

RELAÇÃO DO POLIMORFISMO -1059G>A NO GENE DA METALOPROTEINASE DE MATRIZ-2 (MMP-2) COM A SUSCETIBILIDADE E A MORTALIDADE NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Bruna Lima dos Santos¹

Renan Cesar Sbruzzi²

Bruna Letícia da Silva Pereira³

Andréia Biolo⁴

Kátia Gonçalves dos Santos⁵

RESUMO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica resultante da deterioração da função cardíaca. Durante a sua progressão, o ventrículo esquerdo sofre alterações estruturais na matriz extracelular pela ação das metaloproteinases de matriz (MMPs). Estudos têm relacionado o aumento da expressão das MMPs com a IC. No presente trabalho, analisamos a associação do polimorfismo -1059G>A (rs17859821) no gene da MMP-2 com a presença e progressão da IC. A genotipagem do polimorfismo -1059G>A foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP). As frequências alélicas e genotípicas não diferiram entre os pacientes e os controles ($p > 0,05$) e a análise de sobrevida nos pacientes não indicou nenhuma relação do polimorfismo -1059G>A com a mortalidade total ou por IC ($p > 0,05$).

Palavras-chave: Insuficiência cardíaca, metaloproteinase de matriz, MMP-2, polimorfismo.

ABSTRACT

Heart failure (HF) is a clinical syndrome that results from the deterioration of cardiac function. During its progression, the left ventricle undergoes structural changes in the extracellular matrix by the action of matrix metalloproteinases (MMPs). Studies have linked the increased expression of MMPs with HF. In the present study, we analyzed the association of the -1059G>A (rs17859821) polymorphism in the MMP-2 gene with the presence and progression of HF. Genotyping of the -1059G>A polymorphism was performed by Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). The allele and genotype frequencies did not differ between

¹ Acadêmica do curso de Biologia/ULBRA – Bolsista PIBIC/CNPq

² Acadêmico do curso de Biomedicina/ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS

³ Acadêmica do curso de Biomedicina/FEEVALE

⁴ Cardiologista e professora do curso de Medicina/UFRGS

⁵ Professora – Orientadora do curso de Biologia e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA (kgsantos2010@gmail.com)

patients and controls ($p > 0.05$) and the survival analysis in patients indicated no relationship of the -1059G>A polymorphism with all-cause mortality or HF-related mortality ($p > 0.05$).

Keywords: Heart failure, matrix metalloproteinase, MMP-2, polymorphism.

INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma doença clínica procedente da deterioração da função cardíaca (ROGER et al., 2011; BOCCHI et al., 2012), considerada como uma das principais causas de mortalidade no Brasil. Durante a progressão da IC, ocorrem alterações na geometria cardíaca, no inotropismo e no cronotropismo que estão associados à morte súbita (BOCCHI et al., 2012). Embora vários fatores de risco e preditores de pior prognóstico tenham sido identificados (HUNT et al., 2005), é reconhecido que diferentes polimorfismos genéticos estão envolvidos na suscetibilidade e na progressão da IC (KITSIOS; ZINTZARAS, 2007; DORN, 2011).

Uma das principais características da IC é o remodelamento do ventrículo esquerdo (VE), que ocorre como consequência das alterações na estrutura da matriz extracelular (ZAMILPA; LINDSEY, 2010). Estas alterações são realizadas pelas metaloproteinases de matriz (MMPs), que são responsáveis pela degradação da matriz extracelular (KLEIN; BISCHOFF, 2011). Estudos realizados em modelos experimentais de IC e em humanos relacionaram o aumento da expressão das MMPs com o desenvolvimento e a progressão da doença (VANHOUTTE; HEYMANS, 2010). A expressão aumentada das MMPs pode contribuir consideravelmente para a desintegração do colágeno do tecido do miocárdio e para modificações nas vias de sinalização intracelular do cardiomiócito (SPINALE, 2002; D'ARMIENTO, 2002). Estudos realizados em diferentes populações demonstram que os níveis séricos das MMPs estão mais elevados nos pacientes com IC do que nos indivíduos que não apresentam doença cardíaca (YAMAZAKI et al., 2004; WAGNER et al., 2006).

Variantes nos genes das MMPs podem modificar os níveis ou a atividade destas enzimas, reduzindo ou aumentando a degradação de componentes da matriz celular. Assim, os polimorfismos funcionais podem contribuir para a variabilidade interindividual na suscetibilidade e na progressão das doenças cardíacas (YE, 2006). Em 2011, Velho e colaboradores realizaram um estudo de associação de três variantes nos genes das MMPs -1 (-1607 1G/2G), -3 (-1171 5A/6A) e -9 (-1562 C>T) com a suscetibilidade e o prognóstico da IC. Nesse estudo, as frequências alélicas e genotípicas para os três polimorfismos foram semelhantes nos pacientes e controles. No entanto, os pacientes portadores do alelo 2G no gene da MMP-1 apresentavam uma maior prevalência de IC de etiologia isquêmica e menor taxa de mortalidade por IC (VELHO et al., 2011). Outros dois estudos com polimorfismos no gene da MMP-2 foram realizados na população chinesa, relacionando três polimorfismos genéticos com o risco e o prognóstico da IC, nos quais o polimorfismo -1059G>A foi associado com a suscetibilidade (HUA et al., 2009a) e a mortalidade entre os pacientes com IC (HUA et al., 2009b).

Considerando a importância das MMPs na insuficiência cardíaca e a ausência de estudos sobre a relação de polimorfismos do gene da MMP-2 com a suscetibilidade e

a mortalidade desta doença no Brasil, o presente estudo tem como objetivo avaliar a associação do polimorfismo -1059G>A (rs17859821) no gene da MMP-2 com a presença e progressão da IC na população brasileira, tendo em vista a sua associação com a doença em outras populações estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

População de Estudo e Avaliação do Prognóstico

Neste estudo foram incluídos 129 pacientes com IC por disfunção sistólica (casos), provenientes do Ambulatório de Insuficiência Cardíaca e Transplante do Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), que já participaram de outros projetos do mesmo grupo de pesquisa, que têm por objetivo investigar os fatores clínicos e genéticos de riscos associados com a suscetibilidade e o prognóstico da IC (BIOLO et al., 2008; VELHO et al., 2011; COHEN et al., 2012). Os pacientes foram selecionados no período compreendido entre os meses de julho de 2003 e novembro de 2007, que se enquadravam nos seguintes critérios de inclusão: idade ≥ 18 anos e fração de ejeção do VE $\leq 45\%$. Foram excluídos do estudo os pacientes com IC de etiologia valvular primária, infecciosa ou tóxica, ou com cardiomiopatia obstrutiva ou hipertrófica, assim como os pacientes com expectativa de vida reduzida.

Todos os pacientes realizaram uma avaliação clínica, que consistia em exame físico, avaliação de parâmetros ecocardiográficos e exames laboratoriais. Os dados clínicos e demográficos de todos os pacientes foram coletados por meio de questionário estruturado. O estado vital dos pacientes foi analisado por meio dos registros eletrônicos do HCPA, contato telefônico e banco de certificados de óbito da Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul. Os desfechos prognósticos avaliados foram a morte por todas as causas e a morte relacionada à IC (definida como morte súbita ou causada por progressão da doença avançada refratária ao tratamento).

Também foram incluídos 78 indivíduos saudáveis (controles) provenientes do Centro de Hemoterapia do HCPA. Os doadores de sangue foram selecionados no período compreendido entre os meses de outubro de 2003 e janeiro de 2008, e se enquadravam nos seguintes critérios de inclusão: idade ≥ 18 anos e sem história pessoal ou familiar de doença cardiovascular ou morte súbita precoce. A classificação racial de todos os participantes foi auto-relatada, e todos os indivíduos assinaram um termo de consentimento informado, cujo protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Genotipagem para o Polimorfismo -1059G>A

O DNA foi extraído de leucócitos do sangue periférico por um método de *salting out* (LAHIRI; NURNBERGER, 1991). A genotipagem do polimorfismo -1059G>A foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de

Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP), utilizando-se *primers*, condições de amplificação e digestão com a enzima de restrição *HhaI*, conforme descrito previamente (HUA et al., 2009a). Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%), corados com brometo de etídeo e analisados sob luz ultravioleta, para a visualização dos fragmentos de restrição e identificação dos genótipos.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas no programa SPSS (SPSS Inc., Chicago, EUA). As variáveis demográficas nos casos e controles foram comparadas utilizando-se o teste t de Student e o teste de qui-quadrado. As frequências alélicas foram determinadas pela contagem direta dos alelos e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado por meio do teste de qui-quadrado. As diferenças nas distribuições gênicas e genotípicas entre os grupos de indivíduos foram avaliadas por meio do teste de qui-quadrado ou do teste exato de Fisher, conforme indicado. Foram construídas curvas de sobrevida para avaliar a mortalidade por todas as causas e a mortalidade por IC de acordo com o polimorfismo -1059G>A, utilizando-se o método de Kaplan-Meier e comparando-se a sobrevida entre os diferentes genótipos pelo teste de *log-rank*. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Conforme os dados apresentados na Tabela 1, a idade dos indivíduos analisados foi, em média, de 51 anos para os controles e de 58 anos para os pacientes. A maioria dos indivíduos era do sexo masculino e tinha a pele de cor branca. Entre os pacientes, a etiologia mais frequente foi a isquêmica. Aproximadamente 74% estavam em classe funcional I e II, com uma fração de ejeção do VE média de 32%. As frequências genotípicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto nos pacientes como nos controles. As frequências alélicas foram semelhantes entre os pacientes e controles, assim como as frequências genotípicas (Tabela 2).

Tabela 1. Caracterização clínica e demográfica do grupo de estudo.

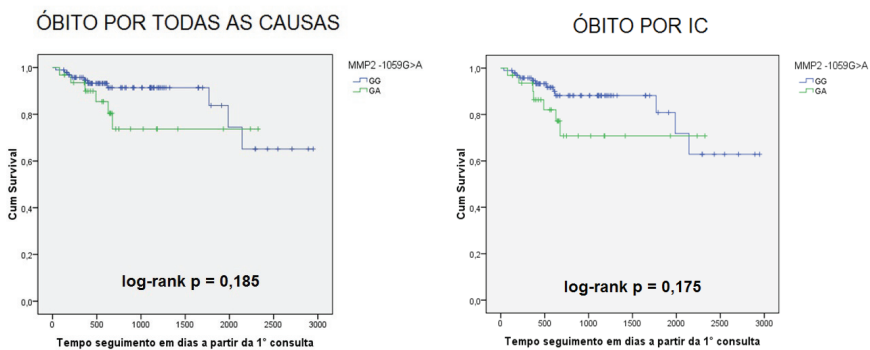
	Controles (n = 78)	Pacientes (n = 129)	p
Idade (anos)	51 ± 9	58 ± 13	< 0,001
Sexo masculino (%)	57 (73,1)	91 (70,5)	0,816
Branco (%)	57 (73,1)	90 (69,8)	0,726
Etiologia isquêmica (%)	-	43 (33,3)	
Etiologia hipertensiva (%)	-	33 (25,6)	
Etiologia idiopática (%)	-	28 (21,7)	
Classe funcional I e II (%)	-	93 (74,4)	
Fração de ejeção do VE (%)	-	32 ± 8	

Tabela 2. Frequências genótípicas e alélicas obtidas para o polimorfismo -1059G>A em pacientes e controles.

	Controles (n = 78)	Pacientes (n = 129)	p
GG	61 (78,2)	97 (75,2)	0,158
GA	15 (19,2)	32 (24,8)	
AA	2 (2,6)	0 (0)	
G	0,88	0,88	> 0,999
A	0,12	0,12	

Após um seguimento mediano de 21 meses, ocorreram 19 mortes no total, sendo 16 atribuídas à IC. Com relação ao óbito total, a taxa de mortalidade foi de 12,4% entre os pacientes com genótipo GG e de 21,9% entre os pacientes com genótipo GA ($p = 0,248$). Os óbitos relacionados à IC foram registrados em 10,3% dos pacientes com genótipo GG e em 18,8% dos pacientes com genótipo GA ($p = 0,224$). A análise de sobrevida nos pacientes não indicou que o polimorfismo -1059G>A estivesse relacionado com a mortalidade por todas as causas ($\log\text{-rank } p = 0,185$) ou com a mortalidade por IC ($\log\text{-rank } p = 0,175$) (Figura 1). Contudo, com o aumento do tamanho amostral, mantendo-se esta diferença entre a sobrevida dos pacientes homocigotos para o alelo G e heterocigotos, é possível que seja encontrada alguma relação do polimorfismo -1059G>A com a mortalidade por todas as causas ou com a mortalidade por IC.

Figura 1: Curvas de sobrevida para a mortalidade total e para a mortalidade por IC.



DISCUSSÃO

Desde que os estudos realizados em modelos experimentais de IC e em humanos demonstraram uma clara relação de causa e efeito entre o aumento na expressão das MMPs durante o desenvolvimento e a progressão da IC (VANHOUTTE e HEYMANS, 2010), alguns polimorfismos nos genes das MMPs foram analisados, sendo que os polimorfismos identificados até agora ocorrem frequentemente na região promotora, afetando, assim, as etapas críticas na

ligação de fatores da transcrição (HUA et al., 2009a). O polimorfismo estudado no presente projeto ocorre na posição -1059 da região promotora do gene da MMP-2 (HUA et al., 2009b).

De todos os pacientes e controles genotipados no presente trabalho, a maioria apresentou o genótipo GG, que nos dois estudos publicados por HUA e colaboradores na população chinesa, foi o genótipo associado ao pior prognóstico e ao risco aumentado da IC (HUA et al., 2009a; HUA et al., 2009b). No entanto, os dados obtidos no presente trabalho mostram que o polimorfismo -1059G>A não está associado com a suscetibilidade à IC. No estudo chinês, os pacientes portadores dos genótipos GA e AA apresentaram uma taxa de mortalidade significativamente menor em relação aos pacientes com genótipo GG, o que conferiu ao alelo A uma associação ao melhor prognóstico da IC (HUA et al., 2009b). No presente trabalho não observamos tal associação.

Uma possível explicação para esta divergência de resultados são as diferenças étnicas entre as populações de estudo. Outro fator que pode ter contribuído para esta discrepância é o tamanho amostral, que na população chinesa foi de 1294 (HUA et al., 2009a) e 605 (HUA et al., 2009b) indivíduos e no presente estudo foi de 207 (129 casos e 78 controles).

CONCLUSÃO

De acordo com os dados preliminares obtidos no presente estudo, não há evidências de que o polimorfismo -1059G>A no gene da metaloproteinase de matriz-2 esteja associado com a presença ou com o prognóstico da insuficiência cardíaca. Tendo em vista o tamanho amostral estudado até o momento, ainda não é possível avaliar adequadamente o papel deste polimorfismo na suscetibilidade e na mortalidade da IC.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente deste estudo e ao CNPq e ao FIPE-HCPA, pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- BIOLO, A. et al. Impact of beta1-adrenergic receptor polymorphisms on susceptibility to heart failure, arrhythmogenesis, prognosis, and response to beta-blocker therapy. **American Journal of Cardiology**, v. 102, p. 726-732, 2008.
- BOCCHI, E. A. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Atualização da diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98 (Supl. 1), p. 1-33, 2012.
- COHEN, C. R. et al. Association study of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end-products (*RAGE*) gene with susceptibility and prognosis of heart failure. **Gene**, v. 510, p. 7-13, 2012.

D'ARMIENTO, J. Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 12, p. 97-101, 2002.

DORN 2nd, G. W. Genetics of common forms of heart failure. **Current Opinion in Cardiology**, v. 26, p. 204-208, 2011.

HUA, Y. et al. Polymorphisms of MMP-2 gene are associated with systolic heart failure risk in Han Chinese. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 337, p. 344-348, 2009a.

HUA, Y. et al. Polymorphisms of MMP-2 gene are associated with systolic heart failure prognosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 404, p. 119-123, 2009b.

HUNT, S. A. et al. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing committee to update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). **Circulation**, v. 112, p. 154-235, 2005.

KITSIOS, G.; ZINTZARAS, E. Genetic variation associated with ischemic heart failure: a HuGE review and meta-analysis. **American Journal of Epidemiology**, v. 166, p. 619-633, 2007.

KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases. **Amino Acids**, v. 41, p. 271-290, 2011.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLPs studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 5444, 1991.

ROGER, V. L. et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 123, p. 18-209, 2011.

SPINALE, F. G. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. **Circulation Research**, v. 90, p. 520-530, 2002.

VANHOUTTE, D.; HEYMANS, S. TIMPs and cardiac remodeling: 'Embracing the MMP-independent-side of the family'. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, p. 445-453, 2010.

VELHO, F. M. et al. Polymorphisms of matrix metalloproteinases in systolic heart failure: role on disease susceptibility, phenotypic characteristics, and prognosis. **Journal of Cardiac Failure**, v. 17, p. 115-121, 2011.

WAGNER, D. R. et al. Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction. **Journal of Cardiac Failure**, v. 12, p. 66-72, 2006.

YAMAZAKI, T. et al. Circulating matrix metalloproteinase-2 is elevated in patients with congestive heart failure. **European Journal of Heart Failure**, v. 6, p. 41-45, 2004.

YE, S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. **Cardiovascular Research**, v. 69, p. 636-645, 2006.

ZAMILPA, R.; LINDSEY, M. L. Extracellular matrix turnover and signaling during cardiac remodeling following MI: Causes and consequences. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, p. 558-563, 2010.