

VANESSA DE ALMEIDA BELO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE HAPLÓTIPOS DE
METALOPROTEINASE-9 DE MATRIZ EXTRACELULAR
(MMP-9) E OBESIDADE INFANTIL:
efeitos sobre a concentração plasmática de MMP-9**

CAMPINAS

Unicamp

2011

VANESSA DE ALMEIDA BELO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE HAPLÓTIPOS DE
METALOPROTEINASE-9 DE MATRIZ EXTRACELULAR
(MMP-9) E OBESIDADE INFANTIL:
efeitos sobre a concentração plasmática de MMP-9**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ EDUARDO TANUS DOS SANTOS

CAMPINAS

Unicamp

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso - CRB-8ª / 6652

B418a Belo, Vanessa de Almeida
 Associação entre haplótipos de metaloproteinase-9 de matriz
 extracelular (MMP-9) e obesidade infantil: efeitos sobre a
 concentração plasmática de MMP-9. / Vanessa de Almeida
 Belo. -- Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: José Eduardo Tanus dos Santos
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Metaloproteinase da matriz. 2. Polimorfismo.
3. Haplótipos. 4. Farmacogenética. 5. Aterosclerose. I. Santos,
José Eduardo Tanus dos. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em Inglês: Association between haplotypes of matrix metalloproteinase-9 extracellular matrix (MMP-9) and childhood obesity: effects on plasma concentration of MMP-9

Keywords: • Matrix metalloproteinase
 • Polymorphism
 • Haplotype
 • Pharmacogenetic
 • Atherosclerosis

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Prof. Dr. José Eduardo krieger

Prof. Dr. Antônio Casella Filho

Prof. Dr. Lício Velloso

Prof. Dr. Maria de Fátima Sonati

Data da defesa: 16.03.2011

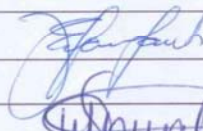
Banca Examinadora de Tese de Doutorado

Vanessa de Almeida Belo

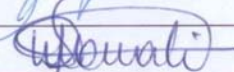
Orientador(a)(a): Prof(a). Dr(a). José Eduardo Tanus dos Santos

Membros:

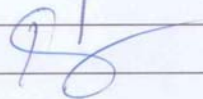
Professor (a) Doutor (a) José Eduardo Tanus dos Santos



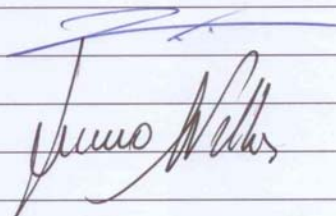
Professor (a) Doutor (a) Maria de Fátima Sonati



Professor (a) Doutor (a) José Eduardo Krieger



Professor (a) Doutor (a) Antonio Casella Filho



Professor (a) Doutor (a) Lício Augusto Velloso

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16/03/2011

*Aos meus pais,
os pilares,
as vigas,
o porto seguro.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a Ele, toda honra e toda glória.

Agradeço a minha mãe, Isa, minha luz e inspiração, e ao meu pai, Claudio, cuja força e estímulo me fizeram crer neste sonho. Minha esperança vem de vocês e em vocês mora a força que carrego.

Aos meus irmãos, Claudinho e Mariana, pelo orgulho que sempre demonstraram diante das minhas conquistas.

Agradeço ao meu afilhado, Ricardo, a coisinha mais preciosa da madrinha.

Ao Sandro, meu melhor amigo e incentivador.

Aos meus avós, tias e primos que entenderam minha ausência e se fizeram presentes com incentivo e carinho.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr. José Eduardo Tanus dos Santos por ter me recebido tão bem em seu laboratório desde o primeiro dia, por acreditar no meu potencial e, principalmente, pelo exemplo de conduta séria na vida acadêmica.

Gostaria de agradecer imensamente a Dra. Débora Cristine Souza-Costa, sem a ajuda dela, não teria tido a oportunidade de desenvolver este projeto.

Agradeço também a grande colaboradora Dra. Carla Moreira Lanna que recrutou nossos voluntários, trabalho de especial importância.

Agradeço ao Marcelo Luizon, pela colaboração nas análises estatísticas e pelos ensinamentos de genética.

À companheira de bancada Patrícia Cândido Carneiro e aos colaboradores da Embrapa e da Fundação IMEPEN de Juiz de Fora.

Sou grata ainda aos voluntários do projeto, minhas crianças, por elas e para elas este trabalho foi realizado.

Agradeço a todos os meus amigos do laboratório, que se fizeram meu 2º lar; em especial as amigas Valzinha, Joice e Flávia - pela cumplicidade e amizade que perdurará - e ao amigo Alisson pela alegria proporcionada.

Agradeço à amiga Pâmela, pelas conversas e cumplicidade e à amiga Lorena pelos momentos tão especiais compartilhados.

Gostaria de agradecer à FAPESP pelo apoio financeiro, o qual custeou minha bolsa de doutorado e permitiu minha participação em Congressos nacionais e internacionais que ampliaram meu conhecimento e visão de mundo.

Por último, gostaria de agradecer aos membros da banca examinadora pelas preciosas sugestões e considerações a fim de enriquecer este trabalho.

*Se fui capaz de ver mais longe
é porque me apoiei em ombros de gigantes.*

(Isaac Newton)



RESUMO

A obesidade em crianças e adolescentes constitui-se num importante fator de risco para doenças cardiovasculares, em especial, aterosclerose. Esta condição é caracterizada por acúmulo de lipídeos e elementos fibrosos em artérias de grande calibre em que mecanismos inflamatórios e remodelamento vascular estão envolvidos. Neste contexto, a metaloproteinase-9 de matriz extracelular (MMP-9) - endopeptidase capaz de degradar componentes da matriz extracelular - e seu inibidor endógeno preferencial, inibidor tecidual de MMP (TIMP-1) são importantes mediadores deste remodelamento e um equilíbrio entre MMP-9 e TIMP-1 deve existir a fim de manter a integridade do sistema cardiovascular. Ademais, níveis aumentados de MMP-9 são observados em pacientes com doenças cardiovasculares e estudos genéticos têm mostrado ainda que polimorfismos funcionais no gene da MMP-9 têm sido relacionados à presença e severidade de doenças cardiovasculares. Contudo, ainda não se sabe como a associação desses polimorfismos com a obesidade infantil pode afetar as concentrações de MMP-9 no plasma. Logo, os objetivos desse trabalho foram: **1)** comparar as concentrações plasmáticas de MMP-9, TIMP-1 e razão MMP-9/TIMP-1 (atividade líquida da MMP-9) entre crianças e adolescentes obesos e controles; **2)** comparar as frequências genótípicas e haplotípicas dos polimorfismos C⁻¹⁵⁶²T, -90(CA)₁₄₋₂₄ e Q279R da MMP-9 entre obesos e controles e **3)** correlacionar as concentrações de MMP-9 aos genótipos e haplótipos da MMP-9. Inicialmente, determinaram-se os níveis de pro-MMP-9 e no plasma, por zimografia, e as concentrações plasmáticas de MMP-9 e TIMP-1 em obesos e controles por ELISA. Nós não encontramos diferenças nas concentrações plasmáticas de MMP-9 e razão MMP-9/TIMP-1 entre obesos e controles. No entanto, nossos resultados revelaram que em obesos houve diminuição de TIMP-1. Em seguida, extraiu-se o DNA dos voluntários e determinaram-se as frequências genótípicas dos polimorfismos C⁻¹⁵⁶²T e (CA)_n, por PCR seguida de eletroforese, do polimorfismo Q279R, por PCR em tempo real, e as frequências haplotípicas, pelo programas PHASE. Não houve diferenças nas frequências genótípicas e haplotípicas entre os grupos. Nós avaliamos a relevância de diferentes genótipos e haplótipos nas concentrações plasmáticas de MMP-9. Para os polimorfismos C⁻¹⁵⁶²T e Q279R,

nós encontramos que no grupo de obesos, portadores dos genótipos CC apresentaram menores níveis de MMP-9 quando comparados aos portadores dos genótipos CT+TT e aos controles com mesmo genótipo. No grupo de obesos, portadores do genótipo QQ apresentaram menores níveis de MMP-9 quando comparados aos portadores do genótipo RR e aos controles com mesmo genótipo. Para o polimorfismo -90(CA)₁₄₋₂₄, não observamos diferenças nos níveis de MMP-9 entre os grupos genotípicos. Em relação aos haplótipos, no grupo de obesos, portadores do haplótipo H2 apresentaram menores concentrações de MMP-9 e da razão MMP-9/TIMP-1 (atividade líquida de MMP-9) quando comparados aos outros haplótipos e aos controles com mesmo haplótipo. No grupo controle, não observamos influência dos genótipos e haplótipos nas concentrações plasmáticas de MMP-9. Portanto, nossos achados que sugerem que genótipos (CC e QQ) e o haplótipo H2 podem diminuir os níveis circulantes de MMP-9 em crianças e adolescentes obesos, mas não em crianças saudáveis, conseqüentemente, estes genótipos e haplótipo poderiam oferecer proteção contra doenças cardiovasculares somente em crianças obesas.

Palavras-chave: Metaloproteinase da matriz, polimorfismo, haplótipos, farmacogenética, aterosclerose.



ABSTRACT

The childhood obesity is important risk factor for cardiovascular diseases, in particular, atherosclerosis. This condition is characterized by the accumulation of lipids and fibrous elements in the large arteries in which inflammatory mechanisms and vascular remodeling are involved. In this context, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) - endopeptidase capable of degrading components of extracellular matrix - and its endogenous inhibitor preferential, the tissue inhibitors of MMP (TIMP-1) are important mediators of this remodeling and a critical equilibrium between MMP-9 and TIMP-1 must exist in order to maintain the integrity of cardiovascular system. Moreover, elevated levels of MMP-9 have been reported in patients with cardiovascular diseases, and genetic studies showing that functional polymorphism MMP-9 gene were related to presence and severity of cardiovascular diseases. However, it remains unclear how the association of these polymorphisms with childhood obesity can affect MMP-9 plasma concentrations. Thus, the objectives of this study were: **1)** to compare plasma MMP-9, TIMP-1 and MMP-9/TIMP-1 (activity) ratio between obese and control groups; **2)** to compare the genotype and haplotype frequencies of MMP-9 polymorphisms (C⁻¹⁵⁶²T and (CA)₁₄₋₂₄ and Q279R) between obese and control and, **3)** correlate the MMP-9 concentrations with MMP-9 genotypes and haplotypes. To achieve our first goal, we determined the plasma pro-MMP-9 levels by zymography, and plasma MMP-9 and TIMP-1 concentrations by ELISA in obese and control. We not found differences in MMP-9 plasma concentrations and MMP-9/TIMP-1 between obese and control. However, our results showed that obese had lower plasma TIMP-1 concentrations than control. Moreover, to achieve our second goal, we firstly extracted DNA from volunteers, and then we determined the genotype frequencies of C⁻¹⁵⁶²T and (CA)₁₄₋₂₄ polymorphisms by PCR followed by electrophoresis, of and Q279R polymorphism by real time PCR, and the haplotype frequencies by the programs PHASE. We found similar genotype and allelic distribution for the three polymorphisms when study groups were compared. We evaluated the relevance of different genotypes in plasma MMP-9 concentrations in study groups. To the C⁻¹⁵⁶²T and Q279R polymorphisms, we found that in the obese group, CC genotype carriers had lower MMP-9 levels when compared with CT+TT

genotype carries and control with the same genotype. In the obese group, QQ genotype carries had lower MMP-9 levels when compared with RR genotype carries and control the same genotype. To the -90(CA)₁₄₋₂₄ polymorphism, we did not observe differences in the MMP-9 levels among different genotypic groups. In relation to haplotypes, we found that in the obese group, H2 haplotype carriers had lower MMP-9 levels and MMP-9/TIMP-1 ratio when compared other haplotypes and control with the same haplotype. Therefore, our findings suggest that (CC and QQ) genotypes and H2 haplotype decrease circulating MMP-9 levels in obese but not in healthy children, thus genotypes and haplotype could offer protection against cardiovascular diseases in those children.

Key-words: Matrix metalloproteinase, polymorphism, haplotype, pharmacogenetic, atherosclerosis.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%-	porcentagem
H-	<i>High</i> - alto; conjunto de alelos do microssatélite -90 CA (14-24) da MMP-9 englobando todos os alelos acima de 21 repetições do dinucleotídeo
HOMA	<i>Homeostasis model assessment insulin resistance index</i> - índice
IR-	de resistência a insulina
IBGE-	Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística
IL-6-	Interleucina 6
IL-8-	Interleucina 8
IMC-	Índice de massa corpórea
L-	<i>low</i> - baixo; alelo do microssatélite -90 CA (14-24) da MMP-9 englobando todos os alelos abaixo de 21 repetições do dinucleotídeo
mmHg-	Milímetros de mercúrio
MMPs-	Metaloproteinases de Matriz Extracelular
MT-MMP-	Metaloproteinase de matriz extracelular do tipo membrana
OMS-	Organização Mundial da Saúde
PCR-	<i>Polimerase chain reaction</i> - reação em cadeia da polimerase
SNP-	<i>Single nucleotide polymorphism</i> - polimorfismo de base única

- TBARs-** *Thiobarbituric acid-reactive species* - espécies reativas de ácido tiobarbitúrico
- TIMPs-** *Tissue inhibitors of metalloproteinases* - inibidores teciduais de metaloproteinases
- TNF- α -** *Tumor necrose factor alfa* - Fator de necrose tumoral alfa
- VCAM-1-** *Vascular cell adhesion molecule - 1-* molécula de adesão a leucócitos

	Pág.
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	xi
1- INTRODUÇÃO GERAL.....	17
1.1- Obesidade: um problema de saúde pública.....	18
1.2- Obesidade e doenças cardiovasculares.....	19
1.3- Metaloproteinases e seus inibidores endógenos (TIMPs).....	20
1.4- MMP-9 e doenças cardiovasculares.....	21
2- OBJETIVOS.....	24
3- CAPÍTULOS.....	26
3.1- Capítulo 1.....	27
3.2- Capítulo 2.....	35
4- DISCUSSÃO GERAL.....	60
5- CONCLUSÃO GERAL.....	68
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
7- ANEXOS.....	79
7.1- Aprovação do comitê de ética.....	80
7.2- Termo de consentimento.....	82



1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1- Obesidade: um problema de saúde pública

A prevalência da obesidade tem crescido rapidamente e representa um dos principais desafios de saúde pública neste início de século. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) [1], cerca de 300 milhões de pessoas atualmente são consideradas obesas e a estimativa é que em 2015 este número chegue a 700 milhões de pessoas. Devido a sua alta prevalência, a OMS considera a obesidade um dos dez principais problemas de saúde pública do mundo, classificando-a como epidemia. No Brasil, observa-se o mesmo cenário preocupante. De acordo com estudos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [2] são cerca de 17 milhões de obesos no país. Ademais, a obesidade que antes era mais frequente em adultos, hoje pode ser observada comumente em crianças e adolescentes cuja prevalência é cerca de 16% entre os meninos e 11% entre as meninas com faixa etária de 5 a 8 anos. Esta epidemia reflete, principalmente, mudanças no estilo de vida e hábitos alimentares, com diminuição das atividades físicas e consumo de alimentos com alta densidade energética [3].

Segundo a OMS, a obesidade é definida como excesso de gordura corporal acumulada no tecido adiposo, com complicações para a saúde. Um adulto é considerado obeso quando seu índice de massa corpórea (IMC) estiver acima ou igual a 30 kg/m^2 . Em crianças e adolescentes, a classificação de sobrepeso e obesidade a partir do índice de massa corpórea é mais arbitrária, e não se correlaciona com morbidade e mortalidade, da forma em que se define obesidade em adultos [4]. Cole et al. (2000) [5] definiram sobrepeso como um índice situado na curva de percentil de índice de massa corpórea entre os valores 85 % a 95 % para cada faixa etária e obesidade para valores acima de 95 %.

Essa desordem metabólica é frequentemente associada à resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão e intolerância à glicose, considerados fatores de risco para o *diabetes mellitus* tipo 2 e as doenças cardiovasculares [6, 7]. Dentre essas, a aterosclerose é importante causa de mortalidade em todo mundo [8] e pode ser considerada um fenômeno precoce. Estudo mostrou que lesões

ateroscleróticas podem ser observadas em crianças e jovens e a extensão dessas lesões correlaciona-se positiva e significativamente com índice de massa corpórea (IMC) [9]. Como as crianças obesas apresentam um maior risco de se tornarem adultos obesos [10], isso pode gerar impactos profundos na saúde pública nos próximos anos. Portanto, a busca por marcadores genéticos torna-se de grande valor prognóstico para doenças cardiovasculares que podem ter início ainda na infância.

1.2- Obesidade e doenças cardiovasculares

Além de sua função clássica de armazenamento de triglicérides, o tecido adiposo tem importantes funções como órgão endócrino ao liberar mediadores solúveis que são principalmente, mas não exclusivamente, produzidos pelos adipócitos chamados adipocinas. Essas adipocinas exercem suas funções biológicas de maneira autócrina, parácrina e sistêmica modulando a sensibilidade à insulina, homeostase cardiovascular, inflamação e ganho de peso corporal [6, 11, 12]. Dentre estas moléculas secretadas responsáveis pelas funções mencionadas acima, podemos citar: leptina, adiponectina, visfatina, interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF- α) [13, 14].

Durante a expansão do tecido adiposo, ocorre liberação de adipocinas de forma desregulada, observa-se aumento da liberação de ácidos graxos não esterificados que irão se acumular, principalmente, no fígado, pâncreas e músculo esquelético, esse acúmulo de lipídeo ectópico altera o metabolismo de glicose e lipídeos ocasionando resistência à insulina [15, 16]. A leptina encontra-se aumentada na obesidade o que pode tornar indivíduos obesos resistentes aos seus efeitos hipotalâmicos, efeitos esses de inibir o apetite e estimular o gasto de energia [17, 18]. Níveis elevados de leptina podem ter ainda efeitos estimulatórios de células imunes contribuindo para o aumento de risco cardiovascular [18]. Observa-se também aumento e citocinas pró-inflamatórias tais como: TNF- α , IL-6 e IL-8 e plasminogênio, o que caracteriza a obesidade como um estado

pró-inflamatório e pró-trombótico [19]. Esse estado inflamatório crônico estimula as células endoteliais a expressarem moléculas para adesão para leucócitos (VCAM-1) que se ligam a monócitos presentes na corrente sanguínea que por diapedese penetram no endotélio e dão início ao processo aterosclerótico [20]. Por outro lado, ocorre diminuição de adiponectina, importante em sensibilizar o corpo à insulina e tem propriedades anti-aterogênicas e anti-inflamatórias [12, 19, 21, 22]. Toda essa alteração no perfil de secreção de adipocinas pode levar a resistência à insulina, disfunção vascular e, finalmente, aterosclerose [6, 14, 20].

O desenvolvimento da obesidade também é associado a modificações no tecido adiposo envolvendo aumento do número e tamanho dos adipócitos, angiogênese e remodelamento da matriz extracelular. Metaloproteinases de matriz (MMPs) podem contribuir para o remodelamento tecidual por degradar componentes da matriz extracelular e membrana basal ou ativar fatores de crescimento latentes [23, 24]. Evidências sugerem participação da metaloproteinase-9 de matriz (MMP-9) no desenvolvimento do tecido adiposo ao contribuir na diferenciação dos adipócitos [25] e sua atividade no tecido adiposo visceral correlaciona-se positivamente com IMC [26]. Aumento nos níveis circulantes desta enzima foi relatado em adultos e crianças obesos [27, 28] e diminuição nos níveis MMP-9 foi observada após redução de peso [29, 30].

1.3- Metaloproteinases e seus inibidores endógenos (TIMPs)

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas zinco-dependentes que degradam várias proteínas da matriz extracelular (colágeno, elastina, proteoglicanas) e têm importantes papéis em vários processos fisiológicos e patológicos. A família das MMPs consiste atualmente em mais de 20 tipos que apresentam diferentes substratos, os quais incluem: colagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisinases (MMP-3, MMP-10 e MMP-11) e as MMPs tipo membrana (ex.: MT1-MMP) [24, 31].

Entre as MMPs destacam-se MMP-2, MMP-8 e MMP-9 que desempenham importante função na patologia de diversas doenças cardiovasculares [32-34].

MMPs são secretadas na forma de precursores inativos (zimogênios) cuja latência é mantida através da interação entre o resíduo de cisteína presente no domínio pró-peptídico com o zinco presente no domínio catalítico, bloqueando o acesso deste ao substrato. São ativadas no tecido por clivagem do domínio pró-peptídico que vai deixar o sítio catalítico livre para interação com o substrato [24]. A regulação da atividade proteolítica dessas enzimas pode ocorrer em vários níveis: **1)** transcrição; **2)** tradução; **3)** secreção dos zimogênios; **4)** ativação dos zimogênios nos tecidos; **5)** interação das MMPs com inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) [24, 35].

Os TIMPs são um grupo de inibidores endógenos de MMPs capazes de inibir e modular a atividade proteolítica dessas enzimas, sendo TIMP-1 inibidor endógeno de MMP-9. Eles agem formando um complexo 1:1 com o zinco do domínio catalítico das MMPs e o impedimento estérico resultante bloqueia a interação das MMPs com seus substratos [24]. O equilíbrio tecidual entre TIMPs e MMPs é fundamental para a manutenção da homeostase dos tecidos, resultando em remodelamento altamente regulado da matriz extracelular [36].

1.4- MMP-9 e doenças cardiovasculares

A MMP-9 (gelatinase B) degrada principalmente colágenos tipo IV e V e gelatina [24]. Está envolvida ainda na migração e proliferação de células musculares lisas vasculares, pois permitem que essas células rompam a barreira de tecido conjuntivo ao redor [37, 38]. A MMP-9 é expressa, sintetizada e secretada por fibroblastos e uma grande variedade de células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) [32].

A MMP-9 tem surgido como potencial marcador para doenças cardiovasculares, principalmente aquelas com componente inflamatório, como aterosclerose. De fato, essa metaloproteinase está altamente expressa em

regiões vulneráveis de placas ateroscleróticas e, por esta razão, acredita-se ser responsável pela ruptura dessas placas culminando em eventos cardiovasculares fatais como infarto [20, 32, 33]. Corroborando estes achados, concentração plasmática de MMP-9 foi encontrada aumentada em pacientes que subseqüentemente apresentaram um evento cardiovascular fatal [39]. Níveis elevados desta enzima também foram relatados em pacientes com angina instável [40] e aneurisma de aorta [41] em que inflamação e aterosclerose estão presentes.

A hipótese de um papel causal da MMP-9 em doenças cardiovasculares é suportada também por estudos genéticos mostrando que polimorfismos funcionais no gene da MMP-9 estão associados à presença e severidade de doenças cardiovasculares [42-44].

O gene da MMP-9 encontra-se no cromossomo 20 na região 20q11.2-q13.1 e apresenta polimorfismos genéticos que afetam a expressão e o nível de atividade desta enzima. Vários polimorfismos já foram descritos, sendo que dois deles, presentes na região promotora, e um, presente no exon 6, são funcionalmente importantes. Um deles é um polimorfismo de base única (*single nucleotide polymorphism-SNP*) funcional localizado na posição -1562 da região promotora do gene onde há uma substituição de C por T. Estudos *in vitro* mostraram que esta substituição resulta na perda da ligação de uma proteína nuclear repressora de transcrição a esta região e, portanto, em aumento da transcrição, resultando em expressão aumentada desta enzima [42]. O outro polimorfismo de interesse é um microssatélite (CA)_n na posição -90 que apresenta uma distribuição bi-modal de frequências alélicas, com o primeiro pico (número de repetições) no alelo (CA)₁₄ e o segundo pico nos alelos (CA)₂₁ e (CA)₂₂. Estudos *in vitro* demonstraram que diferentes números de repetições CA parecem controlar a expressão do gene, sendo que 14 repetições, comparado com 21, conduzem à redução da expressão em 40% [45]. Por último, um SNP no exon 6 do gene, onde ocorre a troca de uma adenina por uma guanina na posição 855 que por sua vez gera a substituição de um aminoácido Glutamina por Arginina

na posição 279 afetando a atividade da enzima [46]. Todos esses polimorfismos já foram associados à susceptibilidade a uma ampla variedade de doenças cardiovasculares como hipertrofia cardíaca [47], hipertensão gestacional [48], aterosclerose [49, 50] e também podem modular as concentrações plasmáticas de MMP-9 em pacientes com doença da artéria coronária [39].

A análise global do exposto acima sugere uma importante participação da MMP-9 em doenças cardiovasculares, o que seria influenciado (modulado) pelos polimorfismos genéticos citados. Entretanto, não existe nenhum trabalho que tenha avaliado como (e se) polimorfismos do gene da MMP-9 modulam as concentrações circulantes de MMP-9 em crianças e adolescentes obesos. Desta forma, a determinação de possíveis associações desses polimorfismos genéticos da MMP-9 com a obesidade infantil pode nos fornecer dados clinicamente relevantes sobre quais indivíduos obesos estariam mais expostos a risco aumentado de desenvolvimento precoce de doenças cardiovasculares.



2- OBJETIVOS

Os objetivos foram:

- 1)** Comparar as concentrações plasmáticas de metaloproteinase-9 de matriz extracelular MMP-2, MMP-8, MMP-9, inibidor tecidual-1 de metaloproteinase (TIMP-1) e TIMP-2 entre crianças e adolescentes obesos e não obesos;
- 2)** Comparar as frequências genóticas e haplotípicas dos polimorfismos (C⁻¹⁵⁶²T, (CA)₁₄₋₂₄ Q279R) da MMP-9 entre crianças e adolescentes obesos e não obesos;
- 3)** Avaliar os efeitos de genótipos e haplótipos sobre as concentrações plasmáticas de MMP-9.



3- CAPÍTULO

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-8, MMP-9, and their inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in obese children and adolescents

Vanessa A. Belo^a, Debora C. Souza-Costa^b, Carla M. Lana^c, Fabio L.D. Caputo^b,
 Andrea M. Marcaccini^d, Raquel F. Gerlach^d, Marcus G. Bastos^e, Jose E. Tanus-Santos^{f,*}

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, 13081-970 Campinas, SP, Brazil

^b Department of Pharmacology, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil

^c Department of Physiology, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil

^d Department of Morphology, Estomatology and Physiology, Dental School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. do Cafe, S/N, 14040-904 Ribeirao Preto, SP, Brazil

^e Department of Medical Clinic, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil

^f Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil

Received 9 December 2008; received in revised form 13 March 2009; accepted 28 March 2009

Available online 7 April 2009

Abstract

Objectives: To compare the circulating levels of matrix metalloproteinase (MMP)-8, pro-MMP-2, pro-MMP-9, and total MMP-9, their endogenous inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2, and the MMP-8/TIMP-1, MMP-9/TIMP-1, and MMP-2/TIMP-2 ratios in normotensive obese children and adolescents with those found in non obese children and adolescents.

Design and methods: We studied 40 obese and 40 non obese (controls) children and adolescents in this cross-sectional study. MMP and TIMP concentrations were measured in plasma samples by gelatin zymography and ELISA.

Results: Obese children and adolescents had higher circulating MMP-8 concentrations, lower plasma TIMP-1 concentrations, and higher MMP-8/TIMP-1 ratios than non obese controls ($P < 0.05$). We found no differences in pro-MMP-9 or total MMP-9 levels, or in MMP-9/TIMP-1 ratios between groups ($P > 0.05$). While we found no significant differences in pro-MMP-2 levels ($P > 0.05$) obese subjects had higher TIMP-2 concentrations and lower pro-MMP-2/TIMP-2 ratios ($P < 0.05$) than non obese controls.

Conclusions: In conclusion, we found evidence indicating higher net MMP-8 (but not MMP-9 and MMP-2) activity in childhood obesity. The increased MMP-8 levels found in obese children suggest a possibly relevant pathophysiological mechanism that may be involved in the increase of cardiovascular risk associated with childhood obesity.

© 2009 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Adolescents; Children; Metalloproteinases; Obesity; TIMPs

Introduction

Obesity is reaching epidemic proportions worldwide, and is now occurring at younger ages [1,2]. It is well-established that this metabolic disorder increases the risk of cardiovascular

diseases leading to premature death [3]. Indeed, the adipose tissue is an active endocrine and paracrine organ that releases a large number of bioactive mediators that influence not only body weight homeostasis but also insulin resistance, circulating lipid levels, arterial blood pressure, coagulation, and inflammatory mediators that are relevant to atherosclerosis [4].

There is clear evidence that inflammatory mechanisms play a role in atherogenesis, which is a process characterized by vascular remodeling and accumulation of lipids and fibrous

* Corresponding author. Fax: +55 16 3633 2301.

E-mail addresses: tanus@fmp.usp.br, tanussantos@yahoo.com (J.E. Tanus-Santos).

elements in the large arteries [5]. In this context, several members of the matrix metalloproteinase (MMP) family and their endogenous inhibitors, the tissue inhibitors of MMPs (TIMPs), have been implicated as primary mediators of this remodeling, and a critical equilibrium between MMPs and TIMPs must exist in order to maintain the integrity of cardiovascular system [6]. Indeed, experimental and clinical studies have shown that altered expression or activity of MMPs and/or TIMPs is an important mechanism implicated in the pathophysiology of a variety of cardiovascular diseases [7–12].

Despite the major relevance of MMPs/TIMPs to the pathophysiology of cardiovascular diseases, little information is available so far with respect to the possible alterations in MMPs/TIMPs levels in obese children and adolescents. Although two studies [13,14] by the same group described increased circulating levels of MMP-9 and TIMP-1 in obese children with coexisting hypertension, and decreased MMP-2 levels in obese children, no previous work has studied the circulating levels of TIMP-2, and the MMP-9/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 ratios in obese children and adolescents. This is important because the MMP-9/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 ratios may be better indexes of net MMP9 and MMP-2 activity, respectively, because TIMP-1 and TIMP-2 are major inhibitors of MMP-9 and MMP-2, respectively [15]. In addition, no previous study has examined the circulating levels of MMP-8 in obese children. This is of major importance because MMP-8 levels were positively associated with subclinical and clinical atherosclerosis [11,12,16], thus suggesting that circulating MMP-8 may be a marker of atherosclerosis, a condition that begins early in life and gradually progresses through adolescence and youth at an accelerated rate in children in whom risk factors are present [17].

In the present study, we aimed at comparing the plasma concentrations of MMP-8, pro-MMP-9, total MMP-9, and pro-MMP-2, as well as the plasma concentrations of TIMP-1 and TIMP-2, and MMP-8/TIMP-1, MMP-9/TIMP-1, and pro-MMP-2/TIMP-2 ratios in normotensive obese children with those found in non obese normotensive children.

Methods

Subjects

Approval for use of human subjects in this cross-sectional study was obtained from the Institutional Review Board at the Federal University of Juiz de Fora, Brazil. Parents and children were informed as to nature and purpose of the study. Parents gave their written consent and children gave their verbal consent.

The study population consisted 40 normotensive obese children and adolescents (18 boys and 22 girls, aged 9.9 ± 1.7 years) recruited from the Endocrinology Ambulatory of the Adolescent and Child Institute at Juiz de Fora and from the Childhood Endocrinology Ambulatory of the IMEPEN Foundation at Juiz de Fora. The control group consisted of 40 healthy children and adolescents (20 boys and 20 girls, aged 10.2 ± 1.7) recruited from local community.

All children underwent thorough physical examination. Height was measured to the nearest 0.1 cm by using a wall-mounted stadiometer. Body weight was measured with a digital scale to the nearest 0.1 kg. BMI was calculated as the weight in kilograms divided by height in meters squared. Obesity was defined as BMI greater than the 95th percentile, matched according to age and sex [18].

Systolic (SBP) and diastolic (DBP) were measured at least 3 times and the presence of hypertension was defined as SBP and/or DBP exceeding the 95th percentile [19]. Children with hypertension were not included in the study because there is evidence that hypertension may affect MMP concentrations [20].

Laboratory analyses

Glucose concentrations and lipid parameters (total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein [HDL] cholesterol) were determined in plasma and serum, respectively, with routine enzymatic methods using commercial kits (Labtest Diagnostic, SA, Lagoa Santa, Brazil). Low-density lipoprotein (LDL) concentration was calculated according to the Friedewald formula.

Enzyme immunoassays of MMP-8, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2

Venous blood samples were collected into tubes containing EDTA in the morning before breakfast after an overnight (8–12 h) fast, centrifuged immediately at $2000 \times g$ for 10 min at room temperature and plasma samples were stored for about 3–4 months at -70°C until analyzed. Concentrations MMP-8, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 were measured in plasma using a commercially available enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) [21,22] according to the manufacturer's instructions.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gelatin zymography of MMP-9 and MMP-2

Gelatin zymography of MMP-9 and MMP-2 from plasma samples was performed as previously described [23–26]. Briefly, plasma samples were subjected to electrophoresis on 7% SDS-PAGE co-polymerized with gelatin (1%) as the substrate. After electrophoresis was complete, the gel was incubated for 1 h at room temperature in a 2% Triton X-100 solution, and incubated at 37°C for 16 h in Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mmol/L CaCl_2 . The gels were stained with 0.05% Coomassie Brilliant Blue G-250, and then destained with 30% methanol and 10% acetic acid. Gelatinolytic activities were detected as unstained bands against the background of Coomassie blue-stained gelatin. Enzyme activity was assayed by densitometry using a Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY). The pro form of MMP-2 and MMP-9 were identified as bands at 72 and 92 kDa, respectively, by the relation of log Mr to the relative mobility of Sigma SDS-PAGE LMW marker proteins. A representative zymogram of plasma samples is shown in Fig. 1.

Statistical analysis

All the results were expressed as mean±SD (Table 1) or are shown as scatter plots and the median (Figs. 1, 3, and 4). The unpaired Student *t* test was used to compare normally distributed variables. The Mann–Whitney *U* test was used to compare non normally distributed variables.

Results

The clinical and laboratorial characteristics of the study groups are presented in Table 1. As expected, subjects in the normotensive obese group had higher BMI than non obese controls ($P<0.05$; Table 1). Obese subjects had higher total

Table 1

Demographic and laboratorial characteristics of study participants.

	Control	Obese
<i>N</i>	40	40
Boys	20	18
Girls	20	22
Age (years)	10.2±1.7	9.9±1.7
BMI (kg/m ²)	16.8±2.3	29.1±5.4*
Total cholesterol (mg/dL)	128.5±25.9	152.2±40.3*
LDL cholesterol (mg/dL)	70.5±21.4	96.8±37.4*
HDL cholesterol (mg/dL)	43.3±9.6	38.1±7.5
Triglycerides (mg/dL)	77.1±31.0	86.8±43.9
SBP (mm Hg)	97.4±8.9	111.3±7.4*
DBP (mm Hg)	62.1±8.3	72.1±6.9*
Fasting glucose (mg/dL)	80.4±10.2	87.8±9.8*

BMI: body mass index; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure. Values are the mean±S.D and analyzed using unpaired Student *t* test. * $P<0.05$ vs. control group.

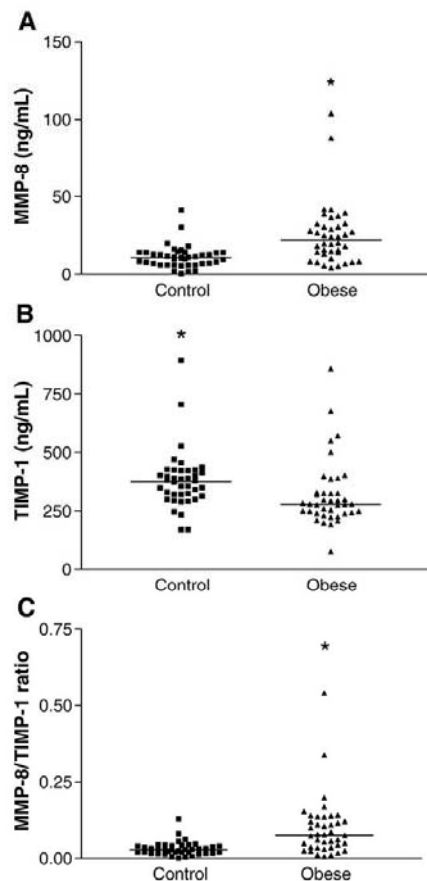


Fig. 1. Plasma MMP-8 concentrations (panel A), TIMP-1 concentrations (panel B), and MMP-8/TIMP-1 ratio (panel C) in control ($N=40$) and obese ($N=40$) children and adolescents. The bar shows the median value. * $P<0.05$ vs. control children and adolescents by Mann–Whitney test (non normally distributed).

cholesterol, LDL cholesterol, arterial blood pressure, and fasting glucose than control subjects (all $P<0.05$; Table 1).

We found no significant differences in MMP-8, pro-MMP-9, MMP-9, MMP-2, TIMP-1, and TIMP-2 levels when girls were compared with boys ($P>0.05$; Table 2).

Obese children and adolescents had higher circulating MMP-8 concentrations than controls ($P<0.05$; Fig. 1A). In addition, obese subjects had lower plasma TIMP-1 concentrations than control subjects ($P<0.05$; Fig. 1B), thus leading to higher MMP-8/TIMP-1 ratios in obese subjects compared with controls ($P<0.05$; Fig. 1C).

Table 2

Plasma MMP and TIMP concentrations in girls and boys.

	Control	<i>P</i>	Obese	<i>P</i>
<i>MMP-8 (ng/mL)</i>				
Girls	68.3 (4.6–412.1)	n.s.	196.2 (40.0–880.1)	n.s.
Boys	137.3 (17.4–301.4)		221.1 (66.1–1038.9)	
<i>Pro-MMP-9 (A.U)</i>				
Girls	0.99 (0.37–3.26)	n.s.	0.86 (0.24–2.81)	n.s.
Boys	0.76 (0.27–2.04)		0.55 (0.14–2.39)	
<i>MMP-9 (ng/mL)</i>				
Girls	84.8 (58.2–211.3)	n.s.	79.5 (36.4–242.3)	n.s.
Boys	68.3 (30.6–154.1)		73.6 (40.2–338.9)	
<i>MMP-2 (A.U)</i>				
Girls	1.59 (0.82–3.0)	n.s.	1.45 (0.57–2.2)	n.s.
Boys	1.59 (0.82–3.0)		1.31 (0.98–2.6)	
<i>TIMP-1 (ng/mL)</i>				
Girls	390.3 (234.8–893.0)	n.s.	287.8 (76.4–856.8)	n.s.
Boys	356.4 (170.3–456.8)		264.4 (222.6–676.5)	
<i>TIMP-2 (ng/mL)</i>				
Girls	110.2 (61.9–166.8)	n.s.	117.2 (73.5–162.5)	n.s.
Boys	101.2 (74.7–143.3)		131.0 (88.2–180.5)	

MMP: matrix metalloproteinase; TIMP: tissue inhibitor of matrix metalloproteinase; A.U: arbitrary units; n.s.: non significant. Values are the median (interquartile range) and were analyzed by unpaired Student *t* test or by Mann–Whitney test.

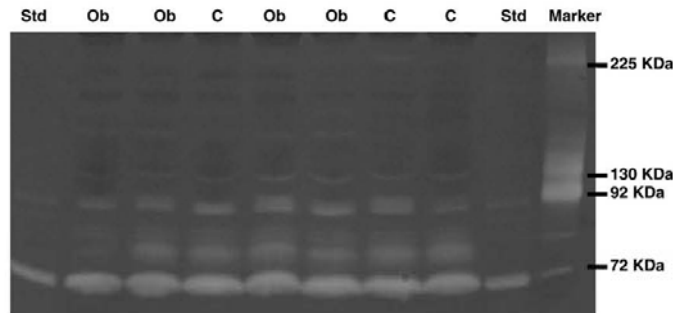


Fig. 2. Representative zymogram of plasma samples. The Marker lane shows the bands corresponding to gelatinases (225 kDa, 130 kDa, 92 kDa, and 72 kDa) in whole blood. Std shows the 72 kDa band (pro-MMP-2) from fetal bovine serum, which was used as a standard to normalize the data from all the gels, thus allowing between gels comparisons. Ob and C correspond to plasma samples from obese and control children and adolescents, respectively.

Gelatin zymography of plasma samples showed all forms of MMPs usually found in human plasma, including the homodimer of the pro-MMP-9 form (225 kDa), the pro-MMP-9 complexed with neutrophil gelatinase-associated lipocalin form (130 kDa), the pro-MMP-9 form (92 kDa) and the pro-MMP-2 (72 kDa) form (Fig. 2). Gelatinolytic activity was completely inhibited by 5 mM EDTA or 1 mM 1, 10-phenantroline (data not shown), thus confirming that these bands correspond to MMP activity. In addition, we have also found some bands between 92 and 72 kDa which were not inhibited by phenantroline and correspond to non MMP gelatinases present in human plasma [27].

We found no significant differences in pro-MMP-9 levels measured by zymography or in pro-MMP-9/TIMP-1 ratios when obese subjects were compared with non obese controls ($P > 0.05$; Figs. 3A and C, respectively). Confirming these findings, we found no significant differences in MMP-9 concentrations measured by ELISA ($P > 0.05$; Fig. 3B), or in MMP-9/TIMP-1 ratios ($P > 0.05$; data not shown) when obese subjects were compared with non obese controls.

While we found no significant differences in pro-MMP-2 levels measured by zymography ($P > 0.05$; Fig. 4A), obese subjects had higher TIMP-2 concentrations ($P < 0.05$; Fig. 4B) and lower pro-MMP-2/TIMP-2 ratios ($P < 0.05$; Fig. 4C) than non obese controls.

Discussion

This is the first study reporting that obese children and adolescents, a group at increased risk of cardiovascular disease, have elevated circulating levels of MMP-8 and increased MMP-8/TIMP-1 ratios compared with non obese subjects.

MMP-8, also known as neutrophil collagenase or collagenase-2, is produced by neutrophils and endothelial cells, and may be involved in collagen breakdown leading to increased vulnerability of atherosclerotic plaques [28]. Importantly, two recent large studies reported that plasma MMP-8 concentrations are positively associated with presence and severity of coronary artery disease [21] and with carotid artery plaque progression

[12]. Giving support to the increased MMP-8 levels that we found in obese children and adolescents, mounting evidence indicates that MMP-8 is implicated in the pathogenesis chronic inflammatory disorders associated with cardiovascular diseases, such as metabolic syndrome [29], and elevated circulating MMP-8 concentrations were reported in non diabetic subjects without symptomatic cardiovascular disease [30]. Moreover, the increased MMP-8/TIMP-1 ratios that we found in obese children and adolescents compared with non obese subjects indicates that these children and adolescents have increased net MMP-8 activity. This is because MMP-8/TIMP-1 ratio is a better indicator of net MMP-8 activity than the circulating MMP-8 levels, although a previous study showed that both MMP-8 levels and MMP-8/TIMP-1 ratios (but not TIMP-1 concentrations) predicted the worst cardiovascular outcome in subjects with subclinical atherosclerosis [16]. Together, these findings are consistent with the suggestion that the obese subjects included in the present study are at increased cardiovascular risk, at least in part, because they have increased MMP-8 levels. Further prospective studies should be done to validate MMP-8 in plasma as a diagnostic and prognostic biomarker of value in predicting the incidence of cardiovascular events.

The comparable pro-MMP-9/TIMP-1 ratios in obese and non obese children and adolescents reported here suggest that there are no differences in net MMP-9 activity between these groups. However, the lack of significant differences in MMP-9 levels between obese and non obese children and adolescents, and the decreased TIMP-1 concentrations in obese subjects reported here are in contrast with previous findings [13]. While methodological differences (zymography vs. ELISA used to measure MMP-9) could explain the differences between studies, we found similar MMP-9 results using two different techniques (zymography and ELISA) to measure MMP-9 levels. However, altered MMP-9 and TIMP-1 levels were reported in hypertensive patients compared with normotensive controls [20,31,32], and the previous study showing increased MMP-9 and TIMP-1 concentrations in obese children and adolescents included hypertensive obese subjects [13].

Therefore, a possible explanation for contrasting results is that our study has not included hypertensive obese children and adolescents.

Our MMP-9 results are in contrast with another recent study showing increased circulating MMP-9 levels in obese adults [33]. However, TIMP-1 concentrations and MMP-9/TIMP-1 ratios were not examined in that study [33], and MMPs/TIMPs levels in children and adolescents may differ significantly from those found in adults. Further studies are needed to confirm these findings and to explore whether childhood obesity differs from obesity in adults in terms of MMPs/TIMPs levels.

Interestingly, we found lower plasma TIMP-1 concentrations in obese children and adolescents compared with the control group. Although we have no precise explanation for this result,

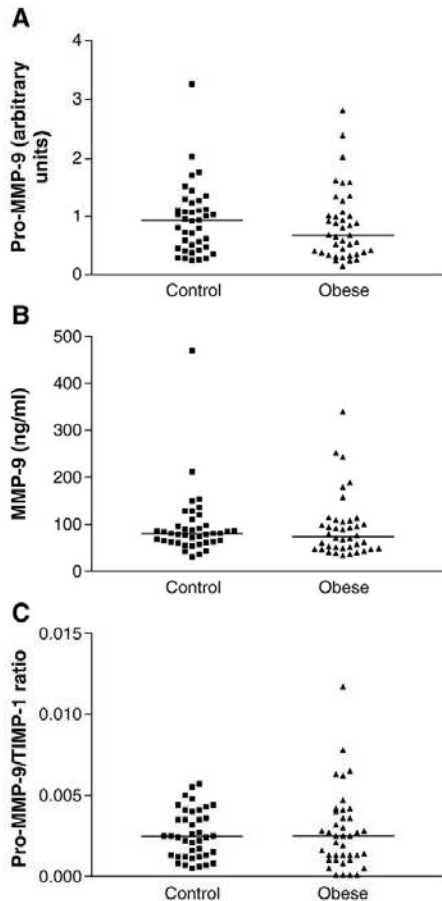


Fig. 3. Plasma pro-MMP-9 levels measured by gel zymography (panel A). Plasma MMP-9 concentrations measured by ELISA (panel B), and MMP-9/TIMP-1 ratio (panel C) in control ($N=40$) and obese ($N=40$) children and adolescents. The bar shows the median value.

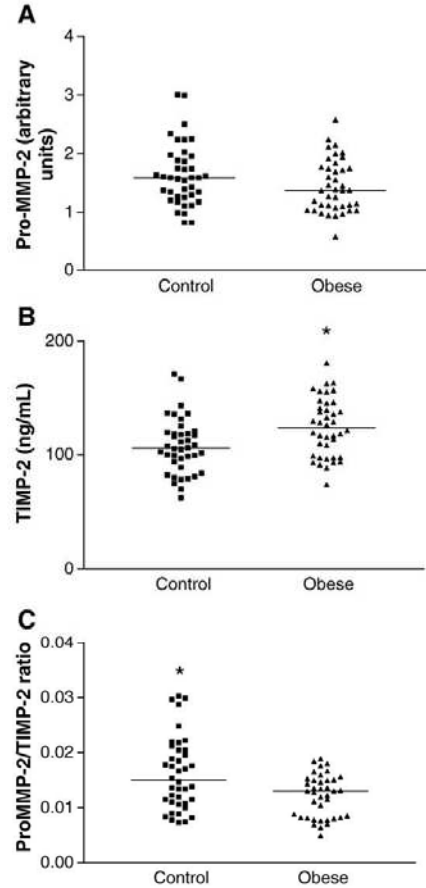


Fig. 4. Plasma pro-MMP-2 levels measured by gel zymography (panel A). Plasma TIMP-2 concentrations measured by ELISA (panel B), and pro-MMP-2/TIMP-2 ratio (panel C) in control ($N=40$) and obese ($N=40$) children and adolescents. The bar shows the median value. * $P < 0.05$ vs. control children and adolescents, by unpaired t test (normally distributed).

obesity is associated with hypoadiponectinemia in both adults and in children [34–37], and a recent study showed that adiponectin (an adipose-specific protein and antiatherogenic factor [38]) increased TIMP-1 expression in macrophages [39]. Therefore, we could speculate that obesity-associated hypoadiponectinemia may have decreased the circulating TIMP-1 levels in obese children and adolescents enrolled in the present study. However, this hypothesis remains to be proved.

Although no significant differences were found in pro-MMP-2 levels in the present study, we found that childhood obesity is associated with higher circulating TIMP-2 levels and lower pro-MMP-2/TIMP-2 ratio compared with those found in control group. These findings suggest lower net MMP-2 activity in childhood obesity, and are in line with previous findings showing lower circulating MMP-2 levels in obese children and

adolescents [40], although TIMP-2 concentrations and MMP-2/TIMP-2 have not been examined in this previous study [40]. Conversely, another study reported increased circulating MMP-2 levels in obese adults [33]. Again, MMPs/TIMPs levels in children and adolescents may differ significantly from those found in adults, and further studies are needed to clarify this issue.

In our study, we found no differences in MMP-8, pro-MMP-9, MMP-9, MMP-2, TIMP-1, and TIMP-2 levels when girls and boys were compared (both in control and obese groups). These results are in line with previous findings showing no influence of gender on circulating levels of several MMPs in healthy adult volunteers [41]. However, further studies are required to clarify possible sex-related differences in more detail.

Some potential limitations of the present study are: i) we have studied a relatively small number of subjects. The study of a huge number of subjects could help to define provisional upper limits for the analytes studied here, and could be used to figure out how many of the obese children showed increased values; ii) it would be interesting to study obese children with hypertension or other components of metabolic syndrome, which has been associated with increased circulating MMPs levels [42].

In conclusion, we found evidence indicating higher net MMP-8 (but not MMP-9 and MMP-2) activity in childhood obesity compared with that found in non obese children and adolescents. The increased MMP-8 levels found in obese children suggest a possibly relevant pathophysiological mechanism that may be involved in the increase of cardiovascular risk associated with childhood obesity.

Acknowledgments

This study was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil).

References

- [1] James PT, Rigby N, Leach R. The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2004;11:3–8.
- [2] Chinn S, Rona RJ. Prevalence and trends in overweight and obesity in three cross sectional studies of British Children, 1974–94. *BMJ* 2001;322:24–6.
- [3] Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 2006;355:763–78.
- [4] Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006;444:875–80.
- [5] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868–74.
- [6] Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:121–31.
- [7] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251–62.
- [8] Palei AC, Sandrim VC, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. Comparative assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, and their inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in preeclampsia and gestational hypertension. *Clin Biochem* 2008;41:875–80.
- [9] Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitol DL, et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis* 2008;198:320–31.
- [10] Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003;107:1579–85.
- [11] Kato R, Momiyama Y, Ohmori R, Taniguchi H, Nakamura H, Ohsuzu F. Plasma matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circ J* 2005;69:1035–40.
- [12] Turu MM, Krupinski J, Catena E, Rosell A, Montaner J, Rubio F, et al. Intraplaque MMP-8 levels are increased in asymptomatic patients with carotid plaque progression on ultrasound. *Atherosclerosis* 2006;187:161–9.
- [13] Glowinska-Olszewska B, Urban M. Elevated matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in obese children and adolescents. *Metabolism* 2007;56:799–805.
- [14] Glowinska-Olszewska B, Urban M, Florys B. Selected matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) in obese children and adolescents. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw* 2006;12:179–83.
- [15] Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmor BL. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem* 1992;267:4583–91.
- [16] Tuomainen AM, Nyyssonen K, Laukkanen JA, Terahartiala T, Tuomainen TP, Salonen JT, et al. Serum matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with cardiovascular outcome in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2722–8.
- [17] Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman III WP, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med* 1998;338:1650–6.
- [18] Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, et al. CDC growth charts: United States. *Adv Data* 2000:1–27.
- [19] Update on the 1987 Task Force Report on High Blood Pressure in Children and Adolescents: a working group report from the National High Blood Pressure Education Program. National High Blood Pressure Education Program Working Group on Hypertension Control in Children and Adolescents. *Pediatrics* 1996;98:649–58.
- [20] Martinez ML, Lopes LF, Coelho EB, Nobre F, Rocha JB, Gerlach RF, et al. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:117–22.
- [21] Souza-Costa DC, Sandrim VC, Lopes LF, Gerlach RF, Rego EM, Tanus-Santos JE. Anti-inflammatory effects of atorvastatin: modulation by the T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene. *Atherosclerosis* 2007;193:438–44.
- [22] Martinez ML, Lopes LF, Coelho EB, Nobre F, Rocha JB, Gerlach RF, et al. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:117–22.
- [23] Demacq C, de Souza AP, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinase (MMP)-9 does not affect plasma MMP-9 activity in healthy subjects. *Clin Chim Acta* 2006;365:183–7.
- [24] Gerlach RF, Demacq C, Jung K, Tanus-Santos JE. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem* 2007;40:119–23.
- [25] Gerlach RF, Uzuelli JA, Souza-Tarla CD, Tanus-Santos JE. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Anal Biochem* 2005;344:147–9.
- [26] Souza-Tarla CD, Uzuelli JA, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin Biochem* 2005;38:410–4.
- [27] Makowski GS, Ramsby ML. Identification and partial characterization of three calcium- and zinc-independent gelatinases constitutively present in human circulation. *Biochem Mol Biol Int* 1998;46:1043–53.

- [28] Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, et al. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation* 2001;104:1899–904.
- [29] Koh KK, Han SH, Quon MJ. Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1978–85.
- [30] Aquilante CL, Beitelshes AL, Zineh I. Correlates of serum matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) concentrations in nondiabetic subjects without cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2007;379:48–52.
- [31] Tayebjee MH, Nadar S, Blann AD, Gareth Beevers D, MacFadyen RJ, Lip GY. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am J Hypertens* 2004;17:764–9.
- [32] Tayebjee MH, Nadar SK, MacFadyen RJ, Lip GY. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9 levels in patients with hypertension relationship to tissue Doppler indices of diastolic relaxation. *Am J Hypertens* 2004;17:770–4.
- [33] Derosa G, Ferrari I, D'Angelo A, Tinelli C, Salvadeo SA, Ciccarelli L, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in obese patients. *Endothelium* 2008;15:219–24.
- [34] Valle M, Martos R, Gascon F, Canete R, Zafra MA, Morales R. Low-grade systemic inflammation, hypo adiponectinemia and a high concentration of leptin are present in very young obese children, and correlate with metabolic syndrome. *Diabetes Metab* 2005;31:55–62.
- [35] Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1930–5.
- [36] Stefan N, Bunt JC, Salbe AD, Funahashi T, Matsuzawa Y, Tataranni PA. Plasma adiponectin concentrations in children: relationships with obesity and insulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4652–6.
- [37] Reinehr T, Roth C, Menke T, Andler W. Adiponectin before and after weight loss in obese children. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3790–4.
- [38] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005;26:439–51.
- [39] Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 2004;109:2046–9.
- [40] Glowinska-Olszewska B, Urban M, Florys B. Selected matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) in obese children and adolescents. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw* 2006;12:179–83.
- [41] Tayebjee MH, Lip GY, Blann AD, MacFadyen RJ. Effects of age, gender, ethnicity, diurnal variation and exercise on circulating levels of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and -9, and their inhibitors, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2. *Thromb Res* 2005;115:205–10.
- [42] Goncalves FM, Jacob-Ferreira AL, Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas AC, Marcaccini AM, et al. Increased circulating levels of matrix metalloproteinase (MMP)-8, MMP-9, and pro-inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta* 2009;403:173–7.

Matrix metalloproteinase (MMP)-9 genotypes and haplotypes affect the circulating MMP-9 levels in obese children and adolescents

Vanessa A. Belo^a, Debora C. Souza-Costa^b, Marcelo R. Luizon^c, Carla MM. Lanna^d, Patrícia C. Carneiro^c, Tatiane C. Izidoro-Toledo^c, Karina C. Ferraz^a, and Jose E. Tanus-Santos^{c,*}.

^aDepartment of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, 13081-970, Campinas, SP, Brazil.

^bDepartment of Pharmacology, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil.

^cDepartment of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

^dDepartment of Physiology, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil.

*Corresponding author: Jose E. Tanus-Santos, MD, PhD.

Department of Pharmacology

Faculty of Medicine of Ribeirao Preto

University of Sao Paulo

Av. Bandeirantes, 3900

14049-900 - Ribeirao Preto, SP, Brazil

FAX: +55 16 3633 2301

Phone: +55 16 3602 3163

E-mail: tanus@fmrp.usp.br; tanussantos@yahoo.com

Abstract

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is involved in the atherosclerotic process, and functional polymorphisms in the MMP-9 gene affect MMP-9 expression/activity and are associated with cardiovascular diseases. However, no study has tested the hypothesis that functional MMP-9 polymorphisms could affect MMP-9 levels in obese children. We investigated whether three MMP-9 gene polymorphisms (C-1562T (rs3918242), 90(CA)₍₁₄₋₂₄₎ (rs2234681) and Q279R (rs17576)) or haplotypes affect MMP-9 levels in obese children. We studied 175 healthy control children and 127 obese children. Plasma MMP-9, tissue inhibitor of MMPs (TIMP)-1 and adiponectin concentrations were measured using ELISA. We found similar MMP-9 genotypes, allelic, and haplotypes distributions in the two study groups ($P > 0.05$). However, we found lower plasma MMP-9 concentrations in obese subjects carrying the CC or the QQ genotypes for the C-1562T and the Q279R polymorphisms, respectively, in obese children compared with children with the other genotypes, or with non obese children with the same genotypes (all $P < 0.05$). Moreover, we found lower MMP-9 levels and lower MMP-9/TIMP-1 ratios (which reflect net MMP-9 activity) in obese children carrying the H2 haplotype (which combines the C, H, and Q alleles for the three polymorphisms, respectively) when compared with obese children carrying the other haplotypes or when compared with non obese children carrying the same haplotype ($P < 0.05$). Our findings show that MMP-9 genotypes and haplotypes affect MMP-9 levels in obese children and adolescents and suggest that genetic factors may modify relevant pathogenetic mechanisms involved in the development of cardiovascular complications associated with obesity in childhood.

Key words: Matrix metalloproteinase-9, childhood obesity, polymorphisms and haplotype.

Introduction

Obesity is reaching epidemic proportions worldwide, and its prevalence is increasing among children and adolescents, likely accelerating the development of cardiovascular diseases and promoting premature death in adults [1]. There is now evidence indicating that the extent of atherosclerotic lesions in children and young adults correlate positively with body mass index [2]. Therefore, the identification of key pathogenetic mechanisms and genetic markers underlying such mechanisms may help to prevent the cardiovascular complications associated with obesity.

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is an endopeptidase capable of degrading components of extracellular matrix (ECM) and other substrates. Altered expression and activity of MMP-9 and its major endogenous inhibitor, the tissue inhibitor of MMPs (TIMP)-1, have been implicated in atherosclerotic vascular remodeling [3]. In fact, experimental and clinical studies have clearly shown that MMP-9 is highly expressed in the atherosclerotic plaques [4, 5], and elevated MMP-9 levels have been shown in patients with atherosclerotic diseases [6, 7]. Importantly, functional genetic polymorphisms in the MMP-9 gene modify MMP-9 levels and prognosis of patients with cardiovascular diseases [6, 8, 9].

Although MMP-9 is a major player in cardiovascular diseases, there are few studies examining possible alterations in MMP-9 and TIMP-1 levels in obese children [10-12]. In addition, no previous study has tested the hypothesis that functional MMP-9 polymorphisms could affect MMP-9 levels in obese children and adolescents. In the present study, we aimed at investigating whether MMP-9 gene polymorphisms or haplotypes (combinations of genetic markers) affect MMP-9 levels in obese children and adolescents. We studied three functional MMP-9 polymorphisms that are known to modify MMP-9 expression or activity [8, 13, 14] and have been associated with cardiovascular diseases [6, 8, 9, 15, 16]: the C-1562T (rs3918242) single nucleotide polymorphism (SNP) and the microsatellite (CA)₁₄₋₂₄ at -90 position (rs2234681), both in the promoter region of the MMP-9 gene, and the Q279R SNP (rs17576) in the exon 6.

Methods

Subjects

This study was approved by the Institutional Review Board at the Federal University of Juiz de Fora, Brazil. Parents and children were informed as to nature and purpose of the study. Parents gave their written consent and children gave their verbal consent.

Study populations consisted of 127 normotensive obese subjects recruited from the Endocrinology Ambulatory of the Adolescent and Child Institute at Juiz de Fora and from the Childhood Endocrinology Ambulatory of the IMEPEN Foundation at Juiz de Fora. The control group consisted of 175 healthy children and adolescents recruited from the local community, and unrelated to the obese patients.

All children underwent through physical examination. Height was measured to the nearest 0.1cm by using a wall-mounted stadiometer. Body weight was measured with a digital scale to the nearest 0.1Kg. BMI was calculated as the weight in kilograms divided by height in meters squared. Obesity was defined as BMI greater than the 95th percentile, matched according to age and sex [17]. Systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressures were measured at least 3 times and the presence of hypertension was defined as SBP and/or DBP exceeding the 95th percentile [18]. Children with hypertension were not included in this study because hypertension may affect MMPs concentrations [19].

At the time of clinical attendance, venous blood samples were collected and genomic DNA was extracted from the cellular component of 1mL of whole blood by a salting-out method and stored at -20⁰C until analyzed.

Laboratory analyses

Glucose concentrations and lipid parameters (total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein [HDL] cholesterol) were determined in plasma and serum, respectively, with routine enzymatic methods using commercial kits (Labtest Diagnostic, SA, Lagoa Santa, Brazil). Low-density lipoprotein (LDL) concentration was calculated according to the Friedewald formula. To evaluate oxidative stress, plasma thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) levels were determined by a fluorimetric method as previously described [20].

Enzyme immunoassays of MMP-9, TIMP-1, adiponectin, and insulin

Venous blood samples were collected after overnight (8-12 hours) fasting, immediately centrifuged at 2000g for 10 min at room temperature, and plasma samples were stored at -70°C until analyzed. MMP-9, TIMP-1, and adiponectin concentrations were measured in EDTA-plasma using commercially available enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to manufacturer's instructions. Insulin concentrations were measured in EDTA-plasma using a kit (Genese Produtos Diagnosticos, Sao Paulo, Brazil). The estimate of insulin resistance obtained by homeostasis model assessment index (HOMA IR) was calculated as previously described [21].

DNA isolation and genotype analyses

Genomic DNA was extracted from the cellular component of 1mL of whole blood by a salting-out method and stored at -20°C until analyzed. Genotypes for the (C-1562T) polymorphism of MMP-9 were determined by polymerase chain reaction (PCR) amplification using the primers 5'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC-3' (sense) and 5'-CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC-3'(antisense) and PCR

conditions as previously described [22, 23]. The amplified products were digested with *Sph I* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) overnight at 37°C, producing fragments of 247bp and 188bp in the case of a polymorphic variant (allele T), or an undigested 435bp fragment in the case of a wild type allele (allele C). Fragments were separated by electrophoresis in 12% polyacrylamide gels and visualized by silver staining.

To determine the genotypes for the -90(CA)14-24 polymorphism, a PCR was carried out using the primers: 5'- GAC TTG GCA GTG GAG ACT GCG GGC A - 3' (sense) e 5'- GAC CCC ACC CCT CCT TGA CAG GCA A -3' (antisense). The PCR conditions were performed as previously described [22, 23], and the amplified products were separated in a 7% polyacrylamide-urea gel and visualized by silver staining. Differences in molecular weight (or number of bases), from 146bp (CA 14 repeats) to 166bp (CA 24 repeats) were determined by comparison with migration of a 10bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and with some samples from homozygotes that were sequenced. The alleles for the microsatellite -90(CA)14-24 polymorphism were classified as "low" (L) count when the number of CA repeats was less than 21, and as "high" (H) when the number of CA repeats was 21 or more. Genotypes of Q279R (rs17576) were determined using TaqMan[®] Allele Discrimination assay (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR conditions were performed according to appointed by manufacturer's instructions.

Statistical analysis

The clinical and laboratorial characteristics of obese patients and controls were compared by unpaired t test (normally distributed variables) or Mann-Whitney test (not normally distributed variables). The categorical variables were compared between groups by χ^2 -tests. The distribution of genotypes for each polymorphism was assessed for deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium, and differences in genotype frequency and in allele frequency between groups

were assessed using χ^2 -tests. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

The Haplo.stats package (version 1.4.4; <http://cran.r-project.org/web/packages/haplo.stats/index.html>) was used to estimate the haplotype frequencies. The haplo.em function computes maximum likelihood estimates of haplotype probabilities using the progressive insertion algorithm. The haplo.score function was used to compute haplotype-specific score statistics to test for association [24]. Only the haplotypes with frequencies greater than 2% were taken into consideration for the haplotype-specific score analysis. The haplo.cc function was also used to calculate odds ratio (OR) and 95% confidence intervals for each haplotype. The haplotypes including genetic variants of three MMP-9 polymorphisms (C-1562T, -90(CA)₁₄₋₂₄, and Q279R) were: H1 (CLQ); H2 (CHQ); H3 (CHR); H4 (THR); H5 (TLR); H6 (CLR); H7 (THQ), and H8 (TLQ). Differences in haplotype frequency were further tested using a contingency table, and a value of $P < 0.00625$ ($0.05/\text{number of haplotypes}$, 8) was considered significant to correct for the number of comparisons made.

To examine the effects of genotypes and haplotype on circulating levels of MMP-9, TIMP-1, and on MMP-9/TIMP-1 ratios, adiponectin, insulin and TBARs levels in the two study groups, we used the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison test (not normally distributed variables) or ANOVA followed by Tukey's test (normally distributed variables). However, the H5, H6, H7 and H8 haplotypes we excluded from this analysis because they were very rare.

Finally, in order to further examine the effects of MMP-9 haplotypes on MMP-9 levels, we also have performed an additional analysis. We compared MMP-9 haplotypes distributions in two groups of obese subjects: the lower quartile (LOWER-Q) group, which included subjects in the lower quartile of plasma MMP-9 distribution, and the upper group quartile (UPPER-Q) group, which included subjects in the upper quartile of plasma MMP-9 distribution. We hypothesized that the haplotypes associated with lower MMP-9 levels in our initial analysis would be more commonly found in the LOWER-Q group than in the UPPER-Q group.

Results

The clinical and laboratorial characteristics of the study groups are presented in Table 1. As expected, subjects in the obese group had higher BMI than non obese controls ($P < 0.05$; Table 1). Obese subjects had higher arterial blood pressure, fasting insulin, HOMA IR index, TBARS, LDL cholesterol and tryglicerides, and lower adiponectin and HDL cholesterol than control subjects (all $P < 0.05$; Table 1).

We found no significant differences in MMP-9 concentrations and in MMP-9/TIMP-1 ratios when obese subjects were compared with controls ($P > 0.05$; Figs. 1A or 1C). However, obese subjects had lower plasma TIMP-1 concentrations than control subjects ($P < 0.05$; Fig. 1B).

Supplementary Table 1 shows MMP-9 genotypes and alleles frequency distributions in the two study groups. The distribution of genotypes for each polymorphism studied here showed no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), except for the Q279R SNP in obese patients, a finding that may be expected in cases of case-control studies [25].

To examine possible effects of ethnicity on MMP-9 genotypes distribution, we carried out two different analyses. The first analysis included black and white children and adolescents, whereas the second analysis took into consideration only white children and adolescents, which corresponded to 48-56% of the subjects. Both analyses showed no significant differences in genotypes and alleles distributions for the three MMP-9 polymorphisms between the control group and obese group (all $P > 0.05$; Supplementary Table 1), except for the Q279R polymorphism. The QR genotype was found with lower frequency in the obese group compared with controls ($P = 0.038$; Supplementary Table 1), and this finding could be due to significant deviation from HWE observed in this group. We found no significant differences in haplotype frequency distributions when both groups were compared ($P < 0.05$; Supplementary Table 2).

Importantly, we examined the effects of MMP-9 genotypes on plasma MMP-9 concentrations. With respect to the C-1562T polymorphism, we found that obese patients with the CC genotype had lower MMP-9 levels than control subjects with the same genotype, and lower MMP-9 levels than obese patients with the CT or TT genotypes (Fig. 2A; both $P < 0.05$). With respect to the -90(CA)₁₄₋₂₄ polymorphism, we found that obese patients with the HL genotype had lower MMP-9 levels than control subjects with the same genotype genotypes (Fig. 2B; $P < 0.05$). Finally, with respect to the Q279R polymorphism, we found that obese patients with the QQ genotype had lower MMP-9 levels than control subjects with the same genotype, and lower MMP-9 levels than obese patients with the RR genotype (Fig. 2C; both $P < 0.05$).

In addition, we studied the effects of MMP-9 haplotypes on MMP-9 and TIMP-1 levels, and on MMP-9/TIMP-1 ratios. While no significant differences were found in TIMP-1 levels when the different haplotype groups were compared (Fig. 3B; $P > 0.05$), we found lower MMP-9 levels and lower MMP-9/TIMP-1 ratios in obese subjects with the H2 haplotype compared with control subjects carrying the H2 haplotype or with obese subjects with the H1, H3 or H4 haplotypes (Figs. 3A and 3C; all $P < 0.05$).

Further confirming the haplotype effects on MMP-9 levels, we found that the H2 haplotype was more commonly found in obese children and adolescents with lower MMP-9 levels than in obese subjects with higher MMP-9 levels (Table 2; $P = 0.001$).

Finally, we found that MMP-9 genotypes for the three MMP-9 polymorphisms had no effects on TIMP-1, MMP-9/TIMP-1, adiponectin, insulin, HOMA IR index, and TBARS levels (Supplementary Table 3; $P > 0.05$). Moreover, MMP-9 haplotypes had no effects on adiponectin, insulin, and TBARS levels, and on the HOMA IR index (Supplementary Table 3; $P > 0.05$).

Discussion

The main novel finding reported here was that two functional MMP-9 genetic polymorphisms affect the circulating MMP-9 levels in obese children and adolescents, either when considered their single effects or when MMP-9 polymorphisms exert their combined effects within MMP-9 haplotypes. Particularly, lower MMP-9 levels were found in obese children with the CC genotype for C-1562T polymorphism, or with the QQ genotype for Q279R polymorphism, or in subjects carrying the H2 (C H Q) haplotype. Because MMP-9 levels are associated with cardiovascular diseases [6, 7], our findings suggest that obese children with these particular MMP-9 genotypes or haplotype may be at lower risk of developing cardiovascular diseases.

While increased MMP-9 levels were shown in cardiovascular diseases [4-7], we found similar MMP-9 concentrations and MMP-9/TIMP-1 in obese compared with non obese children. Although this finding confirms previous results [12], some authors found increased circulating MMP-9 and TIMP-1 levels in obese children with coexisting hypertension [10, 11]. It is possible that hypertension may explain the discrepancies between studies because hypertension may increase MMP-9 levels [19]. Interestingly, we found lower TIMP-1 concentrations and lower adiponectinemia in obese compared with non obese children, and these findings are consistent with the idea that adiponectin (an adipose-specific protein and antiatherogenic factor) modulates TIMP-1 expression by macrophages [26].

While several polymorphisms have been detected in the MMP-9 gene, the C-1562T polymorphism increases MMP-9 expression as a result of loss of a nuclear repressor protein binding site when the T allele is present [8]. The lower MMP-9 levels that we found in obese subjects not carrying the T allele is supported by this previous finding. Conversely, the lack of significant effects of this polymorphism in non obese subjects is in line with previous findings showing that this polymorphism does not affect MMP-9 levels in healthy subjects [22, 23]. In addition, we found that absence of R allele for the Q279R polymorphism was associated with lower MMP-9 levels in obese children, and this finding agrees with

previous results showing that this polymorphism affects MMP-9 activity [14]. Finally, we found no effects of the (CA)₁₄₋₂₄ polymorphism on MMP-9 levels, although there is evidence that this polymorphism affects MMP-9 expression [13]. Although it is clear that the adipose tissue is an active endocrine and paracrine organ that releases a large number of bioactive mediators that could modulate the expression of MMP-9 gene [27], the present study has not been design to define the mechanisms explaining the interactions of MMP-9 polymorphisms with childhood obesity.

The analysis of haplotypes rather than single polymorphisms may provide improved genetic information. Here, we show for the first time that MMP-9 haplotypes may modulate the circulating MMP-9 levels in obese children and adolescents. Particularly, obese children carrying the H2 (C H Q) haplotype had lower MMP-9 levels and lower MMP-9/TIMP-1 ratios (an index of net MMP-9 activity [28]) than those without these genetic markers. Furhter supporting this finding, the comparison of extreme quartiles of MMP-9 levels confirmed that the H2 haplotype is associated with lower circulating MMP-9 levels. Interestingly, these results are in line with a previous study showing that the H2 haplotype protects against the development of hypertensive left ventricle hypertrophy [9]. Together, these findings suggest that lower MMP-9 levels associated with the H2 haplotype could be associated with protective effects against cardiovascular diseases.

In the present study, we found no association between MMP-9 genotypes or haplotypes and childhood obesity, except for the QR genotype, which was apparently more common in non obese than in obese subjects. Although this result is not statistically significant after correction for multiple comparisons, it could be explained by Hardy-Weinberg deviation for this polymorphism in obese subjects, and this finding may be expected in cases of case-control studies [25]. The essentially negative results with respect to the possible association between MMP-9 polymorphisms and obesity suggest that, although MMPs play an important role in the expansion of adipose tissue mass,

with intense extracellular matrix remodeling in obesity [29], genetic markers involving MMP-9 may not be very relevant to the development of childhood obesity.

We found that obese children and adolescents had higher TBARs levels (a marker of oxidative stress) when compared with non obese controls. These results confirm that obesity is associated with increased oxidative stress and may have important implications. In fact, oxidative stress is a major MMPs activator [30] and therefore may potentiate MMPs activities in obese subjects. However, the lack of significant differences between genotypes or haplotypes groups, as reported here, suggest that MMP-9 polymorphisms do not interact significantly with oxidative stress to modulate MMP-9 levels in obese subjects.

In conclusion, we found evidence indicating that MMP-9 genotypes and haplotypes affect MMP-9 levels in obese children. Our findings are consistent with the idea that genetic factors may modify relevant pathogenetic mechanisms involved in the development of cardiovascular complications associated with obesity in childhood. Further studies examining the effects of MMP-9 polymorphisms on the incidence of clinical events in obese children are warranted.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and IMEPEN Foundation at Juiz de Fora.

References

- [1] Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 2006; 355:763-78.
- [2] Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med* 1998; 338:1650-6.
- [3] Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res* 2006; 69:625-35.
- [4] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; 90:251-62.
- [5] Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94:2493-503.
- [6] Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 107:1579-85.
- [7] Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:368-72.
- [8] 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; 99:1788-94.

- [9] Lacchini R, Jacob-Ferreira AL, Luizon MR, Coeli FB, Izidoro-Toledo TC, Gasparini S, et al. Matrix metalloproteinase 9 gene haplotypes affect left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Clin Chim Acta* 2010; 411:1940-4.
- [10] Glowinska-Olszewska B, Urban M. Elevated matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in obese children and adolescents. *Metabolism* 2007; 56:799-805.
- [11] Glowinska-Olszewska B, Urban M, Florys B. [Selected matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) in obese children and adolescents]. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw* 2006; 12:179-83.
- [12] Belo VA, Souza-Costa DC, Lana CM, Caputo FL, Marcaccini AM, Gerlach RF, et al. Assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-8, MMP-9, and their inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in obese children and adolescents. *Clin Biochem* 2009; 42:984-90.
- [13] Shimajiri S, Arima N, Tanimoto A, Murata Y, Hamada T, Wang KY, et al. Shortened microsatellite d(CA)₂₁ sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *FEBS Lett* 1999; 455:70-4.
- [14] Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J* 1995; 309 (Pt 1):299-306.
- [15] Peters DG, Kassam A, St Jean PL, Yonas H, Ferrell RE. Functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter as a potential risk factor for intracranial aneurysm. *Stroke* 1999; 30:2612-6.
- [16] Pollanen PJ, Karhunen PJ, Mikkelsen J, Laippala P, Perola M, Penttila A, et al. Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene: an autopsy study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1446-50.

- [17] Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, et al. CDC growth charts: United States. *Adv Data* 2000;1-27.
- [18] Update on the 1987 Task Force Report on High Blood Pressure in Children and Adolescents: a working group report from the National High Blood Pressure Education Program. National High Blood Pressure Education Program Working Group on Hypertension Control in Children and Adolescents. *Pediatrics* 1996; 98:649-58.
- [19] Martinez ML, Lopes LF, Coelho EB, Nobre F, Rocha JB, Gerlach RF, et al. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47:117-22.
- [20] Cau SB, Dias-Junior CA, Montenegro MF, de Nucci G, Antunes E, Tanus-Santos JE. Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41-2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol* 2008; 581:132-7.
- [21] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-9.
- [22] Demacq C, Vasconcellos VB, Marcaccini AM, Gerlach RF, Silva WA Jr, Tanus-Santos JE. Functional polymorphisms in the promoter of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene are not linked with significant plasma MMP-9 variations in healthy subjects. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46:57-63.
- [23] Demacq C, de Souza AP, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinase (MMP)-9 does not affect plasma MMP-9 activity in healthy subjects. *Clin Chim Acta* 2006; 365:183-7.
- [24] Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet* 2002; 70:425-34.

- [25] Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005; 76:967-86.
- [26] Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 2004; 109:2046-9.
- [27] Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006; 444:875-80.
- [28] Demacq C, Vasconcellos VB, Marcaccini AM, Gerlach RF, Machado AA, Tanus-Santos JE. A genetic polymorphism of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) affects the changes in circulating MMP-9 levels induced by highly active antiretroviral therapy in HIV patients. *Pharmacogenomics J* 2009; 9:265-73.
- [29] Lijnen HR. Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc Res* 2008; 78:286-93.
- [30] Castro MM, Rizzi E, Rodrigues GJ, Ceron CS, Bendhack LM, Gerlach RF, et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. *Free Radic Biol Med* 2009; 46:1298-307.

Figure Legends

Figure 1- Plasma MMP-9 concentrations (panel A), TIMP-1 concentrations (Panel B), and MMP-9/TIMP-1 ratios (panel C) in controls (N=175) and obese (N=127) children and adolescents. The box and whiskers plots show range and quartiles. The boxes extend from the 25th percentile to the 75th percentile, with a line at the median. The whiskers show the highest and the lowest values.

*P<0.05 vs. Control group.

Figure 2- Plasma MMP-9 levels in the Control group (C) and in obese children and adolescents (O) with different genotypes for MMP-9 polymorphisms. Subjects were grouped according to MMP-9 genotypes for the C-1562T (Panel A), the -90(CA)₁₄₋₂₄ (Panel B), and the Q279R (Panel C) MMP-9 polymorphisms. The box and whiskers plots show range and quartiles. The boxes extend from the 25th percentile to the 75th percentile, with a line at the median. The whiskers show the highest and the lowest values.

*P<0.05 vs. the respective Control group.

#P<0.05 vs. obese patients with the CT+TT genotypes (Panel A), or vs. obese patients with the RR genotype (Panel C).

Figure 3- Plasma MMP-9 (Panel A) and TIMP-1 (Panel B) levels, and MMP-9/TIMP-1 ratios (Panel C) in the Control group (C) and in obese children and adolescents (O) with different MMP-9 haplotypes. The box and whiskers plots show range and quartiles. The boxes extend from the 25th percentile to the 75th percentile, with a line at the median. The whiskers show the highest and the lowest values.

*P<0.05 vs. the respective Control group.

#P<0.05 vs. obese patients with the H1, H3, or H4 haplotypes.

Table 1- Clinical characteristics of study participants.

Variable	Control	Obese
N	175	127
Age (years)	11.9±3.1	10.3±2.7*
Ethnicity (% white)	56	48
BMI (Kg/m ²)	18.3±2.9	26.1±4.3*
SBP (mmHg)	105.6±11.5	111.2±10.0*
DPB (mmHg)	65.6±9.0	70.7±8.8*
Fasting glucose (mmol/L)	4.6±0.6	4.7±0.5
Fasting Insulin (μU/L)	9.3±4.2	13.0±6.7*
HOMA RI index	1.8±0.9	2.8±1.6*
Adiponectin (pg/mL)	13730±578	11570±617*
TBARS (nmol/mL)	3.9±2.1	5.0±2.3*
Total cholesterol (mg/dL)	141.9±42.6	147.3±40.1
LDL cholesterol (mg/dL)	74.5±23.1	89.0±31.4*
HDL cholesterol (mg/dL)	43.6±8.9	39.1±10.2*
Triglycerides (mg/dL)	76.8±28.7	88.2±43.6*

BMI: Body Mass Index; **SBP:** Systolic Blood Pressure; **DBP:** Diastolic Blood Pressure. **HOMA IR:** Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance Index; **TBARS:** thiobarbituric acid-reactive species. Values are the mean ± S.D.

*P<0.05 vs. control.

Table 2- MMP-9 haplotypes frequencies distributions in the Lower-Q and in the Upper-Q groups of obese patients.

Haplotype	Hap-Score	P	Frequency	Lower-Q	Upper-Q	OR (95% CI)
H1 CLQ	-0.019	0.985	0.422	0.427	0.422	1.000 (Reference)
H2 CHQ	-3.443	0.001*	0.230	0.322	0.127	0.433 (0.211-0.891)*
H3 CHR	1.155	0.248	0.226	0.201	0.261	1.091 (0.539-2.206)
H4 THR	2.313	0.021	0.087	0.048	0.121	2.663 (0.899-7.886)
H5 TLR	NA	NA	-	NA	0	-
H6 CLR	1.682	0.093	0.021	0.000	0.037	-
H7 THQ	NA	NA	-	NA	0	-
H8 TLQ	NA	NA	-	NA	0	NA

OR: Odds Ratio; **NA:** not available. **Global-stat=20.178, df=5, P=0.0011573*.**

A value of $P < 0.00625$ ($0.05/\text{number of haplotypes}$) was considered significant to correct for the number of comparisons made in haplotype analysis (Bonferroni's correction).

The lower quartile (Lower-Q) group included obese subjects in the lower quartile of plasma MMP-9 distribution, whereas the upper group quartile (Upper-Q) group included obese subjects in the upper quartile of plasma MMP-9 distribution.

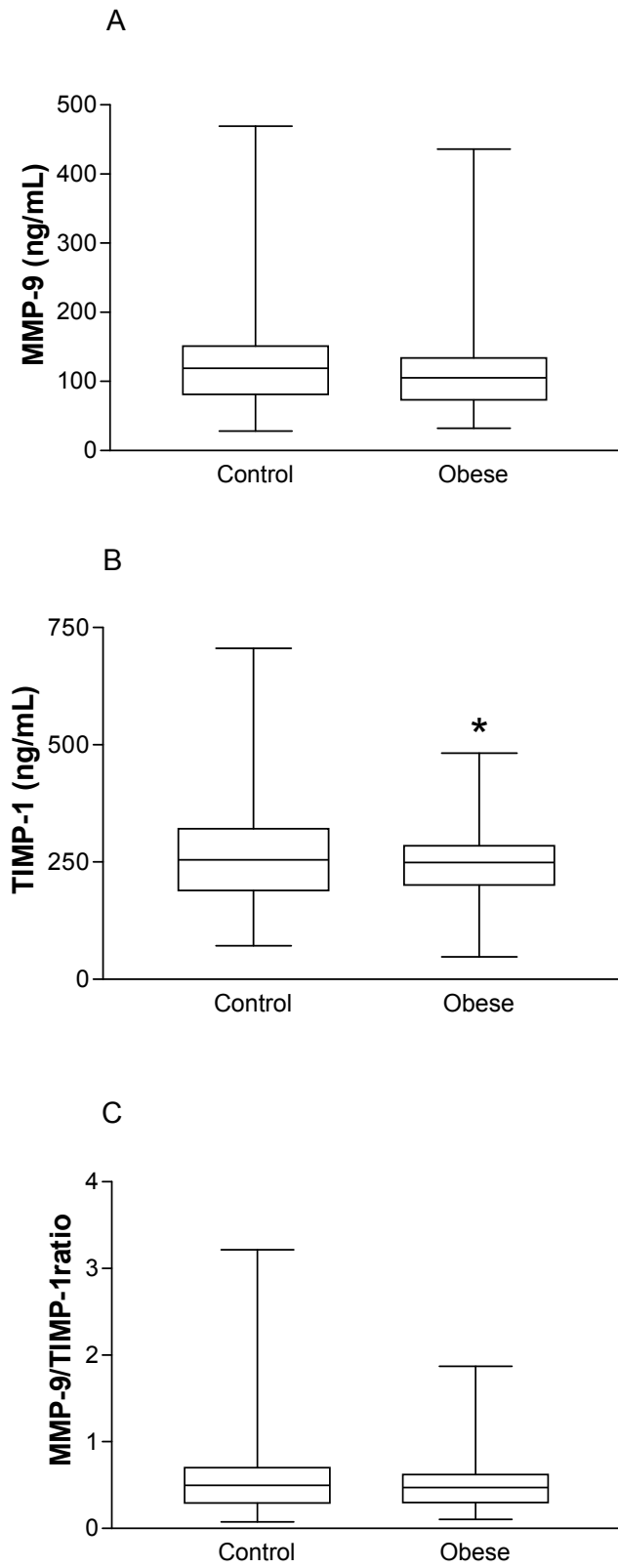


Figure 1

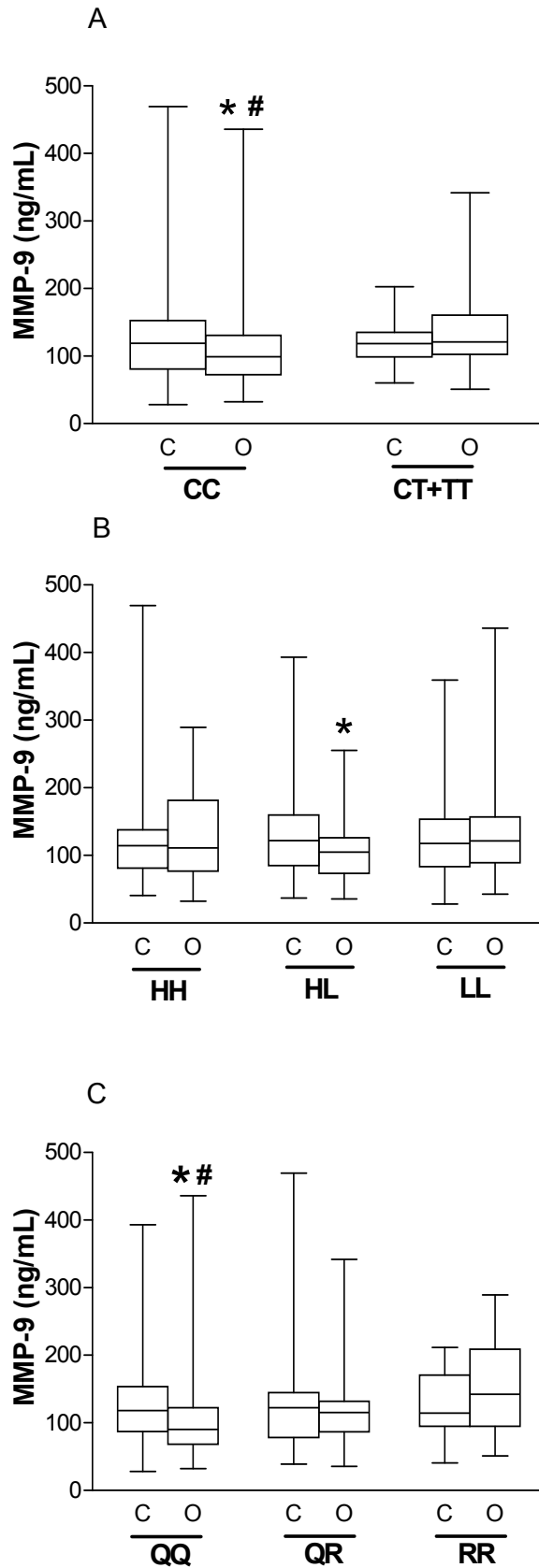


Figure 2

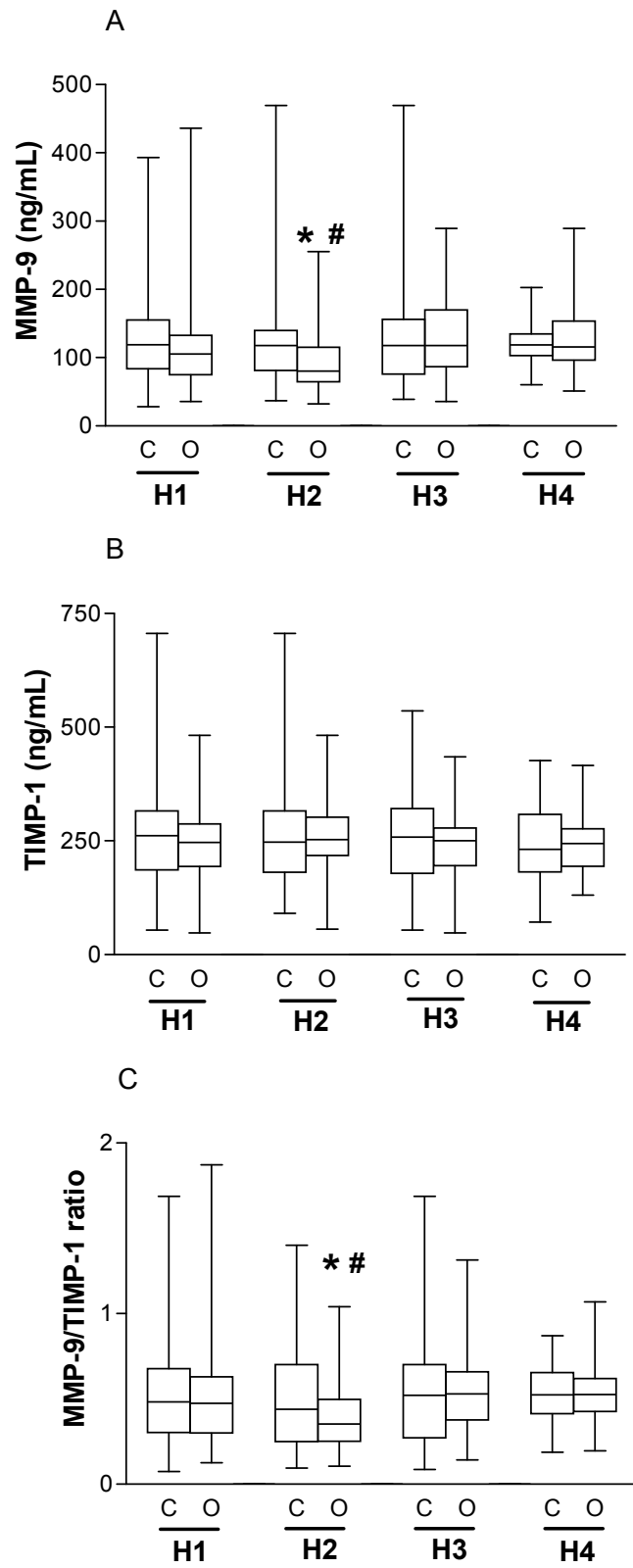


Figure 3-

SUPPLEMENTARY APPENDIXES:

Supplementary Table 1- MMP-9 genotypes and allele relative frequencies in obese children and adolescents and in the Control group.

		All patients (White and black)				White patients only			
		Control	Obese	P	OR	Control	Obese	P	OR
		N(%)	N(%)		(95% CI)	N(%)	N(%)		(95% CI)
Genotypes									
C-1562T	CC	149 (0.85)	102 (0.80)	-	1.000 (Reference)	80 (0.83)	46 (0.81)	-	1.000 (Reference)
	CT	25 (0.14)	25 (0.20)	NS	1.461 (0.794-2.686)	15 (0.16)	11 (0.19)	NS	1.275 (0.540-3.010)
	TT	1 (0.01)	0 (0.00)	NS	0.486 (0.019-12.06)	1 (0.01)	0 (0.00)	NS	0.577 (0.023-14.47)
(CA)¹⁴⁻²⁴	LL	25 (0.14)	28 (0.22)	-	1.000 (Reference)	18 (0.19)	17 (0.30)	-	1.000 (Reference)
	LH	95 (0.54)	59 (0.46)	NS	0.554 (0.295-1.041)	52 (0.54)	24 (0.42)	NS	0.488 (0.215-1.110)
	HH	55 (0.31)	40 (0.31)	NS	0.649 (0.330-1.277)	26 (0.27)	16 (0.28)	NS	0.651 (0.262-1.618)
Q279R	QQ	66 (0.38)	62 (0.49)	-	1.000 (Reference)	38 (0.40)	25 (0.44)	-	1.000 (Reference)
	QR	83 (0.47)	46 (0.36)	0.038*	0.590 (0.357-0.972)	41 (0.43)	22 (0.39)	NS	0.815 (0.395-1.681)
	RR	26 (0.15)	19 (0.15)	NS	0.777 (0.391-1.544)	17 (0.18)	10 (0.18)	NS	0.894 (0.352-2.267)
Alleles									
C-1562T	C	323 (0.92)	229 (0.90)	-	1.000 (Reference)	175 (0.91)	103 (0.90)	-	1.000 (Reference)
	T	27 (0.08)	25 (0.10)	NS	1.306 (0.738-2.309)	17 (0.09)	11 (0.10)	NS	1.099 (0.495-2.439)
(CA)¹⁴⁻²⁴	L	145 (0.41)	115 (0.45)	-	1.000 (Reference)	88 (0.46)	58 (0.51)	-	1.000 (Reference)
	H	205 (0.59)	139 (0.55)	NS	0.854 (0.617-1.185)	104 (0.54)	56 (0.49)	NS	0.817 (0.513-1.300)
Q279R	Q	215 (0.61)	170 (0.67)	-	1.000 (Reference)	117 (0.61)	72 (0.63)	-	1.000 (Reference)
	R	135 (0.39)	84 (0.33)	NS	0.786 (0.560-1.104)	75 (0.39)	42 (0.37)	NS	0.910 (0.563-1.468)

P: P value for Control versus Obese. **OR:** Odds Ratio for Control versus Obese. **CI:** 95% Confidence Interval; **NS:** not significant.

Supplementary Table 2- MMP-9 haplotypes frequencies in obese children and adolescents and in the control group.

	Haplotype			All patients (White and black)				White patients only			
	CT	CAn	QR	Control (n=350)	Obese (n=254)	p	OR (CI)	Control (n=192)	Obese (n=114)	p	OR (CI)
H1	C	L	Q	133 (0.38)	109 (0.43)	NS	1.000 (Reference)	86 (0.45)	55 (0.48)	NS	1.000 (Reference)
H2	C	H	Q	77 (0.22)	58 (0.23)	NS	0.957 (0.605-1.515)	31 (0.16)	17 (0.15)	NS	0.916 (0.429-1.956)
H3	C	H	R	102 (0.29)	56 (0.22)	0.044	0.665 (0.436-1.016)	58 (0.30)	27 (0.24)	NS	0.774 (0.444-1.348)
H4	T	H	R	21 (0.06)	20 (0.08)	NS	1.281 (0.650-2.523)	17 (0.09)	11 (0.10)	NS	1.074 (0.457-2.524)
H5	T	L	R	4 (0.01)	0 (0.00)	NA	0.927 (0.186-4.612)	0 (0.00)	0 (0.00)	-	-
H6	C	L	R	7 (0.02)	5 (0.02)	NS	0.846 (0.250-2.863)	2 (0.01)	3 (0.03)	NA	2.946 (0.380-22.796)
H7	T	H	Q	4 (0.01)	3 (0.01)	NA	0.927 (0.186-4.612)	0 (0.00)	0 (0.00)	-	-
H8	T	L	Q	0 (0.00)	0 (0.00)	NA	-	0 (0.00)	0 (0.00)	NA	NA

P- P value for Control *versus* Obese. **OR-** Odds Ratio for Control *versus* Obese. **CI-** 95% Confidence Interval.

A value of $P_c = 0.00625$ ($0.05/\text{number of haplotypes}$) was considered significant to correct for the number of comparisons made in haplotype analysis (Bonferroni's correction).

NS: not significant;

NA: not available.

Supplementary Table 3- Biochemical characteristics of obese children and adolescents grouped by MMP-9 genotypes or haplotypes.

Biochemical Characteristics							
Genotype		TIMP-1 (ng/mL)	MMP9/ TIMP-1	Adiponectin (pg/mL)	Insulin (μ U/L)	HOMA IR index	TBARS (ng/mL)
C-1562T	CC	247.6 \pm 78.2	0.48 \pm 0.30	11545 \pm 7091	12.7 \pm 6.7	2.7 \pm 1.6	4.9 \pm 2.4
	CT+TT	244.1 \pm 65.6	0.59 \pm 0.25	11679 \pm 5872	14.2 \pm 6.8	3.0 \pm 1.6	5.4 \pm 1.9
(CA)₁₄₋₂₄	HH	268.7 \pm 80.3	0.48 \pm 0.23	11144 \pm 6930	12.5 \pm 5.4	2.8 \pm 1.3	4.9 \pm 1.8
	HL	238.8 \pm 72.8	0.54 \pm 0.25	12215 \pm 6455	13.4 \pm 7.5	2.8 \pm 1.6	4.9 \pm 1.6
	LL	241.1 \pm 68.8	0.61 \pm 0.41	10872 \pm 7588	13.1 \pm 6.8	2.8 \pm 1.8	4.5 \pm 1.1
Q279R	QQ	253.4 \pm 78.7	0.47 \pm 0.32	11354 \pm 7235	13.4 \pm 6.5	2.8 \pm 1.5	4.7 \pm 1.8
	QR	231.3 \pm 70.4	0.55 \pm 0.25	11181 \pm 6151	13.1 \pm 7.7	2.8 \pm 1.7	5.0 \pm 1.6
	RR	265.0 \pm 73.9	0.58 \pm 0.26	13176 \pm 7251	11.7 \pm 4.8	2.5 \pm 1.1	5.0 \pm 1.1
Haplotype							
H1		238.7 \pm 74.0	0.57 \pm 0.40	11651 \pm 7066	13.7 \pm 8.7	2.9 \pm 1.7	4.8 \pm 1.9
H2		263.4 \pm 81.1	0.39 \pm 0.20*	10697 \pm 6739	12.6 \pm 6.7	3.0 \pm 1.7	5.1 \pm 1.3
H3		248.1 \pm 77.4	0.55 \pm 0.26	12295 \pm 7047	13.7 \pm 7.1	2.6 \pm 1.3	5.4 \pm 3.5
H4		244.0 \pm 70.0	0.54 \pm 0.21	11632 \pm 6157	12.8 \pm 5.6	2.8 \pm 1.2	5.1 \pm 0.9

HOMA IR: Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance Index; **TBARS:** thiobarbituric acid-reactive species.

Values are the mean \pm S.D.



4- DISCUSSÃO GERAL

Os principais resultados deste trabalho foram:

- 1- Não há diferença nas concentrações plasmáticas de MMP-9 e relação MMP-9/TIMP-1 entre crianças e adolescentes obesos e controles; no entanto, no grupo de obesos, as concentrações plasmáticas de TIMP-1 estão diminuídas.
- 2- Não há diferença na frequência de genótipos e haplótipos entre os grupos obesos e controles, não há relação entre polimorfismos de MMP-9 e susceptibilidade à obesidade.
- 3- Sugere-se genótipos da MMP-9 podem ter efeitos protetores somente em crianças e adolescentes obesos; mais especificamente, crianças e adolescentes obesos portadores do genótipo CC apresentam menores concentrações plasmáticas de MMP-9, assim como crianças e adolescentes obesos portadores do genótipo QQ.
- 4- Sugere-se haplótipos da MMP-9 podem ter efeitos protetores somente em crianças e adolescentes obesos; mais especificamente, crianças e adolescentes obesos portadores do haplótipo H2 apresentam menores concentrações plasmáticas de MMP-9.
- 5- Crianças e adolescentes obesos apresentam concentrações plasmáticas de MMP-8 e razão MMP-8/TIMP-1 maiores quando comparados aos controles. Embora TIMP-2 esteja aumentada em crianças obesas a MMP-2 e razão MMP-2/TIMP-2 não são diferentes entre os grupos.

Nossos achados mostram que a razão MMP-9/TIMP-1 não difere significativamente entre crianças e adolescentes obesos e não obesos sugerindo que não há diferenças na atividade de MMP-9 nestes grupos. Entretanto, a ausência de diferença significativa nos níveis de MMP-9 e diminuição das concentrações plasmáticas de TIMP-1 em crianças obesas reportados aqui estão

em contraste com um estudo anterior [28]. Enquanto diferenças metodológicas (zimografia vs ELISA usadas para dosar MMP-9) poderiam explicar esta divergência de resultados, nós encontramos resultados similares utilizando estas duas diferentes técnicas. Uma possível explicação para este conflito seria a presença de crianças e adolescentes obesos e hipertensos no estudo anterior [28], e níveis alterados de MMP-9 já foram reportados em pacientes hipertensos comparados a normotensos [51-53].

Nossos resultados de MMP-9 estão em contraste com outro recente estudo que mostra aumento dos níveis plasmáticos de MMP-9 em adultos obesos [27]. Entretanto, concentrações de TIMP-1 e razões MMP-9/TIMP-1 não foram examinadas neste estudo, e os níveis de MMPs/TIMPs em crianças e adolescentes podem diferir significativamente daqueles encontrados em adultos. Estudos futuros são necessários para esclarecer se a obesidade na infância difere da obesidade em adultos em termos de níveis MMPs/TIMPs. Sabe-se ainda que concentrações circulantes de MMP-9 podem estar aumentadas em diversas condições patológicas, muitas delas, frequentemente associadas à obesidade: como diabetes [54, 55] e dislipidemias [56]. Provavelmente, a obesidade em adultos, associada a uma maior resistência a insulina e alterações mais significativas do perfil lipídico quando comparado à obesidade em crianças, poderiam estar envolvidas no aumento dos níveis de MMP-9.

Curiosamente, nós encontramos baixas concentrações de TIMP-1 em crianças e adolescentes obesos comparados ao grupo controle. Embora não tenhamos uma explicação precisa para este resultado, obesidade é associada com hipoadiponectinemia em adultos e crianças [57-60] e recente estudo demonstrou que adiponectina (proteína específica do tecido adiposo e fator antiaterogênico [21]) aumentou a expressão de TIMP-1 em macrófagos [61]. Conseqüentemente, nós sugerimos que hipoadiponectinemia associada à obesidade poderia ter diminuído os níveis circulantes de TIMP-1 em crianças e adolescentes obesos do presente estudo. Entretanto, esta hipótese não foi confirmada, pois não observamos correlação negativa entre os níveis de TIMP-1 e

adiponectina (resultados não mostrados). Concentrações de adiponectina foram menores em crianças e adolescentes obesos como esperado [22], predispondo essas crianças a síndrome metabólica e doenças cardiovasculares [21, 62]. Estudos futuros são necessários para elucidar as possíveis causas para as concentrações de TIMP-1 diminuídas em crianças e adolescentes obesos.

Apesar de não ser o foco principal de nosso trabalho, nós avaliamos as concentrações plasmáticas de MMP-2 e MMP-8 por se tratarem de duas MMPs importantes em doenças cardiovasculares. Um achado importante foi que crianças e adolescentes obesos, um grupo de risco para doenças cardiovasculares, apresentam níveis de MMP-8 e razão MMP-8/TIMP-1 aumentados comparados ao grupo controle. MMP-8 (colagenase de neutrófilos) é produzida por neutrófilos e células endoteliais, e pode estar envolvida na degradação de colágeno levando ao aumento da vulnerabilidade de placas ateroscleróticas [63]. Dois recentes estudos demonstraram que concentrações plasmáticas aumentadas de MMP-8 estão associadas positivamente com presença e severidade de doença da artéria coronária [64] e progressão de placas ateroscleróticas [65]. Portanto, estes achados são consistentes com a sugestão que crianças e adolescentes obesos do presente estudo apresentam aumento do risco cardiovascular, em parte, devido ao aumento de MMP-8 e MMP-8/TIMP-1.

Não encontramos diferença significativa nos níveis de pro-MMP-2 no presente estudo, no entanto, nós observamos que crianças e adolescentes obesos apresentam altas concentrações de TIMP-2 e baixas razões pro-MMP-2/TIMP-2 comparados com o grupo controle. Estes achados sugerem baixa atividade de MMP-2 na obesidade infantil, corroborando estudo anterior mostrando baixos níveis circulantes de MMP-2 em crianças e adolescentes obesos [66], embora as concentrações de TIMP-2 e razão MMP-2/TIMP-2 não tenham sido avaliadas neste estudo [66]. Contrariando estes resultados, outro estudo demonstrou aumento nos níveis de MMP-2 em adultos obesos [27]. Novamente, níveis de MMPs/TIMPs podem diferir significativamente entre crianças e adultos, estudos futuros são necessários para esclarecer esta questão.

Apesar de nossos resultados sugerirem que a obesidade não afeta os níveis circulantes de MMP-9 em crianças e adolescentes obesos, sabe-se que polimorfismos genéticos de MMP-9 têm sido associados a um aumento de transcrição gênica e, conseqüentemente, a uma concentração elevada desta enzima no plasma, o que sugere uma maior susceptibilidade a doenças cardiovasculares. O SNP C⁻¹⁵⁶²T que resulta na perda do sítio de ligação de uma proteína nuclear supressora ocasiona um aumento de expressão de MMP-9 quando o alelo T está presente [42]. Nós encontramos que ausência do alelo T foi associada a concentrações menores de MMP-9 no grupo de crianças e adolescentes obesos portadores do genótipo CC. Entretanto, em crianças saudáveis nós não observamos influência desse polimorfismo nas concentrações plasmáticas de MMP-9, consistente com esse achado, estudos anteriores mostram que tal polimorfismo não afeta as concentrações plasmáticas de MMP-9 em adultos saudáveis [67, 68]. No SNP Q279 no exon 6 da MMP-9 ocorre a troca de uma adenina por uma guanina na posição 855 leva a substituição de um aminoácido Glutamina por Arginina dentro de um domínio tipo fibronectina, responsável pelo reconhecimento ao colágeno tipo IV. A substituição de aminoácido nesse domínio altamente conservado resulta em uma enzima com baixa afinidade pelo colágeno tipo IV [46]. Apesar de não haver evidências nesse estudo de que o polimorfismo altere a expressão de MMP-9, nós observamos que a ausência do alelo polimórfico R em crianças e adolescentes foi associada a concentrações menores de MMP-9 no grupo de obesos e o mesmo não foi observado para o grupo controle. Nossos resultados sugerem que em os genótipos CC e QQ em crianças e adolescentes obesos conferem proteção contra doenças cardiovasculares por estarem associados a menores concentrações de MMP-9. Blankenberg et al. [39] mostraram que a presença dos alelos T e R foram relacionados a elevadas concentrações de MMP-9 no plasma de pacientes com doença da artéria coronária. Outro estudo reportou que pacientes com AIDS tratados com antiretrovirais portadores do alelo T tinham maiores concentrações plasmáticas de MMP-9 [69]. Nós não encontramos níveis aumentados de MMP-9 em obesos portadores do alelo T ou R, entretanto, a ausência desses alelos foi

associada a menores concentrações plasmáticas de MMP-9 em crianças e adolescentes obesos. Nossos achados sugerem que esses polimorfismos funcionais podem depender da associação com outros fatores como, por exemplo, doença. Sabe-se que o tecido adiposo é um órgão endócrino que libera uma variedade de mediadores bioativos [11] que poderiam modular a expressão e conseqüente concentração de MMP-9 no plasma. De fato, recente estudo mostrou que visfatina, uma adipocina aumentada na obesidade [70-72], induziu a produção MMP-9 em células endoteliais [73], no entanto, o impacto dessa regulação nas concentrações plasmáticas de MMP-9 necessita ser avaliado.

O polimorfismo (CA)₁₄₋₂₄ na região promotora é um microsatélite constituído de repetições CA, em que as sequências de 14 repetições, chamadas neste trabalho de *Low* (L) e de 21 a 24 repetições, chamadas de *High* (H), são as mais freqüentes. Estudos *in vitro* mostraram que alelos com repetições em torno de 21 têm maior expressão de MMP-9, provavelmente por facilitar a abertura da dupla-fita e, conseqüentemente, a transcrição gênica [45]. Entretanto, nós não encontramos influência desse polimorfismo nos níveis circulantes de MMP-9 nos grupos de obesos e controles. No entanto, estudos têm mostrado a importância desse polimorfismo em doenças cardiovasculares ao constatar que números de repetições ≥ 21 estão associados à aterosclerose [49, 50].

A análise de haplótipos - combinação de polimorfismos no mesmo gene - constitui-se uma ferramenta muito mais informativa que a análise de genótipos individuais [74], e nós mostramos pela primeira vez que haplótipos de MMP-9 podem modular as concentrações plasmáticas de MMP-9 em crianças e adolescentes obesos. Particularmente, crianças e adolescentes obesos portadores do haplótipo H2 (C H Q) apresentaram menores concentrações plasmáticas de MMP-9 e razão MMP-9/TIMP-1 (melhor indicativo da atividade de MMP-9 [75]). Adicionalmente, analisamos os extremos de fenótipo de concentrações plasmáticas de MMP-9, comparamos a distribuição de haplótipos no quartil de maiores valores de concentrações de MMP-9 contra o quartil de menores valores de concentrações de MMP-9. Nessa análise, nós confirmamos maior frequência

do haplótipo H2 em obesos com menores concentrações de MMP-9. Curiosamente, estudo anterior reportou que o mesmo haplótipo protege contra hipertrofia ventricular esquerda [47], nós poderíamos sugerir que menores níveis de MMP-9 observados neste haplótipo estariam associados a efeitos protetores em doenças cardiovasculares.

Os polimorfismos da MMP-9 estudados aqui têm sido associados à susceptibilidade a uma variedade de doenças [43, 76, 77] e, recentemente, haplótipos de MMP-9 têm sido associados a doenças cardiovasculares [47]. Nós não encontramos associação entre genótipos e haplótipos de MMP-9 com obesidade embora as MMPs tenham um importante papel nessa condição caracterizada por expansão do tecido adiposo com intenso remodelamento da matriz extracelular [23]. A única diferença encontrada foi no genótipo QR, no entanto, essa pode ser explicada pelo desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg observado na distribuição genotípica para esse polimorfismo no grupo de obesos. A conformidade das frequências genotípicas no grupo controle com o equilíbrio de Hardy-Weinberg é um indicativo da qualidade do desenho experimental e boa amostragem em estudos de associações genéticas [78]. Entretanto, desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg é esperado no grupo de casos em *locus* de susceptibilidade a doenças comuns [79].

Finalmente, nós avaliamos se parâmetros bioquímicos poderiam estar associados aos polimorfismos funcionais de MMP-9 e nos fornecer informações que possam direcionar os estudos futuros a fim de entender as possíveis causas das menores concentrações de MMP-9 em obesos portadores dos genótipos CC e QQ e haplótipo H2. Para tanto, nós agrupamos as crianças e adolescentes obesos de acordo com os genótipos e haplótipos. Os parâmetros bioquímicos avaliados foram: adiponectina em que observamos diminuição no grupo de obesos; insulina, HOMA IR (*Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance Index*) e TBARs (*thiobarbituric acid-reactive species*) em que observamos aumento no grupo de obesos. Os níveis de TBARs são uma medida indireta do stress oxidativo conhecido ativador de MMPs [32] e também está aumentado na obesidade [80].

Adicionalmente, nós avaliamos TIMP-1 e razão MMP-9/TIMP-1. Nós não encontramos diferenças significativas entre os grupos, exceto para os portadores do haplótipo H2 que apresentaram menor razão MMP-9/TIMP-1 quando comparado aos outros haplótipos, resultado esse discutido anteriormente. Consequentemente, esses parâmetros avaliados não estão associados às menores concentrações de MMP-9 observadas em crianças e adolescentes obesos portadores dos genótipos CC e QQ e haplótipo H2.



5- CONCLUSÃO GERAL

Embora nossos resultados mostrem que a obesidade não afeta os níveis circulantes de MMP-9, nós encontramos evidências que genótipos e haplótipos de MMP-9 poderiam modular as concentrações plasmáticas de MMP-9 em crianças e adolescentes obesos, mas não em crianças e adolescentes saudáveis. Genótipos CC e QQ estão associados a menores concentrações plasmáticas assim como o haplótipo H2 (C H Q).

Esses resultados sugerem que os genótipos CC e QQ e haplótipo H2 poderiam oferecer proteção contra doenças cardiovasculares, em especial, aterosclerose, em crianças e adolescentes obesos. Estudos futuros examinando as possíveis relações entre genótipos e haplótipos de MMP-9 com fatores ambientais e outros marcadores genéticos envolvidos no desenvolvimento da obesidade e suas complicações são necessários.



6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- World Health Organization Technical report series 894: "Obesity: preventing and managing the global epidemic." 2000.
- 2- Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística (IBGE) - POF 2008-2009 - Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. 2008.
- 3- Deitel M. Overweight and obesity worldwide now estimated to involve 1.7 billion people. *Obes Surg*, 2003. 13(3): p. 329-30.
- 4- Barlow SE and Dietz WH. Obesity evaluation and treatment: Expert Committee recommendations. The Maternal and Child Health Bureau, Health Resources and Services Administration and the Department of Health and Human Services. *Pediatrics*, 1998. 102(3): p. E29.
- 5- Cole TJ, et al. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *Bmj*, 2000. 320(7244): p. 1240-3.
- 6- Van Gaal LF, Mertens IL and De Block CE, Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 2006. 444(7121): p. 875-80.
- 7- Cusi K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 10(4): p. 306-15.
- 8- Kavey RE, et al. American Heart Association guidelines for primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *J Pediatr*, 2003. 142(4): p. 368-72.
- 9- Berenson GS, et al. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med*, 1998. 338(23): p. 1650-6.
- 10- Freedman DS, et al. The relation of childhood BMI to adult adiposity: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*, 2005. 115(1): p. 22-7.

- 11- Ahima RS and Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*, 2000. 11(8): p. 327-32.
- 12- Tilg H and Moschen AR. Role of adiponectin and PBEF/visfatin as regulators of inflammation: involvement in obesity-associated diseases. *Clin Sci (Lond)*, 2008. 114(4): p. 275-88.
- 13- Ahima RS and Flier Leptin JS. *Annu Rev Physiol*, 2000. 62: p. 413-37.
- 14- Maury E and Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 314(1): p. 1-16.
- 15- Petersen KF and Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *Am J Med*, 2006. 119(5 Suppl 1): p. S10-6.
- 16- Chiarelli F and Marcovecchio ML. Insulin resistance and obesity in childhood. *Eur J Endocrinol*, 2008. 159 Suppl 1: p. S67-74.
- 17- Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, 2004. 116(2): p. 337-50.
- 18- Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol*, 2004. 15(11): p. 2792-800.
- 19- Grundy SM. Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. 5(4): p. 295-309.
- 20- Libby P, Ridker PM and Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2002. 105(9): p. 1135-43.
- 21- Kadowaki T and Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*, 2005. 26(3): p. 439-51.
- 22- Jeffery AN, et al. Adiponectin in childhood. *Int J Pediatr Obes*, 2008. 3(3): p. 130-40.

- 23- Lijnen HR. Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc Res*, 2008. 78(2): p. 286-93.
- 24- Visse R and Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 2003. 92(8): p. 827-39.
- 25- Bouloumie A, et al. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes*, 2001. 50(9): p. 2080-6.
- 26- Catalan V, et al. Increased adipose tissue expression of lipocalin-2 in obesity is related to inflammation and matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities in humans. *J Mol Med*, 2009. 87(8): p. 803-13.
- 27- Derosa G, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in obese patients. *Endothelium*, 2008. 15(4): p. 219-24.
- 28- Glowinska-Olszewska B and Urban M. Elevated matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in obese children and adolescents. *Metabolism*, 2007. 56(6): p. 799-805.
- 29- Madsen EL, et al. Long-term weight loss decreases the nontraditional cardiovascular risk factors interleukin-18 and matrix metalloproteinase-9 in obese subjects. *Metabolism*, 2009. 58(7): p. 946-53.
- 30- Laimer M, et al. Effect of pronounced weight loss on the nontraditional cardiovascular risk marker matrix metalloproteinase-9 in middle-aged morbidly obese women. *Int J Obes (Lond)*, 2005. 29(5): p. 498-501.
- 31- Nagase H, Visse R and Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 2006. 69(3): p. 562-73.
- 32- Galis ZS and Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*, 2002. 90(3): p. 251-62.

- 33- Galis ZS, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1994. 94(6): p. 2493-503.
- 34- Laxton RC, et al. A role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. *Circ Res*, 2009. 105(9): p. 921-9.
- 35- Clark IM, et al. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. 40(6-7): p. 1362-78.
- 36- Brew K, Dinakarpanian D and Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1477(1-2): p. 267-83.
- 37- Newby AC, Southgate KM and Davies M. Extracellular matrix degrading metalloproteinases in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Basic Res Cardiol*, 1994. 89 Suppl 1: p. 59-70.
- 38- Pauly RR, et al. Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. *Circ Res*, 1994. 75(1): p. 41-54.
- 39- Blankenberg S, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*, 2003. 107(12): p. 1579-85.
- 40- Kai H, et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 1998. 32(2): p. 368-72.
- 41- Armstrong PJ, et al. Differential gene expression in human abdominal aorta: aneurysmal versus occlusive disease. *J Vasc Surg*, 2002. 35(2): p. 346-55.
- 42- Zhang B, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*, 1999. 99(14): p. 1788-94.

- 43- Peters DG, et al. Functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter as a potential risk factor for intracranial aneurysm. *Stroke*, 1999. 30(12): p. 2612-6.
- 44- Pollanen PJ, et al. Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene: an autopsy study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(9): p. 1446-50.
- 45- Shimajiri S, et al. Shortened microsatellite d(CA)₂₁ sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *FEBS Lett*, 1999. 455(1-2): p. 70-4.
- 46- Allan JA, et al. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J*, 1995. 309 (Pt 1): p. 299-306.
- 47- Lacchini R, et al. Matrix metalloproteinase 9 gene haplotypes affect left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Clin Chim Acta*. 411(23-24): p. 1940-4.
- 48- Palei AC, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 genotypes and haplotypes in preeclampsia and gestational hypertension. *Clin Chim Acta*. 411(11-12): p. 874-7.
- 49- Fiotti N, et al. MMP-9 microsatellite polymorphism: association with the progression of intima-media thickening and constrictive remodeling of carotid atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 2005. 182(2): p. 287-92.
- 50- Fiotti N, et al. MMP-9 microsatellite polymorphism and susceptibility to carotid arteries atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(6): p. 1330-6.
- 51- Martinez ML, et al. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. 47(1): p. 117-22.
- 52- Tayebjee MH, et al. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am J Hypertens*, 2004. 17(9): p. 764-9.

- 53- Tayebjee MH, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9 levels in patients with hypertension Relationship to tissue Doppler indices of diastolic relaxation. *Am J Hypertens*, 2004. 17(9): p. 770-4.
- 54- Derosa G, et al. Metalloproteinase-2 and -9 in diabetic and nondiabetic subjects during acute coronary syndromes. *Endothelium*, 2007. 14(1): p. 45-51.
- 55- Derosa G, et al. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabetes Metab*, 2007. 33(2): p. 129-34.
- 56- Derosa G, et al. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in combined dyslipidemia. *Clin Invest Med*, 2009. 32(2): p. E124-32.
- 57- Valle M, et al. Low-grade systemic inflammation, hypoadiponectinemia and a high concentration of leptin are present in very young obese children, and correlate with metabolic syndrome. *Diabetes Metab*, 2005. 31(1): p. 55-62.
- 58- Weyer C, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(5): p. 1930-5.
- 59- Stefan N, et al. Plasma adiponectin concentrations in children: relationships with obesity and insulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(10): p. 4652-6.
- 60- Reinehr T, et al. Adiponectin before and after weight loss in obese children. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(8): p. 3790-4.
- 61- Kumada M, et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation*, 2004. 109(17): p. 2046-9.
- 62- Gilardini L, et al. Adiponectin is a candidate marker of metabolic syndrome in obese children and adolescents. *Atherosclerosis*, 2006. 189(2): p. 401-7.

- 63- Herman MP, et al. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation*, 2001. 104(16): p. 1899-904.
- 64- Kato R, et al. Plasma matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circ J*, 2005. 69(9): p. 1035-40.
- 65- Turu MM, et al. Intraplaque MMP-8 levels are increased in asymptomatic patients with carotid plaque progression on ultrasound. *Atherosclerosis*, 2006. 187(1): p. 161-9.
- 66- Glowinska-Olszewska B, Urban M and Florys B. [Selected matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) in obese children and adolescents]. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw*, 2006. 12(3): p. 179-83.
- 67- Demacq C, et al. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinase (MMP)-9 does not affect plasma MMP-9 activity in healthy subjects. *Clin Chim Acta*, 2006. 365(1-2): p. 183-7.
- 68- Demacq C, et al. Functional polymorphisms in the promoter of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene are not linked with significant plasma MMP-9 variations in healthy subjects. *Clin Chem Lab Med*, 2008. 46(1): p. 57-63.
- 69- Demacq C, et al. A genetic polymorphism of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) affects the changes in circulating MMP-9 levels induced by highly active antiretroviral therapy in HIV patients. *Pharmacogenomics J*, 2009. 9(4): p. 265-73.
- 70- Araki S, et al. Plasma visfatin concentration as a surrogate marker for visceral fat accumulation in obese children. *Obesity (Silver Spring)*, 2008. 16(2): p. 384-8.
- 71- Garten A, et al. Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer. *Trends Endocrinol Metab*, 2009. 20(3): p. 130-8.

- 72- Malavazos AE, et al. Epicardial fat thickness: relationship with plasma visfatin and plasminogen activator inhibitor-1 levels in visceral obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2008. 18(8): p. 523-30.
- 73- Adya R, et al. Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis. *Cardiovasc Res*, 2008. 78(2): p. 356-65.
- 74- Crawford DC and Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med*, 2005. 56: p. 303-20.
- 75- Goldberg GI, et al. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem*, 1992. 267(7): p. 4583-91.
- 76- Grieu F, Li WQ and Iacopetta B. Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat*, 2004. 88(3): p. 197-204.
- 77- Matsumura S, et al. A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005. 131(1): p. 19-25.
- 78- Zintzaras E and Lau J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. *J Clin Epidemiol*, 2008. 61(7): p. 634-45.
- 79- Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A and Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet*, 2005. 76(6): p. 967-86.
- 80- Furukawa S, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 2004. 114(12): p. 1752-61.



7- ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Parecer nº 075/2007

Protocolo CEP-UFJF: 1006.052.2007 **FR:** 125116 **CAAE** 0640.0.000.180-07

Projeto de Pesquisa: "ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE RELEVÂNCIA CARDIOVASCULAR COM HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA E OBESIDADE NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA"

Área Temática Grupo III


Pesquisador Responsável: CARLA MÁRCIA MOREIRA LANNA

Instituição: FUNDAÇÃO INSTITUTO MINEIRO DE ESTUDOS E PESQUISA EM NEFROLOGIA

Sumário/comentários do protocolo:

O CEP analisou o Protocolo 1006.052.2007, e considerou que:

- A justificativa "polimorfismos genéticos em diferentes genes que regulam o aparelho cardiovascular podem contribuir de forma significativa para o aumento da susceptibilidade do indivíduo ao desenvolvimento de hipertensão arterial, obesidade e outras alterações cardiovasculares. Dessa forma, o estudo de marcadores genéticos associados à hipertensão arterial sistêmica e à obesidade em crianças e adolescentes se faz importante, pois é possível reduzir o risco da susceptibilidade genética, especialmente nos indivíduos com maior risco, efetuando-se modificações na cultura alimentar familiar e também da população como um todo, através de programas de prevenção e educação" observa-se clareza do objeto a ser investigado, pertinência e valor científico do estudo proposto.
- Objetivo(s) verificar se polimorfismos e haplótipos de genes de relevância cardiovascular (citados na introdução) estão associados com hipertensão arterial e/ou obesidade em crianças e adolescentes. Também, avaliaremos a correlação dos polimorfismos estudados e as concentrações de parâmetros bioquímicos nos grupos em estudo são compatíveis com a proposta.
- Metodologia a ser empregada: Serão estudados quatro grupos de voluntários (após esclarecimento e assinatura do termo de consentimento pelos seus responsáveis): 100 crianças/adolescentes hipertensas, 100 crianças/adolescentes normotensas (controle), 100 crianças/adolescentes hipertensas obesas e 100 crianças/adolescentes obesas (controle). Para a investigação tem por análise sua adequação para atender o(s) objetivo(s) proposto(s) e ainda citar (procedimentos que serão utilizados, tipo de estudo, fase da pesquisa e analisar compatibilidade entre eles)
- Revisão e referências sustentam os objetivos do estudo
- Características da população. As crianças e adolescentes normotensas, de ambos os sexos, serão recrutadas a partir da comunidade local. As crianças e adolescentes hipertensas, hipertensas obesas e obesas serão recrutadas dentre as acompanhadas no Ambulatório de Endocrinologia Infantil do Instituto da Criança e do Adolescente – SUS – Juiz de Fora, como também aquelas acompanhadas no Ambulatório de Nefrologia Infantil da Fundação IMEPEN – UFJF. Serão avaliadas crianças com idade entre 5 e 12 anos e adolescentes com idade entre 13 e 18 anos, de ambos os sexos. Após consentimento dos responsáveis serão preenchidas as ficha clínica com os dados do indivíduo (anamnese) e, em seguida, realizado exame clínico com aferição da pressão arterial em 3 medidas realizadas em tempos diferentes.
- Orçamento detalhado e responsável pelo financiamento da pesquisa será o laboratório de farmacologia cardiovascular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP conforme declaração do pesquisador e do respectivo laboratório.


Dra. Anjura Maria Góes
Coordenadora CEP/UFJF



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36036906 - JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

- Instrumento de coleta de dados: serão coletados 30 mLs de sangue venoso, em jejum de 12 horas, no período da manhã. Nas crianças abaixo de 30 Kg será realizada coleta de sangue em dias diferentes 10 mLs em cada dia, com espaço entre os dias da coleta.
- Cronograma: 1º semestre: triagem dos voluntários; 2º e 3º semestres: genotipagens e análises bioquímicas; 4º semestre: análise dos resultados e elaboração do manuscrito e a coleta de dados só poderá ocorrer após aprovação do projeto pelo comitê)
- Relata a pesquisadora que a participação do cliente não implica em riscos por estar participando do protocolo. Observa-se que todos procedimentos em pesquisa de coleta de sangue existe pelo menos risco mínimo.
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, está em linguagem adequada, clara para compreensão do sujeito, descrição suficiente dos procedimentos contatos com o pesquisador informando que está de acordo com a Res. 196/96 CNS.
- Qualificação do(a) pesquisador(a): um pesquisador e Graduado em Farmácia e Bioquímica, outro e Graduada em Medicina e ambos possuem curso de Doutorado
- Salientamos que o pesquisador deverá encaminhar a este comitê o relatório final da pesquisa

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto

Situação: Projeto Aprovado
Juiz de Fora, 19 de abril de 2007

Prof. Dra. Arigela Maria Gollner
Coordenadora – CEP/UFJF

RECEBI
DATA: 05/04/2007
ASS: Carlos Soares

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1 – Identificação do Responsável pela execução da pesquisa:

Nome: CARLA MÁRCIA MOREIRA LANNA

Título: Médica, Prof. Adjunto I do Departamento de Fisiologia da UFJF

Endereço do pesquisador

1) Departamento de Fisiologia – UFJF – Instituto de Ciências Biológicas – ICB – Campus
Universitário – Bairro Martelos, Juiz de Fora - MG

Telefones de contato do pesquisador: (32) 3229-3211

Coordenador do Projeto: Prof. Débora Cristine Souza da Costa

Identidade: MG- 10289744

Endereço do coordenador

1) Departamento de Fisiologia – UFJF – Instituto de Ciências Biológicas – ICB – Campus
Universitário – Bairro Martelos, Juiz de Fora - MG

Telefones de contato do pesquisador: (32) 3229-3210

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa: Universidade Federal de Juiz de Fora – Pró-
Reitoria de Pesquisa (Propesq) – Campus Universitário s/nº - Bairro Martelos, Juiz de Fora – MG
Cep: 36030-900

Telefone: (32) 3229-3788

Informações ao participante ou responsável:

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa : **ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE RELEVÂNCIA CARDIOVASCULAR COM HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA E OBESIDADE NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA** que tem como objetivos a avaliação fatores genéticos associados à hipertensão arterial sistêmica e obesidade na infância e adolescência e a avaliação de substâncias como enzimas e hormônios envolvidos com a hipertensão arterial e obesidade infantil.

1. Antes de aceitar participar da pesquisa, leia atentamente as explicações abaixo que informam sobre o procedimento:
A criança ou adolescente sob sua responsabilidade será chamada para 3 consultas médicas onde será avaliada solicitando informações sobre a criança ou adolescente, será examinada com medida da pressão arterial e na última consulta será marcada um dia/horário para coleta de sangue. O incômodo será apenas o da coleta de sangue, não usaremos procedimentos outros capazes de causar dor na criança ou ainda uso de medicações ou exames com efeitos colaterais (outros efeitos).
2. Você poderá recusar a participar da pesquisa e poderá abandonar o procedimento em qualquer momento, sem nenhuma penalização ou prejuízo.
3. A sua participação como voluntário, não irá conferir nenhum privilégio, seja ele de caráter financeiro ou de qualquer natureza, podendo se retirar do projeto em qualquer momento sem prejuízo a V. SA.
4. A sua participação não implica em riscos por estar participando do protocolo.
5. Serão garantidos o sigilo e privacidade, sendo reservado ao participante ou seu responsável o direito de omissão de sua identificação ou de dados que possam comprometê-lo.
6. Na apresentação dos resultados não serão citados os nomes dos participantes.
7. Este TCLE será assinado em duas vias, sendo que uma será entregue a você (participante ou responsável) e a 2ª via será arquivada com o pesquisador.
8. Confirmando ter conhecimento do conteúdo deste termo. A minha assinatura abaixo indica que concordo em participar desta pesquisa e por isso dou meu consentimento.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20_____.

Nome do paciente: _____

Endereço: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____