis de biomarcadores com a resposta às intervenções terapêuticas e também com o potencial desenvolvimento de complicações que possam advir (Lacoma A. et al, 2009). De acordo com estas aplicações estão Taylor D.R e Pavord I.D (2009), que referem existir três áreas onde o biomarcador pode ter um potencial papel na prática clínica, nomeadamente: identificar o fenótipo patológico subjacente; fornecer um “endpoint” que seja relevante para o modo de acção de determinada intervenção; prever riscos futuros; e orientar decisões clínicas que possam modificar o risco (Taylor D.R e Pavord I.D, 2009).

De salientar que as exacerbações estão associadas a menor qualidade de vida, a declínio da função pulmonar, a pior prognóstico e a maior consumo dos cuidados de saúde. Daí a necessidade urgente de descobrir um biomarcador que defina as mesmas. Tal significaria um grande avanço clínico (Muller B. e Tamm M., 2006).

Pode-se então afirmar que há uma necessidade de aperfeiçoar o diagnóstico, fenotipagem e estadiamento da DPOC, traduzindo-se actualmente em importantes e grandes investigações em curso, de vários biomarcadores candidatos (Patel A. et al, 2010).

II. OBJECTIVOS

A DPOC é uma doença sistémica caracterizada por um padrão específico de inflamação do trato respiratório e do parênquima pulmonar, havendo produção de vários mediadores inflamatórios. Sendo um motivo de incapacidade, com acentuado impacto negativo na qualidade de vida dos doentes e nos seus meios familiar, profissional e social, torna-se imprescindível um maior controlo desta doença.

Perante a inexistência de um tratamento anti-inflamatório com impacto na progressão da doença, da incapacidade para distinguir os diferentes estádios, da dificuldade em prever uma exacerbação da doença assim como a sua evolução e prognóstico, torna-se urgente encontrar biomarcadores que se relacionem com a biopatologia da doença, permitindo, desse modo, a sua monitorização e melhores abordagens diagnóstica, terapêutica e prognóstica. Dada a fisiopatologia desta doença, muitas são as enzimas e os mediadores envolvidos, pelo que existem actualmente muitos biomarcadores em investigação.

Com a realização deste artigo pretende-se, através do estudo alargado dos desenvolvimentos mais recentes, rever esta temática actual e emergente, perspectivando-se que, futuramente, o uso clínico de biomarcadores possa ser alargado, sendo fundamental para se conseguir travar o grande impacto socio-económico e morbi-mortalidade da DPOC.

III. MATERIAL E MÉTODOS

No que diz respeito ao material e métodos, foi efectuada uma pesquisa na PubMed, com o termo “biomarkers in COPD”. De entre 1311 resultados obtidos, seleccionaram-se os incluídos no período de 2000 a 2011. Destes foram valorizados os que abordam a utilidade clínica dos biomarcadores na DPOC e os que focavam num biomarcador em particular. Para melhor compreensão da fisiopatologia desta doença, foi realizada uma pesquisa com os termos “pathophysiology”, “imunopathogenesis” e “exacerbation”, assim como uma leitura da guideline GOLD. Adicionalmente, foi realizada uma pesquisa na direcção electrónica da Sociedade Portuguesa de Pneumologia, recorrendo também através desta a revistas médicas disponíveis.

Após uma leitura adequada das informações obtidas, procedeu-se então à elaboração deste artigo, que é um levantamento equilibrado dos desenvolvimentos mais recentes nesta área.

IV. DESENVOLVIMENTO

IV.1) PATOGENIA E FISIOPATOLOGIA DA DPOC: Mecanismos celulares e moleculares envolvidos

A DPOC caracteriza-se pela limitação não totalmente reversível ao fluxo aéreo associada a inflamação crónica e hipersecreção de muco (bronquite crónica) e/ou a destruição patológica dos espaços aéreos que conduz a enfisema. No entanto, a maioria dos mecanismos básicos que contribuem para a progressão da doença permanecem por esclarecer. Do mesmo modo, as terapêuticas actualmente utilizadas baseiam-se no alívio sintomático e não nos mecanismos patológicos subjacentes (Stefanska, Anna M. e Walsh, Patrick T., 2009).

Devido ao seu grande impacto, há um interesse crescente na melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na DPOC, permitindo assim uma re-avaliação desta doença (Barnes P.J et al, 2003).

Sendo a exposição ao fumo do cigarro o factor de risco mais prevalente, a patogenia encontra-se fortemente relacionada com os efeitos que este tem nos pulmões (MacNee William, 2005). Habitualmente, esta exposição leva a uma resposta inflamatória pulmonar que, no desenvolvimento da DPOC, parece estar amplificada. Segundo Fauci et al (2008), “os mecanismos desta amplificação ainda não estão esclarecidos mas podem ser geneticamente determinados” (Fauci A. et al, 2008).

A inflamação crónica das vias aéreas periféricas e a destruição do parênquima pulmonar ou enfisema, são as principais alterações patológicas da DPOC, responsáveis pela limitação ao fluxo aéreo expiratório, consequência funcional característica desta doença. Assim, o atingimento da arquitectura pulmonar traduz-se em mudanças patológicas encontradas nas

O papel dos biomarcadores na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

vias aéreas centrais e periféricas, no parênquima e na vasculatura pulmonares (Saetta, Marina et al, 2001), como listado no quadro 2.

Vias aéreas proximais (traqueia, brônquios com mais de 2 mm de diâmetro)

Células inflamatórias: aumento do número de macrófagos e linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos); poucos neutrófilos ou eosinófilos.

Mudanças estruturais: hiperplasia das células caliciformes, dilatação das glândulas submucosas (ambas as alterações conduzem a hipersecreção de muco) e metaplasia escamosa do epitélio.

Vias aéreas periféricas (bronquíolos com menos de 2 mm de diâmetro)

Células inflamatórias: aumento do número de macrófagos, linfócitos T (CD8⁺>CD4⁺), linfócitos B, folículos linfóides e fibroblastos; poucos neutrófilos ou eosinófilos.

Mudanças estruturais: Espessamento da parede das vias aéreas, fibrose peribrônquica, estreitamento da via aérea (bronquiolite obstrutiva). A resposta inflamatória aumentada e o exsudato relacionam-se com a severidade da doença.

Parênquima pulmonar (bronquíolos respiratórios e alvéolos)

Células inflamatórias: aumento do número de macrófagos e linfócitos T CD8⁺.

Mudanças estruturais: Destruição da parede alveolar e apoptose das células epiteliais e endoteliais.

- Enfisema centrolobular: dilatação e destruição dos bronquíolos respiratórios; mais comum nos fumadores.
- Enfisema panacinar: destruição dos sacos alveolares assim como dos bronquíolos respiratórios; mais comum quando há deficiência da α 1AT.

Vasculatura pulmonar

Células inflamatórias: aumento do número de macrófagos e linfócitos T.

Mudanças estruturais: Espessamento da íntima, disfunção das células endoteliais e aumento do músculo liso → hipertensão pulmonar.

Quadro 2 – (*Adaptado de Vestbo J. et al, 2011*). Mudanças patológicas segundo o projecto GOLD.

Diversos tipos de células inflamatórias como múltiplos mediadores inflamatórios, estão envolvidos nesta doença complexa, sistémica e multifacetada (Barnes, P.J, 2003). A melhor compreensão da sua patogenia tem conduzido a uma crescente consciência de que a progressão resulta da interacção de vários tipos de células (Stefanska, Anna M. e Walsh, Patrick T., 2009).

Macrófagos

O seu número aumentado, a forte relação entre a sua infiltração e a progressão da doença e a localização em áreas de lesão tecidual, faz com que os macrófagos tenham um papel primordial na DPOC (Stefanska, Anna M. e Walsh, Patrick T., 2009). Este tipo celular encontra-se aumentado nas vias aéreas, no parênquima pulmonar, no lavado bronco-alveolar (LBA) e na expectoração de doentes com DPOC, parecendo resultar do elevado recrutamento de monócitos da circulação em resposta a citocinas quimiotácticas monocíticas, como o peptídeo quimiotáctico monocítico-1 (MCP-1) (MacNee William, 2005). O fumo do cigarro parece activar os macrófagos que, posteriormente, libertam mediadores inflamatórios como o TNF- α , a interleucina-8 (IL-8) e outras quimiocinas CXC, o MCP-1, o leucotrieno B4 (LTB4), espécies reactivas de oxigénio e proteases que incluem as metaloproteinases da matriz, MPM-2, MPM-9 (a mais secretada) e MPM-12, as catepsinas K, L e S e a elastase neutrofílica (Barnes, P.J, 2003). Alguns estudos sugerem que a participação dos macrófagos na patogenia da doença se relaciona com a capacidade em produzir metaloproteinases da matriz, pois estas degradam proteínas facilitando a infiltração nos tecidos lesados. Apesar de ser incerto o modo de actuação dos macrófagos, o seu aumento quantitativo assim como o seu

envolvimento na destruição pulmonar estão comprovados (Sampsonas F., 2007; Chung K.F., 2008). Eles têm também a capacidade de promover a infiltração de células T através da expressão de quimiocinas específicas Th1/Tc1 como a CXCL9, CXCL10 e a CXCL11. Níveis elevados destas quimiocinas têm sido encontrados na expectoração de doentes com DPOC e estão directamente relacionados com o aumento da infiltração dos macrófagos, assim como, com a diminuição da função pulmonar (Stefanska, Anna M. e Walsh, Patrick T., 2009). Comparando fumadores “saudáveis”, isto é, sem DPOC, com doentes com esta patologia, verifica-se que, nestes últimos, os macrófagos secretam mais proteínas inflamatórias e têm uma maior actividade proteolítica (Barnes, P.J, 2003).

A maioria dos mediadores inflamatórios expressos nesta doença é controlada pelo factor de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), sendo este activado nos macrófagos alveolares dos doentes com DPOC, particularmente durante as exacerbações. Uma maior activação deste factor nas células pulmonares pode ser a chave do mecanismo molecular envolvido na progressão da inflamação das vias aéreas (MacNee William, 2005).

Neutrófilos

Um número aumentado de neutrófilos é também evidente na expectoração e no LBA dos doentes com esta patologia. A sua rápida transição através das vias aéreas e parênquima pulmonar reflecte-se no menor número destas células a nível do parênquima. Os neutrófilos secretam proteases séricas, como a elastase neutrofílica, a catepsina G e proteinase 3, assim como, MPM-8 e -9. Estas proteases para além de contribuírem para a destruição alveolar, têm também a capacidade de estimular a secreção de muco (Barnes, P.J, 2003).

A regulação aumentada da selectina-E presente nos doentes com DPOC evidencia a adesão dos neutrófilos às células endoteliais, após o seu recrutamento nas vias aéreas e parênquima. Do mesmo modo, o número aumentado de LTB₄, IL-8, GRO- α (oncoproteína-

alfa relacionada com o crescimento) e ENA-78/CXCL5 (epithelial neutrophil activating protein of 78 kDa) presente nas vias aéreas destes doentes, relaciona-se com o facto de a migração destas células para o tracto respiratório ser controlada por estes factores quimiotácticos (MacNee, William, 2005).

Apesar da relação demonstrada entre os neutrófilos circulantes e a queda no FEV₁, assim como, o seu número elevado nas biópsias brônquicas e na expectoração induzida estar associado à severidade da doença e à taxa de declínio da função pulmonar, o papel destas células na patogenia da DPOC continua por esclarecer (Barnes, P.J, 2003; MacNee, William, 2005). Segundo Bosken, CH et al (1992), não há uma diferença significativa entre o número de neutrófilos presente nos fumadores sem obstrução brônquica e nos doentes com DPOC. Tal sugere que, embora a inflamação neutrofílica seja constante nos fumadores, provavelmente representa uma resposta inespecífica das vias aéreas à agressão causada pelo tabagismo, não estando necessariamente relacionada com a progressão para DPOC (Cosio, M.G et al, 2002).

Eosinófilos

O papel dos eosinófilos ainda não está comprovado. Embora o seu número esteja aumentado na expectoração e no LBA dos doentes com esta patologia, há evidências de que este aumento apenas se relacione com uma melhor resposta à terapêutica corticóide, à existência concomitante de asma ou à ocorrência de exacerbações da DPOC (Barnes P.J., 2003).

Células epiteliais

A primeira linha de defesa da resposta imune inata é constituída pelas células epiteliais que revestem as vias aéreas. Estas têm um papel importante no início e na regulação da resposta inflamatória pulmonar, pois, uma vez activadas pelo fumo do cigarro, produzem mediadores inflamatórios, como o TNF- α , IL-1 β , IL-8 e o factor estimulador da colónia granulócito-macrófago (GM-CSF). O TGF- β (transforming growth factor beta), produzido pelas células epiteliais das pequenas vias aéreas, parece induzir fibrose local. O aumento da proliferação das células epiteliais reflecte-se na metaplasia escamosa existente no epitélio das vias aéreas dos doentes com DPOC. A natureza dos factores de crescimento envolvidos nesta proliferação permanece por investigar (Barnes P.J., 2003; MacNee, William, 2005; Stefanska, Anna M. e Walsh, Patrick T., 2009).

Células dendríticas

Nas paredes das vias aéreas e alveolares de fumadores, verifica-se um aumento do número de células dendríticas. Contudo, na DPOC, o papel das mesmas ainda não está definido, julgando-se terem apenas uma função importante nas respostas imunes inata e adaptativa (MacNee, William, 2005). As células dendríticas podem activar outras células inflamatórias e imunes, incluindo macrófagos, neutrófilos e linfócitos T e B, daí estarem relacionadas com a resposta pulmonar ao fumo do tabaco e a outros agentes nocivos inalados. Tal facto, torna-as um elemento celular fundamental para o melhor conhecimento dos mecanismos celulares envolvidos na DPOC. Estudos aprofundados são necessários para entender qual o papel das células dendríticas no recrutamento de outras células (Barnes P.J., 2003).

Linfócitos T

Em relação aos linfócitos T, ambas as células $CD4^+$ (T helper) e $CD8^+$ (citotóxico) estão aumentadas nas vias aéreas periféricas e centrais e no parênquima pulmonar, com um aumento da relação $CD8^+/CD4^+$. O número de células T presente relaciona-se com a extensão da destruição alveolar e com a severidade da limitação ao fluxo aéreo. As células $CD8^+$ são de dois tipos, Tc1 (que produzem interferão gama – $IFN-\gamma$) e Tc2 (que produzem interleucina-4 – IL-4). Na DPOC, tem interesse o primeiro tipo, encontrando-se aumentado na expectoração, no LBA e na biópsia dos doentes com a patologia, comparativamente com fumadores sem limitação ao fluxo aéreo e com não fumadores. (Barnes, P.J, 2003). De acordo com Grumelli S. et al (2004), a infiltração linfocitária destas células, $CD8^+$, está directamente relacionada com o grau de obstrução brônquica, podendo-se portanto afirmar que a proliferação destas células a nível pulmonar se correlaciona com a progressão da doença obstrutiva. O mecanismo através do qual os linfócitos T $CD8^+$ se acumulam ainda não está completamente compreendido. Embora haja um aumento das células $CD4^+$, não se sabe qual a função das mesmas, julgando-se terem um papel imunológico, nomeadamente de memória imunológica, que permite a continuidade do processo inflamatório após a cessação tabágica. Apesar de tudo, actualmente permanece incerta a relação das células T com a fisiopatologia da DPOC (Barnes P.J, 2003; MacNee, William, 2005).

Linfócitos B

Para além das células T, as células B também participam no sistema imune adaptativo. O interesse crescente em compreender o papel das células $CD4^+$ conduziu à evidência de que se relacionam com a resposta humoral, isto é, com a formação de anticorpos, sendo estes secretados pelos linfócitos B. Nos pulmões de doentes com DPOC pode-se encontrar folículos linfóides, estando o seu número relacionado a severidade da doença. Do mesmo modo, e

reforçando a participação das células B nos mecanismos subjacentes à doença, no sangue destes doentes pode-se encontrar auto-anticorpos contra células pulmonares epiteliais e endoteliais (Stefanska, Anna M. e Walsh, Patrick T., 2009).

Apesar do conhecimento de que diferentes células inflamatórias se encontram envolvidas, o papel e a importância das mesmas no desenvolvimento da DPOC está por esclarecer (Barnes, P.J, 2003).

Recentemente, a hipótese de que um componente auto-imune tem um papel na patogénese da DPOC tem sido investigada. A infiltração celular verificada nos pulmões apoia este facto, pois é composta por células das respostas imunes inata e adaptativa (macrófagos, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos e células natural killer – resposta inata e, células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) e linfócitos T e B – resposta adaptativa). Reforçando esta hipótese, está a evidência de que os doentes com DPOC apresentam algumas características típicas de doenças auto-imunes (Stefanska, Anna M. e Walsh, Patrick T., 2009). De referir a analogia existente entre a DPOC e a artrite reumatóide. O tabagismo como factor de risco, a persistência do estado inflamatório, mesmo após a cessação tabágica, a ocorrência de exacerbações e a semelhança entre as células inflamatórias e as citocinas envolvidas na patogenia, são características comumente encontradas em ambas as doenças.

Estudos destinados a detectar a presença de auto-antígenos, a identificar potenciais epítomos e/ou a determinar alguma relação entre a DPOC e a tipagem HLA, podem, possivelmente, fornecer informações úteis para o benefício destes doentes (Agustí, A. et al, 2003). Novas descobertas nesta área podem levar ao desenvolvimento de novos e eficazes

tratamentos, assim como, a um provável uso da imunoterapia na DPOC (Stefanska, Anna M. e Walsh, Patrick T., 2009).

Existem dois processos que têm merecido alguma atenção - o desequilíbrio proteases-antiproteases e o stress oxidativo, visto a compreensão dos mesmos poder ter utilidade na prática clínica. O primeiro conduz à destruição dos componentes conectivos tecidulares, nomeadamente da elastina, sendo o principal mecanismo envolvido no desenvolvimento de enfisema em fumadores. A elastina é secretada por vários tipos de células como um precursor, a tropoelastina. Após a acção da lisina oxidase, há formação de polímeros insolúveis de elastina, derivados de ligações cruzadas entre monómeros de tropoelastina. Estas ligações cruzadas, conhecidas como desmosinas, são típicas da elastina, o que as torna um marcador da degradação da elastina. Em fumadores e em doentes com DPOC, as desmosinas e os peptídeos de elastina encontram-se elevados. Por um lado, há controvérsias sobre a especificidade da medição destes peptídeos na urina devido à enorme durabilidade da elastina pulmonar e também se essa eliminação reflecte apenas a degradação da elastina pulmonar. Por outro lado, estudos sugerem que a taxa anual de declínio do FEV₁ se relaciona positivamente com níveis urinários de desmosina. Em conclusão, permanece a dúvida do uso clínico destes marcadores como tradutores do processo de elastólise (MacNee William, 2005).

Tem havido um grande interesse em compreender o papel das MPM na patogenia da doença. Estas enzimas catalisam componentes proteicos da matriz extracelular levando à formação de moléculas peptídicas biologicamente activas, envolvidas no processo inflamatório existente na DPOC. Vários estudos têm avaliado a actividade das MPM gelatinases (2 e 9) e MPM colagenases (1, 8 e 13) através da análise de biofluidos (Vernooy, Juanita H.J et al, 2004). No capítulo IV.2: “Recurso a amostras biológicas para identificação de biomarcadores” pode-se encontrar uma melhor abordagem sobre esta temática.

É evidente o aumento do stress oxidativo em fumadores e doentes com DPOC. Os oxidantes existentes no fumo do cigarro causam lesão directa nos componentes da matriz pulmonar, assim como, interferem com a síntese e reparação da elastina, promovendo o desenvolvimento de enfisema. Os radicais livres, também presentes no fumo do cigarro, afectam principalmente os ácidos gordos poliinsaturados das membranas celulares, conduzindo ao processo de peroxidação lipídica. Níveis aumentados dos produtos resultantes deste processo, 4-hidroxi-2-nonenal e malondialdeído (MDA) por exemplo, são encontrados no plasma e LBA de fumadores “saudáveis” e doentes com exacerbações de DPOC, comparativamente com não fumadores “saudáveis”. Adicionalmente, há evidência de que o nível da peroxidação lipídica se correlaciona com o grau de limitação ao fluxo aéreo (MacNee, William, 2005). Estudos recentes demonstraram que doentes fumadores com DPOC apresentam um aumento sérico do MDA, inversamente relacionado com alterações no FEV₁ (Montano, M. et al, 2010). O stress oxidativo parece assim ter um papel importante, pois certos biomarcadores, como o peróxido de hidrogénio e o 8-isoprostano, encontram-se elevados no ar exalado e condensado, na expectoração e na circulação sistémica dos doentes com DPOC. De notar que, perante exacerbações, se verifica uma maior actividade do stress oxidativo. Este mecanismo tem várias repercussões a nível pulmonar, nomeadamente, a activação de genes inflamatórios, inactivação de antiproteases, estimulação da secreção de muco, aumento da exsudação plasmática e redução da actividade das histona-deacetilases nos tecidos pulmonares, o que pode conduzir a uma expressão elevada de genes inflamatórios como também à redução da acção anti-inflamatória dos corticóides (Vestbo J. et al, 2011). Na figura 2, observa-se que o stress oxidativo exerce um papel importante na génese da DPOC através de danos directos nos componentes do tracto respiratório, amplificando também outros mecanismos concomitantes da patogenia (Cavalcante, Antonio G.M. e de Bruin, Pedro Filipe Carvalhedeo, 2009).

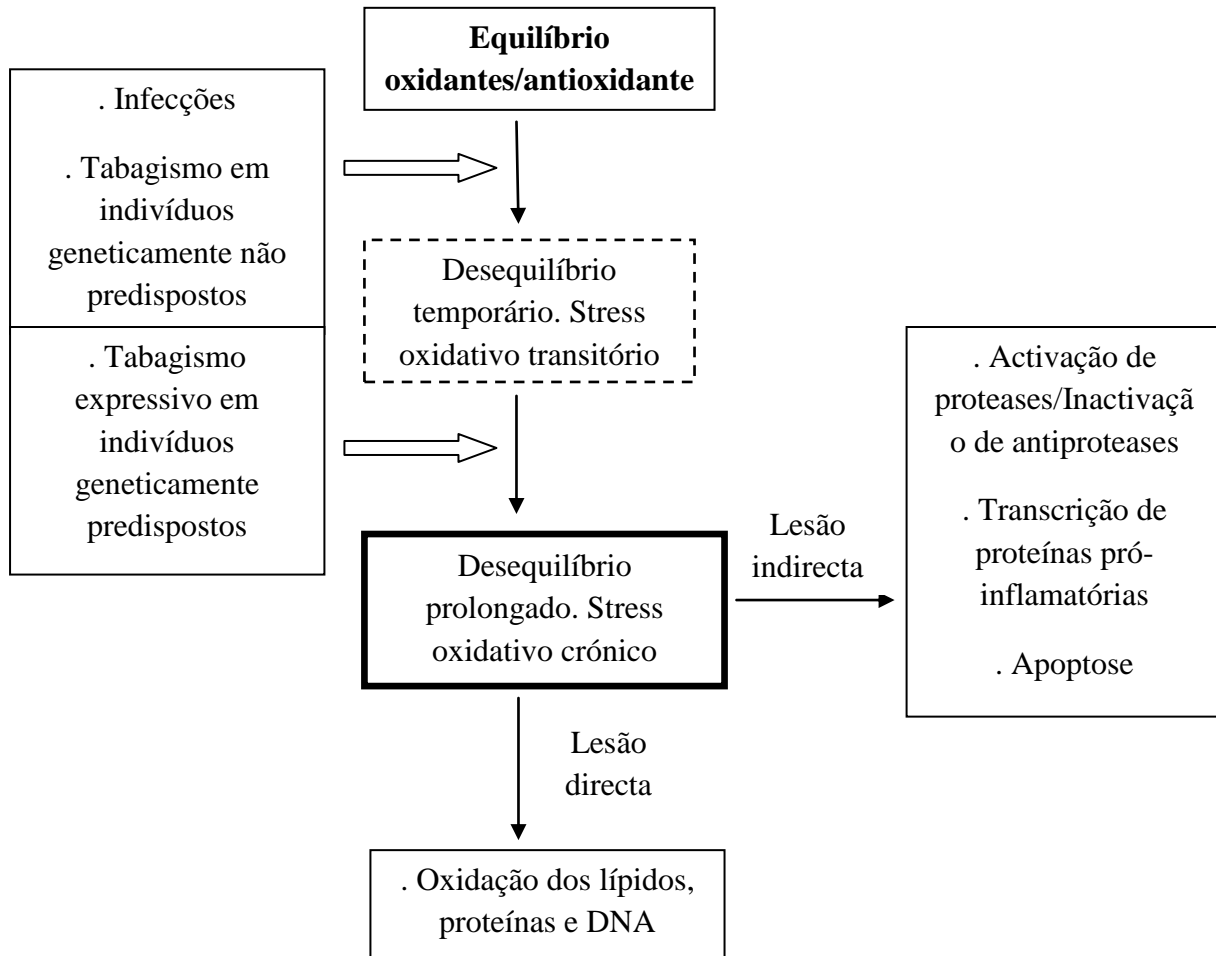


Figura 2 – (Adaptado de Cavalcante, Antonio G.M. e de Bruin, Pedro Filipe Carvalho, 2009). O stress oxidativo na DPOC gera danos directos aos componentes pulmonares e participa como desencadeador e amplificador dos outros mecanismos etiopatogénicos.

Uma melhor compreensão sobre os diferentes mecanismos subjacentes à patogenia da DPOC conduzirá ao desenvolvimento de uma intervenção terapêutica eficaz da mesma (MacNee, William, 2005).

IV.2) RECURSO A AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES

Definido já o conceito de biomarcador, acrescenta-se o facto de ele se poder referir à determinação de qualquer molécula ou material que reflecta determinado processo patológico. Uma variedade de biomarcadores pode ser avaliada e relacionada com a fisiopatologia, com a inflamação e com a destruição pulmonar existentes na DPOC (Cazzola, M. et al, 2008). Naturalmente, a fonte mais fidedigna para obter biomarcadores desta patologia é o pulmão. Deste modo, a metodologia usada para a pesquisa dos mesmos baseia-se na análise de amostras obtidas de doentes com DPOC a partir de biópsias brônquicas, LBA, expectoração (espontânea e induzida), ar exalado e condensado respiratório exalado (CRE), mas também de amostras de plasma/sangue e urina (Barnes, P.J et al, 2006; Noel, S. e Newbold. P, 2008; Cazzola, M. e Novelli, G., 2010). A técnica para a obtenção destas amostras difere no grau de invasão, ordenando-se por ordem decrescente em biópsias brônquicas, LBA, sangue, expectoração, CRE, ar exalado e urina (Noel, S. e Newbold. P, 2008). Nesta rúbrica serão analisadas as vantagens e desvantagens das diferentes amostras biológicas e, na seguinte, serão abordados os biomarcadores com relevância clínica.

Biópsias brônquicas

Em doentes com DPOC, fornecem informações sobre as alterações estruturais, os padrões celulares e a expressão das proteínas inflamatórias, podendo dar indícios quanto à patogenia.

Na doença estável, há infiltração acentuada de macrófagos e linfócitos T activados, nomeadamente células T CD8⁺ que expressam o interferão gama (INF- γ), CXCL10 (IP-10), IL-9 e receptores de quimiocinas relacionados à resposta do tipo 1, por exemplo, CXCR3. De notar que há diminuição das células T que expressam CCR5 (Barnes, P.J et al, 2006; Cazzola, M. et al, 2008).

Os eosinófilos também se encontram em maior número a nível da lâmina própria, podendo ainda denotar-se um pequeno aumento no epitélio (Noel, S. e Newbold. P, 2008; Cazzola, M. e Novelli, G., 2010).

A neutrofilia, que normalmente se verifica no lúmen das vias respiratórias, não é evidente a nível do tecido pulmonar, excepto nos doentes com limitação grave ao fluxo aéreo. Já nas exacerbações, verifica-se um aumento no recrutamento de eosinófilos e neutrófilos, estando estes associados à hiper-regulação de factores quimiotácticos específicos como o CCL5 (RANTES) e o CXCL5 (Barnes, P.J et al, 2006; Cazzola, M. et al, 2008).

Com a finalidade de identificar biomarcadores nas biópsias brônquicas, estudos recentes demonstraram que, na DPOC estável, podemos verificar um aumento da CCL5 e CXCL7, a nível da mucosa brônquica, e das células imunoreactivas IL-17A⁺ e IL-22⁺ na submucosa e IL-22⁺ e IL-23⁺ no epitélio brônquico (Cazzola, M. e Novelli, G., 2010).

A vantagem mais relevante do uso das biópsias brônquicas é que permitem entender as alterações funcionais existentes, pois as relações espaciais entre os diferentes componentes estruturais são mantidas. Biomarcadores da modificação estrutural, da apoptose ou da proliferação descontrolada podem ser determinados através da avaliação dos elementos estruturais da parede das vias respiratórias, que incluem o epitélio, a membrana basal, os

vasos, os tecidos conjuntivos e, por vezes, a musculatura lisa e as glândulas submucosas. Outra vantagem é que é possível identificar os vários subtipos de células inflamatórias envolvidas, avaliando-se as interações entre estas e as células residentes. A última vantagem é a possibilidade de, através do recurso à microdissecção a laser, se poder estudar individualmente os componentes estruturais.

No entanto, várias limitações se colocam na análise de biópsias brônquicas: o facto de ser um procedimento invasivo, pode tornar impossível a sua realização em doentes que apresentem comorbilidades associadas; as biópsias proximais não traduzem as verdadeiras alterações patológicas, visto as vias aéreas periféricas e o parênquima serem os sítios mais envolvidos no desenvolvimento da DPOC; a necessidade de múltiplas biópsias leva à enorme variabilidade nas determinações basais das células inflamatórias; e, por fim, nos estudos efectuados para avaliar os efeitos do tratamento deve-se incluir um número elevado de doentes em cada grupo de tratamento de modo a assegurar resultados fidedignos (Barnes, P.J et al, 2006; Cazzola, M. et al, 2008; Noel, S. e Newbold. P, 2008; Cazzola, M. e Novelli, G., 2010).

LBA

Através do LBA podem ser analisados vários mediadores inflamatórios. Nos fumadores “saudáveis”, bem como naqueles que apresentam DPOC, podem-se encontrar níveis aumentados da proteína catiónica eosinofílica (PCE), da mieloperoxidase (MPO) e da IL-8. Contudo, como em indivíduos não fumadores “saudáveis” tal não se verifica, julga-se que seja o tabagismo o desencadeador desse aumento e não a própria DPOC (Barnes, P.J et al, 2006; Cazzola, M. et al, 2008; Cazzola, M. e Novelli, G., 2010).

No LBA verifica-se também um aumento da actividade total das elastases e uma redução da actividade antielastase, reflectindo o característico desequilíbrio proteases-antiproteases existente nesta patologia (Barnes, P.J et al, 2006).

No que toca à composição celular, o LBA é maioritariamente composto por macrófagos alveolares (>80%), com alguns neutrófilos e linfócitos T, havendo doentes que também apresentam níveis aumentados de eosinófilos. Geralmente, o número de macrófagos e de neutrófilos é maior em doentes com DPOC relativamente aos não fumadores, mas também aos fumadores “saudáveis”. Apesar disso, alguns estudos associam o tabagismo ao aumento numérico dos neutrófilos (Barnes, P.J et al, 2006; Cazzola, M. et al, 2008).

Quanto ao doseamento da prostaglandina D2 e do ácido eicosapentanóico no LBA, é evidente a importante relação linear com a função pulmonar (Cazzola, M. e Novelli, G., 2010).

Estudos realizados mostraram, em doentes com DPOC, níveis elevados de triptase e histamina, sugerindo a activação de mastócitos nesta patologia. Porém, estes dados não foram comparados com fumadores “saudáveis”, podendo ser atribuído ao tabagismo (Cazzola, M. et al, 2008).

Como vantagens na utilização de amostras obtidas por LBA pode referir-se a capacidade para traduzir a inflamação evidente nos tecidos pulmonares periféricos, contrariamente às biópsias brônquicas, de poder ser efectuado com menos riscos e, como pode ser obtido nos mesmos doentes que realizaram biópsia, têm o benefício de fornecer informações adicionais e complementares (Barnes, P.J et al, 2006; Cazzola, M. et al, 2008).

As limitações relativas a esta técnica são o seu carácter invasivo, podendo mesmo levar a um maior desconforto do que a biópsia e ao aparecimento de febre transitória e o facto do volume de líquido resultante poder ser reduzido, conduzindo a uma análise ineficaz das amostras. De salientar que, devido à ausência de um marcador capaz de corrigir o efeito

diluicional da lavagem com solução salina, torna-se difícil a quantificação de biomarcadores no sobrenadante. Este facto, entre outros, contribui para a variabilidade nas determinações, assim como, para a necessidade de nos estudos se recorrer a um número maior de doentes (Barnes, P.J et al, 2006; Cazzola, M. et al, 2008; Cazzola, M. e Novelli, G., 2010).

Sangue

No plasma de doentes com DPOC, vários marcadores e mediadores inflamatórios têm-se mostrado elevados. Exemplos destes são a PCR, o TNF- α , a IL-8, a IL-6, a MPM-9 entre outros (Noel, S. e Newbold. P, 2008).

O perfil inflamatório de uma exacerbação é tipicamente neutrofílico, mas a inflamação eosinofílica também existe, estando associada com uma resposta favorável à terapêutica corticóide. Um estudo de Bafadhel, M. et al (2011), demonstrou que a contagem de eosinófilos no sangue periférico é um biomarcador sensível da eosinofilia na expectoração. Deste modo, afirmam que o uso da corticoterapia nas exacerbações da doença dependendo da contagem periférica de eosinófilos, pode reduzir o tratamento corticóide inapropriado (Bafadhel, M. et al, 2011).

Dois biomarcadores promissores para o diagnóstico e manuseamento da DPOC são o fibrinogénio e o surfactante pulmonar D (SP-D) plasmáticos (Dickens, J. et al, 2011). (Assunto desenvolvido na rúbrica “IV.3) Biomarcadores e sua utilidade clínica na DPOC: na fisiopatologia, monitorização (controlo/exacerbações) e terapêutica).

Tanto no sangue como na urina, pode-se monitorizar os efeitos sistémicos subjacentes a esta patologia, como a inflamação, o stress oxidativo, as anormalidades nutricionais e a degradação do colagénio ou da elastina (Tzortzaki, E.G. et al, 2007).

Expectoração

Embora muitos doentes com DPOC produzam espontaneamente quantidades suficientes de expectoração, estas secreções podem ter células mortas, alterando as contagens celulares e as determinações dos mediadores. Deste modo, a expectoração induzida é o procedimento preferido (Barnes, P.J et al, 2006; Cazzola, M. et al, 2008; Cazzola, M. e Novelli, G., 2010).

Através de análises químicas e imunocitoquímicas da expectoração, populações de células inflamatórias e subpopulações podem ser facilmente estudadas. A aplicação da citometria de fluxo tornou possível a identificação e a caracterização das diferentes populações celulares na expectoração (Tzanakis, N. et al, 2004).

Relativamente a células inflamatórias, verifica-se um aumento quantitativo das contagens totais das mesmas. As informações sobre a reprodutibilidade das contagens diferenciais de células na expectoração induzida são escassas. Contudo, parece existir uma reprodutibilidade razoavelmente satisfatória das contagens de células e dos mediadores nos estudos a longo prazo. Alguns demonstraram que vários mediadores estavam elevados no sobrenadante da expectoração de doentes com DPOC, com aumentos adicionais durante as exacerbações.

A IL-8 encontra-se aumentada na expectoração destes doentes, relacionando-se com a progressão da doença, elevando-se ainda mais durante as exacerbações. De salientar que, numa fase mais avançada da DPOC, se verificam níveis mais altos de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-8 e IL-6, comparativamente com doentes com a forma mais ligeira da doença (Barnes, P.J et al, 2006; Hacievliyagil, S. et al, 2006).

De referir, e de acordo com Broekhuizen, R. et al (2005), a deteção da leptina, uma hormona produzida pelos adipócitos, na expectoração induzida de doentes com DPOC, estando relacionada com outros marcadores inflamatórios, incluindo TNF- α e a PCR (Broekhuizen, R. et al, 2005).

Concentrações mais altas de proteases na expectoração também são evidentes, como as MPM-1,-8,-9 e o TIMP-1 (Cazzola, M. et al, 2008). De realçar que, as concentrações da MPM-8 e a actividade da MPM-9 se correlacionam negativamente com o FEV₁ e positivamente com a percentagem e número de neutrófilos (Cazzola, M. e Novelli, G., 2010). A MPM-12 está marcadamente elevada na expectoração induzida de doentes com DPOC estável, sugerindo um papel desta MPM no seu desenvolvimento (Demedts, IK. et al, 2005).

A principal característica nos doentes com DPOC é o aumento na percentagem de neutrófilos na expectoração, havendo uma relação negativa entre esta e o FEV₁. Na DPOC estável, os mediadores inflamatórios envolvidos no recrutamento de neutrófilos encontram-se significativamente elevados na expectoração, destacando-se a IL-8, GRO- α , o LTB₄, a elastase neutrofílica, o MCP-1 e a lipocalina neutrofílica humana (HNL) (Rutgers, SR. et al, 2000). Segundo Singh, D. et al (2010), a contagem de neutrófilos na expectoração não parece traduzir as anormalidades clínicas e fisiopatológicas da DPOC, servindo apenas este biomarcador para medir a carga de neutrófilos nas vias aéreas (Singh, D. et al, 2010).

O número de eosinófilos encontra-se também aumentado, parecendo haver uma relação inversamente proporcional entre o seu número e a função pulmonar.

Os linfócitos T CD8⁺ estão elevados quantitativamente na expectoração de doentes com DPOC, estando o número de células T CD4⁺ reduzido (Tzanakis, N. et al, 2004). De acordo com Chrysosfakis, G. et al (2004), na expectoração de doentes com DPOC há um aumento no número de células CD8⁺, uma diminuição da relação CD4/CD8 e um aumento da expressão de perforinas e da actividade citotóxica, relativamente a fumadores “saudáveis” (Chrysosfakis, G. et al, 2004).

Várias citocinas, quimiocinas, eicosanóides e marcadores do stress oxidativo mostram um aumento na DPOC comparativamente a fumadores assintomáticos, com um maior aumento durante as exacerbações.

Recentemente, dois biomarcadores identificados na expectoração induzida, apolipoproteína A1 e lipocalina-1, relacionaram-se com a severidade da doença, sugerindo a sua diminuição uma deficiência do sistema imune inato, com consequente aumento da susceptibilidade a infecções (Cazzola, M. e Novelli, G., 2010).

De acordo com um estudo realizado por Roland, M. et al (2001), em doentes com exacerbação os níveis de endotelina-1 (ET-1) na expectoração encontram-se elevados, contudo as suas concentrações na admissão hospitalar não se relacionam com a apresentação clínica nem com o aumento da morbimortalidade na DPOC (Roland, M. et al, 2001).

O ácido hialurónico, um componente da matriz extracelular, pode também ser encontrado em alta concentração a nível da expectoração de doentes com DPOC comparativamente com não fumadores e fumadores “saudáveis” (Dentener, M.A. et al, 2005).

Recentemente, um estudo de Boschetto, P. et al (2005) concluiu que na expectoração de doentes em exacerbação da doença, comparativamente a fumadores “saudáveis” e a não fumadores sem DPOC, encontra-se um nível reduzido de substância P e neuroquinina A (taquicininas). Como não foram encontradas diferenças entre doentes com DPOC estável, fumadores com função pulmonar normal e não fumadores, sugeriu-se que as taquicininas possam estar envolvidas nas exacerbações da DPOC (Boschetto, P. et al, 2005).

Apesar das amostras de expectoração induzida serem fáceis de obter e forneçam informações sobre células inflamatórias e mediadores, elas têm origem principalmente nas vias aéreas proximais podendo não traduzir a inflamação periférica, fortemente relacionada com o prognóstico clínico destes doentes. De notar que, a nebulização de uma solução salina hipertónica, para obtenção de expectoração, estimula a inflamação neutrofílica, que persiste por 24 horas, impossibilitando a repetição da amostra durante esse tempo (Barnes, P.J et al, 2006; Cazzola, M. et al, 2008). No estudo de Cazzola, M. e Novelli, G. (2010), recomenda-se evitar a repetição da amostra durante o período de 48 horas. As proteases existentes na

expectoração têm a capacidade de degradar alguns mediadores proteicos, revelando estudos recentes que o recurso à diálise com o objectivo de remover os inibidores de proteases, torna possível aumentar consideravelmente as concentrações de várias citocinas na expectoração dos doentes (Barnes, P.J et al, 2006; Cazzola, M. et al, 2008).

CRE

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) encontra-se elevado no CRE dos doentes com DPOC, aumentando ainda mais durante as exacerbações. Nestes doentes, foram observadas relações entre o H_2O_2 no CRE e o FEV_1 , neutrófilos da expectoração e escala da dispneia, sugerindo que este marcador se relaciona com a actividade da doença, não sendo, contudo, um biomarcador específico desta patologia (Kostikas, K. et al, 2003).

Outro biomarcador do stress oxidativo, o 8-isoprostano, assim como o LTB_4 , também estão aumentados no CRE, sendo este aumento mais notável nas exacerbações. O 8-isoprostano relaciona-se com a gravidade da doença e o LTB_4 com a neutrofilia da expectoração, podendo ser um biomarcador útil na avaliação do grau de inflamação neutrofílica (Biernacki, WA. et al, 2003).

O pH no CRE encontra-se diminuído nos doentes com DPOC e nos fumadores “saudáveis” comparativamente aos não fumadores sem a doença, permitindo assim a sua distinção. Contudo, não diferencia os fumadores “saudáveis” dos doentes com DPOC (MacNee, William. et al, 2011). O valor do pH relaciona-se com a neutrofilia da expectoração e com o FEV_1 , não sendo afectado pela terapêutica oral com corticóides. Não existem dados da sua correlação com as exacerbações (Kostikas, K. et al, 2002). Estas informações, aliadas ao facto da ausência de relação do pH com a severidade da doença, assim como, com a inflamação, avaliada através da contagem de leucócitos na expectoração, sugerem que o pH

no CRE não parece ser útil como um biomarcador na avaliação da severidade ou do efeito da terapêutica na DPOC (MacNee, William. et al, 2011).

O diagnóstico de exacerbação da doença pode ser melhorado pela análise de biomarcadores como α 1-AT, uma proteína de fase aguda e antiprotease que inibe a elastase neutrofílica. A sua medição no CRE detectou um aumento significativo da sua concentração em todos os doentes com exacerbação de DPOC, comparativamente a indivíduos saudáveis e a doentes com doença estável. A sensibilidade e a especificidade da α 1-AT como biomarcador das exacerbações carecem de uma análise mais aprofundada (Koczulla, A.R. et al, 2011).

Por ser fácil de obter e por não ser invasivo, muitos mediadores podem ser detectados no CRE. Contudo, a variabilidade das determinações associada à diluição variável e extensa que ocorre no vapor de água durante a condensação, as concentrações baixas dos mediadores, próximas dos limites de detecção, entre outros factores, limitam o recurso a este método. Várias abordagens são necessárias para otimizar o uso do CRE na prática clínica, realçando a necessidade de standardizar a técnica (Cazzola, M. et al, 2008).

Ar exalado

Por ser uma abordagem não invasiva e por permitir a obtenção de amostras repetidas, a determinação de biomarcadores no ar exalado tem-se revelado útil. Porém, existem problemas inerentes à sua reprodutibilidade e sensibilidade que devem ser esclarecidos, para que este método passe a ser usado na rotina clínica (Barnes, P.J et al, 2006; Cazzola, M. et al, 2008).

A determinação do óxido nítrico exalado (FeNO) não parece ser útil pois o seu nível está normal ou ligeiramente elevado, excepto durante as exacerbações. Tal deve-se ao aumento do stress oxidativo, com formação de peroxinitrito e nitrato, razão pela qual o NO é removido da fase gasosa. Esta observação também explica a sua diminuição nos fumadores “saudáveis” (Cazzola, M. e Novelli, G., 2010). De notar que, os doentes com DPOC que apresentam

associação de hipertensão pulmonar ou cor pulmonale podem apresentar níveis baixos de FeNO (Clini, E. et al, 2000). O seu aumento na DPOC relaciona-se com as quantidades elevadas de eosinófilos, com positividade da resposta aos broncodilatadores e com a reactividade aos corticóides, podendo assim ser usado para detectar um componente asmático associado (Papi, A. et al, 2000). Embora o óxido nítrico das vias respiratórias esteja reduzido ou normal, verifica-se, através de dosagens do óxido nítrico exalado em diferentes fluxos, que há um aumento do óxido nítrico periférico, estando este relacionado com a gravidade da doença. Apesar da necessidade de estudos adicionais, pode-se considerar o óxido nítrico alveolar um biomarcador não-invasivo útil na monitorização da inflamação associada à DPOC (Barnes, P.J et al, 2006; Cazzola, M. et al, 2008).

O monóxido de carbono (CO) exalado encontra-se aumentado nos doentes com DPOC, assim como, nos fumadores “saudáveis”. Daí que, embora a determinação da sua pressão no ar exalado seja fácil de obter, não é considerado tão útil quanto a determinação do FeNO (Montuschi, P. et al, 2001).

Biomarcadores da peroxidação lipídica, como o etano e o pentano, que são hidrocarbonetos voláteis, podem ser detectados no ar exalado. As suas concentrações elevadas nos doentes com DPOC relacionam-se com a gravidade da doença (Barnes, P.J et al, 2006).

Urina

A análise de amostras de urina é um simples método que permite avaliar os produtos da degradação da elastina e do colagénio. Embora alguns estudos revelem que não há diferença nos marcadores urinários entre doentes com DPOC e fumadores, outros reportam que a desmosina urinária, um marcador da degradação da elastina, se encontra elevada nos fumadores com rápido declínio da função pulmonar (Igishi, T. et al, 2003), assim como nas exacerbações da DPOC (Annovazzi, L. et al, 2004).

Comparando amostras de urina de indivíduos saudáveis com doentes com DPOC, nestes últimos verifica-se um aumento significativo do 8-hidroxidesoxiguanosina, um marcador do stress oxidativo. Também o 8-isoprostano, um produto da peroxidação lipídica, se encontra elevado na urina dos doentes com DPOC, de forma mais significativa durante as exacerbações.

Nos doentes com DPOC é comum ocorrerem complicações trombóticas na circulação pulmonar. O principal metabolito, vasoconstritor e agregante plaquetar, é o tromboxano 11-dihidro-TxB₂, cujo nível está aumentado nas amostras de urina dos doentes com DPOC, relacionando-se com o grau de hipóxia.

A análise das amostras de urina é não invasiva, simples e segura, permitindo determinar as alterações existentes a nível dos marcadores de destruição pulmonar e stress oxidativo. Contudo, tem que se ter em conta alguns aspectos como: as diferentes metodologias adoptadas entre os laboratórios; a viabilidade da técnica ser exacta, reprodutível e de integrar um número reduzido de manipulações evitando perdas indeterminadas de dados; e, finalmente, o facto de os marcadores urinários se alterarem de acordo com a condição clínica do indivíduo em estudo (Tzortzaki, E.G. et al, 2007).

A invasão do procedimento, a fraca reprodutibilidade ou a falta de standardização das técnicas tornam limitado o uso clínico destas potenciais fontes, exceptuando o sangue, para a descoberta de novos biomarcadores. Com a consciência crescente de que a DPOC é uma doença sistémica, actualmente, a procura de biomarcadores plasmáticos torna-se atraente pois a amostra sanguínea é prontamente eficaz, sendo a sua medição facilmente standardizada (Sin, D.D. e Man, S.F.P, 2008). Por este motivo, o capítulo seguinte aborda os biomarcadores, com determinação sérica, que podem vir a ser úteis na prática clínica permitindo assim uma melhor abordagem da DPOC.

❖ **Biomarcadores nas amostras biológicas** - os seus níveis na DPOC estável e exacerbação e a sua relação com a função pulmonar

Amostra biológica	DPOC estável		Relação com a exacerbação	Relação com a gravidade da função pulmonar	
	Nível aumentado	Nível reduzido		↑	↓
Biópsia brônquica	Macrófagos Eosinófilos Neutrófilos Células T CD8+ INF- γ IP-10 IL-9 CXCR3 CCL5 CXCL7 IL-17A ⁺ IL-22 ⁺ IL-23 ⁺	CCR5	↑ eosinófilos e neutrófilos (com hiper-regulação de CCL5 e CXCL5)		
LBA	Macrófagos Eosinófilos Neutrófilos PCE MPO IL-8 Tryptase Histamina	PgD2 Ác.eicosa-pentanóico			PgD2 Ác.eicosa-pentanóico
Sangue	PCR TNF- α IL-6 IL-8 MPM-9 SP-D Fibrinogénio				
Expectoração	Eosinófilos Neutrófilos Células T CD8+ TNF- α IL-6 IL-8 Leptina MPM-1,-8,-9 e -12 TIMP-1 GRO- α LTB4	Células T CD4+ Substância P Neuroquinina A Apolipoproteína A1 Lipocalina-1	↑ IL-8 ↑ ET-1 ↑ Substância P ↑ Neuroquinina A	Eosinófilos Neutrófilos IL-8 TNF- α IL-6 MPM-8 e -9	Apolipoproteína A1 Lipocalina -1

	Elastase neutrofílica MCP-1 HNL ET-1 Ác.hialurónico				
CRE	H ₂ O ₂ 8-isoprostano LTB ₄ α-1AT	pH	↑ H ₂ O ₂ ↑ 8-isoprostano ↑ LTB ₄ ↑ α-1AT	H ₂ O ₂ 8-isopros- tano LTB ₄	pH
Ar exalado	FeNO CO Etano e pentano	FeNO, se à DPOC se associa hipertensão pulmonar ou cor pulmonale	↑ FeNO	FeNO Etano Pentano	
Urina	Desmosina 8-hidroxi-desoxi-guanosina 8-isoprostano 11-dihidroTxB2		↑ Desmosina ↑ 8-isoprostano	Desmosina	

Quadro 3 – Biomarcadores nas amostras biológicas: os seus níveis na DPOC estável e exacerbação e a sua relação com a função pulmonar. *Legenda:* ↑ = nível aumentado e ↓ = nível diminuído.

Nota: os biomarcadores que se repetem nas diferentes amostras encontram-se evidenciados a cinzento.

IV. 3) BIOMARCADORES E SUA UTILIDADE CLÍNICA NA DPOC: na fisiopatologia, monitorização (controle/exacerbações) e terapêutica

1. SP-D

O SP-D é uma glicoproteína colagenosa multimérica e hidrofílica, sintetizada principalmente pelos pneumócitos tipo II, podendo também ser produzida, embora em menor quantidade, pelas células pulmonares Clara, células endoteliais e células glandulares do tracto gastrointestinal (Sin, D. et al, 2007). É composta por monómeros, cada um destes com quatro domínios distintos. A integridade da sua estrutura quaternária é importante para as funções como surfactante pulmonar e homeostase lipídica, na imunidade inata, na regulação da clearance celular, bem como nas respostas inflamatórias e imunológicas (Kishore, U. et al, 2006).

A origem do SP-D no sangue, assim como a relação entre as suas concentrações sérica e pulmonar, sob condições inflamatórias, permanece por esclarecer. A hipótese mais universalmente aceite baseia-se em alterações da permeabilidade alvéolo-capilar, regulando, deste modo, a passagem do SP-D do pulmão para o sangue (hipótese da translocação). Em indivíduos saudáveis, a sua concentração sérica é baixa, sendo a pulmonar elevada. No entanto, em fumadores e em doentes com DPOC, apesar do aumento sérico do SP-D, no LBA verificam-se níveis reduzidos do mesmo.

O seu nível sérico parece estar aumentado tanto em patologias pulmonares - proteinose alveolar, fibrose quística e DPOC, como infecciosas - tuberculose e pneumonia bacteriana (Winkler, C. et al, 2011).

Dados de um estudo realizado por Sin, D. et al (2007), com duração de três meses e abrangendo apenas doentes com DPOC grave ou muito grave, revelam que há uma relação inversa entre o FEV1 e a concentração sérica de SP-D, enquanto medições a nível pulmonar

se correlacionam positivamente com o mesmo. Deste modo, uma concentração sérica elevada de SP-D é um bom marcador da função pulmonar reduzida, do agravamento do estado clínico (especialmente de um aumento da dispneia), associando-se a um pior prognóstico desta patologia. Adicionalmente, foi demonstrado que numa população composta por fumadores e ex-fumadores, os que sofriam de DPOC apresentavam uma concentração sérica de SP-D superior. Estes dados sugerem que o seu nível no sangue traduz a actividade da doença, sendo considerado um potencial biomarcador da integridade epitelial na DPOC. Outra observação revela que os níveis séricos de SP-D decrescem com a terapêutica oral com corticosteróides (20 mg/dia de prednisolona durante 4 semanas conduz a uma descida de 126 para 82,1 ng.ml⁻¹ no SP-D), tornando este biomarcador útil no desenvolvimento de novas terapêuticas anti-inflamatórias para a DPOC (Lomas, D.A. et al, 2009).

Assim, o SP-D sérico é um biomarcador promissor para avaliar a progressão e prever o prognóstico da DPOC em doentes graves, não se podendo generalizar a doentes com DPOC leve ou moderada (Sin, D. et al, 2007).

Quanto ao aumento do risco de exacerbação, e de acordo com Lomas, D.A. et al (2009), há uma associação com o nível sérico elevado de SP-D (Lomas, D.A. et al, 2009).

De salientar a existência de dados que contradizem o anteriormente citado, afirmando não haver correlação entre o nível sérico de SP-D e a severidade da doença definida pela GOLD. Além do mais, acrescentam o facto de não haver diferença na sua concentração sérica quando se compara indivíduos com DPOC e fumadores com bronquite crónica com fumadores que não apresentam este sintoma (Cazzola M. e Novelli G., 2010).

Mais recentemente, um estudo de Winkler, C. et al (2011) concluiu que tanto o nível sérico do SP-D como o pulmonar são marcadores estáveis e que se relacionam com o tabagismo, obstrução das vias aéreas e estado da doença. Além disso, foi demonstrado que o fumo do cigarro é capaz de interromper a estrutura quaternária do SP-D, o que poderá levar a

uma função imunológica diminuída e a um aumento da translocação do SP-D do pulmão para a circulação (Winkler, C. et al, 2011).

Portanto, a utilidade clínica do SP-D como biomarcador não está completamente esclarecida devido a três principais motivos: a compreensão da expressão do SP-D no LBA e no sangue de indivíduos saudáveis, fumadores e doentes com DPOC é ainda reduzida; o stress oxidativo e a acção de proteases, ambos os processos aumentados nos fumadores e em doentes com DPOC, alteram a estrutura quaternária do SP-D, o que afecta a exactidão da sua medição; e, apesar do SP-D não ser afectado pelo exercício físico em indivíduos saudáveis, desconhece-se esta relação em fumadores e em doentes com DPOC (Hoegh, S.V. et al, 2010).

2. Surfactante pulmonar-A (SP-A)

O SP-A é uma lecitina com múltiplas funções que contribuem para a defesa inata e regulam o processo inflamatório pulmonar. Em condições normais, o SP-A parece proteger contra os efeitos do tabaco (Vlachaki, E. et al, 2010).

Segundo um estudo efectuado por Ohlmeier, S. et al (2009), recorrendo à proteómica, concluiu-se que os doentes com DPOC revelaram níveis elevados de SP-A comparativamente a indivíduos com pulmões normais ou fibróticos. Verificou-se que os seus níveis eram baixos num pulmão sem patologia e altos em doentes com DPOC nos estádios II, III e IV. De salientar que, os seus níveis encontraram-se também elevados no sobrenadante da expectoração induzida de doentes com DPOC relativamente a não fumadores e a fumadores “saudáveis” (Ohlmeier, S. et al, 2009).

Um outro estudo realizado por Vlachaki, E. et al (2010), demonstrou uma expressão alterada do SP-A nos doentes com DPOC, relacionando-se com a obstrução das vias aéreas. Esta relação pode sugerir tanto uma produção anormal de SP-A pelos pneumócitos tipo II como um turnover aumentado nos pulmões, nos doentes com DPOC. O mesmo estudo, com

recurso também à Western Blot, revelou dados controversos relativamente ao referido anteriormente, salientando níveis de SP-A superiores em não fumadores relativamente a doentes com DPOC e fumadores “saudáveis”. Contudo, entre estes dois últimos grupos a diferença observada não foi estatisticamente significativa.

Esta é uma área que requer mais exploração para se poder considerar o SP-A um potencial biomarcador na DPOC (Vlachaki, E. et al, 2010).

3. Elastina da matriz (desmosina e isodesmosina)

Na perspectiva de que o desenvolvimento de biomarcadores pode ajudar na descoberta de novas terapêuticas e de que a elastina é um dos principais componentes a ser afectado pelos mecanismos lesionais subjacentes à DPOC, evidências clínicas e laboratoriais sugerem que os produtos de degradação da elastina podem satisfazer essa necessidade. Os aminoácidos, desmosina e isodesmosina (DI), existentes apenas na elastina da matriz, podem ser medidos com especificidade e sensibilidade no sangue, urina e expectoração, indicando alterações no balanço sistémico entre a actividade e a inibição da elastase. Os níveis destes biomarcadores na expectoração reflectem o estado de degradação da elastina no pulmão.

Deste modo, este biomarcador pode ser usado como um indicador das alterações no estado de inflamação, havendo assim uma correlação entre o nível de DI e a severidade da doença, bem como dos efeitos na elastina pulmonar pela resposta à terapêutica (Turino, G.M. et al, 2011).

De acordo com o citado está um estudo prévio, de Fiorenza, D. et al (2002), que mediu os níveis de DI em três amostras de urina de nove doentes com DPOC durante os primeiros cinco dias da exacerbação e nos dois meses seguintes à resolução da mesma, concluindo que, embora ligeiro, há um aumento estatisticamente significativo da degradação da elastina pulmonar durante a exacerbação da DPOC (Fiorenza, D. et al, 2002).

Contudo, o seu uso clínico requer algumas clarificações, em relação ao seu uso nos diferentes fenótipos na DPOC, na sua correlação com a progressão ou regressão do curso clínico da DPOC e da influência das comorbilidades na alteração dos níveis de DI.

Estudos a larga escala com populações de doentes com DPOC, com características clínicas e funcionais bem conhecidas, e recorrendo à tomografia computadorizada pulmonar e genómica, são necessários para se aprofundar a utilidade clínica da degradação da elastina como biomarcador nesta patologia (Turino, G.M. et al, 2011).

Recentemente, foi demonstrado o potencial recurso do método UPLC-IM-MS (cromatografia líquida de ultra-alta pressão e mobilização iónica combinada com a espectrometria de massa) na bioanálise quantitativa dos níveis de desmosina e isodesmosina livres em amostras urinárias de doentes com DPOC. Este método revelou uma maior produtividade e selectividade, sendo de aplicação rápida e não invasivo (Devenport, N. et al, 2011).

4. Lipocalina-1 e Apolipoproteína A1

Um estudo efectuado por Nicholas B. et al (2010) revelou que as concentrações de ambos os biomarcadores na expectoração encontram-se significativamente diminuídas em doentes com DPOC relativamente a fumadores “saudáveis”. Além do mais, evidenciou que esta redução, especialmente a da apolipoproteína A1, se correlaciona com o grau de limitação do fluxo aéreo, isto é, com a relação FEV₁/CPT (capacidade pulmonar total). Deste modo, estes marcadores, analisados a nível da expectoração, relacionam-se com a severidade da doença.

Outros membros da família das apolipoproteínas mostraram estar alterados na DPOC. De referir como exemplo o facto de os níveis plasmáticos da apolipoproteína E estarem aumentados nestes doentes (Bandow, J.E. et al, 2008).

A redução da lipocalina-1 e da apolipoproteína-A1 na DPOC indica uma deficiência na defesa inata, o que poderá explicar uma susceptibilidade aumentada para exacerbações de origem infecciosa (Nicholas B. et al, 2010).

5. Leptina

A presença de leptina no pulmão aliada ao facto da existência de altas concentrações de receptores de leptina, sugere uma função local específica da mesma. Foi demonstrado, *in vitro*, que esta hormona estimula a proliferação celular no epitélio da traqueia, alertando para o seu papel como factor de crescimento, ajudando na manutenção da barreira epitelial. Adicionalmente, a leptina pode estar envolvida na resposta imune local, havendo a expressão de receptores de leptina nos neutrófilos e células T (Bruno, A. et al, 2002).

Níveis séricos de leptina encontram-se aumentados em doentes com DPOC comparativamente a indivíduos controlo, relacionando-se com a severidade da doença, avaliada pelo FEV₁, e com outros marcadores da inflamação sistémica (Sin, D. e Man, S., 2003).

Dados de um estudo revelaram que a leptina é detectada na expectoração induzida de doentes com DPOC moderada, estando relacionada positivamente com marcadores inflamatórios como a PCR e o TNF- α , fundamentando assim, o seu envolvimento na resposta inflamatória local (Broekhuizen, R. et al, 2004).

Adicionalmente, identificou-se que a leptina, assim como a adinopectina, podem representar biomarcadores séricos durante a exacerbação de DPOC. Enquanto a leptina se encontra aumentada na admissão e diminuída na resolução, a adinopectina está reduzida na admissão e elevada na resolução, apresentando a relação leptina/adinopectina uma diminuição entre a admissão e a resolução. De referir também que, ambas estão associadas com o processo inflamatório sistémico da exacerbação, encontrando-se mais relacionadas com a IL-6

e TNF- α . Uma observação importante é que um aumento da relação leptina/adiponectina se correlaciona com um aumento da inflamação sistémica durante a exacerbação. Estes dados sugerem um possível envolvimento do tecido adiposo, para além da sua capacidade de armazenamento de energia, durante a exacerbação na DPOC (Krommidas, G. et al, 2009).

Estudos futuros são necessários para esclarecer a importância da leptina nas vias aéreas dos doentes com DPOC (Broekhuizen, R. et al, 2004).

6. α -2 macroglobulina, haptoglobina, ceruloplasmina e hemopexina

Um estudo efectuado por Verrills, N.M. et al (2011), recorrendo à proteómica, identificou estes quatro biomarcadores séricos que, quando usados em combinação, podem discriminar, de modo eficaz, entre indivíduos controlo, asmáticos e doentes com DPOC. Deste modo, este painel de biomarcadores tem o potencial de vir a ser extremamente útil para o diagnóstico clínico e manuseamento da doença respiratória. Outra observação deste estudo revelou que a via do metabolismo do ferro e a resposta de fase aguda podem estar envolvidas na patogenia da doença das vias aéreas (Verrills, N.M. et al, 2011).

De acordo com Larsen, K. et al (2006), a haptoglobina pode estar implicada na remodelação e fibrose na asma e DPOC (Larsen, K. et al, 2006).

A reforçar este estudo, está uma prévia análise de Engstrom, G. et al (2009) com o objectivo de explorar os níveis séricos de cinco proteínas sensíveis à inflamação (fibrinogénio, ceruloplasmina, α 1-antitripsina, haptoglobina e orosomucóide), verificando que as suas concentrações eram elevadas e que se relacionavam com as admissões hospitalares por DPOC durante vinte e cinco anos de *follow-up* (Engstrom, G. et al, 2009).

7. PCR

A PCR é uma proteína de fase aguda sintetizada principalmente pelos hepatócitos em resposta a lesão tecidual ou inflamação, reflectindo o impacto sistémico da mesma (Pepys, M.B. e Hirschfield, G.M., 2003).

É o biomarcador molecular melhor estudado e mais clinicamente utilizado nos doentes com DPOC. Contudo, não é específico desta patologia, podendo estar elevado em várias condições infecciosas, inflamatórias e malignas (Patel A. et al, 2010).

O objectivo do estudo clínico orientado por de Torres, J.P., et al (2006), foi determinar a relação existente entre os níveis séricos de PCR e os factores preditivos de prognóstico em doentes com DPOC estável. Demonstrou-se que os níveis de PCR são elevados nestes doentes relativamente a indivíduos controlo, verificando-se que a pressão arterial de oxigénio (PaO₂) e a prova dos 6 minutos de marcha têm uma forte associação negativa com os mesmos. Adicionalmente, observou-se que as suas concentrações se correlacionam de modo independente com outras variáveis clínicas de prognóstico, nomeadamente, FEV₁, capacidade vital forçada, relação capacidade inspiratória/capacidade pulmonar total, estadio GOLD e índice de BODE. Deste modo, factores prognósticos da doença afectam os níveis séricos de PCR em doentes com DPOC estável, o que pode ajudar a prever o prognóstico, independentemente do grau de obstrução ao fluxo aéreo. Este estudo suporta a relevância da medição da PCR, devendo ser esta informação considerada quando são analisados os níveis séricos deste marcador em doentes com DPOC estável (de Torres, J.P. et al, 2006).

Conclusões de outros estudos referem o aumento sérico da PCR em fumadores, em indivíduos com a função pulmonar reduzida (isto é, com FEV₁ reduzido) ou em doentes com DPOC estável (Gan, W.Q, et al, 2004; Gan, W.Q, et al, 2005), salientando-se nestes últimos, que os níveis elevados de PCR se relacionam com o risco e o prognóstico cardiovascular (Sin, D.D. et al, 2003) e a sua diminuição com o tratamento com corticosteróides inalados e

sistémicos (Sin, D.D. et al, 2004) e com o uso de terapêutica oral com estatinas (Albert, M.A. et al, 2001).

Apesar do desacordo entre autores em afirmar que os níveis de PCR aumentam numa exacerbação de etiologia bacteriana, um estudo orientado por Weis, N. e Almdal, T. (2005), afirma que a PCR pode ser usada como um marcador da infecção bacteriana numa exacerbação da DPOC, independentemente do tratamento corticóide sistémico contínuo. Contudo, tal facto deve ser testado em ensaios clínicos e, se se confirmar esta observação, o recurso a antibióticos pode ser reduzido neste grupo de doentes (Weis, N. e Almdal, T., 2005). De salientar que, o valor preditivo da PCR em distinguir uma exacerbação devido a uma nova estirpe bacteriana melhora quando em combinação com o TNF- α e a elastase neutrofílica, ambos medidos na expectoração (Sethi, S. et al, 2008).

De acordo com o já referido anteriormente estão Dahl, M. et al (2007), que durante oito anos de *follow-up* de uma população com obstrução aérea, referem que o aumento sérico da PCR é um forte preditivo da hospitalização e da morte dos doentes com DPOC a longo prazo, independentemente do hábito tabágico e da função pulmonar (Dahl, M. et al, 2007).

Num estudo abrangendo doentes com DPOC leve a moderada e durante um período superior a sete anos de *follow-up*, concluiu-se que a relação sérica fibronectina/PCR está associada com todas as causas de mortalidade da DPOC (especialmente a cardíaca). Contudo, em contraste com os restantes biomarcadores, esta associação não é linear, isto é, há uma redução exponencial do risco de mortalidade até valor aproximado de 150 da relação fibronectina/PCR, a partir do qual o risco de mortalidade não se altera significativamente. Ensaios clínicos futuros são necessários para validar esta simples relação como um biomarcador na DPOC (Man, S.F.P. et al, 2008).

Hurst, J.R. et al (2006), após avaliarem a importância de 36 biomarcadores analisados em amostras sanguíneas de doentes com DPOC, antes e durante as exacerbações, concluíram que

a PCR foi o mais efectivo para distinguir uma exacerbação da variação diária dos sintomas. Deste estudo realçam-se também a IL-6, o SP-D e o MPIF-1 (myeloid progenitor inhibitory factor-1). Porém, verificaram que a PCR por si só não é suficientemente específica e sensível para confirmar uma exacerbação e que o aumento da sua concentração sérica não reflecte a gravidade clínica da mesma. Outra observação deste estudo revelou que a via monocítica pode ser um importante alvo em futuras pesquisas (Hurst, J.R. et al, 2006).

Já Muller, B. e Tamm, M. (2006), afirmaram que o uso da PCR na rotina clínica é facilitado pelo seu baixo custo, disponibilidade e extensa experiência clínica. Contudo, após uma análise do seu valor diagnóstico, concluíram também que a sua sensibilidade e especificidade são baixas, 74,4% e 57,5% respectivamente, sendo tal inaceitável para um bom marcador. Porém, combinando a PCR com um dos sintomas major de exacerbação, a sua eficácia diagnóstica melhora. Por este motivo, este estudo afirma ser prematuro monitorizar a PCR em doentes com DPOC sem exacerbações da doença (Muller, B. e Tamm, M., 2006).

Apesar das conclusões de todos estes estudos serem concordantes, uma análise realizada por de Torres J.P. et al (2008) teve grande impacto clínico ao verificar que os níveis basais da PCR afinal não influenciam a taxa de mortalidade destes doentes. Como justificação para esta observação, afirmou que nos estudos anteriores a relação entre a PCR e a mortalidade era fraca, sendo a recolha dos dados para esta relação afastada no tempo. Do mesmo modo, enquanto o seu estudo abrange doentes com DPOC moderada a severa, os anteriores envolviam doentes assintomáticos ou com sintomas mínimos, daí a PCR perder a sua eficácia preditiva em estádios mais severos. Por último, neste estudo incluem-se doentes que estão sob corticóides inalados, tendo alguns várias comorbilidades, contrariamente aos prévios, onde os doentes não estavam medicados nem apresentavam comorbilidades (Torres J.P. et al, 2008).

Com o objectivo de correlacionar os níveis plasmáticos de biomarcadores com o declínio da função pulmonar nos doentes com DPOC, um estudo de Higashimoto, Y. et al (2009)

mostrou que elevados níveis circulantes de PCR e de MPM-9 associam-se ao rápido declínio do FEV₁. Tal sugere que estes biomarcadores são bons candidatos para preditores do rápido declínio da função pulmonar na DPOC, embora estudos mais amplos e a longo prazo sejam necessários para confirmar esta observação (Higashimoto, Y. et al, 2009).

8. Procalcitonina (PCT)

Os antibióticos estão recomendados nos doentes admitidos nas Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) por exacerbações severas da DPOC. Os níveis séricos da PCT podem ser uma ferramenta útil para seleccionar os doentes com menor probabilidade de desenvolver infecção bacteriana, logo, os que não necessitam de tratamento antibiótico.

Um estudo de coorte prospectivo, efectuado por Daublin, C. et al (2008), com doentes admitidos na UCI por exacerbação severa de DPOC, e medindo os níveis de PCT à admissão, após seis e vinte e quatro horas, concluiu que 40% destes doentes têm uma baixa probabilidade de ter infecção bacteriana, correlacionando-se com uma concentração sérica de PCT inferior a 0,1µg/l, sugerindo assim um possível uso inapropriado de antibióticos. Contudo, mais estudos são necessários para avaliar o efeito a curto-prazo neste grupo de doentes da estratégia terapêutica baseada na PCT, assim como, entender o papel dos antibióticos a longo prazo nos doentes com DPOC, particularmente nos que apresentam baixos níveis séricos de PCT e bactérias na expectoração (Daublin, C. et al, 2008).

De referir, e segundo um estudo prospectivo realizado por Rammaert, B. et al (2009), que os níveis de PCT, relativamente ao grupo de doentes mencionado anteriormente, não se relacionam com o aumento do risco de mortalidade (Rammaert, B. et al, 2009).

Por outro lado, um estudo de Daniels, J.M, et al (2010) sugeriu que os níveis de PCT não diferem na presença ou ausência de bactérias e que doentes com concentrações baixas de PCT beneficiam de antibioterapia (Daniels, J.M, et al, 2010).

Um estudo efectuado por Kherad, O. et al (2010), concluiu que a prevalência de vírus é elevada nas exacerbações da DPOC, sendo reduzida após as mesmas, sugerindo que estas possam ser despoletadas por infecções do tracto respiratório superior. Observação mais importante realça que tanto os níveis plasmáticos da PCT como da PCR não discriminam a etiologia viral da não viral numa exacerbação (Kherad, O. et al, 2010).

Embora sejam necessários ensaios clínicos alargados, Koutsokera, A. et al (2011) concluiu que alguns biomarcadores, e mais notavelmente a PCR na identificação da exacerbação e a PCT na orientação do tratamento antibiótico, podem fornecer informação clínica relevante (Koutsokera, A. et al, 2011).

9. Fibrinogénio

Doentes com nível plasmático de fibrinogénio superior a 3,3 g/l, comparativamente aos que têm valor inferior a 2,7 g/l, apresentam função pulmonar reduzida e aumento da incidência de hospitalização, assim como, elevado risco relativo para a hospitalização nos seis anos seguintes de follow-up. Tal sugere que o fibrinogénio plasmático é um bom marcador do prognóstico da DPOC, estando também envolvido na patogénese (Dahl, M. e Nordestgaard, B.G, 2009).

Um outro estudo estimou uma diferença de 0,37 g/l no fibrinogénio plasmático entre doentes com DPOC e indivíduos controlo (Gan, W.Q. et al, 2004).

Mesmo assim, a utilidade clínica como biomarcador parece limitada devido ao seu baixo valor preditivo para a DPOC (Piehl-Aulin, K. et al, 2009).

10. TNF- α , IL-6, IL-8 e NO

Um estudo realizado por Karadag, F. et al (2008), verificou que os níveis séricos do TNF- α e da IL-6 estavam aumentados tanto em doentes com DPOC estável como nas exacerbações relativamente aos indivíduos controlo. Apesar de o nível da IL-6 tender a ser superior nas exacerbações, este estudo não revelou diferença estatística significativa entre estas e a doença estável. Quanto à concentração sérica de NO, salientou-se o facto de não ser elevada nos doentes com DPOC estável quando comparada com indivíduos controlo, estando somente aumentada nas exacerbações. Após o período de exacerbação, durante um follow-up de seis semanas, não foi detectada alteração significativa nos níveis de IL-6 e NO, quando comparados com os existentes à admissão, ou seja, permaneceram elevados.

Deste modo, níveis elevados de TNF- α e IL-6 reforçam o seu uso como biomarcadores da resposta inflamatória sistémica nos doentes com DPOC estável. Contudo, nenhum destes três biomarcadores se mostrou útil para prever uma exacerbação, assim como, monitorizar a doença após a ocorrência da mesma (Karadag, F. et al, 2008).

Bhowmik, A. et al (2000) mostraram que doentes com DPOC, com três ou mais episódios de exacerbações, apresentam níveis de IL-6 e IL-8 mais elevados na expectoração relativamente a doentes com duas ou menos exacerbações. Tal pode ser útil para prever a frequência de futuras exacerbações (Bhowmik, A. et al, 2000).

Embora mais estudos sejam necessários, Al-shair, K. et al (2011) concluíram haver uma associação entre o TNF- α e duas importantes comorbilidades da DPOC, nomeadamente, depressão e fadiga (Al-shair, K. et al, 2011).

11. IL-1 β , CXCL10 (IP-10) e TGF- β

Num ensaio realizado por Bafadhel, M. et al (2011), demonstrou-se que o biomarcador mais sensível e específico para a determinação de bactérias associadas a exacerbações foi o IL-1 β na expectoração. Contudo, o seu uso na prática clínica exige o desenvolvimento de um teste rápido para a sua detecção nos doentes com exacerbação de DPOC.

O mesmo estudo confirma que o nível sérico de CXCL10 é um potencial preditor da associação de vírus a exacerbações, independentemente da avaliação dos sintomas. Novas abordagens terapêuticas antivirais estão em desenvolvimento e o CXCL10 é, portanto, um biomarcador promissor para dirigir estes ensaios (Bafadhel, M. et al, 2011).

O TGF- β encontra-se reduzido tanto em doentes com DPOC como em fumadores “saudáveis” comparativamente a não fumadores (Hodge, G. et al, 2007).

12. Células Clara secretoras de proteína 16 (CC-16, CC-10 ou uteroglobulina)

A função exacta da CC-16 é desconhecido, contudo parece exercer um papel na redução da inflamação nas vias aéreas (Turino, G.M. et al, 2008).

Como parte do estudo ECLIPSE (Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints), Lomas, D.A. et al (2008) concluíram haver diferença significativa nos níveis séricos de CC-16 entre fumadores e ex-fumadores sem obstrução ao fluxo aéreo, assim como, entre estes dois grupos e os não fumadores. Apesar disto, existem limitações em considerar a CC-16 como um biomarcador da DPOC já que não há correlação com a gravidade do enfisema ou com os sintomas de bronquite crónica; e, o uso de corticoterapia inalada ou de β -agonistas de longa acção não se reflecte na concentração plasmática de CC-16 (Lomas, D.A. et al, 2008).

Até ao momento, novos estudos são necessários para perceber se o nível sérico de CC-16 se associa especificamente à DPOC, ou então, se apenas está relacionado com a exposição ao

fumo do tabaco ou ao ozono. Uma vantagem deste marcador é que traduz o impacto da DPOC a nível pulmonar, visto relacionar-se com as células clara e com o epitélio brônquico, ao contrário de outros biomarcadores, como a PCR, IL-8 e TNF- α , que podem reflectir os efeitos sistémicos/extrapulmonares desta patologia (Turino, G.M. et al, 2008).

13. PARC/CCL-18 (pulmonary and activation-regulated chemokine)

Níveis plasmáticos desta proteína encontram-se significativamente elevados nos doentes com DPOC, associando-se com maior risco de hospitalização devido a causa cardiovascular e a uma maior mortalidade nos doentes com DPOC ligeira a moderada (Sin, D.D. et al, 2011). De salientar que, num estudo a curto-prazo usando corticoterapia inalada foi demonstrado que esta pode reduzir os níveis sistémicos deste biomarcador (Man, S.F. et al, 2009).

14. Outros biomarcadores

Osteoprotegerina (OPG)

A OPG é um mediador glicoproteico que, para além de ser um factor inibidor da osteoclastogénese e se encontrar elevado na doença coronária, artrite reumatóide entre outras doenças, também se expressa no pulmão e nos macrófagos. Contudo, está por esclarecer qual o seu papel no pulmão, a sua relação com as doenças inflamatórias das vias aéreas, assim como, a sua origem celular.

Segundo um estudo efectuado por To, M. et al (2011), o nível de OPG na expectoração de doentes com DPOC foi significativamente maior quando comparada à de indivíduos saudáveis, fumadores “saudáveis” e doentes asmáticos. Outra observação foi que, apesar de os níveis plasmáticos de OPG serem usados como um biomarcador para diversas doenças, como as supracitadas, a sua concentração sérica não foi superior em doentes com DPOC

comparativamente com amostras controlo, sugerindo que a OPG é um marcador local e não sistémico da inflamação (To, M. et al, 2011).

Um outro estudo concluiu que os níveis plasmáticos de OPG em doentes com DPOC eram inferiores aos dos indivíduos sem esta doença. De realçar que este estudo, ao contrário do anterior, incluiu doentes com comorbilidade cardíaca, afectando esta a concentração sérica do biomarcador (Eagan, T.M. et al, 2010).

Quanto à sua origem celular, verificou-se que os macrófagos da expectoração e alveolares foram positivamente imunomarcados para OPG e, portanto, macrófagos pulmonares parecem ser uma importante fonte deste marcador no pulmão.

As concentrações de OPG na expectoração de doentes com DPOC mostraram uma significativa correlação com o FEV₁, volume residual/capacidade pulmonar total, DL_{CO} (coeficiente de transferência para o CO), sugerindo uma relação com a severidade da doença ou com a sua progressão. Os três últimos parâmetros mencionados são marcadores fisiológicos da doença pulmonar periférica, podendo-se deste modo afirmar que a OPG pode estar associada com a destruição da parede alveolar (enfisema) presente na DPOC.

A concentração elevada de OPG na expectoração de doentes com DPOC relaciona-se com alterações da função pulmonar, podendo ser um útil biomarcador para monitorizar a destruição do parênquima pulmonar. Contudo, largos e longitudinais estudos são necessários para estabelecer a utilidade clínica deste marcador (To, M. et al, 2011).

N-acetilcisteína (NAC)

Foi demonstrado, através de estudos in vitro e in vivo, que a NAC protege os pulmões contra agentes tóxicos reforçando os mecanismos de defesa de modo directo, através das suas propriedades antioxidantes, e indirecto, como precursor da síntese da glutathiona. Em doentes com DPOC, a terapêutica com NAC, na dose de 600 miligramas por dia, reduz o risco de

exacerbações e melhora a sintomatologia, contrariamente ao tratamento com placebo. Informações obtidas de biomarcadores do ar exalado e de marcadores da inflamação sistémica, assim como, de um estudo recente titulado IFIGENIA, aconselham a administração de doses mais elevadas de NAC, como 600 miligramas duas vezes por dia, a doentes com DPOC (Dekhuijzen, P.N.R. e van Beurden, W.J.C, 2006).

N- α -PGP e PGP (prolina-glicina-prolina)

Estes dois marcadores são fragmentos de colagénio e factores quimiotácticos para os neutrófilos.

De acordo com um estudo realizado por O'Reilly, P. et al (2009), enquanto o N- α -PGP é detectado em amostras de expectoração na maioria dos doentes com DPOC, não estando presente nas de asmáticos e indivíduos controlo, o PGP, para além de se encontrar na expectoração de todos os doentes com DPOC, também existe em alguns indivíduos controlo. Embora os níveis séricos de PGP sejam significativamente elevados nos doentes com DPOC relativamente a indivíduos controlo, os dados sugerem que o PGP pode estar presente no pulmão, sem DPOC associada, resultando do normal turnover do colagénio, contrariamente ao N- α -PGP que é um biomarcador da doença. Deste modo, a acetilação do PGP parece representar um importante passo na patogenia da DPOC.

De realçar que nos doentes com DPOC, os níveis de PGP se relacionam com os níveis de MPO que por sua vez, se relaciona com a severidade da doença e com a taxa de declínio da função pulmonar na DPOC.

Como o N- α -PGP e o PGP resultam da destruição da matriz pulmonar, eles podem identificar, antes de surgirem sinais clínicos, espirométricos e radiográficos, quais os fumadores que estão em risco de desenvolver DPOC. Isto permitirá a instituição precoce de medidas preventivas, assim como, terapêuticas.

Ensaio clínico futuro são necessários para compreender a utilidade destes biomarcadores como alvos terapêuticos, incluindo a sua medição em doentes com DPOC e em indivíduos controlo, correlacionando os seus níveis com parâmetros clínicos como a história tabágica e a severidade da obstrução das vias aéreas (O'Reilly, P. et al, 2009).

Copeptina

De acordo com as observações de Stolz, D. et al (2007), a copeptina foi mais eficaz em prever o curso da exacerbação, comparativamente com a PCR e PCT. Demonstrou-se que níveis séricos aumentados de copeptina na admissão hospitalar correlacionam-se significativamente com o tempo de internamento e com a evolução do quadro durante o mesmo. Deste modo, níveis elevados deste marcador servem como um factor de risco para a falência clínica a longo prazo, incluindo a sobrevivência, independentemente da idade, comorbilidades, hipoxémia e função pulmonar.

Embora sejam necessários estudos adicionais para confirmar estas observações, pode-se afirmar que a copeptina é um potencial biomarcador para o prognóstico, a curto e a longo prazo, das exacerbações que requerem hospitalização.

Contrariamente à copeptina, este estudo revelou que as concentrações séricas de PCT podem ter algum uso a curto prazo, sendo que os seus níveis elevados se associam a pior prognóstico no hospital, incluindo maior tempo de internamento, não identificando os doentes susceptíveis de falência clínica a longo prazo. Do mesmo modo, os níveis plasmáticos da PCR, apesar de elevados nas exacerbações, não têm significado no prognóstico das mesmas (Stolz, D. et al, 2007).

Neopterina

Este marcador é reconhecido como um factor de risco para infecções agudas do tracto respiratório em doentes com DPOC, apresentando estes doentes níveis séricos mais elevados relativamente a indivíduos controlo (Takabatake, N. e tal, 2005).

sTREM-1 (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1)

A sua concentração sérica encontra-se aumentada em doentes com DPOC comparativamente a indivíduos controlo. Os seus níveis plasmáticos durante a doença estável mostram uma correlação negativa com o grau de severidade (Radsak, M.P. et al, 2007).

PCE, MPO e ET-1

Níveis plasmáticos destes marcadores estão elevados em doentes com DPOC estável relativamente a indivíduos controlo, havendo um maior aumento durante as exacerbações. Na doença estável, a concentração sérica da ET-1 correlaciona-se inversamente com a função pulmonar, estando as alterações nos seus níveis plasmáticos relacionadas com mudanças na saturação de oxigénio (Sin, D. e Man, S., 2003).

Amilóide A sérica (AAS)

Alterações séricas deste biomarcador mostraram, num estudo efectuado por Bozinovski, S. et al (2008), estar relacionadas com a gravidade da exacerbação. Contudo, pesquisas prospectivas são necessárias para determinar qual o papel deste marcador como preditor da gravidade. Adicionalmente, revelou ter uma maior sensibilidade e especificidade para a detecção das exacerbações relativamente à PCR, estabelecendo associação com a gravidade da exacerbação quando houve aumento isolado de quatro vezes ou mais no seu nível basal (Bozinovski, S. et al, 2008). Uma vez que o seu nível sérico se relaciona com a doença

coronária e por ser um bom marcador na previsão de acontecimentos cardiovasculares nas mulheres (Johnson, B.D. et al, 2004), este estudo também sugere que o bloqueio da AAS ou das suas acções possa ter benefícios terapêuticos na DPOC, exacerbações, e, possivelmente, na comorbilidade cardiovascular. Outra observação deste estudo mostrou que a terapêutica sistémica com corticosteróides não tinha efeitos nos seus níveis, podendo assim, a medição dos mesmos, auxiliar na avaliação da eficácia de outros tratamentos para a DPOC.

Deste modo, a AAS pode ser um biomarcador útil na identificação, classificação e manuseamento das exacerbações (Bozinovski, S. et al, 2008).

Pro-adrenomedulina (proADM) e Pro-endotelina-1 (pro-ET-1)

Numa investigação, com o objectivo de avaliar, na admissão hospitalar, o impacto dos níveis séricos da proADM e pro-ET-1 no prognóstico de doentes com exacerbação de DPOC requerendo hospitalização, concluiu-se que ambas as concentrações séricas estão significativamente elevadas durante a exacerbação e diminuídas após a resolução da mesma e na DPOC estável. Na admissão hospitalar, o nível sérico da proADM mostrou ter efeito preditivo sobre a sobrevida durante dois anos, independentemente da idade, comorbilidades, hipoxémia, função pulmonar e hipertensão arterial pulmonar.

Deste modo, a proADM é um biomarcador que pode ser usado para prever o prognóstico durante a exacerbação. De salientar que o seu nível plasmático elevado se associa com o aumento da mortalidade. Apesar disto, e tendo em conta que os níveis de proADM não se correlacionam com a severidade da DPOC, está por esclarecer como é que este único biomarcador pode explicar a mortalidade durante a exacerbação, apenas com uma medição plasmática (Stolz, D. et al, 2008).

Peptídeo natriurético tipo B (BNP)

Nos doentes com DPOC, o prognóstico pode ser determinado, pelo menos em parte, pelo aumento do stress cardíaco induzido pela hipóxia e hipertensão arterial pulmonar.

Numa investigação orientada por Stolz, D. et al (2008), onde o nível plasmático do BNP foi analisado em doentes com exacerbação da DPOC e com o objectivo de avaliar o seu potencial para prever a necessidade de tratamento na UCI, assim como, a taxa de mortalidade a curto e a longo prazo, verificaram-se três grandes observações: os seus níveis são superiores durante a exacerbação em relação à fase estável da doença; os doentes que requerem tratamento na UCI apresentam níveis significativamente elevados, prevendo portanto os que necessitam de maior cuidado; e, a sua concentração sérica nas exacerbações da doença não se relaciona com a taxa de mortalidade a curto ou a longo prazo. Este estudo associa esta última lacuna à predominância de mortes de causa não cardíaca nos doentes com DPOC.

Tendo em conta a elevada morbimortalidade desta patologia, estes achados são de grande importância clínica, aumentando a compreensão do BNP como biomarcador do prognóstico nestes doentes (Stolz, D. et al, 2008).

❖ **Biomarcadores** - onde podem ser doseados; a sua alteração na DPOC estável e a relação com a exacerbação e função pulmonar

Biomarcador	Amostra biológica	Alteração na doença estável	Relação com a exacerbação	Relação com a função pulmonar	Observações
SP-D	Sangue	↑	↑	Relação inversa com o FEV1;	Traduz a actividade da doença; biomarcador promissor para avaliar a progressão e prever o prognóstico em doentes com DPOC grave
	LBA	↓			
SP-A	Sangue Expectoração	↑	Sem relação		
Elastina da matriz	Sangue	↑	↑	Na expectoração, os seus níveis reflectem o estado de degradação da elastina pulmonar.	Indicam alterações no balanço sistémico entre a actividade e a inibição da elastase; Correlação entre o nível de DI e a severidade de doença
	Urina				
	Expectoração				
Lipocalina-1 e Apolipoproteína-A1	Expectoração	↓	Sem relação		Os níveis relacionam-se com a severidade da doença
Leptina	Sangue	↑	↑ na admissão hospitalar e ↓ na resolução		Relacionada com o processo de inflamação sistémica da exacerbação, correlacionando-se com os níveis de IL-6 e de TNF-α
	Expectoração				

α-2 macroglobulina, haptoglobulina, ceruloplasmina e hemopexina	Sangue	↑	Sem relação		
PCR	Sangue	↑	↑	Relação com o declínio da função pulmonar	Prevê o prognóstico na DPOC estável; níveis relacionam-se com o risco e prognóstico cardiovascular; há controvérsias sobre a sua relação com a taxa de mortalidade
PCT	Sangue	↓	↓		Útil na orientação da terapêutica antibiótica
Fibrinogénio	Sangue	↑	Sem relação	Relação com o declínio da função pulmonar	
TNF-α, IL-6, IL-8 e NO	Sangue	↑ (excepto o NO que não tem relação)	↑		TNF- α e IL-6 são biomarcadores da resposta inflamatória sistémica na DPOC estável; TNF- α relacionado com a fadiga e depressão
IL-1β CXCL10(IP-10) TGF-β	Expectoração	↑	↑		
	Sangue	↑	↑		
	Sangue	↓	Sem relação		
CC-16	Sangue	↓	Sem relação		Traduz o impacto da DPOC a nível pulmonar

PARC/CCL-18	Sangue	↑	Sem relação		Maior risco de hospitalização por causa cardiovascular; maior mortalidade nos doentes com DPOC ligeira a moderada; Corticoterapia pode reduzir os níveis sistémicos
OPG	Expectoração	↑	↑		Relação com a severidade e progressão da doença; Marcador local e não sistémico da inflamação
	Sangue	Sem relação. (To, M. et al, 2011)/↓(Eagan, T.M. et al, 2010)			
NAC	—	—	—		Terapêutica com NAC reduz o risco de exacerbação e melhora a sintomatologia
N-α-PGP e PGP	Expectoração	↑	Sem relação	Relação com a taxa de declínio da função pulmonar	Permitem identificar quais os fumadores em risco de desenvolver DPOC
	Sangue				
Copeptina	Sangue	↑	↑		Prognóstico das exacerbações
Neopterin	Sangue	↑	Sem relação		Factor de risco para infecção aguda do tracto respiratório em doentes com DPOC

sTREM-1	Sangue	↑	Sem relação		Correlação negativa com o grau de severidade, na DPOC estável
PCE, MPO e ET-1	Sangue	↑	↑	Na DPOC estável, os níveis de ET-1 correlacionam-se inversamente com a função pulmonar	
AAS	Sangue	↑	↑		Útil na identificação, classificação e manuseamento das exacerbações
pro-ADM e pro-ET-1	Sangue	↓	↑		O nível sérico da pró-ADM é usado para prever o prognóstico durante a exacerbação
BNP	Sangue	Sem relação	↑		Biomarcador do prognóstico dos doentes com exacerbação

Quadro 4 – Biomarcadores: onde podem ser doseados; a sua alteração na DPOC estável e a relação com a exacerbação e função pulmonar.

Legenda: ↑ = nível aumentado; ↓ = nível diminuído.

V. Conclusões

A DPOC é uma das principais causas de morbimortalidade em todo o Mundo. Infelizmente, não existe nenhum tratamento eficaz que consiga modificar o seu curso natural.

Apesar de o FEV₁ ser o marcador mais usado e aceite nesta patologia, ele não reflecte o seu verdadeiro impacto nos doentes, sendo necessário identificar e validar novos biomarcadores.

A correlação dos biomarcadores pulmonares com outros parâmetros prognósticos é essencial para a avaliação futura do processo destrutivo inflamatório e para a determinação dos efeitos dos novos agentes anti-inflamatórios em processo de desenvolvimento para o tratamento da DPOC, assim como, para a compreensão dos mecanismos patológicos relacionados com o prognóstico clínico. Como se trata de uma doença complexa e sistémica, vários biomarcadores podem ser determinados nos diferentes biofluidos existentes.

Do descrito neste artigo salienta-se que o SP-D se tem revelado um biomarcador sanguíneo promissor, assim como vários candidatos moleculares, a contagem de neutrófilos na expectoração, o FeNO e os produtos de degradação do colagénio (N- α -PGP e PGP). Porém, a utilidade clínica destes marcadores ainda não foi validada em ensaios clínicos. Relativamente aos já utilizados na clínica, a PCT restringe-se à orientação do uso de terapêutica antibiótica e a PCR e a IL-6, que são marcadores da inflamação, têm falta de especificidade na DPOC, tornando o uso clínico limitado.

É fundamental uma compreensão mais clara do papel dos biomarcadores na fisiopatologia da doença, da sua variabilidade e da sua relação com a progressão da doença.

Actualmente, a exploração e a validação de biomarcadores potenciais para a DPOC está em curso, não tendo sido ainda implementado nenhum marcador específico na prática clínica.

O papel dos biomarcadores na Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

Esta é uma área de pesquisa activa, estando em andamento os estudos adicionais necessários para solucionar as várias lacunas existentes. O uso da genómica, e mais especificamente da proteómica, podem tornar-se cruciais para esta necessária implementação.

Referências bibliográficas

1. Agusti AG, MacNee W, Donaldson K, Cosio M (2003) Hypothesis: Does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 832-834
2. Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X (2003) Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *The European Respiratory Journal* 21:347-360
3. Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM (2001) Effects of statin therapy on C-reactive protein levels. The pravastatin inflammatory / CRP Evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *The journal of American medical association* 286:64-70
4. Al-shair K, Kolsum U, Dockry R, Morris J, Singh D, Vestbo J (2011) Biomarkers of systemic inflammation and depression and fatigue in moderate clinically stable COPD. *Respiratory research* 12:3
5. Annovazzi L, Viglio S, Perani E, Luisetti M, Baraniuk J, Casado B, Cetta G, Iadarola P (2004) Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection as a novel sensitive approach for the analysis of desmosines in real samples. *Electrophoresis* 25(4-5):683-91
6. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Reid C, Haldar P, McCormick M, Haldar K, Kebabdz T, Duvoix A, Lindbland K, Patel H, Rugman P, Dodson P, Jenkins M, Saunders M, Newbold P, Green RH, Venge P, Lomas DA, Barer MR, Johnston SL, Pavord ID, Brightling CE (2011) Acute exacerbations of COPD: identification of biological clusters and their biomarkers. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1-74

7. Bandow JE, Baker JD, Berth M, Painter C, Sepulved OJ, Clarck KA, Kilty I, VanBogelen RA (2008) Improved image analysis workflow for 2-D gels enables large-scale 2-D gel-based proteomics studies: COPD Biomarker Discovery Study. *Proteomics* 8:3030-3041
8. Bárbara C, Ramos F, Almeida M, Gomes MJM (2005) Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica. *Direcção Geral da Saúde*: 5-8
9. Bárbara C, Rodrigues F, Dias H, Cardoso J, Almeida J, Matos MJ, Simão P (2010) COPD prevalence in Portugal. The burden of obstructive lung disease study (BOLD). *European respiratory society*
10. Barnes PJ, Celli BR (2009) Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *The European Respiratory Journal* 33(5):1165-85
11. Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, Magnussen H, Page CP, Postma D, Saetta M (2006) Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 174:6-14
12. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA (2003) Chronic obstructive pulmonary disease: molecular cellular mechanisms. *The European Respiratory Journal* 22:672-688
13. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA (2000) Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 55:114-120
14. Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ (2003) Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax* 58:294-298
15. Boschetto P, Miotto D, Bononi I, Faggian D, Plebani M, Papi A, Creminon C, Rosa ED, Fabbri LM, Mapp CE (2005) Sputum substance P and neurokinin A are reduced

- during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 18:199-205
16. Bosken CH, Hards J, Gatter K, Hogg JC (1992) Characterization of the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry. *The american review of respiratory disease* 145:911-917
 17. Bozinovski S, Hutchinson A, Thompson M, MacGregor L, Black J, Giannakis E, Karlsson AS, Silvestrini R, Smallwood D, Vlahos R, Irving LB, Anderson GP (2008) Serum amyloid A is a biomarker of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 177:269-278
 18. Broekhuizen R, Vernooy JHJ, Schols AMWJ, Dentener MA, Wouters EFM (2004) Leptin as a local inflammatory marker in COPD. *Respiratory medicine* 99:70-74
 19. Bruno A, Chiappara G, Chanez P, Merendino AM, Giammanco S, Bellia V (2002) Expression of leptin and leptin receptor in bronchial biopsies of COPD and asthmatic subjects. *American journal of respiratory and critical care medicine* 165:A559
 20. Cavalcante AGM, de Bruin PFC (2009) O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. *Jornal brasileiro de Pneumologia* 35(12): 1227-1237
 21. Cazzola M, Macnee W, Martinez FJ, Rabe KF, Franciosi LG, Barnes PJ, Brusasco V, Burge PS, Calverley PMA, Celli BR, Jones PW, Mahler DA, Make B, Miravittles M, Page CP, Palange P, Parr D, Pistolesi M, Rennard SI, Mölken MPR, Stockley R, Sullivan SD, Wedzicha JÁ, Wouters EF (2008) Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers. *European respiratory journal* 31(2):416-468
 22. Cazzola M, Novelli G, (2010) The role of biomarkers in respiratory disease. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 23:466-467

23. Celli BR, MacNee W. and committee members (2004) Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. The European Respiratory Journal 23: 932-946
24. Chrysafakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, Tsoumakidou M, Tsiligianni I, Klimathianaki M, Siafakas NM (2004) Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. Chest 125(1):71-6
25. Chung KF, Adcock IM (2008) Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. European Respiratory Journal 31:1334-1356
26. Clini E, Cremona G, Campana M, Scotti C, Pagani M, Bianchi L (2000) Production of endogenous nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease and patients with cor pulmonale. Correlates with echo-doppler assessment. American journal of respiratory and critical care medicine 162:446-450
27. Cosio MG, Majo J, Cosio M (2002) Inflammation in the airways and lung parenchyma in COPD. Role of T cells. Chest journal 121(5):160-5
28. Dahl M, Nordestgaard BG (2009) Markers of early disease and prognosis in COPD. International journal of COPD 4:157-167
29. Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordstgaard BG (2007) C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. American journal of respiratory and critical care medicine 175:250-255
30. Daniels JM, Schoorl M, Snijders D (2010) Procalcitonin vs C-reactive protein as predictive markers of response to antibiotic therapy in acute exacerbations of COPD. Chest 138:1108-1115

31. Daublin C, Parienti JJ, Vabret A, Ramakers M, Fradin S, Terzi N, Freymuth F, Charbonneau P, du Cheyron D (2008) Procalcitonin levels in acute exacerbation of COPD admitted in ICU: a prospective cohort study. *BMC infectious diseases* 8:145
32. Dekhuijzen PNR, Beurden WJC (2006) The role for N-acetylcysteine in the management of COPD. *International journal of COPD* 1(2):99-106
33. Demedts IK, Morel-Montero A, Lebecque S, Pacheco Y, Cataldo D, Joos GF, Pauwels RA, Brusselle GG (2006) Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD. *Thorax* 61:196-201
34. Dentener MA, Vernooij JH, Hendriks S, Wouters EF (2005) Enhanced levels of hyaluronan in lungs of patients with COPD: relationship with lung function and local inflammation. *Thorax* 60:114-119
35. Devenport NA, Reynolds JC, Parkash V, Cook J, Weston DJ, Creaser CS (2011) Determination of free desmosine and isodesmosine as urinary biomarkers of lung disorder using ultra performance liquid chromatography-ion mobility-mass spectrometry. *Journal of chromatography B* 879:3797-3801
36. de Torres JP, Cordoba-Lanus E, López-Aguilar C, de Fuentes MM, de Garcini AM, Aguirre-Jaime A, Celli BR, Casanova C (2006) C-reactive protein levels and clinically important predictive outcomes in stable COPD patients. *European respiratory journal* 27(5):902-907
37. de Torres JP, Pinto-Plata V, Casanova C (2008) C-reactive protein levels and survival in patients with moderate to very severe DPOC. *Chest* 133:1336-1343
38. Dickens JA, Miller BE, Edwards LD, Silverman EK, Lomas DA, Tal-Singer R (2011) COPD association and repeatability of blood biomarkers in the ECLIPSE cohort. *Respiratory research* 12:146

39. Eagan TM, Ueland T, Wagner PD (2010) Systemic inflammatory markers in COPD: results from the Bergen COPD cohort study. *European respiratory journal* 35(3):540-548
40. Engstrom G, Segelstorm N, Ekberg-Aronsson M, Nilsson PM, Lingarde F, Lofdahl CG (2009) Plasma markers of inflammation and incidence of hospitalizations for COPD: results from a population-based study. *Thorax* 64:211-215
41. Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. (2008) *Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica*. *Harrison Medicina Interna* (McGraw Hill, 17ª edição), pp1636. Rio de Janeiro
42. Fiorenza D, Viglio S, Lupi A, Baccheschi J, Tinelli C, Trisolini R, Iadarola P, Luisetti M, Snider GL (2002) Urinary desmosine excretion in acute exacerbations of COPD: a preliminary report. *Respiratory medicine* 96:110-114
43. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD (2004) Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 59:574-580
44. Gan WQ, Paul Man SF, Sin DD (2005) The interactions between cigarette smoking and reduced lung function on systemic inflammation. *Chest* 127:558-564
45. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, Hacken J, Espada R, Bag R, Lewis D.E, Kheradmand F (2004) An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic pulmonary disease and emphysema. *Public Library of Science Medicine* 1:75-83
46. Hacievliyagil S, Gunen H, Mutlu L, Karabulut A, Temel I (2006) Association between cytokines in induced sputum and severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory medicine* 100:846-854

47. Higashimoto Y, Iwata T, Okada M, Satoh H, Fukuda K, Tohda Y (2009) Serum biomarkers as predictors of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory medicine* 103:1231-1238
48. Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds P, Hodge S (2007) Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects. *Clinical experimental immunology* 150:22-29
49. Hoegh SV, Sorensen GL, Tornoe I, Lottenburger T, Ytting H, Nielsen HJ, Junker P, Holmskov U (2010) Long-term stability and circadian variation in circulating levels of surfactant protein D. *Immunobiology* 215:314-320
50. Hurst JR, Donaldson GC, Perera WR, Wilkinson TMA, Bilello JÁ, Hagan GW, Vessey RS, Wedzicha JA (2006), Use of plasma biomarkers at exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 174:867-874
51. Igishi T, Hitsuda Y, Kato K, Sako T, Burioka, N, Yasuda K, Sano H, Shigeoka Y, Nakanishi H, Shimizu E (2003) Elevated urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a biomarker of oxidative stress, and lack of association with antioxidant vitamins in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*, 8(4):455-60
52. Johnson BD, Kip KE, Marroquin OC, Ridker PM, Kelsey SF, Shaw LJ, Pepine CJ, Sharaf B, Bairey Merz CN, Sopko G (2004) Serum amyloid A as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular outcome in women: the National Heart, Lung, and Blood Institute-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *Circulation* 109:726-732

53. Jones PW, Agustí AGN (2006) Outcomes and markers in the assessment of chronic obstructive pulmonary disease. *The European Respiratory Journal* 27(4):822-832
54. Karadag F, Karul AB, Cildag O, Yilmaz M, Ozcan H (2008) Biomarkers of systemic inflammation in stable and exacerbation phases of COPD. *Lung* 186:403-409
55. Kherad O, Kaiser L, Bridevaux PO, Sarasin F, Thomas Y, Janssens JP, Rutschmann OT (2010) Upper-respiratory viral infection, biomarkers, and COPD exacerbations. *Chest* 138(4)
56. Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamram MF, Bernal AL, Reid KB, Madan T, Chakraborty T (2006) Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Molecular Immunology* 43:1293-1315
57. Koczulla AR, Noeske S, Herr C, Koepke J, Jörres RA, Nell C, Schmid S, Vogelmeier C, Bals R (2011) Alpha-1 antitrypsin is elevated in exhaled breath condensate and serum in exacerbated COPD patients. *Respiratory medicine* 1-7
58. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S (2002) pH in expired breath condensate in patients with inflammatory airway diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine* 165:1364-1370
59. Kostikas K, Papatheodorou G, Psathakis K, Panagou P, Loukides S (2003) Oxidative stress in expired breath condensate of patients with COPD. *Chest* 124:1373-1380
60. Krommidas G, Kostikas K, Papatheodorou G, Koutsokera A, Gourgoulisanis KI, Roussos C, Koulouris NG, Loukides S (2009) Plasma leptin and adiponectin in COPD exacerbations: Associations with inflammatory biomarkers. *Respiratory medicine* 104:40-46
61. Lacoma A, Prat C, Andreo F, Dominguez J (2009) Biomarkers in the management of COPD. *European Respiratory Review* 18(112):96-104

62. Larsen K, Macleod D, Nihlberg K, Gurcan E, Bjermer L, Marko-Varga G, Westergren-Thorsson G (2006) Specific haptoglobin expression in bronchoalveolar lavage during differentiation of circulating fibroblast progenitor cells in mild asthma. *Allergy* 53:184-189
63. Lomas DA, Silverman Ek, Edwards LD, Locantore NW, Miller BE, Horstman DH, Tal-Singer R (2009) Serum surfactant protein D is steroid sensitive and associated with exacerbations of COPD. *European respiratory journal* 34(1):95-102
64. Lomas DA, Silverman EK, Edwards LD, Miller BE, Coxson HO, Tal-Singer R (2008) Evaluation of COPD longitudinally to identify predictive surrogate endpoints (ECLIPSE) investigators. Evaluation of serum CC-16 as a biomarker for COPD in the ECLIPSE cohort. *Thorax* 63:1058-1063
65. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, Schmid V. and Buist S (2006) Chronic Obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *The European Respiratory Journal* 27:397-412
66. MacNee W (2005) Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American thoracic society* 2:258-266
67. MacNee W, Rennard SI, Hunt JF, Edwards LD, Miller BE, Locantore NW, Tal-Singer R (2011) Evaluation of exhaled breath condensate pH as a biomarker for COPD. *Respiratory medicine* 105:1037-1045
68. Man SF, Xing L, Connet JE, Anthonisen NR, Wise RA, Tashkin DP, Zhang X, Vessey R, Walker TG, Celli BR, Sin DD (2008) Circulatin fibronectin to C-reactive protein ratio and mortality: a biomarker in COPD? *European respiratory journal* 32(6):1451-1457

69. Man SF, Zhang X, Vessey R, Walker T, Lee K, Park D, Sin DD (2009) The effects of inhaled and oral corticosteroids on serum inflammatory biomarkers in COPD: an exploratory study. *Therapeutic advances in respiratory disease* 3(2):73-80
70. Montano M, Cisneros J, Ramirez-Venegas A (2010) Malondialdehyde and superoxide dismutase correlate with FEV(1) in patients with COPD associated with wood smoke exposure and tobacco smoking. *Inhalation toxicology* 22:868-874
71. Montuschi P, Kharitov SA, Barnes PJ (2001) Exhaled carbon monoxide and nitric oxide in COPD. *Chest* 120: 495-502
72. Muller B, Tamm M (2006) Biomarkers in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 174:848-849
73. Nicholas BL, Skipp P, Barton S, Singh D, Bagmane D, Mould R, Angco G, Ward J, Guha-Niyogi B, Wilson S, Howarth P, Davies DE, Rennard S, O'Connor CD, Djukanovic R (2010) Identification of lipocalin and apolipoprotein A1 as biomarkers of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 181:1049-1060
74. Noel S, Newbold P (2008) The clinical utility of biomarkers in asthma and COPD. *Current opinion in pharmacology* 8:222-235
75. Ohlmeier S, Vuolanto M, Toljamo T, Vuopala K, Salmenkivi K, Myllarniemi M, Kinnula VL (2009) Proteomics of human lung tissue identifies surfactant protein A (SP-A) as a marker of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *American journal of respiratory and critical care medicine* 179:A3775

76. O'Reilly P, Jackson PL, Noerager B, Parker S, Dransfield M, Gaggar A, Blalock JE (2009) N-a-PGP and PGP, potencial biomarkers and therapeutic targets for COPD. *Respiratory research* 10:38
77. Papi A, Romagnoli M, Baraldo S, Braccioni F, Guzzinati I, Saetta M (2000) Partial reversibility of airflow limitation and increased exhaled NO and sputum eosinophilia in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 162: 1773-1777
78. Patel ARC, Hurst JR, Wedzicha JA (2010) The potencial value of biomarkers in diagnosis and staging of COPD and exacerbations. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 31(3):267-275
79. Pepys MB, Hirschfield GM (2003) C-reactive protein: a critical update. *The journal of clinical investigation* 111:1805-1812
80. Piehl-Aulin K, Jones I, Lindvall B, Magnuson A, Abdel-Halim SM (2009) Increased serum inflammatory markers in the absence of clinical and skeletal muscle inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 78:191-196
81. Radsak MP, Taube C, Haselmayer P (2007) Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 is released in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical and developmental immunology* 2007:52040
82. Rammaert B, Verdier N, Cavestri B, Nseir D (2009) Procalcitonin as a prognostic factor in sever acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 14:969-974
83. Roland M, Bhowmik A, Sapsford RJ (2001) Sputum and plasma endothelin-1 levels in exacerbations of chronic pulmonary obstructive disease. *Thorax* 56:30-35

84. Rutgers SR, Timens W, Kaufmann HF, van der Mark TW, Koeter GH, Postma DS (2000) Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in COPD. *European respiratory journal* 15:109-115
85. Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM (2001) Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 163:1304-1309
86. Sampsonas F, Kaparianos A, Lykouras D, Karkoulas K, Spiropoulos K (2007) DNA sequence variations of metalloproteinases: their role in asthma and COPD. *Postgraduate Medical Journal* 83:244-250
87. Sethi S, Wrona C, Aschberger K, Lobbins P, Cai X, Murphy TF (2008) Inflammatory profile of new bacterial strain exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 177:491-497
88. Shenkin A (2006) Serum prealbumin: is it a marker of nutritional status or of risk of malnutrition. *Clinical Chemistry* 52:2177-2179
89. Sin DD, Lacy P, York E, Paul Man SF (2004) Effects of fluticasone on systemic markers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 170:760-765
90. Sin DD, Leung R, Gan WQ, Man SFP (2007) Circulating surfactant protein D as a potential lung-specific biomarker of health outcomes in COPD: a pilot study. *BMC pulmonary medicine* 7:13
91. Sin DD, Man SFP (2003) Impaired lung function and serum leptin in men and women with normal body weight: a population based study. *Thorax* 58:695-698
92. Sin DD, Man SFP (2003) Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular disease? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 107:1514-1519

93. Sin DD, Man SFP (2008) Biomarkers in COPD: are we there yet? *Chest* 133:1296-1298
94. Sin D.D., Miller B, Duvoix A, Paul Man SF, Zhang X, Silverman EK, Connett JE, Anthonisen NA, Wise RA, Tashkin D, Celli BR, Edwards LD, Locantore N, MacNee W, Tal-Singer R, Lomas DA (2011) Serum PARC/CCL-18 concentrations and health outcomes in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine* 183(9):1187-92
95. Sin DD, Vestbo J (2009) Biomarkers in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 6:543-545.
96. Soriano JB, Visick G., Muellerova H, Payvandi N, Hansell AL (2005) Patterns of comorbidities in newly diagnosed COPD and asthma in primary care. *Chest* 128(4):2099-107
100. Stefanska AM, Walsh PT (2009) Chronic obstructive pulmonary disease: evidence for an autoimmune component. *Cellular & molecular immunology* 6(2):81-86
101. Stolz D, Breidhardt T, Christ-Crain M, Bingisser R, Miedinger D, Leuppi J, Mueller B, Tamm M, Mueller C (2008) Use of B-type natriuretic peptide in risk of stratification of acute exacerbations of COPD. *Chest* 133:1088-1094
102. Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Leuppi J, Miedinger D, Bingisser R, Müller C, Struck J, Müller B, Tamm M (2007) Copeptin, C-reactive protein, and procalcitonin as prognostic biomarkers in acute exacerbations of COPD. *Chest* 131:1058-1067
103. Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Miedinger D, Leuppi J, Müller C, Bingisser R, Struck J, Müller B, Tamm M (2008) Plasma pro-adrenomedullin but not plasma pro-endothelin predicts survival in exacerbations of COPD. *Chest* 134:263-272

104. Taylor DR, Pavord ID (2008) Biomarkers in the assessment and management of airways diseases. *Postgraduate medical journal* 84:628-634
105. To M, Ito K, Ausin PM, Kharitonov SA, Barnes PJ (2011) Osteoprotegerin in sputum is a potencial biomarker in COPD. *Chest* 140(1)
106. Turino GM (2008) COPD and biomarkers: the search goes on. *Thorax* 63(12):1032-1034
107. Turino GM, Ma S, Lin YY, Cantor JO, Luisetti M (2011) Matrix elastin: a promising biomarker for COPD. *American journal of respiratory and critical care medicine* 184(6):637-41
108. Tzanakis N, Chrysofakis G, Tsoumakidou M, Kyrakou D, Tsiligianni J, Bouros D, Siafakis N (2004) Induced sputum CD8+ T- lymphocyte subpopulations in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Medicine* 98:57-65
109. Tzortzaki EG, Lambiri I, Vlachaki E, Siafakas NM (2007) Biomarkers in COPD. *Current medical chemistry* 14:1037-1048
110. Van Weel C, Schellevis FG (2006) Comorbidity and guidelines: conflicting interests. *Lancet* 367:550-551.
111. Vernooij JHJ, Linderman JHN, Jacobs JA, Hanemaaijer R, Wouters EFM (2004) Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced sputum from patients with COPD. *Chest journal* 126(6):1802-1810
112. Verrills NM, Irwin JA, He XY, Wood LG, Powell H, Simpson JL, McDonald VM, Sim A, Gibson PG (2011) Identification of novel diagnostic biomarkers for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 183:1633-1643

113. Vestbo J, Agusti AG, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Jones P, Martinez F, Nishimura M, Rodriguez-Roisin R, Sin D, Stockley R, Volgermeier C (2011) Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Global initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) 12-24
114. Vestbo J, Rennard S (2010) Chronic Obstructive Pulmonary Disease Biomarker(s) for Disease Activity Needed – Urgently. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 182:863-869
115. Vlachaki EM, Koutsopoulos AV, Tzanakis N, Neofytou E, Siganiaki M, Drositis I, Moniakakis A, Schiza S, Siafakas NM, Tzortzaki EG (2010) Altered surfactant protein-A expression in type II pneumocytes in COPD. Chest 137:37-45
116. Weis N, Almdal T (2005) C-reactive protein – can it be used as a marker of infection in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease? European journal of internal medicine 17:88-91
117. Winkler C, Atochina-Vasserman EN, Holz O, Beers MF, Erpenback VJ, Krug N, Roepke S, Lauer G, Elmlinger M, Hohlfeld JM (2011) Comprehensive characterization of pulmonary and serum surfactant protein D in COPD. Respiratory research 12:29