

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Cardiologia e Ciências Cardiovasculares

**Papel de Polimorfismos das Metaloproteinases de Matriz na
Insuficiência Cardíaca Sistólica na Suscetibilidade à Doença, nas
Características Fenotípicas e no Prognóstico**

Autor: Dr. Fábio Michalski Velho

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Rohde

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, maio de 2010

V436p Velho, Fábio Michalski

Papel de polimorfismos das metaloproteinases de matriz na insuficiência cardíaca sistólica na suscetibilidade à doença, nas características fenotípicas e no prognóstico / Fábio Michalski Velho ; orient. Luis Eduardo Rohde. – 2010.

123 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Insuficiência cardíaca sistólica 2. Prognóstico 3. Fenótipo 4.

Metaloproteinases da matriz 5. Polimorfismo genético I. Rohde, Luis

Eduardo Paim II. Título.

NLM: WG 370

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Este trabalho foi desenvolvido no Ambulatório de Insuficiência Cardíaca e Transplante e no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o auxílio financeiro do CNPq e FIPE-HCPA.

“Eu prefiro ser essa metamorfose ambulante
do que ter a velha opinião formada sobre tudo”.

Raul Seixas

AGRADECIMENTOS

O projeto de mestrado é fruto de mentes brilhantes. Cada pessoa no cumprimento da sua função permitiu que essa pesquisa fosse concluída. Esse projeto originou-se no ano 2004 quando a então mestranda Andréia Biolo, sob comando dos professores doutores Luís Eduardo Paim Rohde e Nadine Clausell, iniciou uma nova linha de pesquisa sobre polimorfismos genéticos em insuficiência cardíaca. Sua brilhante defesa de dissertação coincidiu com meu ingresso na residência médica em cardiologia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Após a bem sucedida defesa da doutora Andréia e sob os mesmos tutores, eu juntamente com o doutor Roberto Gabriel Salvaro resolvemos assumir o timão desse navio e dar continuidade a esse trabalho. Nessa longa jornada, de mares muitas vezes revoltosos, a agregação da professora Doutora Kátia Gonçalves dos Santos e sua equipe permitiu importantes avanços no nosso laboratório de pesquisa cardiovascular permitindo que nossa engrenagem funcionasse sem vacilos.

Sou muito grato ao Doutor Luis Eduardo Paim Rohde, meu orientador, amigo, pesquisador, pela sua orientação, transmissão de conhecimento, paciência, dedicação e exemplo de ética e conduta médica profissional.

A Doutora Andréia Biolo, amiga, pesquisadora, exemplo profissional, por ter me proporcionado uma experiência de vida maravilhosa no exterior.

A Doutora Nadine Clausell meu reconhecimento a sua qualidade como pesquisadora, exemplo de liderança e competência profissional.

A Doutora Kátia Gonçalves dos Santos por sua competência, dedicação, organização e paciência.

Ao Doutor Luis Beck da Silva Neto, pela amizade, apoio e troca de conhecimento.

À mestranda Carolina Cohen, meu braço direito na análise estatística, contextualização e na elaboração das tabelas desse trabalho pela sua excelência profissional, troca de conhecimento, dedicação e trabalho laboratorial.

Pelo desenvolvimento e produção deste trabalho também não poderia deixar de agradecer as seguintes pessoas:

Mestrandas Daiane Silvello e Nidiane Martinelli pelo exaustivo trabalho de genotipagem.

Médicos Residentes Aníbal Borges e Rafael Seewald, Pedro Píccaro e Alberto Treiguer, acadêmicos Jerônimo Oliveira e Fabian Berth. Incansáveis na captação de pacientes e revisão de prontuários.

Doutor Roberto Gabriel Salvaro, grande amigo, colega da residência, do ambulatório, do mestrado, pelo apoio e companheirismo nesta jornada científica.

Alunas de iniciação científica e bolsistas de apoio técnico do Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do HCPA, Vanessa La Porta, Paula Marson, Alice Ribeiro e Daniela Fraga. A dedicação e paciência de vocês também foram fundamentais.

Eneida Rabelo, Graziella Aliti, Daniela Rivera Domingues e demais enfermeiras do Grupo de Insuficiência Cardíaca do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo auxílio na pesquisa e pela qualidade assistencial no atendimento multidisciplinar dos pacientes ambulatoriais e internados.

Acadêmicos e preceptores do Ambulatório de Insuficiência Cardíaca do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela compreensão nas interrupções dos atendimentos para a coleta de dados.

Pacientes que aceitaram participar da pesquisa, oferecendo-se para contribuir na construção do conhecimento.

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por oferecem uma oportunidade ímpar de crescimento profissional e pessoal.

Deus que sempre está presente em todos os momentos da minha vida e iluminando nossos caminhos.

Meus pais, a origem de tudo, e a Ana meus exemplos de médicos dedicados, éticos, responsáveis, pelo seu amor, educação e por me sinalizarem os melhores caminhos a serem seguidos.

Aos meus irmãos, Fabrício, Felipe, Bruno e Luisa, meus grandes amigos e companheiros, pelo seu carinho, amizade e estímulo ao meu crescimento profissional.

Minha avó, Flavia, pelo seu carinho, amor, educação.

As famílias Michalski, Petersen, Velho, Reveilleau, Jung e Serafini pelo seu incessante apoio.

E finalmente, à minha esposa Adriana, meu grande amor, eterna companheira, pelo seu amor, carinho, dedicação e compreensão.

ÍNDICE

1. Resumo Geral.....	10
2. Marco Teórico.....	12
2.1. Insuficiência Cardíaca.....	12
2.2. Remodelamento Cardíaco.....	15
2.3. Matriz Extracelular.....	19
2.4. Metaloproteinases de Matriz.....	24
2.5 MMP-1.....	28
2.6 MMP-3.....	29
2.7 MMP-9.....	29
2.8 Polimorfismos das Metaloproteinases de Matriz.....	30
3. Justificativa do Estudo.....	33
4. Objetivos.....	35
5. Referências.....	36
6. Artigo Original	
6.1 Resumo.....	47
6.2 Introdução.....	48
6.3 Métodos.....	49
6.4 Resultados.....	52
6.5 Discussão.....	55
6.6 Referências.....	60
6.7 Tabelas e Figuras.....	65

6.8 Legenda das Figuras.....	75
7. Artigo Original em Inglês.....	85
8. Anexos.....	120

1. RESUMO GERAL

A insuficiência cardíaca (IC) é, ainda nos dias de hoje, um problema de saúde pública, pois apesar dos definidos avanços terapêuticos sua morbi-mortalidade persiste elevada. Dados do sistema único de saúde do Brasil demonstram taxa de mortalidade intrahospitalar de 8.5%. Trata-se de uma síndrome clínica com herança multifatorial caracterizada, do ponto de vista fisiopatológico, pelo remodelamento das cavidades cardíacas. Neste processo, ocorre uma reestruturação da matriz extracelular, mediada em grande parte, pelas metaloproteinases de matriz (MMPs). Estudos têm evidenciado que os polimorfismos nas regiões promotoras dos genes da MMP-1 (-1607 1G/2G), da MMP-3 (-1171 5A/6A) e da MMP-9 (-1562 C/T) afetam a expressão desses genes e têm sido implicados em doenças cardíacas como a aterosclerose, infarto agudo do miocárdio (IAM) e arritmias cardíacas. Sugere-se que a presença dos alelos 2G, 5A e T podem estar relacionados a susceptibilidade à IC e com a mortalidade nos pacientes com IC. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel desses polimorfismos genéticos na fisiopatologia da IC e no prognóstico dos pacientes. Para isto, foram estudados 313 pacientes com IC por disfunção sistólica do ventrículo esquerdo e 367 indivíduos saudáveis. A genotipagem foi realizada utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase e restrição enzimática de fragmentos. Curvas de sobrevivência foram construídas por meio do método de Kaplan-Meier para avaliar os desfechos de interesse (morte súbita cardíaca ou morte por progressão da IC). As frequências alélicas e genotípicas observadas para os polimorfismos -1607 1G/2G (MMP-1), -1171 5A/6A (MMP-3) e -

1562 C/T (MMP-9) foram semelhantes nos casos e controles ($p > 0,05$ para todas as comparações). Encontramos que os carreadores do alelo 2G da MMP1 foram associados a etiologia isquêmica, história de infarto agudo do miocárdio e procedimentos de revascularização miocárdica (todos os valores de $p < 0.05$). Durante um acompanhamento médio de 37 meses (variação entre quartis 16 a 62 meses) ocorreram 58 mortes relacionadas a IC. Sobrevida relacionada a IC foi significativamente melhor nos pacientes carreadores do alelo 2G da MMP1 (73% versus 44% para pacientes 1G/1G, $p=0.003$) e nos carreadores do alelo 6A da MMP-3 (71% versus 61% para pacientes 5A/5A, $p=0.05$), particularmente em pacientes de etiologia não isquêmica ($p=0.03$). Os portadores do genótipo 1G1G da MMP1 foram independentemente associados a mortalidade por IC depois de ajustados para vários preditores de risco (RR 2.1, IC 95% 1.2-3.6; $p=0.01$). Apesar destes achados, concluímos que os polimorfismos das MMP -1, -3 e -9 não foram associados a suscetibilidade a IC. Os carreadores do alelo 2G da MMP -1 apresentam maior etiologia isquêmica e a presença dos alelos 1G/1G e 5A/5A estão relacionados a pior sobrevida dos pacientes com IC.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Insuficiência Cardíaca

Definição. A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica que resulta da deterioração da função cardíaca, caracterizada por alterações estruturais, funcionais, genéticas, hemodinâmicas e neuro-humorais secundárias e compensatórias. Tais alterações manifestam-se, do ponto de vista clínico, freqüentemente por dispnéia e fadiga, redução da capacidade funcional, acúmulo de líquidos, com conseqüente congestão pulmonar e periférica (1,2).

Epidemiologia. Existe grande interesse no estudo da IC, uma vez que esta é uma doença cuja incidência, prevalência, custos e índices de hospitalizações vêm aumentando nos últimos anos, apesar do melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença e dos definidos avanços terapêuticos recentes, como o uso de ressincronizadores e cardiodesfibriladores implantáveis (3-7), tornando-se, dessa forma, um grave problema de saúde pública. Nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que 5.7 milhões de norte-americanos sejam portadores de IC sendo 60% do sexo masculino. Além disso, somente no ano de 2006 mais de 292.000 norte-americanos faleceram em decorrência da doença. Dados da coorte de Framingham indicam que a mortalidade anual é de aproximadamente 20%, sendo que aproximadamente 80% dos portadores de IC com idade até 65 anos morrerão em 8 anos(8). Os custos também são elevados, somente no ano de 2009 os custos diretos e indiretos com pacientes portadores de IC somaram U\$\$ 37.2 bilhões de dólares

americano. Nos últimos 10 anos naquele país, o número de internações hospitalares aumentou de 800.000 para mais de 1.1 milhão (8).

No Brasil, fenômeno semelhante é observado, sendo a IC uma das principais causas de mortalidade de toda a federação como também responsável por cerca de 250.000 internações anuais, com crescentes incrementos de custo, tempo de internação e letalidade nos últimos 11 anos (9). Os dados da tabela I ilustram esses achados.

Tabela I - Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca em Hospitais Públicos Brasileiros.

	1998	2008	2009
Internações(n)	388.892	268.980	271.020
Óbitos	26.298	22.078	23.099
Custo Total	R\$161,2 milhões	R\$247,62 milhões	R\$295,90 milhões
Tempo de permanência	6 dias	6.5 dias	6.5 dias
Taxa de mortalidade	6.76%	8.21%	8.52%

Etiologia. No nosso país, assim como nos Estado Unidos, a principal causa de IC é cardiopatia isquêmica crônica associada à hipertensão arterial sistêmica. Também existem causas endêmicas como a doença de Chagas presente em algumas regiões, bem como a endomiocardiofibrose e a cardiopatia reumática crônica as quais estão relacionadas a regiões com perfil sócio econômico mais baixo (10). As principais etiologias de IC envolvem distúrbios relacionados com deficiência de contratilidade miocárdica como na miocardiopatia dilatada, bem como relacionada à doença arterial coronariana; situações onde há sobrecarga de pressão como na hipertensão arterial sistêmica, coarctação da aorta e estenose aórtica; sobrecarga de volume, observada na

insuficiência mitral, hipertireoidismo, anemia, beribéri, fístula arteriovenosa e finalmente por distúrbios do enchimento ventricular exemplificados nas miocardiopatias restritivas e endomiocardiofibrose.

Preditores Prognósticos. A busca de entendimento dos fatores prognósticos em pacientes com IC sempre foi intensa e com objetivo de definir e investigar estratégias de tratamento. Além disto, ao paciente e seus familiares a informação prognóstica permite o planejamento do seu futuro. Ao médico permite identificar de maneira apropriada pacientes com indicação de transplante cardíaco ou dispositivos de assistência (11).

Diversos fatores prognósticos já são conhecidos e permitiram a elaboração de modelos prognósticos. São itens destes modelos a redução da fração de ejeção, piora da capacidade funcional, o consumo máximo de oxigênio, anemia, hiponatremia, largura do complexo QRS, taquicardia sinusal em repouso, hipotensão, congestão refratária, insuficiência renal e elevação persistente de níveis plasmáticos de peptídeo natriurético do tipo B (BNP) durante hospitalizações (11). A identificação destes fatores auxiliou na elaboração de modelos de escores prognósticos. O Escore de Seattle (12), por exemplo, foi derivado e validado a partir de seis estudos de coorte totalizando mais de onze mil pacientes. Baseia-se em características clínicas como idade, sexo, classe funcional, pressão arterial sistólica, peso, etiologia isquêmica e fração de ejeção; uso de medicações como inibidores da enzima de conversão de angiotensina (IECA), betabloqueadores, diuréticos, espironolactona, estatina e marcadores laboratoriais

como colesterol total, número total de leucócitos, ácido úrico, sódio e hemoglobina. Esse escore é capaz de prever com alta acurácia (área sob a curva roc= 0.729, IC95%= 0.714 a 0.744) a sobrevida dos pacientes em até cinco anos antes e após intervenções farmacológicas e de dispositivos como ressincronizadores e cardiodesfibriladores implantáveis. No entanto, com a identificação de novos preditores prognósticos e melhor consistência terapêutica dos pacientes com IC os modelos prognósticos necessitarão ser revalidados. Além disso, ocorreram importantes avanços no entendimento fisiopatológico da IC que permitiu identificar diversos biomarcadores como renina, interleucinas, endotelina e noradrenalina, relacionados com remodelamento cardíaco e que serão abordados a seguir (2).

2.2 Remodelamento Cardíaco

Remodelamento cardíaco pode ser definido como expressão genômica que resulta em mudanças moleculares, celulares e intersticiais as quais se manifestam clinicamente como alteração na estrutura (massa, dimensão e formato) e função cardíaca (13). É influenciado pela resposta do cardiomiócito a sobrecarga pressórica, volumétrica ou dano celular em associação a ativação neurohumoral. Desempenham papel importante nesse processo o interstício, os fibroblastos, o colágeno, a vascularização coronariana, isquemia miocárdica, necrose e apoptose celular. Pode ser classificado como fisiológico como ocorre nos atletas profissionais ou patológico como comumente observado em indivíduos que sofreram um infarto agudo do miocárdio (IAM), em situações de sobrecarga pressórica, sobrecarga volumétrica ou

por processo inflamatório miocárdico (13). Também pode ser classificado nas formas com ou sem adaptação (14). No processo adaptativo em que o coração é submetido à injúria por longos períodos de tempo (na insuficiência mitral, por exemplo) o remodelamento permite que o coração mantenha sua função preservada. Entretanto, com a exposição prolongada à sobrecarga volumétrica ou mesmo após um IAM à continuidade do remodelamento não consegue manter o suporte circulatório necessário, sendo visto, assim, como um processo deletério. Não há dúvida que o entendimento do processo fisiopatológico do remodelamento cardíaco, seu controle e até mesmo a sua reversão são buscados, a fim de diminuir eventos cardíacos maiores em pacientes com IC. Diversos ensaios clínicos, utilizando inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) (15), betabloqueadores (16), espironolactona (17,18), associação hidralazina-isossorbida (19,20) demonstraram redução de mortalidade em pacientes com IC que utilizaram esse tipo de medicação. O remodelamento cardíaco está implicado diretamente na obtenção desses resultados, já que os referidos medicamentos determinaram melhora da fração de ejeção e do débito cardíaco, reduções dos volumes sistólico e diastólico finais do ventrículo esquerdo. O mesmo raciocínio é utilizado para explicar por que medicações vasodilatadoras como prazosin (19) e diltiazem (21) ou mesmo agentes inotrópicos (22), os quais melhoram a hemodinâmica cardíaca, não trouxeram benefícios em termos de mortalidade ou hospitalizações por IC.

Fatores envolvidos no processo de remodelamento cardíaco: Os cardiomiócitos são as células diretamente envolvidas no processo de remodelamento cardíaco. São

determinantes nos processo de contração ventricular, bem como da sua massa. Ao ser exposto a lesão, aguda ou crônica, há, freqüentemente, uma diminuição de cardiomiócitos e os remanescentes tornam-se alongados e hipertrofiados, com objetivo de manter o débito cardíaco, o que determina aumento da espessura da parede ventricular (13). Esse processo pode ocorrer de forma homogênea, como nos casos de sobrecarga pressórica por hipertensão arterial sistêmica, ou focal, como quando ocorre hipertrofia compensatória em segmentos próximos ao infarto do miocárdio. Além disto, existe indução da expressão de genes associados à hipertrofia ventricular, resultando em síntese de novas proteínas contráteis e formação de novos sarcômeros, o que, por sua vez, aumenta o estresse parietal e, muitas vezes, determina isquemia do cardiomiócito (13).

A ativação neuro-humoral é outro fator importante no processo do remodelamento cardíaco, já bem estudada e inicialmente ocorre como resposta compensatória do organismo ao débito cardíaco ineficiente. Em longo prazo, essa ativação está relacionada a progressão da doença e ao processo de remodelamento ventricular. A ativação dos sistemas simpático e renino-angiotensina-aldosterona (SRA) são os principais envolvidos nesse processo e determinam aumento da pós-carga devido a vasoconstrição periférica. Quando há lesão de cardiomiócito ocorre aumento nos níveis de angiotensina II, o que determina a síntese de fibroblastos gerando necrose e fibrose do endocárdio. Além disso, há aumento da produção de aldosterona que estimulará a síntese de colágeno determinando fibrose e contribuindo para o processo de remodelamento. Em sub-análise do ensaio clínico RALES (23), a

administração de espironolactona, um antagonista da aldosterona, determinou redução dos níveis plasmáticos do procolágeno tipo III, com suposta redução da síntese de colágeno, sendo este fenômeno sugerido como possível explicação dos benefícios dessa medicação em pacientes com IC. Em relação ao sistema simpático, desde a década de 60, sabe-se que pacientes com IC apresentam níveis elevados de noradrenalina (NA) (24). Latini e colaboradores (25) estudaram 4300 pacientes do ensaio Val-HeFT e dosaram os níveis plasmáticos de BNP (marcador de estresse parietal), noradrenalina, aldosterona, endotelina e renina antes da randomização. Os pacientes com níveis elevados de BNP (Risco relativo [RR] = 2.5), NA (RR = 1.5) e renina plasmática (RR = 1.55) apresentaram maior morbi-mortalidade.

Nos últimos anos, fatores envolvidos na proliferação dos fibroblastos, degradação de colágeno, apoptose celular e marcadores inflamatórios têm sido estudados para melhor entendimento do processo de remodelamento cardíaco, bem como buscar alternativas terapêuticas para os pacientes com IC (24). O processo inflamatório, por exemplo, está envolvido na fisiopatologia e progressão da IC. Desde a década de 50, diversos biomarcadores têm sido foco de intensa investigação. A proteína C reativa, por exemplo, determina dano endotelial reduzindo a síntese de óxido nítrico, aumento da síntese de endotelina-1 e expressão de moléculas de adesão (26). Em 2005, Anand e colaboradores demonstraram que pacientes portadores de IC com níveis elevados de proteína C reativa apresentavam maior ocorrência de eventos cardiovasculares maiores (26).

Além disso, estudos da década de 90 sugerem que o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e as interleucinas 1, -6 e -18 apresentam níveis elevados em pacientes com IC. Estas citocinas pró-inflamatórias podem ser produzidas pelas células nucleadas cardíacas e estão relacionadas à apoptose e necrose de cardiomiócitos, enquanto o TNF α está envolvido com os processos que levam a dilatação do ventrículo esquerdo, em parte, devido à ativação de enzimas proteolíticas, conhecidas como metaloproteinases de matriz (27,28).

Outro fator importante que parece estar implicado na progressão da IC é o estresse oxidativo, o qual resulta do desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o nível de antioxidantes, determinando redução nos níveis de óxido nítrico. Esse desbalanço determina importante dano endotelial e afeta a progressão da IC devido a indução do processo de apoptose e conseqüente necrose dos cardiomiócitos (26). Por ser de difícil mensurar diretamente as espécies reativas de oxigênio, alguns marcadores indiretos de estresse oxidativo têm sido investigados. A mensuração de mieloperoxidase e isoprostano, por exemplo, são capazes de prever mortalidade em pacientes com IC (29,30).

2.3 Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) representa uma trama complexa de moléculas biologicamente ativas que dá base aos cardiomiócitos, sendo composta de proteínas de matriz, como o colágeno tipo I e tipo III – responsáveis pela integridade dos

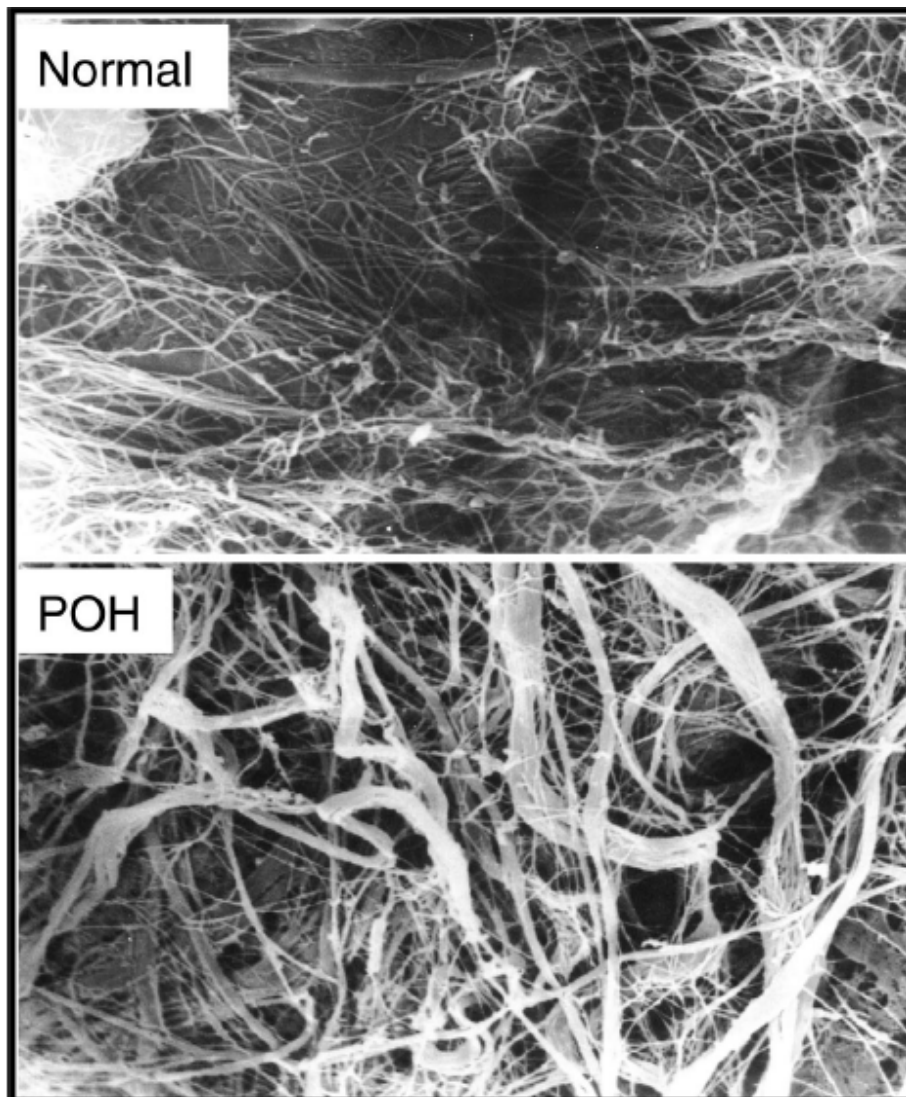
cardiomiócitos adjacentes; moléculas de sinalização celular; proteases e determinados tipos celulares, que desempenham importante papel no remodelamento cardíaco (31).

A matriz extracelular tem a função de manter o adequado alinhamento dos cardiomiócitos a partir do endocárdio até o epicárdio. A microscopia eletrônica permitiu melhor entendimento das suas funções, sua relação com a vascularização, bem como demonstrou sua capacidade de armazenar rede fibrilar de colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e componentes biológicos ativos como a endotelina, angiotensina II e TNF α (31). Sua integridade é preservada pela equidade de expressão e atividade entre as metaloproteinases de matriz (MMPs) e os inibidores teciduais de matriz (TIMPs). Quando há predomínio de atividade das MMPs sobre os TIMPs há remodelamento e dilatação ventricular (24). Ativação de procolágeno tipo I e tipo III determinam incremento no processo de fibrose, remodelamento e estão associados à maior ocorrência de eventos em pacientes com IC (24,32). No entanto, existem pelo menos 25 tipos diferentes de MMPs, colágeno e TIMPs que necessitam de melhor entendimento do seu papel, a fim de rotineiramente serem aferidos (24).

O entendimento da MEC e sua relação com o processo de remodelamento é de fundamental importância para elaboração de estratégias de tratamento que freiem este processo. No período logo após um IAM, por exemplo, sabe-se que inicialmente existe a degradação da MEC, liberação de moléculas bioativas e citocinas (31). Essa degradação de MEC inicial é processo importante para que alguns dias após o IAM as células inflamatórias, juntamente com maturação e proliferação de fibroblastos, permitam as condições necessárias para formação de nova MEC e conseqüente

formação de tecido cicatricial. Na fase tardia do remodelamento pós IAM a nova MEC permite que o endocárdio resista ao estresse gerado. Entretanto, quando a MEC não suporta o estresse endocavitário ocorre a expansão do IAM, a qual se caracteriza pela dilatação ventricular que poderá evoluir para IC (33). Uma das prováveis explicações para essa situação é o aumento na degradação da MEC e é um preditor de aumento de morbi-mortalidade (33). O remodelamento que ocorre nos estados de sobrecarga pressórica e volumétrica, ou na doença chagásica também envolve de maneira diversa a estrutura da MEC. O estado de sobrecarga pressórica, comumente observada em indivíduos hipertensos ou na estenose aórtica, determina hipertrofia concêntrica, a qual resulta da adição de sarcômeros em paralelo ao cardiomiócito, determinando aumento na espessura parietal do miocárdio e, muitas vezes, redução do volume diastólico final (32). Esse estresse gerado determina acúmulo progressivo de colágeno e MEC espessa e disposta de forma desorganizada. Já os estados de sobrecarga volumétrica, determinam hipertrofia excêntrica, que resulta da adição de sarcômeros em série, determinando aumento dos volumes sistólico e diastólico finais. Há diminuição de colágeno e perda de MEC. Na doença chagásica a MEC normal é substituída por outra desestruturada e com aspecto “enfisematoso” entre os miócitos. As figuras 1, 2 e 3 obtidas por microscopia eletrônica ilustram esses aspectos.

Figura 1- Remodelamento miocárdio nas sobrecargas pressóricas



Fonte: Retirado de Spinale (31).

Figura 2- Remodelamento nas sobrecargas de volume

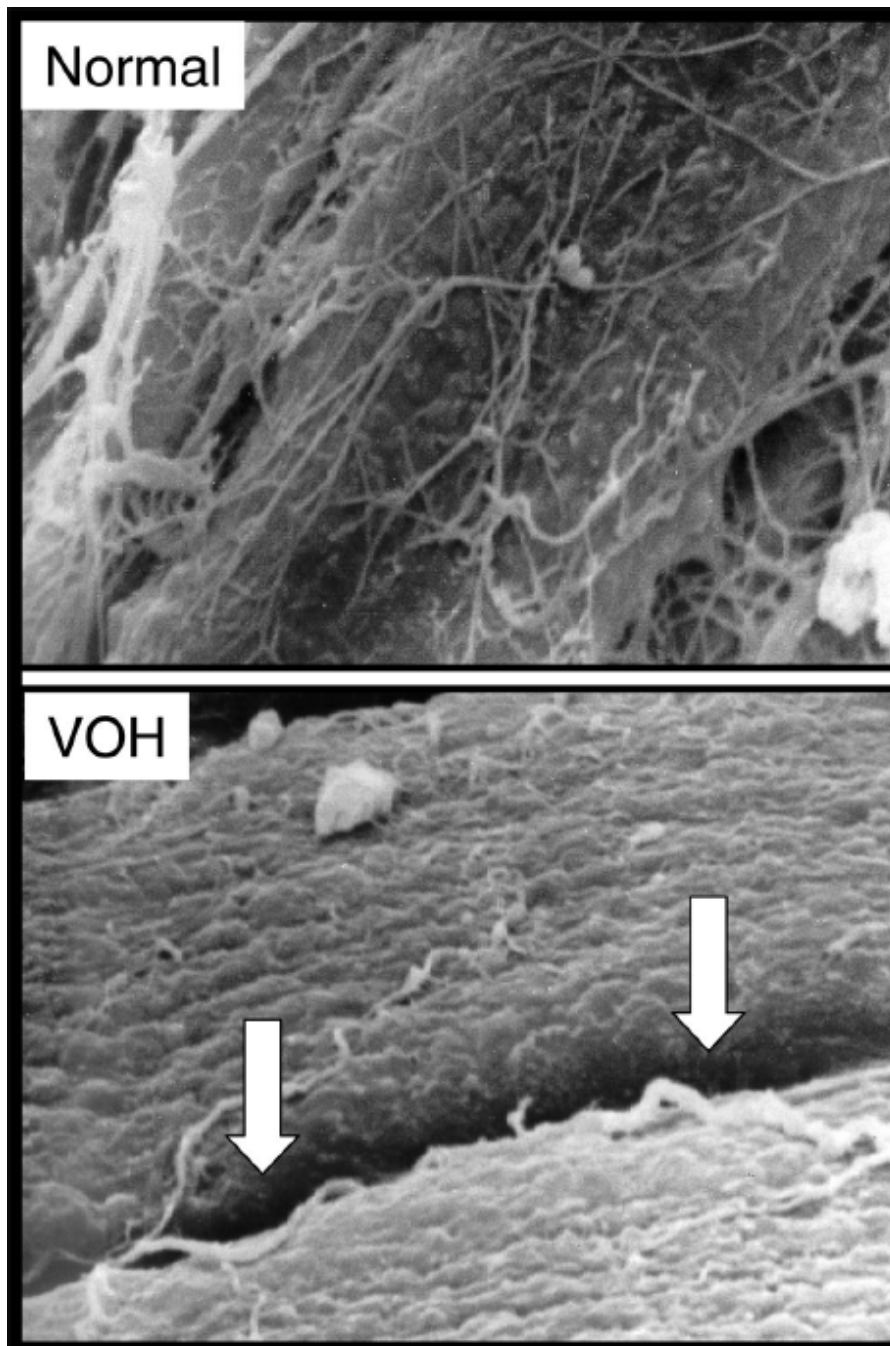
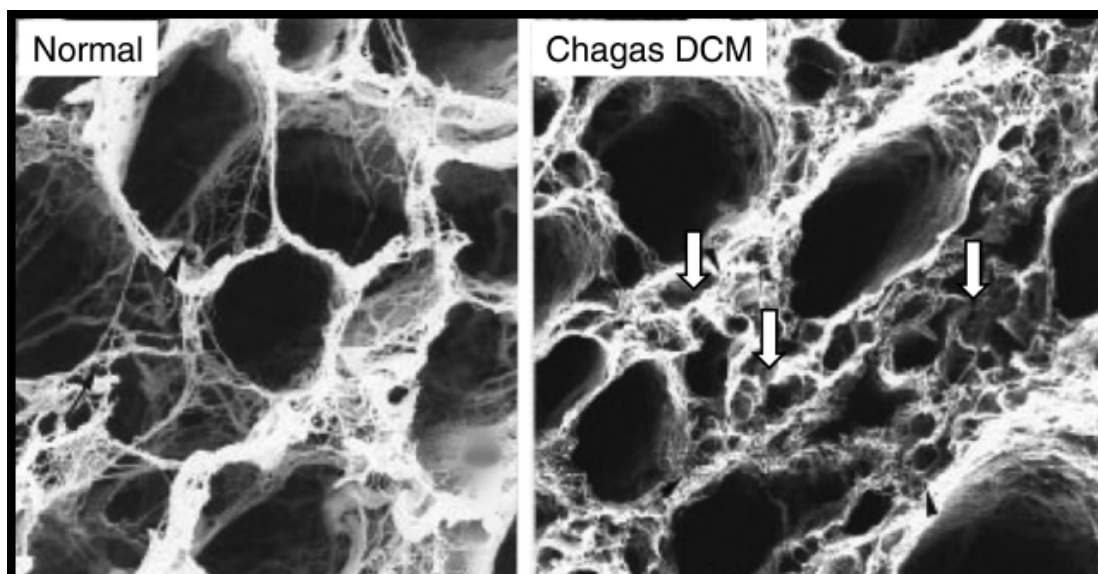


Figura 3- Remodelamento na Doença de Chagas



Fonte: Retirado de Spinale (31).

2.4 Metaloproteinasas de Matriz (MMP)

As MMPs são uma família de proteinases zinco-dependentes que participam da degradação e remodelamento da matriz extracelular (34-36). Estão envolvidas em processos fisiológicos como o desenvolvimento embrionário, a organogênese, a reprodução, a ovulação, a apoptose, a angiogênese, a migração celular, o remodelamento e a reabsorção tecidual (36-37). Também estão associadas a processos patológicos como o crescimento e metastatização de neoplasias malignas, processos inflamatórios sistêmicos e em diversas doenças cardíacas. Esta família de endoproteinases é composta por mais de 25 diferentes enzimas que compartilham

domínios estruturais e características funcionais, mas diferem na especificidade do substrato (38-39). Desta forma, as MMPs são divididas em grupos, quanto ao substrato que degradam, conforme exemplificado na Tabela 2 (35). Porém, todas as MMPs compartilham as seguintes características: (1) degradam componentes da MEC; (2) contêm íon zinco (Zn^{+2}) em seu sítio ativo; (3) necessitam do íon cálcio (Ca^{+2}) para a sua estabilidade; (4) funcionam em pH neutro; e (5) são inibidas por inibidores específicos de metaloproteinases de matriz teciduais (TIMPs)(38-40). Também apresentam quatro domínios distintos: domínios das sequências de peptídeo e propeptídeo, os quais contêm a porção NH_2 - terminal; domínio catalítico que contém a região de ligação do íon Zn^{+2} e é responsável pela atividade proteolítica; e o domínio hemopexina/vitronectina, que está presente em todas as MMPs, exceto na MMP-7, e confere substrato específico (33).

Tabela 2 – Principais MMPs e seus principais substratos

Grupo	Principais substratos da ME
Colagenases	
MMP-1	Colágenos I, II, III, VII e X e agrecan
MMP-8	Colágenos I, II e III
MMP-13	Colágenos I, II, III, VI e X, agrecan, fibronectina e laminina
Gelatinases	
MMP-2	Colágenos I, IV, V, VI, VII, X e XI, fibronectina, laminina e vitronectina
MMP-9	Colágenos I, IV, V, VI, X e XI, elastina, agrecan, fibronectina e vitronectina
Matrilisina	
MMP-7	Colágenos III, IV, IX, X e XI, elastina, fibrina, laminina, fibronectina e vitronectina
Estromelisinases	
MMP-3	Colágenos III, IV, V, VI, IX, X e XI, pró-MMP-1, -3, -7, -9, -13, fibronectina, laminina e proteoglicanos
MMP-10	Colágenos III, IV, V e XI, fibronectina, laminina e proteoglicanos
MMP-11	Colágeno IV, fibronectina e laminina

Fonte: Modificado de Brauer (35).

A maioria das MMPs são constitutivamente expressas e altamente induzíveis, respondendo a muitos fatores, incluindo estiramento mecânico, hormônios, transformações celulares, fatores de crescimento e citocinas (34,36). A maioria desses fatores está presente no miocárdio, particularmente durante a progressão para a IC. Assim, as MMPs podem responder a estímulos do ambiente, de maneira rápida e sustentada, para reorganizar a estrutura e o conteúdo da MEC tecidual (41).

As MMPs são sintetizadas como pró-enzimas e ativadas pela remoção do pró-peptídeo N-terminal (36,42). Este pró-peptídeo parece manter a molécula em estado de latência devido à interação de um resíduo de cisteína com o íon zinco. Quando o pró-peptídeo é clivado, a cisteína para de interagir com o zinco e a enzima fica ativa. Embora este não seja o único mecanismo de ativação, é certamente o mais importante e comum para todas as moléculas desta família. Essa ativação pode ser realizada pelas serino-proteinases, por proteinases plasmáticas como a plasmina, ou por outras MMPs ativadas (40,43).

As mudanças na expressão/ativação das MMPs contribuem para a patogênese de doenças, tais como o enfisema pulmonar, a aterosclerose, os aneurismas vasculares, a IC e o crescimento, invasão e metástase tumoral (44-45). Mais especificamente, na IC de etiologias diversas, a expressão e a atividade das MMPs estão elevadas, sugerindo que o remodelamento da MEC realizado por estas enzimas é uma resposta comum e deliberada do miocárdio ao dano tecidual (41).

A importância da MEC e da atividade das MMPs no desenvolvimento e progressão da IC têm sido demonstrada em modelos experimentais de doença

cardíaca (34). Evidências de uma relação causa e efeito entre as MMPs e o processo de remodelamento do VE foram demonstradas pelo uso de modelos animais de doença arterial crônica, de animais transgênicos e de inibidores endógenos ou farmacológicos de MMPs. No modelo murino de insuficiência do VE, um aumento nos níveis de MMPs no miocárdio, foi acompanhado pela progressão da dilatação e disfunção do VE (42). Outros modelos experimentais indicam que inibidores (endógenos ou farmacológicos) de MMPs e nocaute gênico afetam favoravelmente o remodelamento cardíaco e sugerem o uso de inibição farmacológica como terapia potencial para pacientes em risco para o desenvolvimento de IC (34,46).

2.5 A MMP-1

A MMP-1, também conhecida como colagenase-1, é uma proteinase capaz de degradar colágeno fibrilar insolúvel, especialmente tipo I, II e III (34,47). As alterações do nível sérico ou da atividade da enzima têm sido pesquisadas e associadas com doenças cardiovasculares (34,46,48). A MMP-1 pode prevenir ou retardar a progressão da aterosclerose em camundongos nocauteados para ApoE (48). Porém, a expressão elevada de MMP-1 no coração de camundongos transgênicos pode causar hipertrofia cardíaca, dilatação e disfunção sistólica (46). De forma similar, a rápida progressão da IC em humanos está associada a uma maior expressão gênica da MMP-1. No entanto, um estudo espanhol demonstrou a diminuição do nível sérico de MMP-1 e o aumento proporcional de seu inibidor TIMP-1 em pacientes com IC, em relação aos controles, e entre pacientes com desfecho (morte, readmissão por IC ou

transplante cardíaco) comparados aos indivíduos livres de evento (49). Além disso, tecidos infartados apresentam três a quatro vezes mais RNA mensageiro da MMP-1 quando comparados a tecidos saudáveis, resultando no aumento do nível sérico da MMP-1 após o infarto (50).

2.6 A MMP-3

A MMP-3 ou estromelisina-1 é uma enzima com atividade proteolítica contra um amplo espectro de componentes extracelulares como proteoglicanos, fibronectinas, lamininas, vitronectina e alguns tipos de colágeno (38,44). De forma muito similar à MMP-1, a alteração do nível sérico ou da atividade da MMP-3 tem sido amplamente estudada e associada com doenças cardiovasculares (45,51,52). Alguns estudos destacam o envolvimento da MMP-3 na estabilidade da placa aterosclerótica, no remodelamento cardíaco e na ativação de outras MMPs, incluindo a MMP-1 (40,42,53). Camundongos com deficiência de apolipoproteína E (ApoE) e MMP-3 desenvolvem aterosclerose avançada na aorta (52). Estudos com humanos demonstraram níveis elevados da MMP-3 no miocárdio com doença cardíaca estrutural e na IC de etiologia não-isquêmica(42,54).

2.7 A MMP-9

A MMP-9 também é conhecida por gelatinase B e possui a capacidade de degradar diversos tipos de proteínas intersticiais como fibronectina, colágeno tipo I, IV e V (55). A MMP-9 tem sido foco de estudos em relação ao seu papel sobre o

remodelamento cardíaco. Em um estudo utilizando pacientes da coorte de Framingham (56), níveis séricos de MMP-9 foram associados a aumento do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, bem como de suas espessuras parietais. Diversos estudos também têm demonstrado correlação entre os níveis de MMP-9 no período pós-infarto agudo com mediadores neurohumorais e marcadores ecocardiográficos de remodelamento cardíaco (57-59). Em recente trabalho de Dini e colaboradores (60), em pacientes com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, níveis elevados de MMP-9 sérica foram superiores aos níveis de BNP em determinar sobrevida e ocorrência de eventos cardíacos. A MMP-9 também parece exercer papel importante em preservar a integridade miocárdica em miocardites virais por Cocksakie conforme estudo em modelo animal (61). Na área de neurologia, a MMP-9 tem sido investigada como possível fator de risco para acidente vascular cerebral. Em trabalho recente, Eldrup e colaboradores, demonstraram que indivíduos com níveis elevados de MMP-9 e estenose carotídea superior a 50% apresentam risco dobrado para acidente vascular cerebral e morte cardiovascular (62).

2.8 Os polimorfismos nos genes das MMPs

Foram identificados vários polimorfismos nos genes das MMP-1 e -3 no cromossomo 11q21-23 e da MMP-9 no cromossomo 20q11-13, que afetam a região promotora e podem influenciar em etapas críticas da ligação de fatores de transcrição ou na eficiência transcricional como um todo, resultando em uma expressão diferencial de MMPs em diferentes indivíduos (37, 45, 54). Diversos estudos

demonstraram evidências clínicas da associação entre polimorfismos genéticos, níveis plasmáticos das MMPs e desfechos cardiovasculares (52,63-65).

Um dos polimorfismos descritos no gene da MMP-1 ocorre na posição –1607 (1G/2G) e altera a expressão gênica, sendo que o alelo 2G está associado à maior atividade transcricional, que pode chegar a ser 20 vezes maior do que o alelo 1G (46,48). O alelo 2G está associado com estenose coronariana e maior remodelamento pós-infarto agudo do miocárdio (IAM). Da mesma forma, o genótipo 2G2G foi associado ao aumento de risco para doença carotídea (66,67).

O polimorfismo 5A/6A na posição –1171 no gene da MMP-3 também afeta a expressão gênica, sendo que o alelo 5A é descrito como o de maior atividade transcricional (68,69). Esse aumento na atividade foi demonstrado por ensaios *in vitro*, onde células transfectadas com o gene contendo o alelo 5A apresentaram duas a quatro vezes mais expressão do que as células com o alelo 6A (70). Além disso, há evidências *in vivo*, em humanos, que confirmam que o alelo 5A tem maior atividade e nível sérico (51,63).

O alelo 5A tem sido associado com diversas doenças cardiovasculares, tais como miocardiopatia dilatada idiopática, infarto agudo do miocárdio, ruptura da placa aterosclerótica e formação de aneurismas (39,45). O alelo 6A, que tem menor expressão, está associado com a susceptibilidade à estenose da carótida interna, desenvolvimento de aterosclerose e progressão para doença arterial coronariana (45,51,66). Interessante trabalho de Liu e colaboradores (63) demonstrou que o alelo 5A foi associado com maior atividade plasmática da MMP-3, susceptibilidade,

gravidade e complexidade da doença aterosclerótica coronariana em pacientes com síndrome coronariana aguda. Esse estudo também demonstrou que os portadores do alelo 5A apresentam risco dobrado para infarto agudo do miocárdio e um efeito sinérgico entre o hábito de fumar, o genótipo e a ocorrência de síndrome coronariana aguda, pois fumantes carreadores do alelo 5A apresentaram vinte vezes mais risco (63).

Os genes das MMP-1 e -3 estão em regiões muito próximas no cromossomo 11; por isso, alguns trabalhos estudaram a combinação de seus genótipos com doenças cardiovasculares. Um estudo demonstrou que pacientes homocigotos para os alelos 6A e 2G apresentavam elevado risco para estenose carotídea (66). Da mesma forma, o haplótipo 5A/1G estava associado com doença arterial coronariana (69,71).

Apesar de inúmeras evidências envolvendo polimorfismos genéticos de MMPs com doenças cardiovasculares, são escassos os estudos que avaliaram o seu papel no contexto da IC. Mizon-Gérard e colaboradores (54) estudaram o papel de polimorfismos genéticos nos genes da MMP-2, MMP-3 e MMP-9 no prognóstico de pacientes caucasianos com IC por disfunção sistólica. Estes investigadores observaram que o polimorfismo da MMP-3 tem efeito diferencial na sobrevivência dos pacientes com IC. A análise demonstrou que o genótipo 5A5A foi um preditor independente de mortalidade cardíaca apenas em pacientes não-isquêmicos (54). Também demonstrou que os carreadores do alelo T da MMP-9 apresentaram maior mortalidade (54). Tang e colaboradores (39), em estudo de caso controle, avaliaram o

papel de polimorfismos genéticos de MMPs (-1607 1G/2G no gene da MMP-1, -1171 5A/6A no gene da MMP-3 e -1562C>T no gene da MMP-9) no risco de desenvolver IC (cardiomiopatia dilatada idiopática) na população chinesa. Nos pacientes chineses com cardiomiopatia dilatada idiopática encontraram que o polimorfismo da MMP-3 está associado à susceptibilidade à IC. O alelo 5A do gene da MMP-3 foi mais freqüente nos pacientes do que nos controles, e o genótipo 5A6A, quando comparado ao genótipo 6A6A, aumentou significativamente o risco para o desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada idiopática (RR= 2.7, intervalo de confiança 95%= 1.45 a 5.1). No entanto, o polimorfismo da MMP-1 não demonstrou estar associado com a susceptibilidade à cardiomiopatia dilatada idiopática neste estudo (39).

O polimorfismo T/C na posição -1562 no gene da MMP-9 afeta a transcrição gênica sendo o alelo T o de maior atividade transcricional. A presença do alelo T parece estar relacionado à doença aterosclerótica coronariana, mas os dados não são consensuais (72,73). A presença do alelo T em estudo com indivíduos que tiveram um IAM determina maiores níveis de MMP-9 e está correlacionado a maior risco de IAM (74). Recente trabalho também levantou a hipótese de que o alelo T poderia ser um fator de risco para fibrilação atrial em indivíduos hipertensos (75).

3. Justificativa do Estudo

A IC é o estágio final de diversas doenças cardíacas e apresenta alta taxa de morbi-mortalidade. O componente central para a progressão da IC é a disfunção ventricular, a qual está relacionada às alterações na geometria ventricular, processo

conhecido como remodelamento ventricular. Esse processo determina progressiva dilatação do ventrículo esquerdo e está relacionado a aumento da morbi-mortalidade dos pacientes com IC. A matriz extracelular do miocárdio contribui para manutenção da geometria do miocárdio e o alinhamento dos cardiomiócitos. As metaloproteinases de matriz são uma família de enzimas endógenas que têm a função de degradar a matriz extracelular. Diversos estudos têm demonstrado que as MMP-1,-2,-3 e -9 estão relacionadas com o processo de remodelamento cardíaco, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral. Os polimorfismos das metaloproteinases de matriz influenciam a atividade transcricional dos genes determinando diferentes níveis de atividade das MMPs em relação à degradação da matriz extracelular, o que pode resultar, em última instância, em processo de remodelamento distintos, influenciando o prognóstico dos pacientes com IC.

Esse trabalho tem como objetivos avaliar a influência dos polimorfismos de metaloproteinases de matriz sobre suscetibilidade da doença, caracterização fenotípica e prognóstico numa coorte brasileira de pacientes com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo.

4. Objetivos

Objetivo principal

1. Determinar se os polimorfismos das MMP-1, -3 e -9 apresentam relação com mortalidade por IC em indivíduos com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo de grau moderado a grave.

Objetivos secundários

1. Determinar se os polimorfismos das MMP-1, -3 e -9 estão relacionados a suscetibilidade a IC.
2. Determinar se os polimorfismos das MMP-1, -3 e -9 estão relacionados a características fenotípicas da IC.

5. Referências

- (1) Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW. 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). *J Am Coll Cardiol* 2005;46:e1-82.
- (2) Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med* 2003;348:2007-18.
- (3) Schocken DD, Arrieta MI, Leaverton PE, Ross EA. Prevalence and mortality rate of congestive heart failure in the United States. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:301-306.
- (4) Haldeman GA, Croft JB, Giles WH, Rashidee A. Hospitalization of patients with heart failure: National Hospital Discharge Survey, 1985 to 1995. *Am Heart J* 1999;137:352-60.
- (5) Packer M, Coats AJS, Fowler MB, Katus HA, Mohapsi P, Rouleau JL, et.al. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001;344:1651-8.
- (6) Cleland JG, Daubert JC, Freemantle N, Gras D, Kappenberger L, Tavazzi L. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *N Eng J Med* 2005;352:1539-1549.
- (7) Bardy GH, Lee KL, Mark DB, Packer DI, Boineau R, Domanski M, et al. Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *N Eng J Med* 2005;352:225-237.

(8) American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics. 2009 Update. Dallas, Texas: American Heart Association;2009.

(9) <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miuf.def> Acesso em 15 de janeiro de 2010.

(10) Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Ayub-Ferreira SM, Rohde LE, Oliveira WA, Almeida DR, e cols. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. Arq Bras Cardiol.2009;93(1 supl.1):1-71.

(11) Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW. 2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation. J Am Coll Cardiol 2009;53:e1-e90.

(12) Levy WC, Mozaffarian D, Linker DR, et al. The Seattle Heart Failure Model: prediction of survival in heart failure. Circulation 2006;113:1424-33.

(13) Cohn, JN, Ferrari, R, Sharpe, N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol 2000; 35:569.

- (14) Dorn GW, 2nd, Robbins, J, Sugden, PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res* 2003; 92:1171.
- (15) The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Eng J Med* 1987;316:1429-35.
- (16) Packer M, Fowler MB, Roecker EB, et al. Effect of Cravedilol on Morbidity of Patients with severe Heart Failure: Results of the Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) study. *Circulation* 2002;106:2194-2199.
- (17) Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et. al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality inpatients with severe heart failure. *N Eng J Med* 1999;341:709-717.
- (18) Pitt B, Remme WJ, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B. Esplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Eng J Med* 2003;348:1309-1321.
- (19) Cohn JN, Archibald DG, Ziesche S, et.al. Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Eng J Med* 1986;314:1547-1552.
- (20) Taylor AL, Ziesche RN, Yancy C, et.al. Combination of isossorbide dinitrate and hydralazine in blacks with heart failure. *N Eng J Med* 2004;351:2049-2057.
- (21) Goldstein RE, Bocuzzi SJ, Cruess D, Nattel S, the Adverse Experience Committee and the Multicenter Diltiazem Postinfarction Reseach Group. Diltiazem increases late-onset congestive heart failure in postinfarction patients early reduction in ejection fractio. *Circulation* 1991;83:52-60.

- (22) Mebazaa A, Nieminen MS, Packer M, Cohen-Solal A, Kleber FX, Pocock SJ, et al. Levosimendan vs dobutamine for patients with acute decompensated heart failure. *JAMA*. 2007;297:1883-1891.
- (23) Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitations of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES). *Circulation*;102:2700-6.
- (24) Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *NEJM* 2008;358:2148-59.
- (25) Latini R, Masson S, Anand I, et al. The comparative prognostic value of plasma neurohormones at baseline in patients with heart failure enrolled in Val-HeFT. *Eur Heart J* 2004;25:292-299.
- (26) Anand IS, Latini R, Florea VG, et al. C-reactive protein in heart failure: prognostic value and the effect of valsartan. *Circulation* 2005;112:1428-34.
- (27) Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990;323:236-41.
- (28) Seta Y, Shan K, Bozkurt B, Oral H, Mann DL. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *J Card Fail* 1996;2:243-9.
- (29) Tang WH, Brennan ML, Philip K, et al. Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2006;98:796-9.
- (30) Kameda K, Matsunaga T, Abe N, et al. Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 2003;24:2180-5.

- (31) Spinale FG Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: Influence in cardiac form and function *Physiol Rev* 2007;87:1285-1342.
- (32) Cicoira M, Rossi A, Bonapance S, et al. Independent and additional prognostic value of aminoteminal propeptide of type III procollagen circulating levels in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 2004;10:403-11.
- (33) Chareonthitawee P, Christian TF, Hirose K, Gibbons RJ, Rumberger JA. Relation of initial infarct size to extend left ventricular remodeling in the year after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1995;25:567-73.
- (34) D' Armiento J. Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction. *TCM* 2002;12:97–101.
- (35) Brauer PR. MMPs - Role in cardiovascular development and disease. *Front Biosci* 2006;11:447-478.
- (36) Nagase H, Woessner J. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491–21494.
- (37) Spinale FG. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms in heart failure: new pieces to the myocardial matrix puzzle. *Eur Heart J* 2004;25:631–633.
- (38) Creemers E, Cleutjens J, Smits J, Daemen M. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction. A new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001;89:201–210.
- (39) Tang L, Chen X, Zhu M, Jiang JJ, Lu XB, Du YX, et al. Matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 gene polymorphisms and the risk of idiopathic dilated cardiomyopathy in Chinese Han population. *Clin Biochem* 2007;40:1427-1430.

- (40) Rutschow S, Li J, Schultheiss HP, Pauschinger M. Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease. *Cardiovasc Res* 2006;69:646–656.
- (41) Fedak PWM, Verma S, Weisel RD, Li R. Cardiac remodeling and failure: From molecules to man (Part II). *Cardiovasc Pathol* 2005;14:49-60.
- (42) Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002;90:520–530.
- (43) Pasotti M, Repetto A, Tavazzi L, Arbustini E. Genetic predisposition to heart failure. *Med Clin N Am* 2004;88:1173–1192.
- (44) Hijova E. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl Lek Listy* 2005;3:127–132.
- (45) Ye S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovasc Res* 2006;69:636–645.
- (46) Lee RT. Matrix metalloproteinase inhibition and the prevention of heart failure. *TCM* 2001;11:202–205.
- (47) Dunleavey L, Beyzade S, Ye S. Rapid genotype analysis of the matrix metalloproteinase-1 gene 1G 2G polymorphism that is associated with risk of cancer. *Matrix Biol* 2000;19:175–177.
- (48) Ye S, Gale CR, Martyn N. Variation in the matrix metalloproteinase-1 gene and risk of coronary heart disease. *Eur Heart J* 2003;24:1668-1671.
- (49) Jordán A, Roldán V, García M, Monmeneu J, Burgos FG, Lip GYH, et al. Matrix metalloproteinase-1 and its inhibitor, TIMP-1, in systolic heart failure: relation to functional data and prognosis. *J Intern Med* 2007;262:385-392.

(50) Tyagi SC, Kumar SG, Haas SJ, Reddy HK, Voelker DJ, Hayden MR, et al. Post-transcriptional regulation of extracellular matrix metalloproteinase in human heart end-stage failure secondary to ischemic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:1415-1428.

(51) Zhu C, Odeberg J, Hamsten A, Eriksson P. Allele-specific MMP-3 transcription under in vivo conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348:1150-1156.

(52) Silence J, Lupu F, Collen D, Lijnen HR. Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1 (MMP-3) gene inactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1440-1445.

(53) White AJ, Duffy SJ, Walton AS, Ng JF, Rice GE, Mukherjee S, et al. Matrix metalloproteinase-3 and coronary remodelling: implications for unstable coronary disease. *Cardiovasc Res* 2007;75:813–820.

(54) Mizon-Gerard F, Groote P, Lamblin N, Hermant X, Dallongeville J, Amouyel P, et al. Prognostic impact of matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with heart failure according to the aetiology of left ventricular systolic dysfunction. *Eur Heart J* 2004;25:688–693.

(55) Spinale FG, Coker ML, Heung L, et al. A Matrix Metalloproteinase Induction/Activation System Exists in the Human Left Ventricular Myocardium and Is Upregulated in Heart Failure. *Circulation* 2000;102:1944-1949.

(56) Sundström J, Evans JC, Benjamin EJ, et al. Relations of the Plasma Matrix Metalloproteinase-9 to Clinical Cardiovascular Risk Factors and Echocardiographic

Left Ventricular Measures. The Framingham Heart Study. *Circulation* 2004;109:2850-2856.

(57) Squire IB, Evans J, Ng LL, Loftus IM, Thompson MM. Plasma MMP-9 and MMP-2 Following Acute Myocardial Infarction in Man: Correlation with Echocardiographic and Neurohumoral Parameters of Left Ventricular Dysfunction. *J Card Fail* 2004;10:328-333.

(58) Kelly D, Cockerill G, NG LL, Thompson M, Khan S, Samani NJ, Squire IB. Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodelling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study. *Eur Heart J* 2007;28:711-718.

(59) Kelly D, Khan S, Thompson M, Cockerill G, Ng LL, Samani S, Squire IB. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9: novel indicators of left ventricular remodeling and prognosis after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2008;29:2116-2124.

(60) Dini FL, Buralli S, bajraktari G, et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 better predicts outcome than N-terminal protype-B natriuretic peptide in patients with systolic heart failure and high prevalence of coronary artery disease. *Biomedicine & Phamacotherapy* 2009;article in press.

(61) Cheung C, Marchant D, Walker EK, et al. Ablation of Matrix Metalloproteinase-9 Increases Severity of Viral Myocarditis in Mice. *Circulation* 2008;117:1574-1582.

(62) Eldrup N, Gronholdt MM, Sillesen H, Nordestgaard BG. Elevated Matrix Metalloproteinase-9 Associated With Stroke or Cardiovascular Death in Patients With Carotid Stenosis. 2006 *Circulation*;114;1847-1854.

- (63) Liu PY, Li YH, Chan SH, Lin LJ, Wu HL, Shi GY, et al. Genotype-phenotype association of matrix metalloproteinase-3 polymorphism and its synergistic effect with smoking on the occurrence of acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2006;98:1012–1017.
- (64) Abilleira S, Bevan S, Markus HS. The role of genetic variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis. *J Med Genet* 2006;43:897–901.
- (65) Nanni S, Melandri G, Hanemaaijer R, Cervi V, Tomasi L, Altimari A, et al. Matrix metalloproteinases in premature coronary atherosclerosis: influence of inhibitors, inflammation, and genetic polymorphisms. *Transl Res* 2007;149:137-144.
- (66) Ghilardi G, Biondi ML, DeMonti M, Turri O, Guagnellini E, Scorza R. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-3 gene promoter polymorphisms are associated with carotid artery stenosis. *Stroke* 2002;33:2408-2412.
- (67) Martin TN, Penney DE, Smith JA, Groenning BA, Dargie HJ, Hillis GS. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphisms and changes in left ventricular volume following acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004;94:1044–1046.
- (68) Dunleavey L, Beyzade S, Ye S. Rapid genotype analysis of the stromelysin gene 5A/6A polymorphism. *Atherosclerosis* 2000;151:587–589.
- (69) Horne BD, Camp NJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, Kolek MJ, Nicholas ZP, et al. Multiple-polymorphism associations of 7 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor metalloproteinase genes with myocardial infarction and angiographic coronary artery disease. *Am Heart J* 2007;154:751–758.

(70) Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem* 1996;271:13055–13060.

(71) Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, et al. Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Int J Cardiol* 2003;92:181-186.

(72) Zhang B, Ye Shu, Herrmann SM, et al. Functional Polymorphism in the Regulatory Region of Gelatinase B Gene in Relation to Severity of Coronary Atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1788-1794.

(73) Zhi H, Wang H, Ren L, et al. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 and risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Mol Biol Rep* 2010;37:13-20.

(74) Koh YS, Chang K, Kim PJ, et al. A close relationship between functional polymorphism in the promoter region of matrix metalloproteinase-9 and acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2008;127:430-432.

(75) Gai X, Lan X, Wang F, et al. Association of MMP-9 polymorphisms with atrial fibrillation in hypertensive heart disease patients. *Clin Chim Acta* 2009;408:105-109.

Papel dos Polimorfismos das Metaloproteinases de Matriz na Insuficiência Cardíaca Sistólica na Suscetibilidade à Doença, nas Características Fenotípicas e no Prognóstico

Título Resumido: Polimorfismos das MMPs e Insuficiência Cardíaca

Fábio M. Velho*, Carolina R. Cohen*, Kátia G. Santos, Daiane Silvello, Nidiane Martinelli,

Andréia Biolo, Nadine Clausell, Luis E. Rohde

* ambos os autores contribuíram igualmente na elaboração deste artigo

Departamento de Insuficiência Cardíaca e Unidade de Transplante Cardíaco, Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Programa de Pós-Graduação em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. Dra. Kátia G Santos é Professora Associada do Centro de Pesquisas em Ciências Médicas da Universidade Luterana do Brasil

Projeto parcialmente financiado pelo *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* e *Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE-HCPA)*.

Endereço para correspondência:

Dr. Luis E. Rohde

Departamento de Insuficiência Cardíaca e Transplante Cardíaco

Serviço de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Sala 2061

Porto Alegre, RS, Brasil 90035-003

Fone/Fax 55 51 21018344

RESUMO

Objetivos: O papel funcional dos polimorfismos das metaloproteinases de matriz (MMPs) sobre a suscetibilidade a insuficiência cardíaca (IC), características fenotípicas e prognóstico têm sido pouco estudados.

Métodos: Foram estudados 313 com IC sistólica e 367 indivíduos saudáveis que serviram de grupo controle. O processo de genotipagem dos polimorfismos das MMP-1 (-1607 1G/2G), MMP-3 (-1171 5A/6A) e MMP-9 (-1562 C/T) foi realizado utilizando-se o método de PCR-RFLP (reação em cadeia de polimerase). Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier e modelos de regressão de Cox foram construídos para avaliar mortalidade relacionada a insuficiência cardíaca.

Resultados As frequências alélicas e genotípicas das MMP-1, MMP-3 e MMP-9 foram semelhantes em pacientes com IC e nos controles, porém o genótipo 1G/1G da MMP-1 foi significativamente menos freqüente ($p = 0,03$) em análise restrita a pacientes com IC de etiologia isquêmica. Carreadores do alelo 2G da MMP1 foram associados à etiologia isquêmica, história de infarto agudo do miocárdio e procedimentos de revascularização miocárdica (todos os valores de $p < 0,05$). Os pacientes foram acompanhados em média por 37 meses (variação interquartil de 16 a 62 meses) e ocorreram 58 mortes relacionadas a IC. Sobrevida relacionada à IC foi significativamente melhor nos pacientes carreadores do alelo 2G da MMP1 (73% versus 44% para pacientes 1G/1G, $p=0,003$) e nos carreadores do alelo 6A da MMP-3 (71% versus 61% para pacientes 5A/5A, $p=0,05$), particularmente em pacientes de etiologia não isquêmica ($p=0,03$). Os portadores do genótipo 1G1G da MMP1 foram independentemente associados à

mortalidade por IC depois de ajustados para vários preditores de risco (RR 2,1, IC 95% 1,2-3,6; p=0,01)

Conclusões Os polimorfismos das MMP-1, MMP-3 e MM-9 não foram associados a suscetibilidade a IC. Os carreadores do polimorfismo MMP-1 (-1607 1G/2G) tiveram maior prevalência de IC de etiologia isquêmica e melhor prognóstico.

INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) representa a fase final de diversas doenças cardíacas e permanece como grande causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo.¹ Estudos clínicos e experimentais demonstraram que o remodelamento e dilatação do ventrículo esquerdo (VE) ocorre durante a progressão da falência do VE determinando o estágio final da doença e IC refratária.² A reestruturação da matriz de colágeno tem papel principal no processo adaptativo do miocárdio doente e na transição para a descompensação cardíaca.³ As metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs), uma família de enzimas endógenas zinco dependentes, têm sido identificadas com peças chaves nesse processo. Colagenases (MMP-1), gelatinases (MMP-2 e MMP-9) e estromelinas (MMP-3) atuam no remodelamento da matriz em diferentes estágios do desenvolvimento e progressão da IC.^{4,5,6}

Os polimorfismos genéticos das MMPs influenciam substancialmente a eficiência transcricional do gene determinando expressão gênica heterogênea.^{7,8} Uma variante comum da região promotora do gene da MMP-1 na qual um (1G) ou dois (2G) nucleotídeos da guanina foi descrito na posição -1607 e se refere ao local de início do processo transcricional desse gene.⁹ Foi demonstrado que o alelo promotor 2G do gene da MMP-1 apresenta atividade

transcricional 20 vezes mais intenso que o alelo promotor 1G. A presença do alelo 2G esteve associado com aumento do risco de doença arterial coronariana (DAC)¹⁰, estenose carotídea¹¹ e aumento do remodelamento do VE após infarto agudo do miocárdio (IAM).¹² Um polimorfismo comum na posição -1171 na região promotora da MMP-3 (um alelo apresenta seis adeninas em sequência [6A] e o outro alelo cinco[5A]) também já foi descrito).⁹ Ensaios de transfecção demonstraram que o gene promotor da MMP-3 que contém o alelo 5A apresenta duas a quatro vezes mais atividade transcricional do que o alelo 6A.⁷ Estudos iniciais sugeriram que o alelo 5A está associado a aumento do risco de miocardiopatia dilatada¹³ e possivelmente apresenta impacto no prognóstico da IC.¹⁴ Finalmente a presença do alelo T do polimorfismo da posição -1562 da MMP-9 tem sido associado ao aumento da atividade promotora e a DAC de maior gravidade.¹⁵

No presente estudo, hipotetizamos que a variabilidade geneticamente mediada das MMPs está relacionada à suscetibilidade a doença, a sua caracterização fenotípica e ao prognóstico em pacientes brasileiros com IC. Avaliamos estas hipóteses através da análise dos polimorfismos acima citados numa coorte de pacientes ambulatoriais portadores de IC com disfunção sistólica do VE de grau moderado a grave.

MÉTODOS

Pacientes. Incluímos 312 pacientes consecutivos, maiores de 18 anos, com IC e disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (fração de ejeção inferior a 45%). Pacientes portadores de doenças graves ou com expectativa de vida reduzida foram excluídos. Os pacientes foram recrutados consecutivamente entre julho de 2003 e novembro de 2007 do ambulatório de

Insuficiência Cardíaca e Transplante de um hospital universitário e terciário localizado na cidade de Porto Alegre, Brasil. Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e laboratorial através de questionário padrão, exame físico, avaliação de parâmetros ecocardiográficos e testes laboratoriais. Os pacientes portadores de IC foram seguidos ambulatorialmente na instituição tendo seu estado vital monitorado através de prontuário eletrônico, contato telefônico e através do banco de dados regional de certidão de óbitos. O desfecho primário foi morte relacionada à IC, definida como morte súbita inesperada (dentro da primeira hora do início dos sintomas) ou causada por doença refratária avançada.

Também foram avaliados 367 indivíduos aparentemente saudáveis, doadores do Centro de Hemoterapia do mesmo hospital, os quais não apresentavam história própria ou familiar de morte súbita prematura ou doença cardiovascular. O protocolo do estudo foi aprovado pelo comitê institucional local e pela Agência Nacional de Ética em Pesquisa de acordo com os princípios contidos na Declaração de Helsinque. Todos os indivíduos assinaram o consentimento informado antes de entrar no estudo.

Genotipagem. O DNA genômico foi extraído de sangue periférico de acordo com método não enzimático previamente descrito.¹⁶ A metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada com a finalidade de amplificar os fragmentos que contém os polimorfismos da MMP-1 1G/2G, MMP-3 5A/6A e MMP-9 C/T, utilizando-se *primers* e condições previamente descritas por Dunleavy e colaboradores^{8,17} e Zhang e colaboradores¹⁸ respectivamente. Os produtos da PCR foram submetidos a processo digestivo utilizando-se endonucleases de restrição *XmnI* ou *PaeI* de acordo com as instruções do fabricante (MBI Fermentas, St. Leon-

Rot, Germany). Os fragmentos digeridos foram separados por gel de eletroforese de poliacrilamida a 8% e visualizados com nitrato de prata corado (polimorfismo da MMP-1 e MMP-3) ou gel de agarose a 2% e visualizados com brometo de etídio sob luz ultravioleta (polimorfismo MMP-9).

Análise Estatística. Os dados foram apresentados através de suas médias \pm desvio padrão ou através de número absoluto e percentuais. As variáveis contínuas foram comparadas através do teste *t* de Student ou teste *U* de Mann-Whitney e as variáveis categóricas através do teste do qui quadrado ou Exato de Fisher, quando apropriado. O teste do qui-quadrado também foi utilizado para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e para comparar as frequências alélicas e genotípicas dos pacientes caso e controle. As frequências dos haplótipos foram estimadas pelo método Baiesiano utilizando o software PHASE versão 2.1^{19,20}. O desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos genéticos da MMP-1 e MMP-3 foram calculados e expressos em *D'* e *r*².²¹ Análise de regressão logística foi utilizada para avaliar a associação independente da MMP-1 como preditor de etiologia isquêmica. As curvas de sobrevida de Kaplan-Meier foram construídas a partir do início do acompanhamento ambulatorial do paciente até o último registro médico ou morte e comparada através da estatística de log-rank. Modelos proporcionais de Cox foram criados e ajustados para outras variáveis que influenciariam a mortalidade relacionada à IC. Todos os dados foram analisados utilizando-se os softwares SPSS para Windows versão 16.0 ou SAS 9.0 para Windows. O valor de *p* < 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Pacientes e Controles. Os pacientes com IC alocados para este estudo eram predominantemente do sexo masculino (69%), caucasianos (70%), com idade média de 60 ± 13 anos, apresentavam disfunção sistólica do ventrículo esquerdo de grau moderado a grave e classe funcional (NYHA) I ou II (78%). A etiologia da IC era isquêmica em 115 (38%) pacientes e idiopática em 91 (30%) pacientes. A maioria dos pacientes utilizava inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) (90%) e beta-bloqueadores (88%). A maioria dos indivíduos do grupo controle era do sexo masculino (70%), caucasiano (77%), com idade média de 45 ± 12 anos e eram significativamente mais jovens que os pacientes portadores de IC ($p=0,001$).

Suscetibilidade a Doença. As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos das MMP-1, -3 e -9 dos pacientes portadores de IC e saudáveis estão descritas na Tabela 1. As frequências genotípicas observadas estiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos casos, controles e em toda amostra estudada para todos os polimorfismos analisados. As frequências alélicas e genotípicas foram semelhantes nos indivíduos aparentemente saudáveis do grupo caso e no grupo controle, independentemente da etiologia da IC (isquêmicos versus não isquêmicos). Entretanto, nós observamos menor prevalência do genótipo 1G1G (polimorfismo da MMP-1) em pacientes isquêmicos quando comparados aos controles (14% versus 25%; $p=0,03$).

Como os genes das MMP-1 e -3 genes estão agrupados no mesmo cromossomo (11q22.3), foi realizada análise de haplótipos e suas frequências foram estimadas. Os polimorfismos se encontravam em pobre desequilíbrio de ligação em ambos os grupos ($D'=0.53$; $r^2=0.21$ para os casos e $D'=0.56$; $r^2=0.22$ para os controles). As frequências dos

haplótipos 1G/6A, 1G/5A, 2G/6A e 2G/5A nos pacientes (0,18, 0,31, 0,42 e 0,09, respectivamente) foram semelhantes às encontradas nos controles (0,17, 0,30, 0,43 e 0,10, respectivamente) ($p= 0,72$),

Caracterização Fenotípica. As características clínicas e demográficas dos pacientes de acordo com os genótipos das MMP-1, -3 e -9 estão apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente. Etiologia isquêmica, infarto do miocárdio prévio, disfunção regional do VE e hipercolesterolemia foram significativamente mais frequentes nos pacientes com IC carreadores do alelo da MMP-1 2G ($n = 244$) (todos os valores de $p < 0,05$). O genótipo 1G1G também foi associado a complexos QRS mais alargados ao eletrocardiograma de superfície (Tabela 2). Os polimorfismos da MMP-3 (-1171 5A/6A) não foram significativamente associados aos aspectos clínicos tradicionais da IC, como demonstrado na Tabela 3. Entretanto, os carreadores do alelo 5A da MMP-3 ($n = 197$) tiveram diminuição da variabilidade da frequência cardíaca, aumento das dimensões do VE e maior duração do complexo QRS. Finalmente, nós não observamos associações significantes entre os polimorfismos da MMP-9 (-1562 C/T) com as características clínicas da IC, exceto para duração mais longa do complexo QRS nos pacientes homocigotos para CC ($n = 250$) (Tabela 4).

Como o alelo 2G da MMP-1 foi associado à IC de etiologia isquêmica, análise de regressão logística múltipla foi realizada para avaliar outros preditores potenciais de IC de etiologia isquêmica em nossa coorte (Tabela 5; modelo ajustado para idade, gênero, hipercolesterolemia, pressão arterial, diabete mérito, doença pulmonar obstrutiva crônica, alcoolismo, creatinina, glicemia e sódio séricos). Nossos dados sugerem que o alelo 2G

(polimorfismo da MMP-1) seja preditor independente de IC de etiologia isquêmica (RR ajustado 2,14, intervalo de confiança (IC) 95% 1,1–4,15, $p = 0,024$).

Seguimento e Prognóstico. Os dados clínicos de seguimento foram obtidos de todos os pacientes recrutados. Durante o seguimento médio de 76 meses, houve 58 mortes relacionadas à IC e 38 mortes de outras causas. As Figuras 1, 2 e 3 representam respectivamente as curvas de sobrevida de Kaplan-Meier de acordo com os genótipos das MMP-1, MMP-3 e MMP-9 (painel A para todos os pacientes, painel B para etiologia não isquêmica e painel C para etiologia isquêmica). A sobrevida relacionada à IC foi, ao longo do tempo, melhor nos portadores do alelo 2G da MMP-1 2G (valor do log-rank de $p = 0,003$). A análise estratificada por etiologia demonstrou perfil de sobrevida semelhante nos pacientes não isquêmicos (Figura 1B), embora nós tenhamos observado uma tendência estatística nos pacientes de etiologia isquêmica (valor do log rank de $p = 0,08$; Figura 1C). Os portadores do alelo 6A da MMP-3 apresentaram, também, melhor prognóstico relacionado à IC, particularmente no grupo não isquêmico (valor do log rank de $p = 0,03$; Figura 2B). O polimorfismo da MMP-9 não teve impacto na sobrevida relacionada à IC independentemente da etiologia (Figura 3).

Modelos proporcionais de Cox foram criados para avaliar preditores relacionados à morte por IC. O genótipo 1G/1G do gene da MMP-1 foi associado independentemente à mortalidade por IC depois de ajustado para classe funcional, pressão arterial sistólica, dimensões do VE, e níveis séricos de creatinina e sódio (RR 2,1; intervalo de confiança 95% de 1,2-3,6; valor de $p = 0,01$). Esta associação foi atenuada quando foi adicionado ao modelo a duração do complexo

QRS (modelo 2 na Tabela 6), sugerindo que parte da interação entre o genótipo da MMP-1 e a sobrevida relacionada a IC foi modulada por anormalidades da condução intraventricular.

DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que um polimorfismo genético comum da MMP-1 (-1607 1G/2G) esteve associado a aumento de risco de IC em pacientes isquêmicos, maior prevalência de etiologia isquêmica nos pacientes com IC sistólica e pior prognóstico relacionado à IC. Nenhum outro polimorfismo das MMPs esteve relacionado a suscetibilidade à IC, mas os carreadores do alelo 6A (MMP-3 -1171 5A/6A) também estiveram relacionados a maior risco de mortalidade relacionada à IC em pacientes não isquêmicos. De maneira interessante, estes polimorfismos implicaram em diferenças na duração do complexo QRS no eletrocardiograma de superfície, sugerindo que as associações observadas podem ser moduladas, pelo menos em parte, por anormalidades na condução intraventricular.

A reestruturação da matriz de colágeno, realizada em parte pelas MMPs, tem papel principal no remodelamento do ventrículo esquerdo e sobre a transição para a descompensação cardíaca.^{2,3,22} A expressão e atividade das MMPs estão elevadas nas várias etiologias da IC sugerindo que o remodelamento da matriz extracelular é uma resposta comum e deliberada para o dano do tecido miocárdico.³ A elevação da expressão da MMP-1 no coração de camundongos transgênicos pode causar expansão e hipertrofia cardíacas e disfunção sistólica.²³ De forma similar, a rápida progressão da IC em humanos está associada com maior expressão gênica da MMP-1 e MMP-3.^{2,14,24} Além disso, nosso grupo e outros investigadores

demonstraram que a inibição das MMPs pode atenuar de maneira importante o remodelamento do VE em modelos experimentais de infarto agudo do miocárdio^{25,26}.

Proveniente de uma família de mais de 20 MMPs, a colagenase fibrilar, as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) e a estromelisina (MMP-3) são consideradas as principais enzimas que atuam no processo que conduz a quebra, degeneração e reorganização extracelular do coração. Alguns polimorfismos de MMPs têm sido descritos e implicados em efeitos significantes sobre a sua expressão gênica. Particularmente, os genes da MMP-1 e MMP-3 apresentam variações em suas regiões promotoras (-1607 1G/2G e -1171 5A/6A, respectivamente), as quais resultam em aumento importante da atividade transcripcional e tem sido associado a suscetibilidade a doença e a desfechos clínicos em diversas condições cardiovasculares.⁹ Além disto, o polimorfismo do alelo T da MMP-9 na posição -1562 também tem sido associado a gravidade da doença arterial coronariana em estudos angiográficos.¹⁸ Tang e colaboradores,¹³ investigou polimorfismos genéticos semelhantes em pacientes chineses com miocardiopatia dilatada idiopática e encontraram que o alelo 5A da MMP-3 foi associado a suscetibilidade a IC. Esta associação não foi reproduzida em nossos pacientes, porém a ancestralidade genética da amostra do nosso estudo não é comparável a população chinesa. Desta forma, as frequências alélicas e genótípicas dos indivíduos chineses foram diferentes das encontradas em nosso estudo; de maneira surpreendente, por exemplo, o genótipo 5A5A não foi encontrado na população chinesa. Nossos achados em relação às frequências alélicas das MMPs assemelha-se a outros estudos Europeus e Brasileiros com frequências genótípicas semelhantes.^{10,11,27} No presente estudo, não foram identificadas diferenças nas frequências alélicas e genótípicas da MMP-1 e MMP-9 entre pacientes com IC e nos controles na população geral do estudo.

Entretanto, nós observamos menos frequência do genótipo 1G1G da MMP-1 em pacientes com IC de etiologia isquêmica. Devido à proximidade dos genes da MMP-1 e -3 no cromossomo 11, alguns pesquisadores têm estudado os haplótipos dos dois polimorfismos. Trabalhos prévios têm demonstrado que o haplótipo 5A/1G está associado à suscetibilidade a infarto do miocárdio e doença arterial coronariana.^{28,29} Nosso estudo não encontrou associação destes haplótipos e suscetibilidade a IC.

A associação entre os polimorfismos das MMPs e aterosclerose tem sido explorada em cenários clínicos distintos conduzindo a achados conflitantes. Estudo pioneiro realizado por Ghilardi e colaboradores¹¹ demonstrou que indivíduos homocigotos para os alelos 6A (MMP-3) e 2G (MMP-1) apresentavam risco aumentado para estenose de carótida em estudo pequeno de pacientes que foram submetidos a endarterectomia. Posteriormente, Ye e colaboradores¹⁰ demonstraram que indivíduos homocigotos para o alelo com transcrição mais ativa (2G) do gene da MMP-1 apresentavam risco reduzido para doença coronariana cardíaca em comparação com o alelo 1G. Nesse estudo envolvendo 471 homens e mulheres caucasianos europeus, o polimorfismo genético 5A/6A da MMP-3 não foi associado ao risco de doença arterial coronariana. Nossos dados sugerem que a etiologia isquêmica, infarto agudo do miocárdio prévio e anormalidades segmentares do VE foram mais frequentes nos pacientes com IC carreadores do alelo 2G da MMP-1. Podemos especular que os indivíduos com a variante genética mais ativa podem ter chance reduzida de desenvolver doença aterosclerótica, como sugerido por Ye e colaboradores¹⁰; mas quando o ateroma já está presente, a atividade proteolítica aumenta e pode incrementar o risco de instabilidade da placa e determinar o risco de eventos agudos e disfunção ventricular, como sugerido por nossos achados.

Mizon-Gérard e colaboradores¹⁴ estudaram os impactos dos polimorfismos genéticos da MMP-2 (-1306 C/T), MMP-3 (-1171 5A/6A) e MMP-9 (-1562 C/T) no prognóstico de pacientes com IC e disfunção sistólica. Esses investigadores observaram que o genótipo 5A5A (MMP-3) foi preditor independente de mortalidade cardiovascular somente nos pacientes não isquêmicos. Nossos achados em relação ao polimorfismo -1171 5A/6A da MMP-3 foram notavelmente semelhantes (Figura 2B). Entretanto, nós não replicamos o impacto significativo do polimorfismo -1562 C/T da MMP-9 no prognóstico da IC como observado por Mizon-Gérard e colaboradores, pois em nossa amostra não houve associação desta variante genética e mortalidade relacionada à IC. No presente trabalho, nós demonstramos pela primeira vez, associação significativa do polimorfismo (-1607 1G/2G) da MMP-1 com mortalidade cardíaca. Pacientes que eram homocigotos para o alelo transcricionalmente ativo 2G da MMP-1 teve redução substancial da mortalidade relacionada à IC. O mecanismo desta associação necessita ainda ser determinado, pois os portadores do alelo 2G têm dimensões semelhantes de ventrículo esquerdo, prevalência similar de arritmias ventriculares na monitorização por Holter e recebiam o mesmo tratamento farmacológico. Interessantemente, além do aumento da prevalência de etiologia isquêmica, um reconhecido marcador de pior prognóstico de pacientes com IC, os portadores do alelo 2G também estavam associados com redução na duração do complexo QRS, um fator que pode explicar em parte a evolução favorável deste grupo de pacientes.^{30,31}

Alguns aspectos metodológicos de nosso estudo merecem consideração cuidadosa. Considerando a possibilidade teórica que as associações observadas nesta análise ocorram somente em grupos étnicos específicos, nossos resultados devem ser vistos com cautela, pois

existe algum grau de mistura na população caucasiana brasileira (aproximadamente 70% da nossa amostra). Entretanto, a prevalência dos polimorfismos estudados foi semelhante aos reportados em outras populações européias e americanas. Como esperado, nossa amostra de controles aparentemente saudáveis era mais jovem do que os pacientes portadores de IC, pois estes indivíduos provinham da clínica de doadores de sangue. Nós realizamos uma análise de caso-controle restrita a controles de idade maior (>50 anos de idade) e os resultados não se alteraram substancialmente (dados não demonstrados). Finalmente, sabe-se que o efeito dos polimorfismos de um nucleotídeo isolado pode ser suplantado por outros mecanismos compensatórios ou regulatórios atuantes na IC. Medidas dos níveis séricos das MMPs ou a expressão tecidual das MMPs pode aumentar o entendimento nos processos envolvidos no prognóstico da IC.

Em conclusão, nossos dados sugerem que o polimorfismo da MMP-1 (-1607 1G/2G) contribui para a variabilidade da apresentação clínica e de desfechos clínicos relevantes em pacientes com IC. Estudos futuros são necessários para explorar potenciais interações farmacogenéticas dos polimorfismos das MMPs. Estudos genéticos envolvendo diferentes mecanismos compensatórios ^{32, 33,34} podem servir de fundamento para o desenvolvimento das “tão aguardadas” estratégias individualizadas de manejo e tratamento da IC.

FINANCIAMENTO

Projeto parcialmente financiado pelo *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* e *Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE-HCPA)*. Não há conflito de interesse nessa publicação.

REFERÊNCIAS

- [1] Davis RC, Hobbs FDR, Lip GYH. ABC of heart failure: History and epidemiology. *BMJ* 2000;320:39-42.
- [2] Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002;90:520–530.
- [3] Fedak PWM, Verma S, Weisel RD, Li R. Cardiac remodeling and failure: From molecules to man (Part II). *Cardiovasc Pathol* 2005;14:49-60.
- [4] Creemers E, Cleutjens J, Smits J, Daemen M. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction. A new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001;89:201–210.
- [5] Spinale FG. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms in heart failure: new pieces to the myocardial matrix puzzle. *Eur Heart J* 2004;25:631–633.
- [6] White AJ, Duffy SJ, Walton AS, Ng JF, Rice GE, Mukherjee S, *et al.* Matrix metalloproteinase-3 and coronary remodelling: implications for unstable coronary disease. *Cardiovasc Res* 2007;75:813–820.

- [7] Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem* 1996;271:13055–13060.
- [8] Dunleavey L, Beyzade S, Ye S. Rapid genotype analysis of the matrix metalloproteinase-1 gene 1G 2G polymorphism that is associated with risk of cancer. *Matrix Biol* 2000;19:175–177.
- [9] Ye S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovasc Res* 2006;69:636–645.
- [10] Ye S, Gale CR, Martyn N. Variation in the matrix metalloproteinase-1 gene and risk of coronary heart disease. *Eur Heart J* 2003;24:1668-1671.
- [11] Ghilardi G, Biondi ML, DeMonti M, Turri O, Guagnellini E, Scorza R. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-3 gene promoter polymorphisms are associated with carotid artery stenosis. *Stroke* 2002;33:2408-2412.
- [12] Martin TN, Penney DE, Smith JA, Groenning BA, Dargie HJ, Hillis GS. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphisms and changes in left ventricular volume following acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004;94:1044–1046.
- [13] Tang L, Chen X, Zhu M, Jiang JJ, Lu XB, Du YX, *et al.* Matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 gene polymorphisms and the risk of idiopathic dilated cardiomyopathy in Chinese Han population. *Clin Biochem* 2007;40:1427-1430.
- [14] Mizon-Gerard F, Groote P, Lamblin N, Hermant X, Dallongeville J, Amouyel P, *et al.* Prognostic impact of matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with heart

- failure according to the aetiology of left ventricular systolic failure according to the aetiology of left ventricular systolic dysfunction. *Eur Heart J* 2004;25:688–693.
- [15] Haberbosch W, Gardemann A. Gelatinase B C(-1562) T polymorphism in relation with ischemic heart disease. *Scand J Clin Lab Inves* 2005;65:513-522.
- [16] Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5444.
- [17] Dunleavy L, Beyzade S, Ye S. Rapid genotype analysis of the stromelysin gene 5A/6A polymorphism. *Atherosclerosis* 2000;151:587–589.
- [18] Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, De Maat M, Evans A *et al.* Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1788-1794.
- [19] Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. *Am J Hum Genet* 2005;76:449-462.
- [20] Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;68:978-989.
- [21] Hedrick PW. Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. *Genetics* 1987;17:331-341.
- [22] D' Armiento J. Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction. *TCM* 2002;12:97–101.
- [23] Lee RT. Matrix metalloproteinase inhibition and the prevention of heart failure. *TCM* 2001;11:202–205.
- [24] Felkin LE, Birks EJ, George R, Wong S, Khaghani A, Yacoub MH, *et al.* A quantitative gene expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs)

- in the myocardium of patients with deteriorating heart failure requiring left ventricular assist device support. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:1413-1419.
- [25] Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, Aikawa M, Sukhova GH, Lopez-Anaya A, McClure KF, Mitchell PG, Libby P, Lee RT. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 1999;99:3063-70.
- [26] Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinases inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001;89:201-10.
- [27] Dalepiane VLN, Silvello DN, Paludo CA, Roisenberg I, Simon D. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with coronary artery disease. *Genet Mol Biol* 2007;30:505-510.
- [28] Horne BD, Camp NJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, Kolek MJ, Nicholas ZP, *et al.* Multiple-polymorphism associations of 7 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor metalloproteinase genes with myocardial infarction and angiographic coronary artery disease. *Am Heart J* 2007;154:751-758.
- [29] Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, *et al.* Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Int J Cardiol* 2003;92:181-186.
- [30] De Winter O, Van de Veire N, Van Heuverswijn F, Van Pottelberge G, Gillebert TC, De Sutter J. Relationship between QRS duration, left ventricular volumes and prevalence of nonviability in patients with coronary artery disease and severe left ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail* 2006;8:275-277.

- [31] Attar MN, Wong K, Groves DG, Newall N, Ramsdale DR, Moore RK. Clinical implications of QRS duration and QT peak prolongation in patients with suspected coronary disease referred for elective cardiac catheterization. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2008;13:106-112.
- [32] McNamara DM, Tam SW, Sabolinski ML, Tobelmann P, Janosko K, Venkitachalam L, et al. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) polymorphisms in African Americans with heart failure: results from the A-HeFT trial. *J Card Fail* 2009;15:191-8.
- [33] Biolo A, Clausell N, Santos KG, Salvato R, Ashton-Prolla P, Borges A, Rohde LE. Impact of beta1-adrenergic receptor polymorphisms on susceptibility to heart failure, arrhythmogenesis, prognosis, and response to beta-blocker therapy. *Am J Cardiol* 2008;102:726-32.
- [34] McNamara DM, Holubkov R, Postava L, Janosko K, MacGowan GA, Mathier M, et al. Pharmacogenetic interactions between angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2019-26.

Tabela 1 – Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos genéticos da metaloproteinase de matriz (MMP) em Pacientes com insuficiência cardíaca e controles.

	Todos pacientes	Etiologia não isquêmica	Etiologia isquêmica	Controles
MMP-1				
N	313	195	118	367
Frequência Genotípica				
1G1G	69 (22)	52 (27)	17 (14)	93 (25)*
1G2G	157 (50)	88 (45)	69 (59)	174 (48)
2G2G	87 (28)	55 (28)	32 (27)	100 (27)
Frequência Alélica				
1G	0,47	0,49	0,44	0,49
2G	0,53	0,51	0,56	0,51
MMP-3				
N	306	193	113	366
Frequência Genotípica				
5A5A	49 (16)	31 (16)	18 (16)	54 (15)
5A6A	148 (48)	97 (50)	51 (45)	184 (50)
6A6A	109 (36)	65 (34)	44 (39)	128 (35)
Frequência Alélica				
5A	0,40	0,41	0,38	0,40
6A	0,60	0,59	0,62	0,60

MMP-9

N	307	193	114	359
Frequência Genotípica				
CC	250 (81)	159 (82)	91 (80)	280 (78)
CT	54 (18)	31 (16)	23 (20)	75 (21)
TT	3 (1)	3 (2)	0 (0)	4 (1)
Frequência Alélica				
C	0,90	0,90	0,90	0,88
T	0,10	0,10	0,10	0,12

Os resultados são apresentados em número absoluto e percentuais (entre parênteses).

*valor de $p < 0,05$ para comparação em pacientes isquêmicos ajustados para sexo, idade e grupo étnico.

Tabela 2 – Características clínicas dos pacientes com IC de acordo com o polimorfismo genético da MMP-1.

Variável	MMP-1			p
	Total N = 312	1G1G N = 68	Carreadores 2G N = 244	
Idade (anos)	61 ± 13	62 ± 13	59 ± 12	0,18
Homens (%)	215 (69)	48 (71)	167 (68)	0,73
Caucasianos (%)	220 (70)	55 (81)	165 (68)	0,05
Etiologia da IC (%)				
Isquêmica	118 (38)	17 (25)	101 (41)	0,014
Idiopática	91 (29)	30 (44)	61 (25)	0,002
Hipertensiva	73 (23)	16 (24)	57 (23)	0,97
Classe funcional I e II da NYHA (%)	238 (78)	52 (78)	186 (78)	> 0,99
Hipertensão (%)	183 (59)	36 (53)	147 (60)	0,28
Diabete melito (%)	93 (30)	20 (30)	73 (30)	0,93
Obesidade (%)	50 (16)	13 (20)	37 (15)	0,43
Tabagismo atual (%)	38 (12)	7 (10)	31 (13)	0,59
Hipercolesterolemia (%)	93 (30)	13 (20)	80 (34)	0,029
Infarto do miocárdio prévio (%)	101 (32)	13 (19)	88 (36)	0,008
Revascularização Miocárdica (%)	34 (11)	8 (12)	26 (11)	0,97
Acidente vascular cerebral (%)	23 (7)	5 (7)	18 (7)	>0,99
Pressão arterial sistólica (mmHg)	125 ± 24	124 ± 22	125 ± 24	0,89
Creatinina (mg/dL)	1,29 ± 0,47	1,24 ± 0,47	1,30 ± 0,46	0,28
Sódio (mEq/L)	140,4 ± 3,4	140,5 ± 3,0	140,4 ± 3,5	0,84
Hemoglobina (mg/dL)	13,1 ± 1,7	13,3 ± 1,5	13,0 ± 1,7	0,28
Eletrocardiograma				
Duração do QRS (ms)	129 ± 35	142 ± 38	125 ± 33	0,001

Fibrilação atrial (%)	57 (19)	16 (24)	41 (17)	0,23
Ecocardiograma				
Diametro diastólico do VE (cm)	5,6 ± 1,1	5,7 ± 1,00	5,5 ± 1,1	0,23
Fração de ejeção do VE (%)	31 ± 8	30 ± 8	32 ± 8,3	0,17
Disfunção segmentar do VE (%)	100 (34)	12 (19)	88 (38)	0,006
Átrio esquerdo (cm)	4,8 ± 0,8	4,9 ± 0,8	4,7 ± 0,8	0,39
Holter de 24-horas*				
TV não sustentada (%)	107 (42)	30 (48)	77 (40)	0,27
SDNN (ms)	109 ± 44	102 ± 39	111 ± 46	0,28
Medicações (%)				
IECA	284 (88)	59 (87)	215 (88)	0,955
Beta-bloqueadores	269 (88)	60 (86)	209 (86)	0,687
Diuréticos	271 (89)	56 (85)	215 (90)	> 0,99
Espironolactona	113 (37)	26 (39)	87 (36)	0,763

Dados expressos como média ± desvio padrão e números absolutos (percentuais).

NYHA – New York Heart Association; VE – ventrículo esquerdo; TV – taquicardia ventricular; SDNN – desvio padrão dos intervalos RR; IECA – inibidores da enzima de conversão da angiotensina.

* dados disponíveis para 257 pacientes.

Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes com IC de acordo com o polimorfismo genético da MMP-3.

Variável	MMP-3			p
	Total N = 306	6A6A N = 109	Carreadores 5A N = 197	
Idade (anos)	60 ± 13	61 ± 12	59 ± 13	0,27
Homens (%)	209 (68)	78 (72)	131 (66)	0,36
Caucasianos (%)	216 (71)	72 (66)	144 (73)	0,009
Etiologia da IC (%)				
Isquêmica	113 (37)	44 (40)	69 (35)	0,35
Idiopática	89 (29)	25 (23)	64 (32)	0,08
Hipertensiva	73 (24)	30 (27)	43 (22)	0,26
Classe funcional I e II da NYHA (%)	234 (78)	86 (81)	148 (76)	0,90
Hipertensão (%)	180 (59)	68 (62)	112 (57)	0,35
Diabete melito (%)	93 (30)	28 (26)	65 (33)	0,18
Obesidade (%)	50 (16)	15 (14)	35 (18)	0,36
Tabagismo atual (%)	38 (12)	17 (16)	21 (11)	0,21
Hipercolesterolemia (%)	80 (29)	29 (27)	61 (31)	0,42
Infarto do miocárdio prévio (%)	97 (32)	36 (33)	61 (31)	0,71
Revascularização Miocárdica (%)	33 (11)	11 (10)	22 (11)	0,77
Acidente vascular cerebral (%)	26 (8)	8 (7)	18 (9)	0,59
Pressão arterial sistólica (mmHg)	124 ± 24	126 ± 24	124 ± 24	0,48
Creatinina (mg/dL)	1,29 ± 0,47	1,31 ± 0,49	1,26 ± 0,43	0,16
Sódio (mEq/L)	140 ± 3,4	140 ± 3,7	140 ± 3,2	0,76
Hemoglobina (mg/dL)	13,1 ± 1,7	13,0 ± 1,8	13,1 ± 1,7	0,65
Eletrocardiograma				
Duração do QRS (ms)	129 ± 35	122 ± 32	131 ± 35	0,041

Fibrilação atrial (%)	55 (18)	17 (16)	38 (20)	0,92
Ecocardiograma				
Diâmetro diastólico do VE (cm)	5,6 ± 1,1	5,4 ± 1,1	5,7 ± 1,0	0,04
Fração de ejeção do VE (%)	31 ± 8,0	31 ± 7,7	31 ± 8,5	0,79
Disfunção segmentar do VE (%)	97 (33)	39 (37)	58 (31)	0,26
Átrio esquerdo (cm)	4,8 ± 0,8	4,7 ± 0,8	4,8 ± 0,8	0,07
Holter de 24-horas*				
TV não sustentada (%)	103 (41)	39 (45)	64 (39)	0,32
SDNN (ms)	109 ± 44	118 ± 45	103 ± 43	0,039
Medicações (%)				
IECA	268 (88)	98 (90)	170 (86)	0,77
Beta-bloqueadores	264 (86)	95 (87)	169 (86)	0,74
Diuréticos	172 (90)	66 (92)	106 (89)	0,74
Espironolactona	70 (37)	27 (37)	43 (36)	0,94

Dados expressos como média ± desvio padrão e números absolutos (percentuais).

NYHA – New York Heart Association; VE – ventrículo esquerdo; TV – taquicardia ventricular; SDNN – desvio padrão dos intervalos RR; IECA – inibidores da enzima de conversão da angiotensina.

* dados disponíveis para 251 pacientes.

Tabela 4 – Características clínicas dos pacientes com IC de acordo com o polimorfismo genético da MMP-9.

Variável	MMP-9			p
	Total N = 307	CC N = 250	Carreadores T N = 57	
Idade (anos)	60 ± 13	60 ± 13	59 ± 13	0,36
Homens (%)	211 (69)	171 (68)	40 (70)	0,92
Caucasianos (%)	217 (71)	174 (70)	43 (75)	0,48
Etiologia da IC (%)				
Isquêmica	114 (37)	91 (36)	23 (40)	0,68
Idiopática	90 (29)	76 (30)	14 (25)	0,47
Hipertensiva	72 (23)	60 (24)	12 (21)	0,76
Classe funcional I e II da NYHA (%)	234 (78)	190 (78)	44 (79)	0,99
Hipertensão (%)	179 (58)	144 (58)	35 (61)	0,71
Diabete melito (%)	91 (30)	71 (28)	20 (35)	0,40
Obesidade (%)	50 (16)	43 (17)	7 (12)	0,48
Tabagismo atual (%)	38 (12)	34 (14)	4 (7)	0,25
Hipercolesterolemia (%)	90 (29)	75 (30)	15 (26)	0,70
Infarto do miocárdio prévio (%)	98 (32)	76 (30)	22 (39)	0,30
Revascularização Miocárdica (%)	33 (11)	27 (11)	6 (11)	>0,99
Acidente vascular cerebral (%)	24 (8)	19 (8)	5 (9)	0,98
Pressão arterial sistólica (mmHg)	125 ± 24	125 ± 24	123 ± 23	0,55
Creatinina (mg/dL)	1,29 ± 0,47	1,31 ± 0,49	1,26 ± 0,43	0,33
Sódio (mEq/L)	140,4 ± 3,4	140,5 ± 3,2	139,9 ± 4,0	0,22
Hemoglobina (mg/dL)	13,1 ± 1,7	13,1 ± 1,7	13,3 ± 1,4	0,41
Eletrocardiograma				
Duração do QRS (ms)	129 ± 34	131 ± 35	118 ± 29	0,011
Fibrilação atrial (%)	56 (18)	47 (19)	9 (16)	0,69

Ecocardiograma				
Diâmetro diastólico do VE (cm)	6,6 ± 1,0	6,6 ± 0,9	6,6 ± 1,2	0,51
Fração de ejeção do VE (%)	31 ± 8	31 ± 8	32 ± 9	0,43
Disfunção segmentar do VE (%)	97 (33)	77 (32)	20 (36)	0,70
Átrio esquerdo (cm)	4,8 ± 0,8	4,8 ± 0,8	4,7 ± 1,0	0,54
Holter de 24-horas*				
TV não sustentada (%)	104 (41)	91 (43)	13 (32)	0,28
SDNN (ms)	110 ± 45	109 ± 45	113 ± 43	0,72
Medicações (%)				
IECA	269 (88)	220 (88)	49 (86)	0,84
Beta-bloqueadores	269 (88)	219 (88)	50 (88)	>0,99
Diuréticos	290 (94)	236 (94)	54 (95)	>0,99
Espironolactona	117 (38)	91 (36)	26 (46)	0,25

Dados expressos como média ± desvio padrão e números absolutos (percentuais).

NYHA – New York Heart Association; VE – ventrículo esquerdo; TV – taquicardia ventricular; SDNN – desvio padrão dos intervalos RR; IECA – inibidores da enzima de conversão da angiotensina.

* dados disponíveis para 251 pacientes.

Tabela 5 – Preditores independentes de etiologia isquêmica na análise de regressão múltipla

Variável	RR	IC 95%	p
Carreadores MMP-1 2G	2,14	1,10–4,15	0,024
Idade (anos)	1,03	1,01–1,05	0,006
Hipercolesterolemia	2,76	1,58–4,80	<0,001
Diabete melito	3,04	1,75–5,30	<0,001
Pressão arterial diastólica (mmHg)	0,97	0,95–0,99	0,002

RR, risco relativo; IC, interval de confiança.

Tabela 6 – Análise univariada e modelo proporcional de Cox para mortalidade relacionada a IC.

Variável	Análise Univariada			Modelo Ajustado 1*			Modelo Ajustado 2 *		
	HR	IC 95%	p	HR	IC 95%	p	HR	IC 95%	p
SAS Classe Funcional III e IV	2,9	1,7-5,0	<0,001	2,4	1,3-4,2	0,003	2,2	1,2-4,0	0,008
PAS, cada 1 mmHg	0,98	0,96-0,99	<0,001	0,98	0,97-0,99	0,01	0,99	0,97-1,0	0,06
Creatinina, cada 1 mg/dL	2,0	1,2-3,1	0,005	1,6	0,98-2,7	0,06	1,4	0,8-2,3	0,25
Sódio, cada 1 mEq/L	0,85	0,8-0,9	<0,001	0,85	0,79-0,92	<0,001	0,84	0,78-0,92	<0,001
Duração do QRS, cada 10 ms	1,2	1,1-1,3	<0,001	--	--	--	1,1	1,01-1,19	0,02
Diâmetro diast. VE, cada 1 mm	1,5	1,2-1,9	0,002	1,4	1,04-1,8	0,03	1,2	0,9-1,6	0,26
Genótipo MMP-1 1G/1G	2,2	1,3-3,8	0,003	2,1	1,2-3,6	0,01	1,5	0,84-2,7	0,16

SAS – escala específica de atividade; PAS– pressão arterial sistólica; VE – ventrículo esquerdo; MMP – metaloproteinase de matriz.

Modelo 1 não foi ajustado para duração do QRS; Modelo 2 foi ajustado para todas as variáveis.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier comparando pacientes com IC portadores do genótipo 1G1G (polimorfismo da MMP-1) e carreadores do alelo 2G (A – todos os pacientes com IC; B – etiologia não isquêmica; C – etiologia isquêmica).

Figura 2 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier comparando pacientes com IC portadores do genótipo 5A5A (polimorfismo da MMP-3) e carreadores do alelo 6A (A – todos os pacientes com IC; B – etiologia não isquêmica; C – etiologia isquêmica).

Figura 3 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier comparando pacientes com IC portadores do genótipo CC (polimorfismo da MMP-9) e carreadores do alelo T (A – todos os pacientes com IC; B – etiologia não isquêmica; C – etiologia isquêmica).

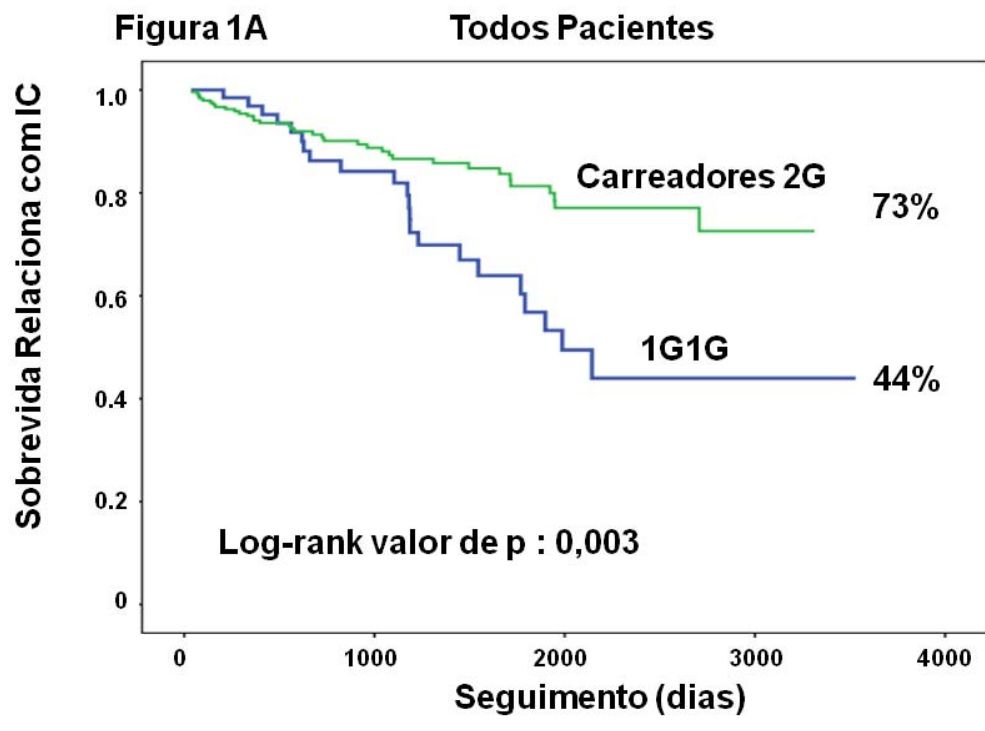


Figura 1B Etiologia Não-Isquêmica

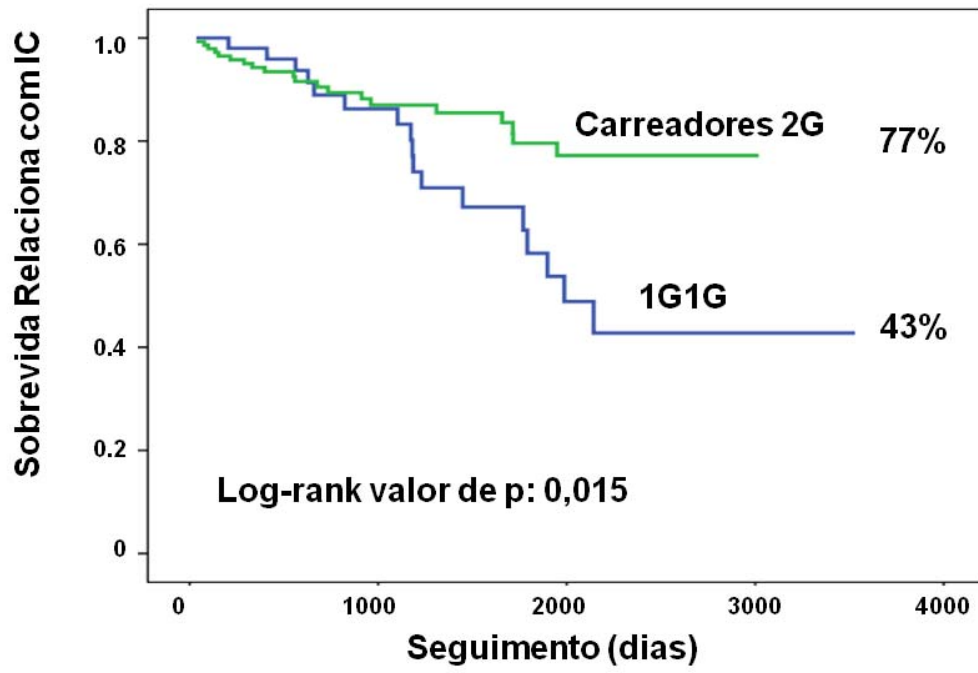
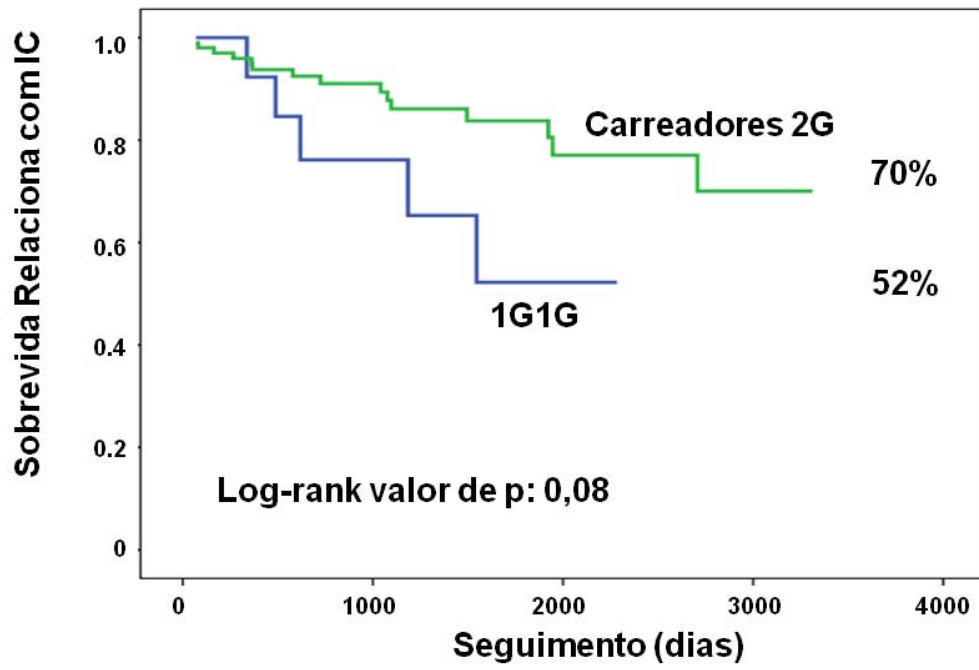


Figura 1C Etiologia Isquêmica



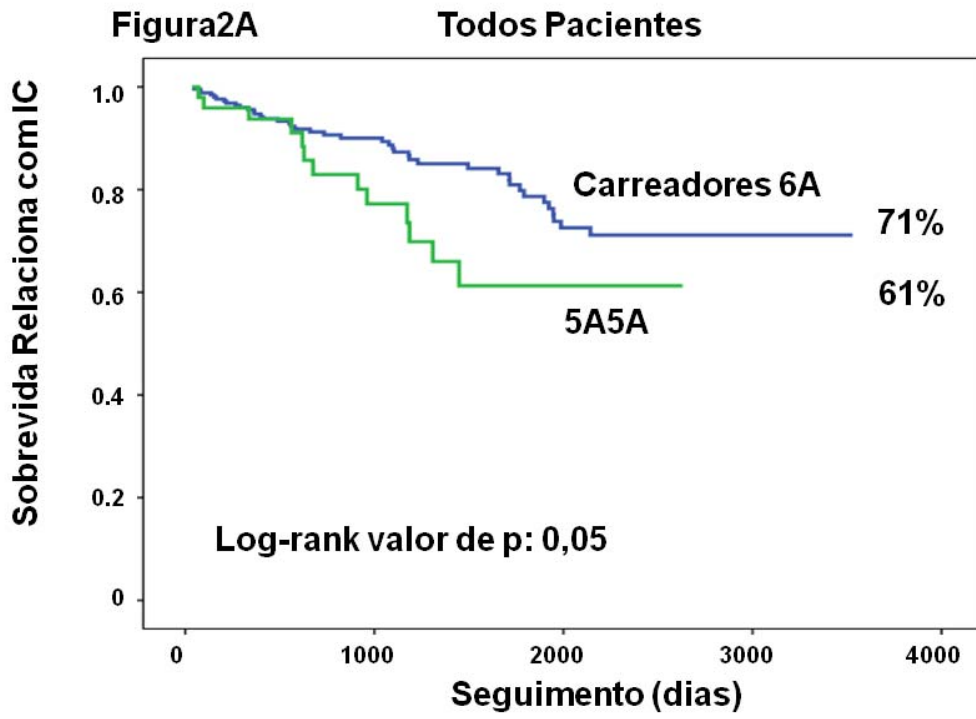


Figura 2B Etiologia Não-Isquêmica

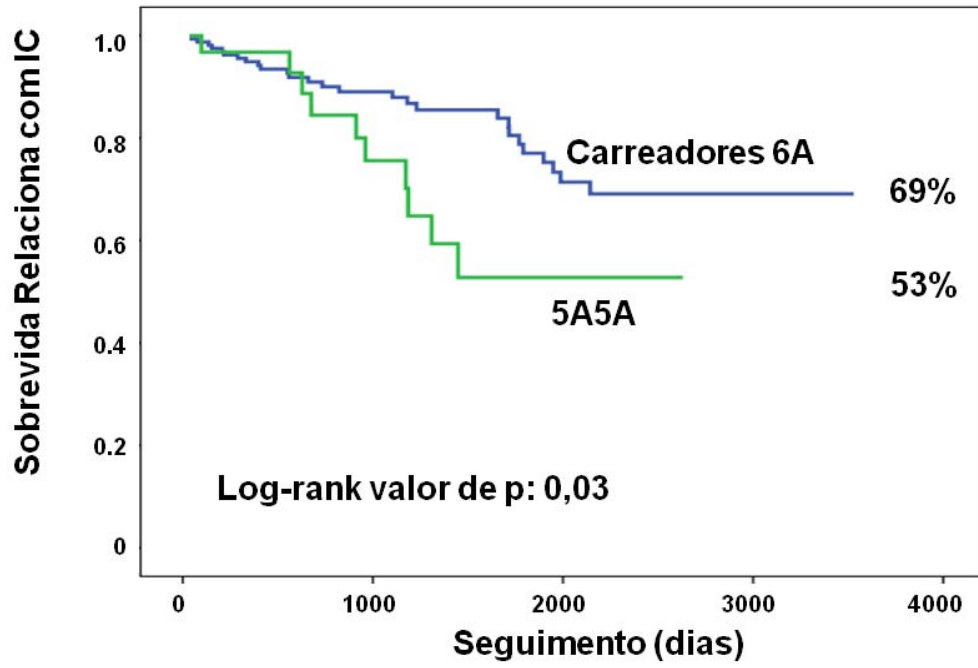


Figura 2C Etiologia Isquêmica

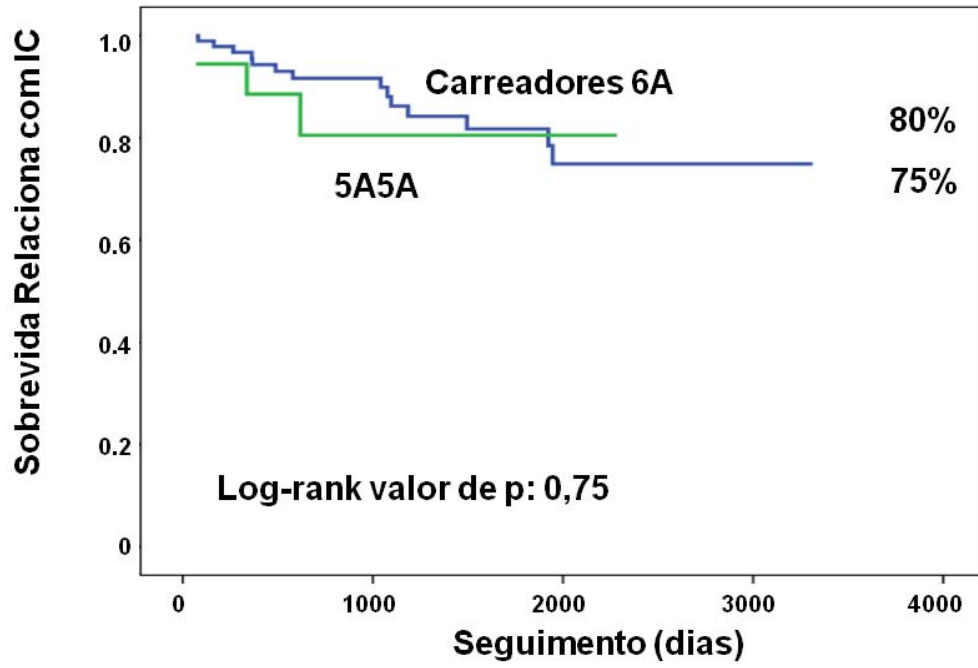


Figura 3A Todos Pacientes

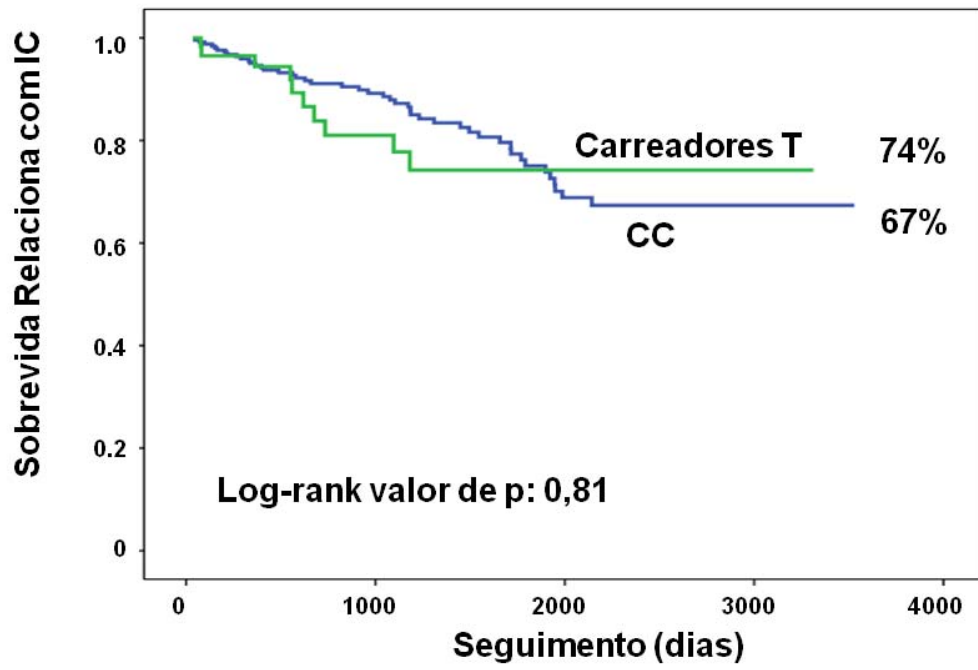


Figura 3B Etiologia Não-Isquêmica

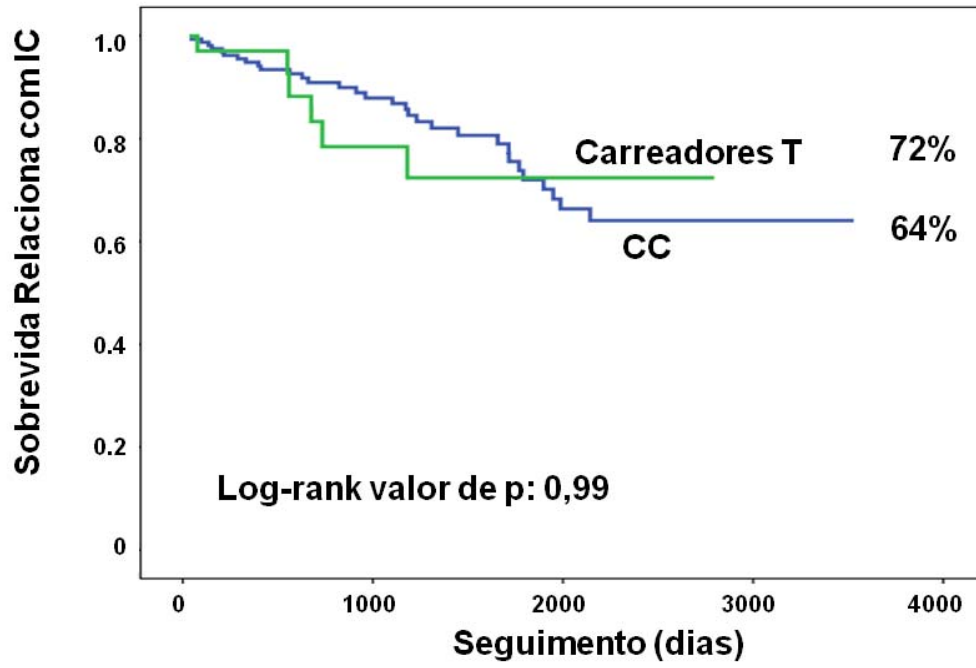
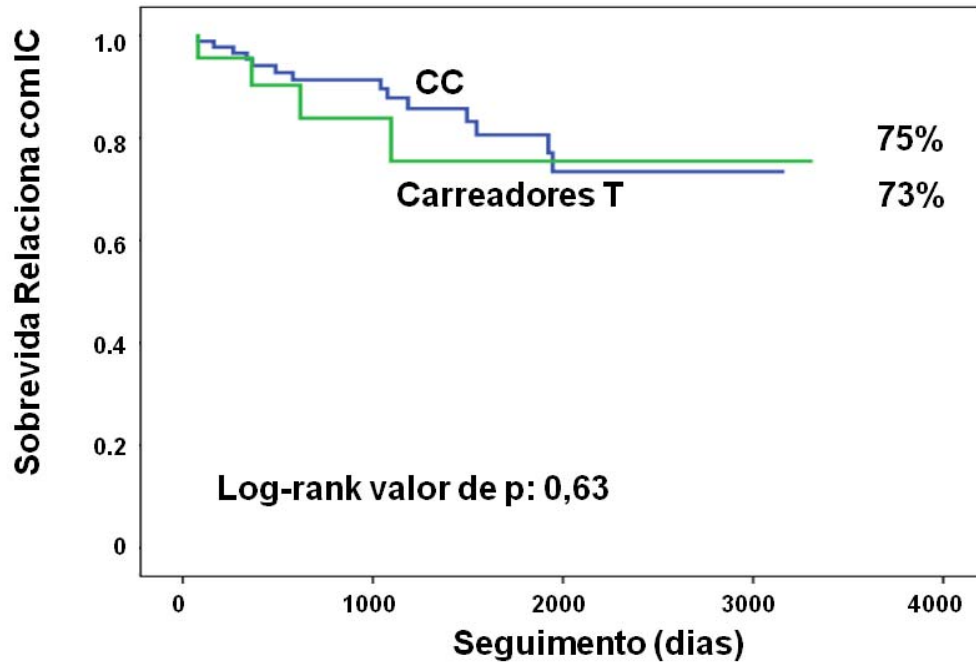


Figure 3A Etiologia Isquêmica



Functional Polymorphisms of Matrix Metalloproteinases in Systolic Heart Failure: Role on Disease Susceptibility, Phenotypic Characteristics and Prognosis

Fábio M. Velho*, Carolina R. Cohen*, Kátia G. Santos, Daiane Silvello, Nidiane Martinelli,
Andréia Biolo, Nadine Clausell, Luis E. Rohde

From the Heart Failure and Cardiac Transplantation Unit,
Cardiology Division at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and
Post-Graduation Program in Cardiology and Cardiovascular Science
Medical School of the Federal University of Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Brazil

* both authors contributed equally to this manuscripts

Address for correspondence:

Luis E. Rohde MD
Heart Failure and Transplant Unit
Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos 2350, Sala 2061
Porto Alegre, RS, Brazil 90035-003
Phone/Fax 55 51 21018344

ABSTRACT

Aims Matrix metalloproteinases (MMPs) are implicated in extracellular matrix restructuring and MMPs functional polymorphisms substantially affect gene expression, but their role on heart failure (HF) susceptibility, phenotypic characterization and prognosis is poorly explored.

Methods We studied 313 HF patients with LV systolic dysfunction and 367 healthy control subjects. Genotyping of MMP-1 (-1607 1G/2G), MMP-3 (-1171 5A/6A) and MMP-9 (-1562 C/T) polymorphisms was performed using the PCR-RFLP method. Kaplan-Meier survival curves and Cox proportional hazard models were constructed to evaluate HF-related mortality.

Results Allelic and genotypic frequencies of MMP-1, -3 and -9 were similar in HF patients and controls, but the 1G/1G genotype of MMP-1 was significantly less frequent ($p = 0.03$) in analysis restricted to HF from ischemic etiology. MMP1 2G allele carriers were positively associated to ischemic etiology, history of myocardial infarction and revascularization procedures (all p values < 0.05). Patients were followed-up for a median of 37 months (interquartile range 16 to 62 months) and there were 58 HF-related deaths. HF related survival was significantly better in MMP1 2G allele carriers (73% versus 44% for 1G/1G patients, $p=0.003$) and in MMP-3 6A allele carrier (71% versus 61% for 5A/5A patients, $p=0.05$), particularly in non-ischemic patients ($p=0.03$). MMP1 2G allele carriers were independently associated to HF mortality after adjustment for several other predictors of risk (HR 2.1, 95% CI 1.2-3.6; $p=0.01$)

Conclusions MMP-1, -3 and -9 polymorphisms were not associated to HF susceptibility. MMP-1 (-1607 1G/2G) was related to a higher prevalence of ischemic etiology among patients with systolic HF and worse HF-related prognosis.

INTRODUCTION

Heart failure (HF) represents the end-stage of several heart diseases and remains a major cause of morbidity and mortality worldwide.¹ Experimental and clinical studies have demonstrated that left ventricular (LV) remodeling and dilation occur along with LV failure progression, culminating with end-stage and refractory HF.² Restructuring of the collagen matrix plays a central role in the adaptations of the failing myocardium and the ultimate transition to cardiac decompensation.³ Matrix metalloproteinases (MMPs), an endogenous family of zinc-dependent enzymes, have been identified as key players in this process. Collagenases (MMP-1), gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and stromelysins (MMP-3)^{4,5,6} have all been linked to matrix remodeling in the different stages of HF development and progression.

Genetic polymorphisms of MMPs substantially influence the overall gene transcriptional efficiency, resulting in heterogeneous gene expression.^{7,8} A common variant in the promoter region of the MMP-1 gene with one (1G) or two (2G) guanine nucleotides has been described at position -1607 relative to the transcriptional start site of the gene.⁹ It has been shown that the 2G allelic promoter of the MMP-1 gene has a 20-fold higher transcriptional activity than the 1G allelic promoter.¹⁰ The 2G allele was associated to increased risk of coronary heart disease (CHD), increased risk of carotid artery stenosis, and enhanced LV remodeling after an acute myocardial infarction (AMI).^{11,12} A common polymorphism at the -1171 position in the promoter region of MMP-3 (one allele having a run of six adenines [6A] and another allele having five adenines [5A]) has also been described.⁹ Transfection assays have shown that the MMP-3 promoter containing the 5A allele has two- to four-fold higher transcriptional activity than promoter constructs containing the 6A allele.⁷ Initial studies have

suggested that the 5A allele is associated to the risk of idiopathic dilated cardiomyopathy¹³ and might have an impact on HF prognosis.¹⁴ Finally, the T allele of the MMP-9 polymorphism at position -1562 has also been associated to increased promoter activity and to the extent of coronary artery disease¹⁵.

In the present study, we hypothesized that genetically mediated variability of MMPs are related to the disease susceptibility, phenotypic characterization and prognosis in Brazilian HF patients. We evaluated these hypotheses by analyzing the above mentioned polymorphisms in a cohort of HF outpatients with moderate to severe left ventricular systolic dysfunction.

METHODS

Patients. We included a total of 312 consecutive patients, older than 18 years, with HF and left ventricular systolic dysfunction (ejection fraction lower than 45%). Patients with other serious illnesses or with reduced life-expectancy were excluded. Patients were recruited consecutively between July, 2003 and November, 2007 from the Heart Failure and Transplant outpatient clinic in a tertiary care university hospital in Porto Alegre, Brazil. Patients underwent clinical and laboratory evaluation consisting of a standardized questionnaire, physical examination, evaluation of echocardiographic parameters and laboratory tests. HF patients were followed-up in the outpatient clinic at our institution and vital status was evaluated at hospital electronic records, by telephone contact and at a local Death Certificate database. The outcome of interest was HF-related death, defined as sudden unexpected death (within 1 hour of initiation of symptoms) or caused by advanced refractory disease.

We also evaluated 367 apparently healthy blood donors from the Hemotherapy Center of the same hospital, who had no personal or family history of premature sudden death or cardiovascular diseases. The study protocol was approved by the local institutional review board and by the National Agency of Ethics in Research and conforms with the principles outlined in the Declaration of Helsinki. All subjects provided written informed consent prior to enrollment.

Genotyping. Genomic DNA was extracted from peripheral blood according to a non-enzymatic method previously described.¹⁶ The polymerase chain reaction (PCR) method was used to amplify fragments containing the MMP-1 1G/2G, MMP-3 5A/6A and MMP-9 C/T polymorphisms, using primers and conditions as described by Dunleavy *et al.*^{8,17} and Zhang *et al.*¹⁸ The PCR products were then subjected to digestion by restriction endonuclease *XmnI* or *PaeI* following the manufacturer's instructions (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). The digested fragments were separated by 8% polyacrylamide gel electrophoresis and visualized with silver nitrate staining or 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

Statistical analysis. Data are presented as mean \pm standard deviation or absolute numbers and percentages. Continuous variables were compared by the Student *t* test or Mann-Whitney *U* test, and categorical variables by the chi-square test or Fisher Exact test, as appropriate. Chi-square was also used to test the Hardy-Weinberg equilibrium and to compare the allele and genotype frequencies between cases and control subjects. Haplotype frequencies were estimated by a Bayesian method using PHASE version 2.1^{19,20}. The linkage disequilibrium

between MMP-1 and -3 genetic polymorphisms was calculated and expressed in terms of D' and r^2 ²¹. Multivariate logistic regression was used to assess the independent role of MMP-1 as a predictor of ischemic etiology. Kaplan-Meier survival curves were constructed from the date of entry at the outpatient clinic up to the last registry of follow-up or death, and compared by the log-rank statistics. Cox proportional hazard models were created and adjusted for other variables that might influence HF-related mortality. All data were analyzed using SPSS for Windows 16.0 or SAS 9.0 for Windows. A p value of < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Patients and Controls. HF patients enrolled in this study were predominantly males (69%) and Caucasian (70%), with a mean age of 60 ± 13 years, moderate to severe left ventricular dysfunction and in New York Heart Association (NYHA) class I or II (78%). The etiology of HF was ischemic in 115 (38%) patients and idiopathic in 91 (30%) patients. The majority of patients used angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors (90%) and beta-blockers (88%). Most control subjects were men (70%) and Caucasian (77%), with mean age of 45 ± 12 years and they were significantly younger than patients ($p= 0.001$).

Disease susceptibility. The allele and genotype frequencies of MMP-1, -3 and -9 polymorphisms in HF patients and controls are presented in Table 1. The observed genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in cases, controls and in the overall studied sample for all analyzed polymorphisms. Genotype and allele frequencies were remarkably

similar in apparently healthy controls and cases, regardless of HF etiology (ischemic versus non-ischemic), except for a lower prevalence of the 1G1G genotype in ischemic patients when compared to controls (14% versus 25%; $p = 0.03$).

As the MMP-1 and -3 genes are in the same chromosome cluster (11q22.3), haplotype analysis was undertaken and their frequencies were estimated. The polymorphisms were in moderate linkage disequilibrium in both groups of subjects ($D' = 0.53$; $r^2 = 0.21$ for cases and $D' = 0.56$; $r^2 = 0.22$ for controls). The frequencies of 1G6A, 1G5A, 2G6A and 2G5A haplotypes in patients (0.18, 0.31, 0.42 and 0.09, respectively) were similar to those found in controls (0.17, 0.30, 0.43 and 0.10, respectively) ($p = 0.72$).

Phenotypic Characterization. Clinical and demographic characteristics of patients according to MMP-1, -3 and -9 genotypes are presented in Tables 2, 3 and 4, respectively. MMP-1 2G allele carriers ($n = 244$) were significantly more frequent in HF patients with ischemic etiology, a previous myocardial infarction, regional left ventricle dysfunction and hypercholesterolemia (all p values < 0.05). The 1G1G genotype was also associated to longer QRS complexes on surface EKG (Table 2). MMP-3 (-1171 5A/6A) polymorphism was not significantly associated to most traditional clinical features of HF. MMP-3 5A carriers ($n = 197$), however, had decreased heart rate variability and increased LV dimensions and longer QRS complex duration (Table 3). Finally, we did not observe significant associations between the MMP-9 (-1572 C/T) polymorphism with HF clinical characteristics, except for a longer QRS complex duration in CC homozygous patients ($n = 250$).

As the MMP-1 2G allele was associated to ischemic HF etiology, we performed multiple logistic regression analysis to examine other potential predictors of ischemic etiology in our cohort (Table 5; model adjusted for age, gender, hypercholesterolemia, blood pressure, diabetes mellitus, chronic obstructive pulmonary disease, alcoholism and serum creatinine, glucose and sodium). Our data suggest that the 2G allele (MMP-1 polymorphism) is an independent risk factor for HF of ischemic etiology (adjusted OR= 2.14, 95% confidence interval [CI] 1.1 – 4.15, $p= 0.024$).

Follow-up and Prognosis. Clinical follow-up data were obtained for all enrolled patients. During a median follow-up of 76 months, there were 58 HF-related deaths and 38 deaths from other causes. Figures 1, 2 and 3 depicts the Kaplan-Meier survival curves according to MMP-1, MMP-3 and MMP-9 genotypes, respectively (panel A for all patients, panel B for non-ischemic etiology and panel C for ischemic etiology). HF related survival was significantly better over time in MMP-1 2G carriers (log-rank p value = 0.003). Analysis stratified by etiology demonstrated a similar survival profile, although we observed only a statistical trend in ischemic patients (log rank p value = 0.08; Figure1C). MMP-3 6A carriers also depicted a better HF related prognosis, particularly in the non-ischemic group (log rank p value = 0.03; Figure 2B). MMP-9 polymorphism had no impact on HF related survival, irrespective of etiology (Figure 3).

Cox proportional hazard models were created to evaluate predictors of HF-related mortality. MMP1 2G carriers were independently associated to HF mortality after adjustment for functional class, systolic arterial pressure, left ventricular dimensions and serum levels of

creatinine and sodium (OR 2.1; 95% confidence interval of 1.2-3.6; p value = 0.01). This association was attenuated in a model that was additionally adjusted for QRS complex duration (model 2 in Table 6), suggesting that part of the interaction between MMP1 genotype and HF related survival was modulated by intraventricular conduction abnormalities.

DISCUSSION

In the present study, we have demonstrated that a common genetic polymorphism of MMP-1 (-1607 1G/2G) was associated to increased HF risk in ischemic patients, higher prevalence of ischemic etiology among patients with systolic HF and worse HF-related prognosis. No other MMPs polymorphisms was associated to increased HF susceptibility, but 6A carriers (MMP3 -1171 5A/6A) were also associated to a increase risk of HF-related mortality in non-ischemic patients. Interestingly, these polymorphisms implicated in differences on QRS complex duration in surface EKG, suggesting that the observed associations could be modulated, at least in part, by intraventricular conduction abnormalities.

Restructuring of the collagen matrix, performed in part by MMPs, has a pivotal role in left ventricle remodeling of the failing myocardium and the ultimate transition to cardiac decompensation.^{2,3,22} MMP expression and activity are elevated in HF of various etiologies, suggesting that extracellular matrix remodeling is a common and deliberate response to myocardium tissue damage.³ Elevated MMP-1 expression in the heart of transgenic mice can cause cardiac hypertrophy, expansion and systolic dysfunction.²³ Similarly, the rapid progression of HF in humans is associated with higher MMP-1 and MMP-3 gene

expression.^{2,14,24} Also, we and others have demonstrated that MMPs inhibition can greatly attenuate LV remodeling in experimental models of acute myocardial infarction^{25,26}.

From a family of more than 20 MMPs, fibrillar collagenase (MMP-1), gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and stromelysin (MMP-3) are considered major players in the processes that lead to extracellular disruption, degeneration, and reorganization in the heart. Several MMPs polymorphisms have been described and are implicated in significant effects on gene expression. In particular, MMP-1 and MMP-3 genes have variants in their promoter regions (-1607 1G/2G and -1171 5A/6A, respectively) that result in significantly higher transcriptional activity and have been associated to disease susceptibility and clinical outcomes in several cardiovascular conditions⁹. Also, the T allele of MMP-9 polymorphism at position -1562 has also been associated to the severity of coronary artery disease in angiographic studies¹⁸. Tang *et al.*¹³ have investigated similar genetic polymorphisms in Chinese Han patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and found that the 5A allele of MMP-3 was associated to HF susceptibility. This association was not replicated in our patients, but the genetic ancestry of our study sample is not comparable to the Chinese population. As such, allelic and genotypic frequencies in Chinese subjects were distinctively different from those found in our study; surprisingly, for example, 5A5A genotype was not found in the Chinese population. Our findings regarding MMPs allele frequencies resembles those from other European and Brazilian studies, with similar genotypic frequencies.^{10,11,27} In the present study no significant differences in the frequencies of MMP-1 and MMP-9 genotypes or alleles were identified between HF patients and controls in the overall population. We did observe, however, a lower frequency of the 1G1G genotype of MMP-1 in ischemic HF patients. Because the proximity of the MMP-1

and -3 genes in chromosome 11, some researchers have studied haplotypes of the two polymorphisms. Previous reports have shown that the 5A/1G haplotype was associated to susceptibility to myocardial infarction and coronary artery disease.^{28,29} Our study did not find an association of these haplotypes with HF susceptibility.

The association of MMPs polymorphisms and atherosclerosis has been previously explored in distinct clinical scenarios with somewhat conflicting findings. A pioneer study by Ghilardi et al¹¹ have demonstrated that subjects who were homozygous for both the 6A (MMP-3) and 2G alleles (MMP-1) had an elevated relative risk of carotid artery stenosis in a small study of patients who underwent carotid endarterectomy. Subsequently, Ye et al¹⁰ have shown that subjects homozygous for the more transcriptionally active 2G allele of the MMP-1 gene had a reduced risk of coronary heart disease compared to homozygous for the less transcriptionally active 1G allele. In their study, involving 471 caucasian European men and women, the 5A/6A polymorphism in the MMP-3 gene was not associated to the risk of coronary artery disease. Our data suggest that ischemic etiology, previous acute myocardial infarction and left ventricular segmental abnormalities were more frequent in 2G allele carriers of the MMP-1 gene in HF patients. One could speculate that subjects with the more active genetic variant of the MMP-1 gene might have a reduced chance to develop atherosclerotic disease, as suggested by Ye et al; but whenever the atheroma is already present, the enhanced proteolytic activity could increase the risk of plaque instability and implicate in risk for acute events and ventricular dysfunction, as suggested by our findings.

Mizon-Gérard et al¹⁴ have studied the impact of the MMP-2 (-1306 C/T), MMP-3 (-1171 5A/6A) and MMP-9 (-1562 C/T) genetic polymorphisms in the prognosis of HF patients

with systolic dysfunction. These investigators have observed that the 5A5A genotype (MMP-3) was an independent predictor of cardiac mortality only in non-ischemic patients. Our findings regarding MMP3 -1171 5A/6A polymorphism were remarkably similar (Figure 2B). However, we did not replicate the significant impact of MMP-9 -1562 C/T on HF prognosis observed by Mizon-Gérard et al, as in our sample there was no association between this genetic variant and HF-related mortality. In present study, we have demonstrated, for the first time, a significant association of MMP-1 (-1607 1G/2G) polymorphism with cardiac mortality. Patients that were homozygous for the more transcriptionally active 2G allele of the MMP-1 gene had a substantially reduced HF-related mortality. The mechanism of this association has yet to be determined, as 2G allele carriers had similar left ventricular dimensions, similar prevalence of ventricular arrhythmias on Holter monitoring and received the same pharmacological treatment. Interestingly, besides the increased prevalence of ischemic etiology, a recognized marker for worse prognosis in HF, 2G allele carriers were also associated to a reduced QRS complex duration, a factor that could explain in part the relative favorable evolution of this subset of patients.^{30,31}

Some methodological aspects of our study deserve careful consideration. Considering the theoretical possibility that the associations observed in this analysis occurs only in specific ethnic groups, our results should be viewed with caution, as there is some degree of genetic admixture in the Caucasian-Brazilian population (~70% of our sample). However, the prevalence of the studied polymorphisms was similar to that reported in other European and American populations. As expected, our sample of apparently healthy controls was younger than our HF patients, as this subjects were derived from a blood donor clinic. We performed a

case-control analysis restricted to aged controls (>50 years old) and the results were not substantially altered (data not shown). Finally, it is well-recognized that the net final effect of isolated nucleotide polymorphisms might be outweighed by other compensatory or regulatory pathways. Measurements of MMPs serum levels or identification of MMPs tissue expression might also enhance the understanding of the processes involved in HF prognostication.

In conclusion, our data suggest that MMP-1 (-1607 1G/2G) polymorphism contributes to the variability of clinical presentation and to relevant clinical outcomes in HF patients. Further studies are needed to explore potential pharmacogenetic interactions of MMPs polymorphisms. Genetic studies involving different compensatory pathways^{32,33,34} can set the background for the development of the “so-called” individualized strategies to manage and treat HF.

FUNDING AND ACKNOWLEDGEMENTS

Supported in part by grants from *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* and *Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE-HCPA)*. There is no conflict of interest with this submission.

REFERENCES

- [1] Davis RC, Hobbs FDR, Lip GYH. ABC of heart failure: History and epidemiology. *BMJ* 2000;320:39-42.
- [2] Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002;90:520–530.
- [3] Fedak PWM, Verma S, Weisel RD, Li R. Cardiac remodeling and failure: From molecules to man (Part II). *Cardiovasc Pathol* 2005;14:49-60.
- [4] Creemers E, Cleutjens J, Smits J, Daemen M. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction. A new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001;89:201–210.
- [5] Spinale FG. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms in heart failure: new pieces to the myocardial matrix puzzle. *Eur Heart J* 2004;25:631–633.
- [6] White AJ, Duffy SJ, Walton AS, Ng JF, Rice GE, Mukherjee S, *et al.* Matrix metalloproteinase-3 and coronary remodelling: implications for unstable coronary disease. *Cardiovasc Res* 2007;75:813–820.
- [7] Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem* 1996;271:13055–13060.

- [8] Dunleavy L, Beyzade S, Ye S. Rapid genotype analysis of the matrix metalloproteinase-1 gene 1G 2G polymorphism that is associated with risk of cancer. *Matrix Biol* 2000;19:175–177.
- [9] Ye S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovasc Res* 2006;69:636–645.
- [10] Ye S, Gale CR, Martyn N. Variation in the matrix metalloproteinase-1 gene and risk of coronary heart disease. *Eur Heart J* 2003;24:1668-1671.
- [11] Ghilardi G, Biondi ML, DeMonti M, Turri O, Guagnellini E, Scorza R. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-3 gene promoter polymorphisms are associated with carotid artery stenosis. *Stroke* 2002;33:2408-2412.
- [12] Martin TN, Penney DE, Smith JA, Groenning BA, Dargie HJ, Hillis GS. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphisms and changes in left ventricular volume following acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004;94:1044–1046.
- [13] Tang L, Chen X, Zhu M, Jiang JJ, Lu XB, Du YX, *et al.* Matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 gene polymorphisms and the risk of idiopathic dilated cardiomyopathy in Chinese Han population. *Clin Biochem* 2007;40:1427-1430.
- [14] Mizon-Gerard F, Groote P, Lamblin N, Hermant X, Dallongeville J, Amouyel P, *et al.* Prognostic impact of matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with heart failure according to the aetiology of left ventricular systolic failure according to the aetiology of left ventricular systolic dysfunction. *Eur Heart J* 2004;25:688–693.
- [15] Haberbosch W, Gardemann A. Gelatinase B C(-1562) T polymorphism in relation with ischemic heart disease. *Scand J Clin Lab Inves* 2005;65:513-522.

- [16] Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5444.
- [17] Dunleavy L, Beyzade S, Ye S. Rapid genotype analysis of the stromelysin gene 5A/6A polymorphism. *Atherosclerosis* 2000;151:587–589.
- [18] Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, De Maat M, Evans A *et al.* Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1788-1794.
- [19] Stephens, M. & Scheet, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 449-462.
- [20] Stephens, M., Smith, N. J. & Donnelly, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;68: 978-989.
- [21] Hedrick, P. W. Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. *Genetics* 1987;117: 331-341.
- [22] D' Armiento J. Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction. *TCM* 2002;12:97–101.
- [23] Lee RT. Matrix metalloproteinase inhibition and the prevention of heart failure. *TCM* 2001;11:202–205.
- [24] Felkin LE, Birks EJ, George R, Wong S, Khaghani A, Yacoub MH, *et al.* A quantitative gene expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the myocardium of patients with deteriorating heart failure requiring left ventricular assist device support. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:1413-1419.

- [25] Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, Aikawa M, Sukhova GH, Lopez-Anaya A, McClure KF, Mitchell PG, Libby P, Lee RT. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation*. 1999;99:3063-70.
- [26] Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinases inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res*. 2001;89:201-10.
- [27] Dalepiane VLN, Silvello DN, Paludo CA, Roisenberg I, Simon D. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with coronary artery disease. *Genet Mol Biol* 2007;30:505-510.
- [28] Horne BD, Camp NJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, Kolek MJ, Nicholas ZP, *et al*. Multiple-polymorphism associations of 7 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor metalloproteinase genes with myocardial infarction and angiographic coronary artery disease. *Am Heart J* 2007;154:751–758.
- [29] Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, *et al*. Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Int J Cardiol* 2003;92:181-186.
- [30] De Winter O, Van de Veire N, Van Heuverswijn F, Van Pottelberge G, Gillebert TC, De Sutter J. Relationship between QRS duration, left ventricular volumes and prevalence of nonviability in patients with coronary artery disease and severe left ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail* 2006;8:275-277.

- [31] Attar MN, Wong K, Groves DG, Newall N, Ramsdale DR, Moore RK. Clinical implications of QRS duration and QT peak prolongation in patients with suspected coronary disease referred for elective cardiac catheterization. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2008;13:106-112.

Table 1 - Allele and genotype frequencies of matrix metalloproteinase (MMP) gene polymorphisms in heart failure patients and control individuals.

	All patients	Non-ischemic etiology	Ischemic etiology	Controls
MMP-1				
N	313	195	118	367
Genotype frequency				
1G1G	68 (22)	52 (27)	17 (14)	93 (25)*
1G2G	157 (50)	88 (45)	69 (59)	174 (48)
2G2G	87 (28)	55 (28)	32 (27)	100 (27)
Allele frequency				
1G	0.47	0.49	0.44	0.49
2G	0.53	0.51	0.56	0.51
MMP-3				
N	306	193	113	366
Genotype frequency				
5A5A	49 (16)	31 (16)	18 (16)	54 (15)
5A6A	148 (48)	97 (50)	51 (45)	184 (50)
6A6A	109 (36)	65 (34)	44 (39)	128 (35)
Allele frequency				
5A	0.40	0.41	0.38	0.40
6A	0.60	0.59	0.62	0.60

MMP-9

N	307	193	114	359
Genotype frequency				
CC	250 (81)	159 (82)	91 (80)	280 (78)
CT	54 (18)	31 (16)	23 (20)	75 (21)
TT	3 (1)	3 (2)	0 (0)	4 (1)
Allele frequency				
C	0.90	0.90	0.90	0.88
T	0.10	0.10	0.10	0.12

Results are presented as absolute numbers and percentages in parentheses.

* p value < 0.05 for comparison with ischemic patients adjusted for sex, age and ethnic group.

All others comparisons were non significant.

Table 2 - Clinical characteristics of HF patients according to MMP-1 gene polymorphism.

Variable	MMP-1			<i>p</i> value
	Overall N = 312	1G1G N = 68	2G carriers N = 244	
Age (years)	61 ± 13	62 ± 13	59 ± 12	0.18
Males (%)	215 (69)	48 (71)	167 (68)	0.73
Caucasian (%)	220 (70)	55 (81)	165 (68)	0.05
Heart failure etiology (%)				
Ischemic	118 (38)	17 (25)	101 (41)	0.014
Idiopathic	91 (29)	30 (44)	61 (25)	0.002
Hypertensive	73 (23)	16 (24)	57 (23)	0.97
NYHA class I-II (%)	238 (78)	52 (78)	186 (78)	> 0.99
Hypertension (%)	183 (59)	36 (53)	147 (60)	0.28
Diabetes mellitus (%)	93 (30)	20 (30)	73 (30)	0.93
Obesity (%)	50 (16)	13 (20)	37 (15)	0.43
Current smoking (%)	38 (12)	7 (10)	31 (13)	0.59
Hypercholesterolemia (%)	93 (30)	13 (20)	80 (34)	0.029
Acute myocardial infarction (%)	101 (32)	13 (19)	88 (36)	0.008
CABG (%)	34 (11)	8 (12)	26 (11)	0.97
Stroke (%)	23 (7.4)	5 (7.4)	18 (7.4)	>0.99
Systolic blood pressure (mmHg)	125 ± 24	124 ± 22	125 ± 24	0.866
Creatinine (mg/dL)	1.29 ± 0.47	1.24 ± 0.47	1.30 ± 0.46	0.283
Sodium (mEq/L)	140.4 ± 3.4	140.5 ± 3	140.4 ± 3.5	0.84
Hemoglobin (mg/dl)	13.1 ± 1.7	13.3 ± 1.5	13.04 ± 1.7	0.28
Electrocardiogram				
QRS duration (ms)	129 ± 35	142 ± 38	125 ± 33	0.001
Atrial fibrillation (%)	57 (19)	16 (24)	41 (17)	0.230

Echocardiography				
LV diastolic diameter (cm)	5.58 ± 1.1	5.75 ± 1.00	5.54 ± 1.1	0.230
LV ejection fraction (%)	31 ± 8	30 ± 8	32 ± 8.3	0.171
Regional left ventricle dysfunction (%)	100 (34)	12 (19)	88 (38)	0.006
Left Atrium (cm)	4.78 ± 0.8	4.85 ± 0.8	4.75 ± 0.8	0.39
24-hour Holter monitoring*				
Non-sustained VT (%)	107 (42)	30 (48)	77 (40)	0.267
SDNN (ms)	109 ± 44	102 ± 390	111 ± 46	0.285
Medications (%)				
ACE inhibitors	284 (88)	59 (87)	215 (88)	0.955
Beta-blockers	269 (88)	60 (86)	209 (86)	0.687
Diuretics	271 (89)	56 (85)	215 (90)	> 0.99
Spirolactone	113 (37)	26 (39)	87 (36)	0.763

Data expressed as means ± standard deviation or absolute numbers (percentages).

NYHA – New York Heart Association; CABG –coronary artery bypass graft; LV – left ventricular; VT – ventricular tachycardia; SDNN – standard-deviation of RR intervals; ACE – angiotensin-converting enzyme.

* data available for 257 patients.

Table 3 - Clinical characteristics of HF patients according to MMP-3 gene polymorphism.

Variable	MMP-3			p value
	Overall N = 306	6A6A N = 109	5A carriers N = 197	
Age (years)	60 ± 13	61 ± 12	59 ± 13	0.27
Males (%)	209 (68)	78 (72)	131 (66)	0.36
Caucasian (%)	216 (71)	72 (66)	144 (73)	0.009
Heart failure etiology (%)				
Ischemic	113 (44)	37 (40)	44 (40)	
Idiopathic	89 (29)	25 (23)	32 (23)	
Hypertensive	73 (24)	30 (27)	43 (22)	
NYHA class I and II (%)	234 (78)	86 (81)	148 (76)	> 0.99
Hypertension (%)	180 (59)	68 (62)	112 (57)	0.35
Diabetes mellitus (%)	93 (30)	28 (26)	65 (33)	0.18

Obesity (%)	50 (16)	15 (14)	35 (18)	0.36
Current smoking (%)	38 (12)	17 (16)	21 (11)	0.21
Hypercholesterolemia (%)	80 (29)	29 (27)	61 (31)	0.42
Past myocardial infarction (%)	97 (32)	36 (33)	61 (31)	0.71
CABG (%)	33 (11)	11 (10)	22 (11)	0.77
Stroke (%)	26 (8,5)	8 (7,3)	18 (9)	0.59
Systolic blood pressure (mmHg)	124 ± 24	126 ± 24	124 ± 24	0.48
Creatinine (mg/dL)	1.29 ± 0.47	1.31 ± 0.49	1.26 ± 0.43	0.16
Sodium (mEq/L)	140.4±3.4	140.3±3.7	140.4±3.2	0.76
Hemoglobin (mg/dl)	13.1±1.7	13±1.8	13.1±1.7	0.65
Electrocardiogram				
QRS duration (ms)	129 ± 35	122 ± 32	131 ± 35	0.041
Atrial fibrillation (%)	55 (18)	17 (16)	38 (20)	0.92
Echocardiography				
LV diastolic diameter (cm)	5.58 ± 1.1	5.4 ± 1.1	5.66± 1.0	0.04
LV ejection fraction (%)	31 ± 8	31 ± 7.7	31 ± 8.5	0.79
Regional left ventricle dysfunction (%)	97 (33)	39 (37)	58 (31)	0.26
Left Atrium (cm)	4.8±0.8	4.7±0.8	4.8±0.8	0.07
24-hour Holter monitoring*				
Non-sustained VT (%)	103 (41)	39 (45)	64 (39)	0.32
SDNN (ms)	109 ± 44	118 ± 45	103 ± 43	0.039
Medications (%)				
ACE inhibitors	268 (88)	98 (90)	170 (86)	0.77
Beta-blockers	264 (86)	95 (87)	169 (86)	0.74
Diuretics	172 (90)	66 (92)	106 (89)	0.74
Spironolactone	70 (37)	27 (37)	43 (36)	0.94

Data are expressed as means ± standard deviation or absolute numbers (percentages).

NYHA – New York Heart Association; CABG –coronary artery bypass graft; LV – left ventricular; VT – ventricular tachycardia; SDNN – standard-deviation of RR intervals; ACE – angiotensin-converting enzyme.

* data available for 251 patients.

Table 4 – Clinical characteristics of HF patients according to MMP-9 gene polymorphism.

Variable	MMP-9			<i>p</i> value
	Overall N = 307	CC N = 250	T carriers N = 57	
Age (years)	60 ± 13	60 ± 13	59 ± 13	0.36
Males (%)	211 (69)	171 (68)	40 (70)	0.92
Caucasian (%)	217 (71)	174 (70)	43 (75)	0.48
Heart failure etiology (%)				
Ischemic	114 (37)	91 (36)	23 (40)	0.68
Idiopathic	90 (29)	76 (30)	14 (25)	0.47
Hypertensive	72 (23)	60 (24)	12 (21)	0.76
NYHA class I and II (%)	234 (78)	190 (78)	44 (79)	> 0.99
Hypertension (%)	179 (58)	144 (58)	35 (61)	0.71
Diabetes mellitus (%)	91 (30)	71 (28)	20 (35)	0.40
Obesity (%)	50 (16)	43 (17)	7 (12)	0.48
Current smoking (%)	38 (12)	34 (14)	4 (7)	0.25
Hypercholesterolemia (%)	90 (29)	75 (30)	15 (26)	0.70
Acute myocardial infarction (%)	98 (32)	76 (30)	22 (39)	0.30
CABG (%)	33 (10.7)	27 (10.8)	6 (10.5)	>0.99
Stroke (%)	24 (7.8)	19 (7.6)	5 (8.8)	0.98
Systolic blood pressure (mmHg)	125 ± 24	125 ± 24	123 ± 23	0.55
Creatinine (mg/dL)	1.29 ± 0.47	1.31 ± 0.49	1.26 ± 0.43	0.33
Sodium (mEq/L)	140.4 ± 3.4	140.5 ± 3.2	139.9 ± 4.0	0.22
Hemoglobin (mg/dl)	13.08 ± 1.7	13.07 ± 1.7	13.3 ± 1.4	0.41
Electrocardiogram				
QRS duration (ms)	129 ± 34	131 ± 35	118 ± 29	0.011
Atrial fibrillation (%)	56 (18)	47 (19)	9 (16)	0.69

Echocardiography				
LV diastolic diameter (cm)	6.6 ± 1.0	6.6 ± 0.9	6.6 ± 1.2	0.51
Left ventricular ejection fraction (%)	31 ± 8	31 ± 8	32 ± 9	0.43
Regional left ventricle dysfunction (%)	97 (33)	77 (32)	20 (36)	0.70
Left Atrium (cm)	4.77 ± 0.8	4.78 ± 0.8	4.7 ± 1	0.54
24-hour Holter monitoring*				
Non-sustained VT (%)	104 (41)	91 (43)	13 (32)	0.28
SDNN (ms)	110 ± 45	109 ± 45	113 ± 43	0.72
Medications (%)				
ACE inhibitors	269 (88)	220 (88)	49 (86)	0.84
Beta-blockers	269 (88)	219 (88)	50 (88)	> 0.99
Diuretics	290 (94)	236 (94)	54 (95)	> 0.99
Spironolactone	117 (38)	91 (36)	26 (46)	0.25

Data are expressed as means ± standard deviation or absolute numbers (percentages).

NYHA – New York Heart Association; CABG –coronary artery bypass graft; LV – left ventricular; VT – ventricular tachycardia; SDNN – standard-deviation of RR intervals; ACE – angiotensin-converting enzyme.

* data available for 251 patients.

Table 5 – Independent predictors of ischemic etiology in multiple regression analysis

Variable	OR	95% CI	<i>p</i> value
MMP-1 2G carriers	2.14	1.1 – 4.15	0.024
Age (years)	1.03	1.01 – 1.05	0.006
Hypercholesterolemia	2.76	1.58 – 4.8	< 0.001
Diabetes mellitus	3.04	1.75 – 5.3	< 0.001
Diastolic blood pressure (mmHg)	0.97	0.95 – 0.99	0.002

OR, Odds ratio; CI, confidence interval

Table 6. Univariate analysis and Cox proportional hazard model for HF-related mortality.

Variable	Univariate Analysis			Adjusted Model 1*			Adjusted Model 2 *		
	OR	95% CI	<i>p</i> value	OR	95% CI	<i>p</i> value	OR	95% CI	<i>p</i> value
SAS Functional Class III or IV	2.9	1.7-5.0	<0.001	2.4	1.3-4.2	0.003	2.2	1.2-4.0	0.008
SAP, each 1 mmHg	0.98	0.96-0.99	<0.001	0.98	0.97-0.99	0.01	0.99	0.97-1.0	0.06
Creatinine, each 1mg/dL	2.0	1.2-3.1	0.005	1.6	0.98-2.7	0.06	1.4	0.8-2.3	0.25
Sodium, each 1 mEq/L	0.85	0.8-0.9	<0.001	0.85	0.79-0.92	<0.001	0.84	0.78-0.92	<0.001
QRS duration, each 10 ms	1.2	1.1-1.3	<0.001	--	--	--	1.1	1.01-1.19	0.02
LV diastolic diameter, each 1 mm	1.5	1.2-1.9	0.002	1.4	1.04-1.8	0.03	1.2	0.9-1.6	0.26
MMP-1 2G carriers	2.2	1.3-3.8	0.003	2.1	1.2-3.6	0.01	1.5	0.84-2.7	0.16

SAS – Specific activity scale; SAP – systolic arterial pressure; LV – left ventricle; MMP – matrix metalloproteinase.

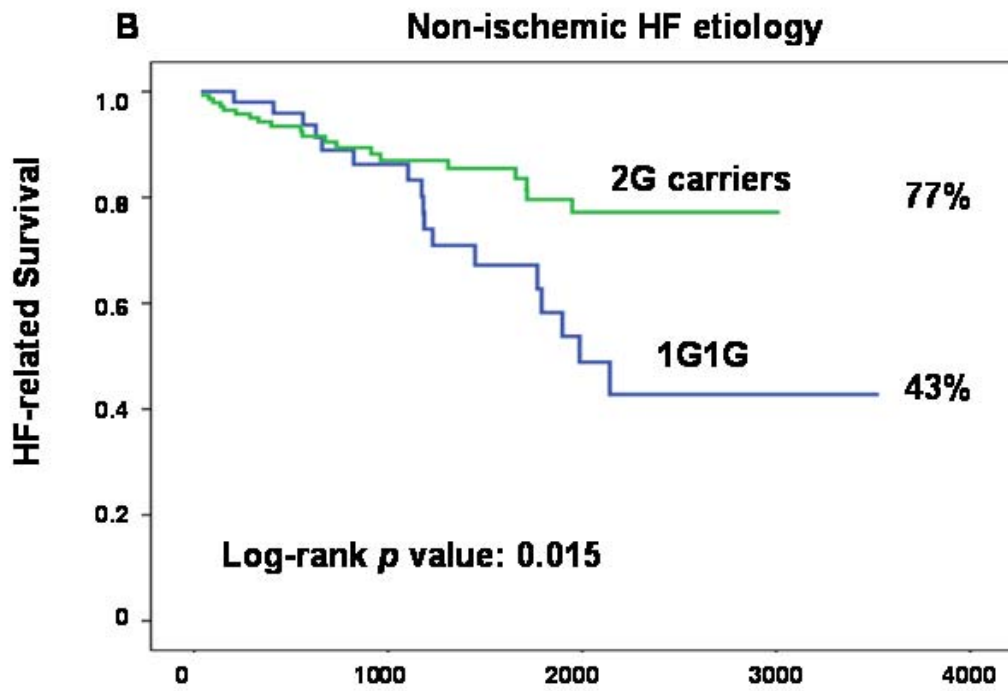
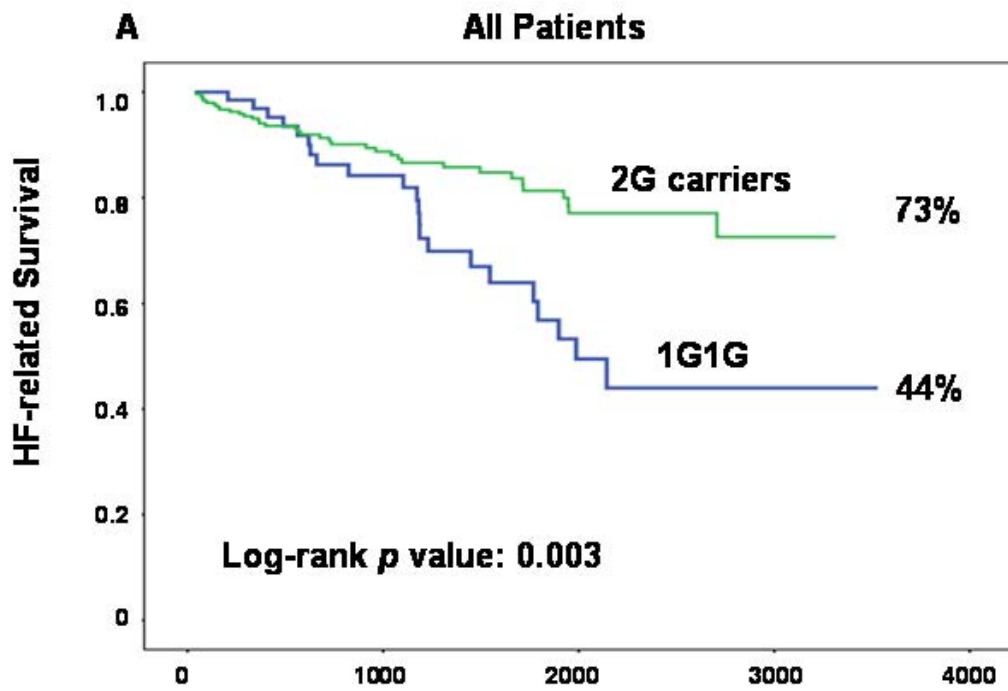
Model 1 was not adjusted for QRS duration; Model 2 was adjusted for all variables.

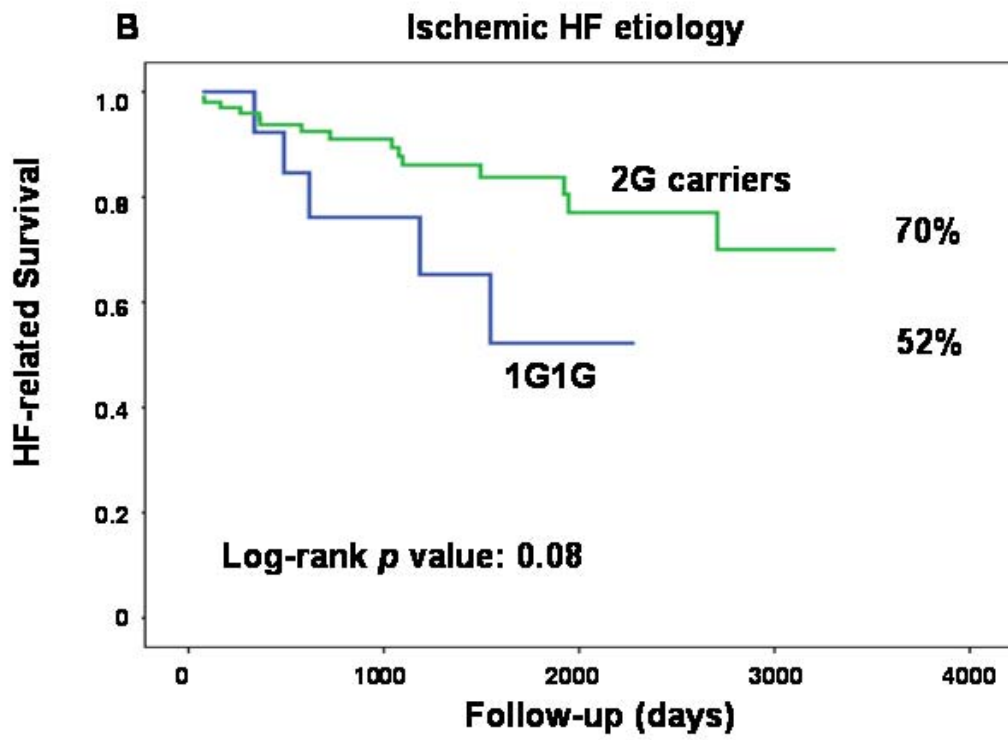
FIGURE LEGENDS

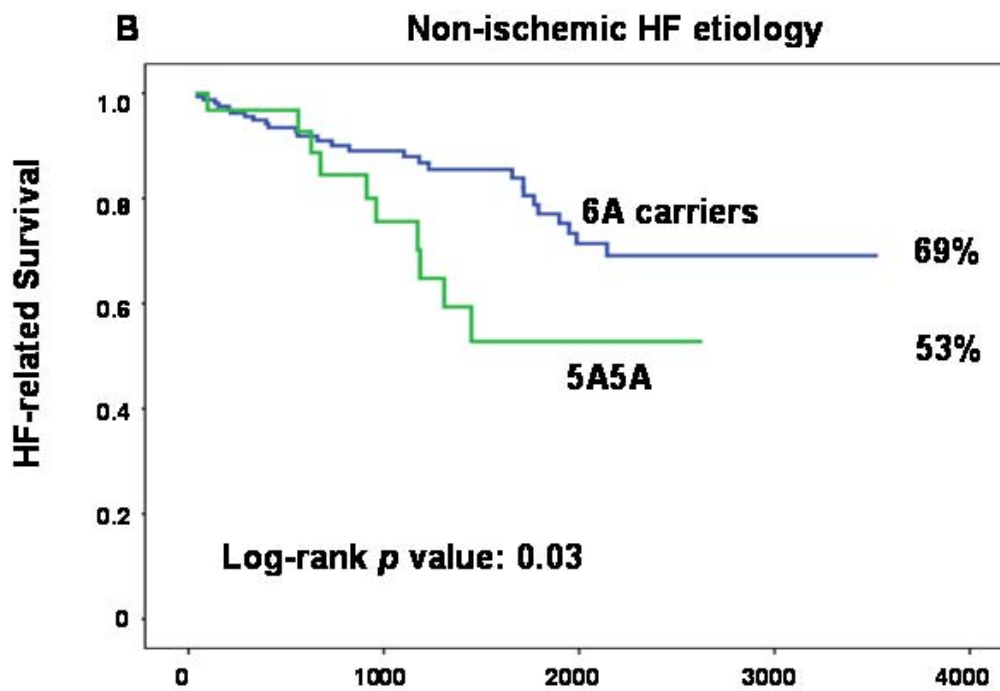
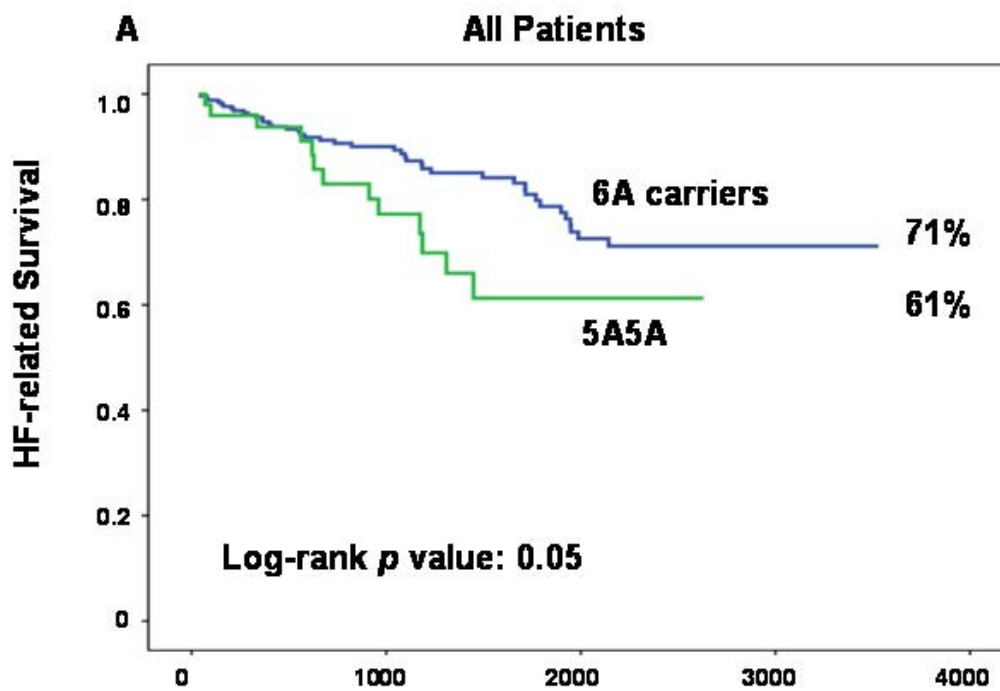
Figure 1 - Kaplan-Meier survival curves comparing HF patients with 1G1G genotype (MMP-1 polymorphism) and 2G allele carriers (A – all HF patients; B – non-ischemic etiology; C – ischemic etiology).

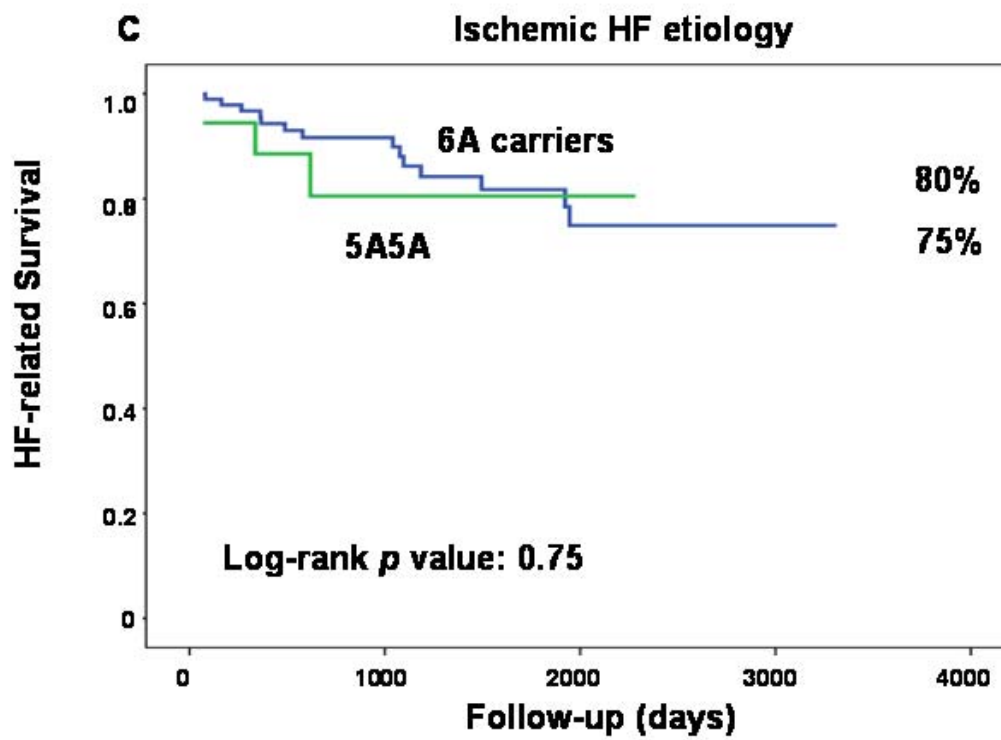
Figure 2 - Kaplan-Meier survival curves comparing HF patients with 5A5A genotype (MMP-3 polymorphism) and 6A allele carriers (A – all HF patients; B – non-ischemic etiology; C – ischemic etiology).

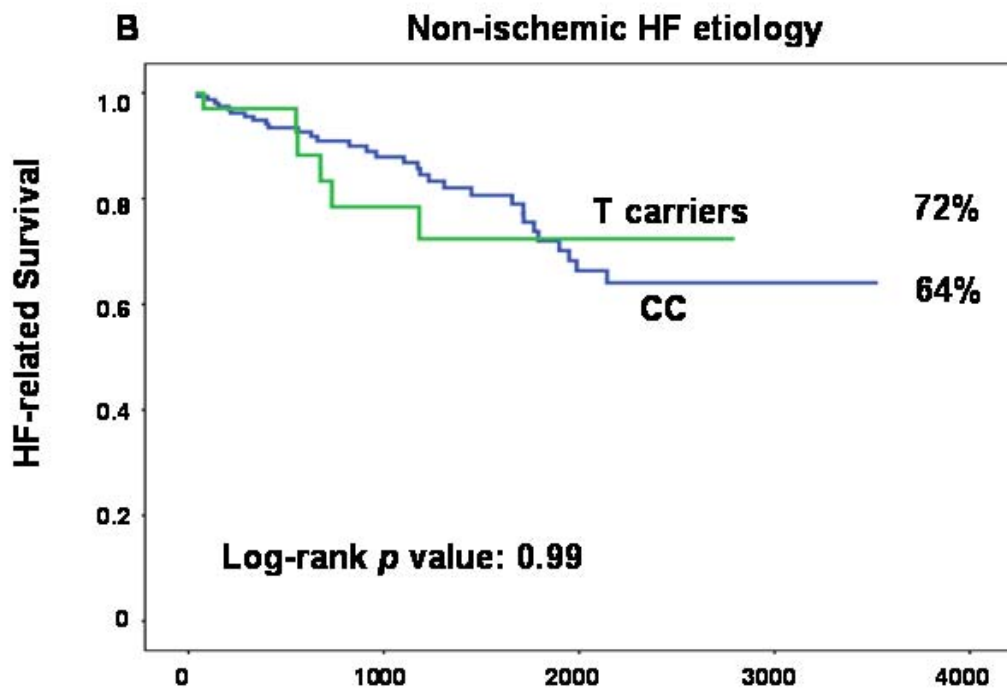
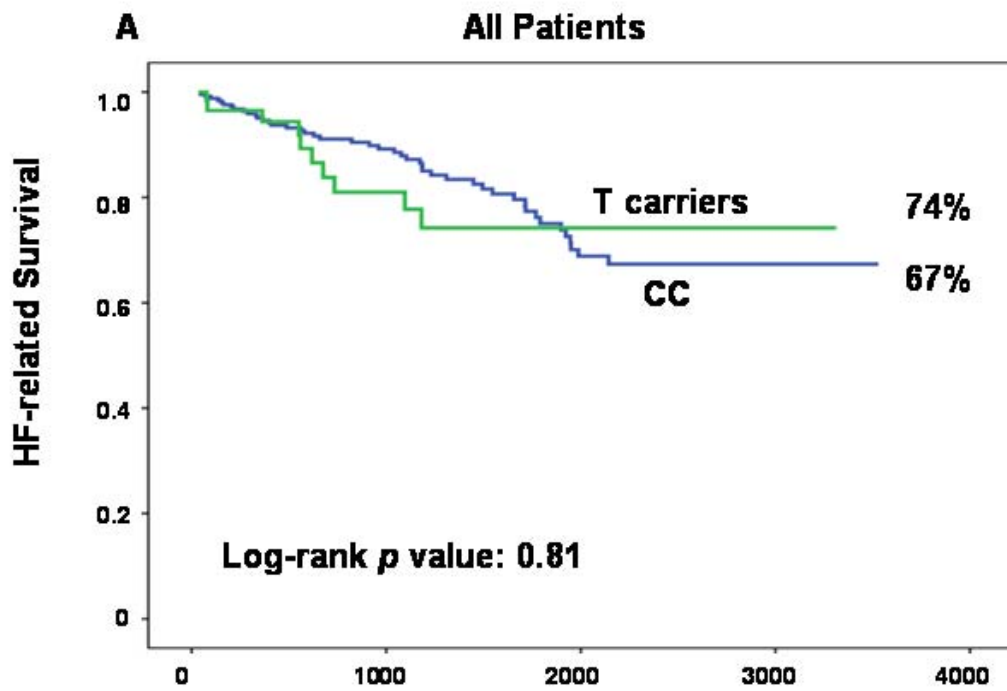
Figure 3 - Kaplan-Meier survival curves comparing HF patients with CC genotype (MMP-9 polymorphism) and T allele carriers (A – all HF patients; B – non-ischemic etiology; C – ischemic etiology).

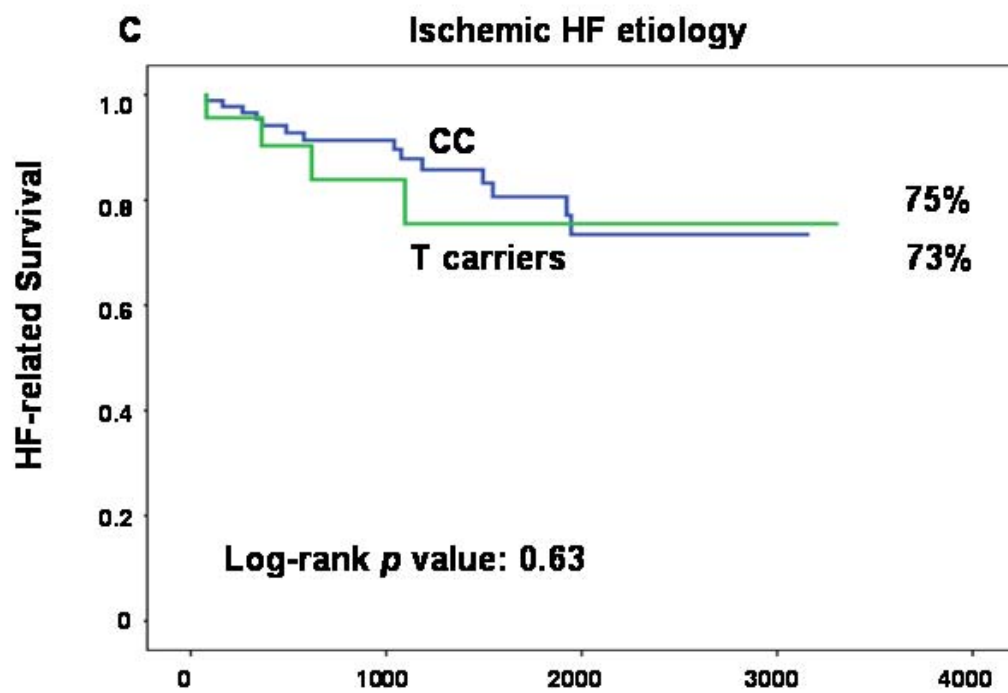












ANEXOS

Anexo 1. Termo de Consentimento Informado

Prezado Sr/a:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver um problema no coração chamado insuficiência cardíaca. Os polimorfismos são alterações que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Como o Sr/a tem insuficiência cardíaca, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso – 10 ml de sangue – na ocasião de sua entrada no estudo. Após, estaremos registrando novamente estas informações nas suas próximas consultas. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 3 polimorfismos em genes responsáveis pela regulação da função cardíaca, que podem estar associadas ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca e à forma com que ela se apresenta. Se o Sr/a concordar, armazenaremos as amostras para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na escolha mais individualizada dos medicamentos, com mais benefícios para os pacientes e menores custos no tratamento da insuficiência cardíaca. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o Sr/a.

O Sr/a é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são o Dr. Luiz Eduardo Paim Rohde, a Dra. Nadine Clausell, a Dra. Andréia Biolo e o Dr. Fábio Michalski Velho (fone para contato com os pesquisadores 21018344), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data

Paciente ou responsável:

Nome

Assinatura

Anexo 2. Ficha de Registro Ambulatorial de Pacientes com Insuficiência Cardíaca

GRUPO DE ICC - HCPA

Nome: _____
Prontuário: _____
Endereço: _____
Telefone: 1) _____ 2) _____
Data de nascimento: ___/___/_____
Sexo: () fem () masc
Cor: () branco () pardo () preto

HISTÓRIA
Duração da IC: _____ meses
Idade de início da IC: _____ anos
No. Internações por IC: _____
Etiologia:
() isquêmica
() idiopática
() hipertensiva
() alcoólica
() valvular
() pós-parto
() pós-QMT
() outra: _____
() Cardiopatia isquêmica
() Angina atual () IAM
() CRM () ACTP/stent
() Síncope () AVE
() Vasculopatia periférica
() Marcapasso permanente
() Dislipidemia () Obesidade
() DM () HAS
() Tabagismo: _____ anos-maço
() Tabagismo atual
() Uso abusivo de álcool () Atual

COMORBIDADES CHARLSON
() DPOC () d renal mod/grave
() d. cerebrovascular () neoplasia
() demência () neo metastática
() úlcera péptica () SIDA
() d. tecido conjuntivo () linfoma/leucemia
() d. hepática leve () d. hepática mod/sev
() d. vascular periférica
() DM com lesão em órgão-alvo

REGISTRO GERAL: _____

REGISTRO POLIMORFISMOS: _____

- () **excluído** () etiologia
() FE > 45%
() recusa
() diálise
() SCA últimos 3 meses
() SIDA em uso ARVs
() neoplasia não-curada
() _____

CHECKLIST
() Registro Data: _____
() Coleta Data: _____
() Holter Data: _____
() Ecocardio Data: _____
() Etiologia definida Data: _____
() Seguimento 1 ano Data prevista: _____
() Consulta de seguimento marcada Data da consulta: _____

Anexo 3. Ficha de seguimento clínico.

Óbito: Data ___ / ___ / ___ Causa () _____

- Causa do óbito:
1. Morte súbita
 2. Progressão da ICC
 3. Infarto do miocárdio
 4. Outra causa cardíaca
 5. Não cardíaca conhecida
 6. Desconhecida.

DATA	Tipo do Evento	Causa do evento	Descrição / Observações
Evento/Admissão: ___ / ___ / _____ Alta: ___ / ___ / _____			
Evento/Admissão: ___ / ___ / _____ Alta: ___ / ___ / _____			
Evento/Admissão: ___ / ___ / _____ Alta: ___ / ___ / _____			
Evento/Admissão: ___ / ___ / _____ Alta: ___ / ___ / _____			

- Tipo de evento:
1. Visita à Emergência
 2. Internação
 3. Síncope

Motivo da internação ou visita à emergência / internação:

1. ICC
2. Intoxicação digitalica
3. Síncope
4. IAM com supra
5. IAM sem supra
6. Angina instável
7. Bradiarritmia
8. Taquiarritmia supraventricular
9. Taquiarritmia ventricular
10. Desidratação
11. Outra causa cardíaca
12. Outra causa não cardíaca
13. Desconhecida