

# **Polimorfismo genético da metaloproteinase de matriz MMP-9 e doença pulmonar obstrutiva crônica**

DAIANE NICOLI SILVELLO<sup>1</sup>

HELENA SCHIRMER<sup>2</sup>

PAULO JOSÉ ZIMERMANN TEIXEIRA<sup>3</sup>

LUCIANO BASSO DA SILVA<sup>4</sup>

DANIEL SIMON<sup>5</sup>

## **RESUMO**

As metaloproteinases de matriz (MMPs) compreendem uma família de aproximadamente 20 enzimas proteolíticas com papel essencial na remodelação e reparo tecidual. A metaloproteinase de matriz MMP-9 é uma das MMPs mais abundantes em diversas doenças pulmonares, incluindo a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Foi descrito um polimorfismo na região promotora do gene da MMP-9, -1562C/T, sendo o alelo T associado com níveis de expressão mais altos do que o alelo C. O presente estudo teve por objetivo investigar a associação entre o polimorfismo -1562C/T da MMP-9 e o desenvolvimento da DPOC. Foram estudados 89 pacientes com DPOC e 96 indivíduos normais. O polimorfismo foi analisado por PCR seguido da clivagem com a enzima de restrição SphI. A frequência do alelo T foi de 9,0% no grupo de pacientes e 8,3% no grupo controle, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $p=0,82$ ). Estes resultados sugerem que o polimorfismo -1562C/T não é um fator de risco genético para o desenvolvimento de DPOC na amostra estudada.

---

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

<sup>2</sup>Aluna do Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA e Professora do Curso de Biomedicina/FEEVALE

<sup>3</sup>Professor do Curso de Fisioterapia/FEEVALE

<sup>4</sup>Professor do Curso de Biologia/FEEVALE

<sup>5</sup>Professor - Orientador do Curso de Biologia/ULBRA e do Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA (daniel.simon@ulbra.br)

**Palavras-chave:** doença pulmonar obstrutiva crônica; metaloproteínas de matriz; polimorfismo genético; fator de risco

## ABSTRACT

The matrix metalloproteinases (MMPs) comprised a family of over 20 proteolytic enzymes which plays an essential role in the tissue remodeling and repair. The MMP-9 (gelatinase B) is an MMP that is present in low quantities in the healthy adult lung, but much more abundant in several lung diseases, including chronic obstructive pulmonary disease (COPD), participating of the tissue remodeling and the inflammatory response. A polymorphism in the MMP-9 promoter region was described, -1562C/T, being that carriers of the T allele have higher MMP-9 transcriptional activity than carriers of the C allele. The aim of the present study was to study the association between the -1562C/T polymorphism and the development of COPD. We studied 185 Brazilian Caucasian subjects, of which 89 had COPD and 96 were normal non-smokers (control group). The polymorphism was analyzed by PCR followed by restriction digestion with SphI. The frequency of the T allele was 9.0% in the COPD group and 8.3% in the control group. This difference was not statistically significant ( $p=0.82$ ). These results suggest that the MMP-9 polymorphism does not act as a genetic factor for the development of COPD in the Brazilian Caucasian sample studied.

**Key words:** chronic obstructive pulmonary disease; matrix metalloproteinase; genetic polymorphism; risk factor

## INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é caracterizada por uma obstrução progressiva e irreversível das vias respiratórias, destruição do parênquima pulmonar e perda da elasticidade do pulmão (PETER & BARNES, 2000). A DPOC é uma das principais causas de mortalidade e morbidade no mundo, com enorme impacto sócio-econômico, sendo o resultado de uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais. O principal fator ambiental é o hábito crônico de fumar, e, portanto, evitável. Entre os componentes genéticos a deficiência de alfa-1-antitripsina é o único fator de risco bem estabelecido, indicando a importância do sistema proteases-antiproteases no desenvolvimento da DPOC (FOSS, PERE &

SADFORS, 2002). As metaloproteínas de matriz (MMPs) compreendem uma família funcional e estrutural de aproximadamente 20 enzimas proteolíticas com papel essencial na remodelação e reparo tecidual. A metaloproteínase de matriz MMP-9 (gelatinase B) é uma das MMPs mais abundantes em diversas doenças pulmonares, incluindo DPOC, participando do remodelamento tecidual e da resposta inflamatória.

Alteração da expressão das MMPs pela fumaça do cigarro, direta ou indiretamente, podem conduzir a destruição pulmonar, característica da DPOC, sobretudo com enfisema pulmonar. Níveis aumentados de MMP-9 foram encontrados em pacientes com DPOC (ATKINSON & SENIOR, 2003). Foi descrito um polimorfismo na

região promotora do gene da MMP-9, -1562C/T, sendo o alelo T associado com altos níveis de expressão de MMP-9 (ZHANG et al., 1999). Este polimorfismo foi associado com o desenvolvimento de enfisema pulmonar em fumantes japoneses (MINEMATSU et al., 2001).

O presente trabalho teve por objetivo estudar a associação do polimorfismo -1562C/T do gene da MMP-9 com a doença pulmonar obstrutiva crônica. Desta forma, foram estabelecidas as metodologias para genotipagem do polimorfismo -1562C/T e determinadas as frequências alélicas e genotípicas deste polimorfismo em uma amostra de indivíduos normais e pacientes com DPOC da população brasileira.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Indivíduos Estudados**

Foram estudados 89 pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) provenientes do projeto “Programa de Reabilitação Pulmonar” do Centro Universitário FEEVALE e 96 indivíduos normais, não fumantes, doadores do banco de sangue, que constituíram o grupo controle. Os grupos foram pareados por sexo e idade. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FEEVALE e consentimento informado foi obtido de todos os indivíduos participantes do estudo.

### **Extração de DNA**

DNA de alto peso molecular foi extraído dos pacientes com DPOC a partir de esfregaço de

mucosa bucal utilizando o método descrito por BOOM et al. (1990). O DNA do grupo controle foi extraído a partir de sangue total utilizando o método descrito por LAHIRI & NURNBERGER (1991).

### **Determinação dos Genótipos**

O polimorfismo -1562C/T foi genotipado através da amplificação das amostras pela reação em cadeia da polimerase seguida de clivagem com enzima de restrição *SphI*, metodologia conhecida como PCR-RFLP. As condições de amplificação e primers foram descritos por MORGAN et al. (2003). O fragmento amplificado possui 436 pares de bases (pb), e quando o alelo T está presente a clivagem gera fragmentos de 242 pb e 194 pb.

### **Análise dos Produtos Amplificados**

Após a clivagem os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. O tamanho dos fragmentos foi analisado e estimado por comparação com a migração das bandas de DNA do marcador de peso molecular 50 pb.

### **Análise Estatística**

As frequências alélicas foram determinadas através da contagem direta dos alelos. As frequências genotípicas foram testadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg através do teste de qui-quadrado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foram determinadas as freqüências alélicas do polimorfismo -1562C/T do gene MMP-9 em uma amostra de indivíduos caucasóides do sul do Brasil. Foram estudados 89 indivíduos do grupo de pacientes com DPOC e 96 indivíduos do grupo

controle. A freqüência do alelo T no grupo de pacientes foi de 9,0% e no grupo controle foi de 8,3% (Tabela 1). Esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,82$ ). Desta forma, os resultados não indicam a existência de associação entre o polimorfismo e a doença. As freqüências observadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os subgrupos estudados.

**Tabela 1** - Freqüências alélicas e genótípicas do polimorfismo -1562C/T do gene da MMP-9 no grupo de pacientes (n=89) e grupo controle (n=96).

		Pacientes*	Controles
Alelos	C	162 (91,0)	176 (91,7)
	T	16 (9,0)	16 (8,3)
Genótipos	CC	74 (83,1)	80 (83,3)
	CT	14 (15,8)	16 (16,7)
	TT	1 (1,1)	-

\*Valores entre parênteses são porcentagens.

Os mecanismos que estão na base da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e o desenvolvimento da limitação respiratória ainda não estão totalmente esclarecidos. Eles envolvem uma série de fatores ambientais e genéticos que promovem o recrutamento de células inflamatórias e originam uma resposta alterada das células estruturais do pulmão, na qual se destaca o desequilíbrio do balanço proteases-antiproteases. A MMP-9 está presente em pequenas quantidades em um pulmão saudável de um adulto, mas apresenta sua atividade aumentada em muitas doenças pulmonares, incluindo asma, fibrose pulmonar e DPOC (ATKINSON & SENIOR, 2003). A MMP-9 atua na remodelação, resposta inflamatória e desenvolvimento de enfisema pulmonar.

O efeito do polimorfismo -1562C/T na população pode ser modulado por fatores ambientais como hábito crônico de fumar, ou fatores genéticos tais como etnicidade e o repertório genético. Poucos estudos analisaram a influência do polimorfismo genético -1562C/T e o desenvolvimento de DPOC e apresentaram resultados controversos. A maior parte destes estudos foi realizada em populações orientais, ressaltando a importância de estudos em populações caucasóides. MINEMATSU et al. (2001) e ZHOU et al. (2004) observaram que o alelo T do polimorfismo aumenta o risco de desenvolvimento de DPOC em japoneses e chineses, respectivamente. O alelo T, associado com o desenvolvimento de DPOC, foi associado com maior atividade transcricional do gene da MMP-9 (ZHANG et al.,

1999). Por outro lado, ITO et al. (2005) não encontraram diferença significativa na frequência deste polimorfismo entre o grupo de pacientes e o grupo controle em uma amostra da população japonesa. Contudo, estes autores observaram associação entre o polimorfismo e a ocorrência de enfisema pulmonar superior nos pacientes com DPOC (ITO et al., 2005). JOOS et al. (2002) realizaram estudo de associação, em indivíduos fumantes caucasóides americanos, entre a taxa de declínio da função pulmonar e polimorfismos em três genes das MMPs. Não foi encontrada diferença significativa na frequência do polimorfismo -1562C/T entre pacientes que apresentaram declínio rápido ou lento da função pulmonar. Contudo estes autores observaram que polimorfismos nos genes da MMP-1 e MMP-12 apresentaram associação com o declínio da função pulmonar.

Com relação a interpretação de nossos dados, algumas limitações devem ser consideradas. Em primeiro lugar, deve ser destacado que o poder estatístico para detectar diferenças no presente estudo pode ser limitado devido ao número relativamente pequeno de indivíduos estudados. Contudo, o tamanho amostral é semelhante ao analisado em outros trabalhos da literatura que observaram associação (MINEMATSU et al., 2001; ITO et al., 2005). Em segundo lugar, tendo em vista que a doença é desenvolvida somente em cerca de 15% dos fumantes, um grupo controle constituído de indivíduos fumantes que não desenvolveram a doença poderia ser mais adequado. Por outro lado, diversos estudos comparando pacientes com DPOC e indivíduos não fumantes foram relatados na literatura (por exemplo, MINEMATSU et al., 2001; GASPAR et al., 2004). Além disso, não se espera que fumantes apresentem frequências alélicas diferentes dos

não fumantes na população.

Em conclusão, os resultados do nosso estudo indicam que o polimorfismo -1562C/T do gene da MMP-9 não tem impacto significativo no risco de desenvolver DPOC na amostra caucasóide estudada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATKINSON, J. J.; SENIOR, R. M. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.28, p.12-24, 2003.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.495-503, 1990.

FOOS, L.; PERE, P. D.; SADFOR, A. F. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. **Swiss Medicine Weekly**, v.132, p.27-37, 2002.

GASPAR, P. et al. CYP 1A1, CYP 2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? **Genetic and Molecular Biology**, v.27, p.133-138, 2004.

ITO, I. et al. Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v.172, p.1378-1382, 2005.

JOOS, L. et al. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate

of decline in lung function. **Human Molecular Genetics**, v.11, p.569-576, 2002.  
Erratum in: **Human Molecular Genetics**, v.12, p.803-804, 2003.

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

MINEMATSU, N. et al. Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, p.116-119, 2001.

MORGAN, A.R. et al. Haplotypic analysis of the MMP-9 gene in relation to coronary

artery disease. **Journal of Molecular Medicine**, v. 81, p. 321-326, 2003.

PETER, J.; BARNES, D.S.C. Chronic obstructive pulmonary disease. **The New England Journal of Medicine**, v.343, p.269-280, 2000.

ZHANG, B. et al. Functional polymorphism in regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. **Circulation**, v.99, p.1788-1794, 1999.

ZHOU, M. et al. Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and the susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Han population of south China. **Chinese Medical Journal**, v.117, p.1481-1484, 2004