

FLÁVIA MAGAZONI GONÇALVES

**“AVALIAÇÃO DE METALOPROTEINASES E DE
MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM
SÍNDROME METABÓLICA”**

CAMPINAS

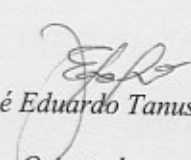
Unicamp

2009

FLÁVIA MAGAZONI GONÇALVES

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia, da aluna Flávia Magazoni Gonçalves

Campinas, 29 de julho 2009.


Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

- Orientador -

**“AVALIAÇÃO DE METALOPROTEINASES E DE
MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM
SÍNDROME METABÓLICA”**

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ EDUARDO TANUS DOS SANTOS

CAMPINAS

Unicamp

2009

FLÁVIA MAGAZONI GONÇALVES

**“AVALIAÇÃO DE METALOPROTEINASES E DE
MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM
SÍNDROME METABÓLICA”**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Farmacologia

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ EDUARDO TANUS DOS SANTOS

CAMPINAS

Unicamp

2009

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

G586a	Gonçalves, Flávia Magazoni “Avaliação de metaloproteinases e de marcadores inflamatórios em pacientes com síndrome metabólica” / Flávia Magazoni Gonçalves. Campinas, SP: [s.n.], 2009. Orientador: José Eduardo Tanus dos Santos Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Síndrome metabólica. 2. Metaloproteinase. 3. Marcadores inflamatórios. I. Santos, José Eduardo Tanus dos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	---

**Título em inglês: “Assessment of metaloproteinases and pro-inflammatory
markers in patients with metabolic syndrome”**

Keywords: • Metabolic syndrome
• Metalloproteinases
• Inflammatory markers

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Prof. Dr. José Ernesto dos Santos

Prof. Dr. Wilson Nadruz Júnior

Data da defesa: 29-07-2009

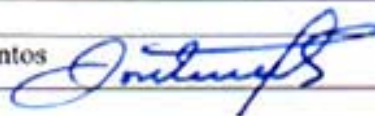
Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Flávia Magazoni Gonçalves

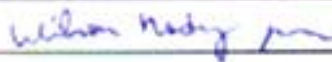
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). José Eduardo Tanus dos Santos

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Jose Ernesto dos Santos



Professor (a) Doutor (a) Wilson Nadruz Junior



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



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

Data: 29/07/2009

DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais,
Luiz e Fátima,
pela força e compreensão,*

*à minha irmã
Patrícia
pela demonstração de carinho e*

*ao meu namorado
Reinaldo
pelo companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

À DEUS por iluminar minha vida e me dar sempre força e perseverança para nunca desistir de meus objetivos.

Ao Professor Doutor José Eduardo Tanus dos Santos, não só pelas orientações, mas, também, pela oportunidade e pela paciência e dedicação no ensinamento que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Antônio Casella Filho pelas colaborações e discussões proveitosas.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia da USP de Ribeirão Preto, que tão bem me acolheram e com os quais pude vivenciar momentos únicos, em especial ao Alisson, a Vanessa e a Joice.

Ao professor Doutor Edson Antunes minha imensa gratidão pela atenção e auxílio junto à coordenação da Pós-Graduação da Farmacologia - UNICAMP.

Aos voluntários que aceitaram participar desse estudo, sem os quais esse projeto não existiria.

Aos meus pais Luiz e Fátima que sempre estiveram tão presentes nessa minha caminhada e que sem dúvida serão meus eternos alicerces.

A minha irmã Patrícia pelo apoio, pelo carinho e pela amizade eterna.

Ao Reinaldo pelo amor, companheirismo e principalmente por entender minha ausência em momentos especiais.

*Eu tenho uma espécie de dever,
de dever de sonhar,
de sonhar sempre,
pois sendo mais do que
uma espectadora de mim mesma,
eu tenho que ter o melhor espetáculo que posso.
E assim me construo a ouro e sedas,
em salas supostas, invento palco, cenário,
para viver o meu sonho
entre luzes brandas
e músicas invisíveis”.
(Fernando Pessoa)*

A síndrome metabólica (MetS) é caracterizada por conjunto de fatores de risco para doenças cardiovasculares e diabetes. As metaloproteinases (MMPs) são enzimas envolvidas na manutenção da homeostase da matriz extracelular e um desequilíbrio entre suas concentrações e as de seus inibidores endógenos (TIMPs) pode ter um papel importante nas modificações cardiovasculares associadas com a MetS. Além disso, um estado inflamatório crônico tem sido descrito em pacientes com MetS e podem levar ao desenvolvimento de aterosclerose. A hipótese deste estudo é que aumento nas concentrações de alguns marcadores pró-inflamatórios e um desequilíbrio entre as concentrações de metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) e seus inibidores endógenos (TIMPs) possam estar envolvidos na fisiopatologia da MetS. Para abordar esta questão, foram estudados 25 indivíduos saudáveis (controles) e 25 pacientes com MetS. As concentrações plasmáticas de pró-MMP-2 e de pró-MMP-9 foram determinadas por zimografia. A concentração plasmática de MMP-8, MMP-3, TIMP-1, TIMP-2, proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), interleucina-6 (IL-6), molécula de adesão intracelular-1 (sICAM-1) e sP-selectina foram medidas por kits de ELISA. Os resultados revelaram um aumento nas concentrações de sP-selectina, sICAM-1, MCP-1, IL-6, pró-MMP-9, MMP-8 e TIMP-1 em pacientes com MetS comparados com controles saudáveis. Além disso, nenhuma diferença nos níveis de pró-MMP-2, MMP-3 e TIMP-2 foi encontrada. Nossos resultados sugerem que as MMPs podem ter um papel no aumento do risco cardiovascular em pacientes com MetS e que intervenções farmacológicas no alvo das MMPs, especialmente a MMP-9 e a MMP-8 merecem maior atenção em pacientes com MetS.

Palavras-chave- Síndrome metabólica, metaloproteinases, mediadores pró-inflamatórios.

The metabolic syndrome (MetS) denotes a clustering of cardiovascular and diabetes risk factors. The metalloproteinase (MMPs) are enzymes involved in maintaining the homeostasis of the extracellular matrix and an imbalance between their concentrations and their endogenous inhibitors (TIMPs) may play important role in the cardiovascular modifications associated with MetS. In addition, a chronic inflammatory state has been described in patients with MetS, thus leading to the development of atherosclerosis. We hypothesized that increased concentrations of pro-inflammatory mediators and imbalanced concentrations of matrix metalloproteinases (MMPs) and their endogenous inhibitors (TIMPs) may reflect the pathophysiology of MetS. To address this issue, we studied 25 healthy subjects and 25 MetS patients. The plasma levels of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 were determined by gelatin zymography. The plasma concentrations of MMP-8, MMP-3, TIMP-1, TIMP-2, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), intercellular adhesion molecule (sICAM-1), and sP-selectin were measured by ELISA kits. The results revealed an increase in sP-selectin, sICAM-1, MCP-1, IL-6, pro-MMP-9, MMP-8, and TIMP-1 in MetS patients compared with healthy controls. In addition, no differences in pro-MMP-2, MMP-3, and TIMP-2 levels were found. These findings suggest that MMPs may have a role in the increased cardiovascular risk of MetS patients and pharmacological interventions targeting MMPs, especially MMP-9 and MMP-8 deserve further investigation in MetS patients.

Key words- Metabolic Syndrome, Matrix metalloproteinases, pro-inflammatory mediators.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AHA	American Heart Association
CCR2	Receptor do tipo 2 de quimiocinas
ECM	Matriz extracelular
EGIR	European Group for Study of Insulin Resistance
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
IDF	International Diabetes Foundation (IDF)
IL-6	Interleucina 6
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
MetS	Síndrome Metabólica
MMPs	Metaloproteinases da matriz extracelular
NCEP-ATP III	National Cholesterol Education Program
sICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1
TIMPs	Inibidores endógenos das metaloproteinases
WHO	World Health Organization

3- Concentração reduzida de HDL:

Homens: HDL < 40mg/dL

Mulheres: HDL < 50mg/dL

4- Hipertensão arterial com PA sistólica ≥ 130 mmHg e diastólica ≥ 85 mmHg ou em uso de medicamento anti-hipertensivo;

5- Glicemia de jejum ≥ 100 mg/dL ou diagnóstico prévio de diabetes.

Algumas peculiaridades são observadas em outros critérios de diagnóstico em relação ao apresentado acima. Os critérios usados pela WHO e pelo EGIR consideram a presença de resistência à insulina como um critério obrigatório para o diagnóstico. Em contrapartida, o critério IDF considera a presença da obesidade abdominal como um critério obrigatório (Grundy, et al., 2005).

A fisiopatologia da MetS é complexa e ainda não está completamente elucidada. De acordo com a literatura, tanto a obesidade abdominal quanto a resistência a insulina têm sido consideradas principais causas da MetS (Cornier, et al., 2008; Grundy, 2006). Esses dois componentes estão fortemente inter-relacionados. A insulina não está envolvida apenas com o metabolismo de carboidratos, mas também desempenha importante papel no metabolismo de lipídeos. Desta forma, acredita-se que um defeito na via de sinalização dependente da insulina poderia prejudicar o metabolismo de lipídeos e constituir um mecanismo chave para o desenvolvimento de MetS, principalmente nos tecidos adiposos em que resultaria em um quadro de dislipidemia. Por outro lado, outros pesquisadores sugerem que esse defeito na sinalização da insulina realmente ocorre em pacientes com MetS, embora seja secundário a um distúrbio intracelular de lipídeos nos tecidos, que está presente principalmente quando há um sobrepeso (Shaw, et al., 2005).

	Pág.
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1- INTRODUÇÃO	11
1.1- Síndrome Metabólica	12
1.2- Metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs)	15
1.3- Marcadores Inflamatórios e Aterosclerose	20
2- OBJETIVOS	23
3- CAPÍTULO	25
4- DISCUSSÃO	31
5- CONCLUSÃO	38
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
7- ANEXOS	51
Anexo 1- Termos de consentimento livre e esclarecido - TCLE para Portadores de Síndrome Metabólica.....	52
Anexo 2- Termos de consentimento livre e esclarecido - TCLE para Participantes Normais servindo como Controle.....	57

1- INTRODUÇÃO

1.1- Síndrome Metabólica

O conceito de Síndrome Metabólica (MetS) é conhecido há cerca de 80 anos e é definido como uma constelação de distúrbios metabólicos que representam fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2. Esse conceito foi primeiramente descrito na década de 1920 por Kylin que observou uma associação entre hipertensão, hiperglicemia e gota. Mais tarde, em 1974, Vague chamou atenção para a presença de alterações metabólicas relacionadas com a obesidade abdominal. Em 1998, Reaven relacionou esse conjunto de fatores de risco metabólico com a resistência à insulina e deu origem ao termo “síndrome X” ou síndrome da resistência à insulina (Eckel, et al., 2005).

Apesar do grande número de critérios para o diagnóstico da MetS, vem sendo proposto atualmente que resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia, obesidade abdominal e hipertensão sejam as características-chaves consideradas para o seu diagnóstico (Shaw, et al., 2005). Além disso, frequentemente um estado pró-trombótico e pró-inflamatório vem sendo considerado nos pacientes com MetS, ainda que não sejam necessariamente utilizados como critério para o diagnóstico. (Grundy, 2006).

De acordo com os critérios estabelecidos pelo NCEP-ATP III-2001 e pela AHA, o diagnóstico de MetS é dado pela presença de pelo menos 3 dos seguintes componentes:

1- Presença de obesidade abdominal estimada pela circunferência abdominal:

Homens: circunferência abdominal > 102cm

Mulheres: circunferência abdominal > 88cm

2- Concentração plasmática de triglicérides $\geq 150\text{mg/dL}$ ou em uso de medicação hipolipemiante;

O diagnóstico e o tratamento precoce da MetS são de fundamental importância uma vez que evidências na literatura mostram que a presença da MetS está fortemente associada a um aumento da taxa de morbidade e mortalidade cardiovascular (Isomaa, et al., 2001; Malik, et al., 2004). Pacientes com MetS apresentam um aumento de até 2 vezes no risco relativo de desenvolver doenças cardiovasculares, especialmente doença aterosclerótica, e de até 5 vezes o risco relativo de desenvolver diabetes tipo 2 (Grundy, 2006; Shaw, et al., 2005). Além disso, a presença de MetS está relacionada com a incidência de infarto do miocárdio e com a ocorrência de acidente vascular encefálico (Ninomiya, et al., 2004).

A progressão do quadro de MetS segue praticamente um mesmo padrão, apesar de haver pequenas variações entre os indivíduos, onde os mais susceptíveis terão uma progressão mais acelerada. Geralmente, a MetS tem início com o surgimento da obesidade abdominal e/ou resistência à insulina. Nos estágios iniciais, estas alterações metabólicas não são tão acentuadas; porém, com o passar do tempo, vão ficando mais evidentes e podem levar ao início de processos aterogênicos e, conseqüentemente, de doenças cardiovasculares ateroscleróticas. Além disso, o avanço de alterações metabólicas nesses indivíduos pode levar ao desenvolvimento de diabetes tipo 2, fato que aumenta ainda mais os risco de desenvolver doenças cardiovasculares como já mencionado anteriormente. Quando a MetS progride até esse estágio, surgem algumas complicações metabólicas e há a necessidade de intervenções terapêuticas.

Alguns outros fatores como a inatividade física, o avanço da idade, desequilíbrio hormonal e alterações em fatores genéticos podem agravar a MetS. Tanto com o avanço da idade quanto com a presença de sedentarismo há uma diminuição da massa muscular e, conseqüentemente, um aumento da quantidade de gordura corporal que pode agravar a resistência á insulina. Nesse sentido, mudanças no estilo de vida como uma dieta equilibrada e um programa de exercícios físicos regulares podem melhorar o prognóstico da doença (Grundy, 2006).

Em virtude do grande número de critérios para o diagnóstico da MetS, bem como das peculiaridades de cada um, o estudo da prevalência da MetS é dificultado e muitas vezes, dependendo do critério utilizado, há grande disparidade em relação ao resultado apresentado. Além disso, os resultados variam de acordo com as características (sexo, idade, raça e etnia) das populações consideradas em cada grupo de estudo (Cornier, et al., 2008; Shaw, et al., 2005). De qualquer forma, a incidência da MetS em todo o mundo é relativamente alta, tendo aumentado nas últimas décadas, em virtude do aumento da incidência de obesidade e diabetes (Grundy, 2008). Na população americana adulta a prevalência de MetS está em torno de 24% (Ford, 2005; Ford, et al., 2002). Independente do critério utilizado para o diagnóstico da MetS, há um consenso que sua prevalência aumenta com o avanço da idade (Ceska, 2007), sendo que nos Estados Unidos a prevalência de MetS aumenta de 7% em pacientes com 20 a 29 anos para 44% em pacientes com idade entre 60 a 69 anos (Ford, et al., 2002).

1.2- Metaloproteínases (MMPs) e seus inibidores endógenos (TIMPs)

As metaloproteínases da matriz extracelular conhecidas também como matrixinas ou MMPs, são enzimas zinco-dependentes com capacidade de degradar componentes da matriz extracelular (ECM) como colágeno, elastina, proteoglicanas, entre outros (Visse and Nagase, 2003). As MMPs têm importantes papéis tanto em processos fisiológicos como o desenvolvimento embrionário, morfogênese e angiogênese, reprodução, reabsorção e remodelagem tecidual, quanto em processos patológicos como hipertensão, doença periodontal, destruição de cartilagem em artrite, ruptura de placa aterosclerótica, reestenose miocárdica, desenvolvimento de aneurismas, metástase tumoral, degeneração macular, entre outros (Raffetto and Khalil, 2008).

Atualmente mais de 25 tipos de MMPs diferentes foram identificadas de acordo com a estrutura e com o tipo de substrato que preferencialmente são degradados por elas. Basicamente são divididas em 6 grupos: collagenases

(MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), matrilinas (MMP-7, MMP-11 e MMP-26), MMPs tipo membrana (MT1-MMP ou MMP-14, MT2-MMP ou MMP-15, MT3-MMP ou MMP-16 e MT4-MMP ou MMP-17, entre outras) e um grupo classificado como “outras”, que apresenta grande diversidade quanto a estrutura e ao substrato que degradam (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, entre outras) (Nagase, et al., 2006).

Dentro dessa grande diversidade de enzimas, as gelatinases A e B, conhecidas respectivamente como MMP-2 e MMP-9, representam uma subfamília de MMPs com importante papel em algumas doenças principalmente do sistema cardiovascular, incluindo aterosclerose, isquemia e aneurisma (Chow, et al., 2007). A MMP-2 é imensamente distribuída e constitutivamente expressa pela maioria das células do tecido conjuntivo (fibroblastos), células endoteliais e células epiteliais, enquanto que a MMP-9 é expressa, sintetizada e secretada por uma grande variedade de células inflamatórias (macrófagos alveolares, neutrófilos, eosinófilos e células epiteliais). A MMP-2 ativada (72 kDa) tem a capacidade de degradar os colágenos tipo I, IV e V e gelatina (colágeno desnaturado), conduzindo a renovação da membrana basal e a MMP-9 ativada (92 kDa) exerce uma função importante na remodelação e reparo de tecidos, através da degradação dos colágenos tipo IV e V e gelatina (Ohbayashi, 2002), bem como um importante valor prognóstico para doenças cardiovasculares (Blankenberg, et al., 2003; Garvin, et al., 2008).

Dentro da subfamília das collagenases, a MMP-8, conhecida também como collagenase neutrofílica ou collagenase de neutrófilos, está presente em macrófagos, em células musculares lisas da capa fibrosa das placas ateroscleróticas e no endotélio dos ateromas, o que pode contribuir para o processo de remodelamento do colágeno e inflamação presente na aterosclerose (Lemaitre and D'Armiento, 2006). Além da presença em lesões ateroscleróticas e de sua contribuição para a ruptura das placas pela degradação preferencial de colágeno tipo I, a MMP-8 tem sido associada não apenas com a presença, mas também com a severidade de doença coronariana (Kato, et al., 2005).

A MMP-3, conhecida também como estromelisina-1, é capaz de degradar uma grande variedade de componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, fibronectina, laminina, caseína, gelatina, colágeno, entre outros) além de poder participar da ativação de outras MMPs como a MMP-9 e a MMP-8 (Lemaitre and D'Armiento, 2006; Visse and Nagase, 2003). O papel da MMP-3 no desenvolvimento e progressão das lesões ateroscleróticas é ainda controverso. Enquanto alguns estudos mostram haver aumento nos níveis circulantes de MMP-3 em lesões ateroscleróticas (Beaudeux, et al., 2003; Galis, et al., 1994), outros estudos mostram haver diminuição (Noji, et al., 2001). Em modelo animal, a MMP-3 mostrou ter papel duplo nas lesões ateroscleróticas: contribui para a redução do tamanho das placas por degradar componentes da matriz extracelular e, ao mesmo tempo, promoveu a formação de aneurisma arterial pela degradação da lamina elástica, sugerindo que a MMP-3 pode atenuar o processo aterogênico, sem excluir a possibilidade da ruptura das placas (Silence, et al., 2001). Dessa forma, podemos sugerir que nem todas as MMPs possuem um papel pró-aterogênico.

A estrutura típica das MMPs contém um peptídeo de sinalização na região N-terminal que permite a secreção e o transporte da enzima. Há também um domínio pró-peptídico ou pró-domínio cuja função é proteger o domínio catalítico da enzima, além de um domínio catalítico contendo uma sequência conservada na qual três resíduos de histidina forma um complexo com o zinco e um domínio hemopexin na região C-terminal que é conectado ao domínio catalítico por uma região flexível e que permite a ligação de outras proteínas que podem alterar a atividade das MMPs. Uma peculiaridade do domínio catalítico das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) é a presença de três domínios de fibronectina que permite a ligação e a consequente degradação de colágeno tipo IV ou colágeno desnaturado (gelatina) (Chow, et al., 2007; Nagase and Woessner, 1999)

Geralmente as MMPs são secretadas na forma de seus precursores inativos (zimogênios ou na forma de pró-MMP), cuja latência é mantida através da interação entre o resíduo de cisteína presente no domínio pró-peptídico,

e o íon zinco no domínio catalítico, bloqueando seu acesso ao substrato. A quebra da interação entre o grupamento tiol e o íon zinco permite a clivagem do domínio pró-peptídico, deixando o sítio catalítico livre para interação com o substrato (Nagase, 1997; Stamenkovic, 2003). O rompimento dessa ligação pode ocorrer por diferentes mecanismos: **1)** clivagem direta do pró-domínio por outras proteases, inclusive por membros de subfamílias específicas das próprias MMPs; **2)** redução do grupamento tiol por agentes oxidantes e espécies reativas de oxigênio e alguns reagentes contendo metais pesados; **3)** perturbação alostérica da forma zimogênica, entre outros mecanismos (Ra and Parks, 2007). Tais mudanças conformacionais que ocorrem durante a ativação das MMPs representam a base para a detecção das formas latentes e ativas das MMPs por zimografia (Galis and Khatri, 2002).

Além da alteração entre as forma de zimogênio ativa e inativa, a atividade das MMPs também pode ser regulada por meio da transcrição gênica, da ativação pós-traducional dos zimogênios e através de sua interação com seus inibidores teciduais, os TIMPs (Chakraborti, et al., 2003; Galis and Khatri, 2002). Desta forma, com a regulação da atividade catalítica das MMPs, podemos impedir a extensa degradação dos componentes importantes da ECM e, conseqüentemente, alguns danos teciduais.

Os TIMPs representam um grupo de inibidores endógenos não-seletivos das MMPs, capazes de inibir e, desta maneira, modular a atividade proteolítica dessas enzimas. Em humanos, quatro membros diferentes de TIMPs foram caracterizados e são designados por TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Esses inibidores são expressos em uma grande variedade de tipo celular e estão presentes na maioria dos tecidos e fluidos corporais. Os TIMPs inibem as MMPs em uma proporção estequiométrica de 1:1 através da interação da região N-terminal da molécula de TIMP com o sítio ativo das MMPs (Gill and Parks, 2008). Apesar dos TIMPs não possuírem seletividade para as MMPs, o TIMP-1 é conhecido como inibidor preferencial da MMP-9, enquanto que o TIMP-2 inibe preferencialmente a MMP-2 (Lambert, et al., 2004).

Apesar de conhecidos na literatura por sua capacidade de inibir a atividade das MMPs, os TIMPs possuem outras funções biológicas. O TIMP-1 e o TIMP-2 apresentam atividade mitogênica em uma grande variedade de tipos celulares (Nagase and Woessner, 1999). Além disso, em baixas concentrações o TIMP-2 participa da ativação da pró-MMP-2 juntamente com a MMP-14, uma MMP de membrana (Nagase, et al., 2006; Ra and Parks, 2007).

O balanço entre as atividades de MMPs e TIMPs determina a dinâmica na ECM em um determinado momento. Em algumas doenças, principalmente as do sistema cardiovascular, em que há um desequilíbrio na atividade das MMPs, as mudanças nos níveis dos TIMPs são importantes, já que podem afetar a atividade dessas enzimas (Visse and Nagase, 2003). Um aumento nos níveis circulantes de MMPs sem um aumento concomitante dos níveis de TIMPs, resulta na destruição tecidual, podendo levar a um processo de remodelamento vascular associado à aterosclerose, aumentando dessa forma o risco cardiovascular (Gomez, et al., 1997). Desta forma, as MMPs vêm sendo consideradas como importantes alvos terapêuticos e aumenta a cada momento o interesse em desenvolver alguns inibidores, especialmente os seletivos, para as MMPs. Alguns inibidores estão sendo testados principalmente em doenças de natureza inflamatória como o câncer (Hu, et al., 2007).

Em relação à MetS, poucos estudos na literatura avaliaram até o presente momento as concentrações de MMPs e TIMPs nesses pacientes (Cicero, et al., 2007; Miksztowicz, et al., 2008). Um desequilíbrio entre as concentrações de MMPs e/ou TIMPs pode ter um papel importante em relação às modificações cardiovasculares associadas à MetS. O primeiro trabalho que avaliou as concentrações plasmáticas de MMPs e TIMPs em pacientes com MetS mostrou que os níveis plasmáticos de MMP-9 e TIMP-1 encontram-se significativamente aumentados em pacientes com MetS quando comparados com o grupo controle, enquanto que nenhuma alteração foi encontrada em relação a concentração plasmática de MMP-2 nesses dois grupos (Cicero, et al., 2007). Contrariando esses achados, posteriormente, outro trabalho mostrou haver um

aumento significativo nos níveis plasmáticos de MMP-2 em mulheres com MetS (Miksztoicz, et al., 2008). Em relação a MMP-8, o único trabalho que existe na literatura considera amostras de soro e mostra que os níveis circulantes de MMP-8 encontram-se significativamente aumentados em pacientes com MetS (Aquilante, et al., 2007). Nenhum trabalho até o presente momento avaliou os níveis plasmáticos da MMP-3 em pacientes com MetS.

1.3- Marcadores Inflamatórios e Aterosclerose

Um estado inflamatório crônico acompanhado de um quadro de comprometimento da formação de óxido nítrico e disfunção endotelial tem sido observado em pacientes com MetS e pode levar ao desenvolvimento de aterosclerose (Gomes, et al., 2008; Koh, et al., 2005; Pischon, et al., 2008). O processo aterosclerótico é desencadeado por uma inflamação vascular crônica cujo início é um processo complexo e multifatorial, no qual uma injúria nas paredes dos vasos pode ativar células endoteliais e musculares lisas que passam a sintetizar alguns tipos de proteínas pró-inflamatórias importantes (Koh, et al., 2005). Dentre as proteínas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas inflamatórias e fatores de crescimento estão frequentemente presentes nas placas ateroscleróticas e podem conduzir a eventos clínicos relevantes (Gonzalez and Selwyn, 2003; Libby, 2002).

As moléculas de adesão celular participam do processo inflamatório característico na aterosclerose. Essas moléculas medeiam o recrutamento e a migração de leucócitos através da superfície endotelial em resposta a algumas citocinas inflamatórias e tem um importante papel no início do processo aterosclerótico. Três grupos de moléculas de adesão são bem caracterizados: as integrinas, as selectinas (L-selectina, E-selectina, P-selectina) e alguns membros da família das imunoglobulinas (VCAM-1, ICAM-1). Enquanto as selectinas são responsáveis em grande parte pelo rolamento leucocitário inicial, as moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 desempenham importantes papéis na adesão e na

migração posterior desses leucócitos através da superfície do endotélio (Schram and Stehouwer, 2005).

A P-selectina é uma molécula expressa em plaquetas ativadas e o rolamento de células inflamatórias mediadas por essas moléculas é importante tanto em processos inflamatórios quanto na manutenção da homeostase (Gokulakrishnan, et al., 2006; McEver, 1991). Já a molécula de adesão intracelular-1(ICAM-1) é expressa em células endoteliais, células musculares lisas e monócitos, ficando aderida a membranas podendo participar a adesão de monócitos, linfócitos e neutrófilos. Sua forma solúvel (s-ICAM-1) é detectada no plasma e está diretamente associada com sua quantidade ligada a membranas (Schram and Stehouwer, 2005).

Além das moléculas de adesão citadas acima, a proteína quimioatratante de monócitos-1 (MCP-1) desempenha importante papel no recrutamento dos leucócitos para dentro da camada íntima, facilitando a migração dos leucócitos através da parede do endotélio por diapedese (Libby, 2002). MCP-1 representa um fator quimiotático específico para monócitos/macrófagos e seu importante papel na patogênese de doenças crônicas é mediado através de sua interação com receptores CCR2 (Chacon, et al., 2007). Pode causar um quadro de inflamações vascular crônica e induzir trombose, proliferação e migração de células musculares lisas, angiogênese e *stress* oxidativo. Estudos apontam para um aumento da produção de MCP-1 por células endoteliais e musculares lisas na presença de disfunção endotelial e fatores de risco para aterosclerose (Egashira, 2003).

Dentro da camada íntima, os monócitos adquirem características morfológicas de macrófagos e passam a contribuir para a formação das células esponjosas que caracterizam o primeiro estágio de lesão aterosclerótica. Além disso, colaboram para o aumento da secreção de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6) que irão contribuir para a progressão e, conseqüentemente, para complicações frequentemente observadas em aterosclerose (Libby, 2002). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida

por uma variedade de tipos celulares (monócitos, fibroblastos, células endoteliais, adipócitos, entre outras) que tem importante papel nas lesões ateroscleróticas, mediando a amplificação dos sinais pró-inflamatório dentro das placas (Blake and Ridker, 2002; Sutherland, et al., 2004). Os níveis circulantes de IL-6 correlacionam-se positivamente com a presença de obesidade, resistência à insulina e hipertensão e altos níveis são observados em pacientes com aterosclerose, diabetes tipo 2 e MetS (Mathieu, et al., 2006; Sutherland, et al., 2004).

Apoiando o que foi mencionado anteriormente, estudos recentes que enfocam a vulnerabilidade de placas ateroscleróticas comprovam o risco cardiovascular aumentado em pacientes com MetS. Estes pacientes, quando comparados com o grupo sem MetS, apresentam não apenas placas de ateroma com volume maior, mas também anormalidades mais acentuadas nessas placas, como alto nível de calcificação e de lipídeos (Hitsumoto, et al., 2007).

Em relação à MetS, a avaliação de marcadores inflamatórios como as moléculas de adesão e citocinas tem sido frequente e é de fundamental importância uma vez que essas moléculas vêm emergindo como moléculas candidatas promissora para o entendimento da inflamação vascular presente na aterosclerose e vêm sendo sugeridas como marcadores capazes de predizer o risco de eventos cardiovasculares (Willerson and Ridker, 2004).

2- OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar se há alguma alteração nos níveis circulantes de MMPs e seus inibidores endógenos, os TIMPs, bem como de alguns marcadores inflamatórios em pacientes com Síndrome Metabólica. Para testar esta hipótese, foram avaliados os níveis circulantes de alguns marcadores inflamatórios como as moléculas de adesão sICAM-1 e sP-selectina, da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e da interleucina-6 (IL-6). Além disso, foram medidos os níveis circulantes das metaloproteinases, pró-MMP-2, MMP-3, MMP-8 e pró-MMP-9, e de seus inibidores endógenos, o TIMP-1 e o TIMP-2.

3- CAPÍTULO 1



Increased circulating levels of matrix metalloproteinase (MMP)-8, MMP-9, and pro-inflammatory markers in patients with metabolic syndrome

Flavia M. Gonçalves^a, Anna L.B. Jacob-Ferreira^a, Valeria A. Gomes^a, Antonio Casella-Filho^b, Antonio C.P. Chagas^b, Andrea M. Marcaccini^c, Raquel F. Gerlach^c, Jose E. Tanus-Santos^{d,*}

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

^b Atherosclerosis Unit, Heart Institute (Incor), Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

^c Department of Morphology, Estomatology and Physiology, Dental School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 November 2008

Received in revised form 19 February 2009

Accepted 20 February 2009

Available online 28 February 2009

Keywords:

Inflammatory markers

Matrix metalloproteinases

Metabolic syndrome

Tissue inhibitors of metalloproteinases

ABSTRACT

Background: Metabolic syndrome (MetS) predisposes to cardiovascular complications. Increased concentrations of pro-inflammatory mediators and imbalanced concentrations of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) may reflect the pathophysiology of MetS. We compared the circulating levels of MMPs, TIMPs, and inflammatory mediators in MetS patients with those found in healthy controls.

Methods: We studied 25 healthy subjects and 25 MetS patients. The plasma levels of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 were determined by gelatin zymography. The plasma concentrations of MMP-8, MMP-3, TIMP-1, TIMP-2, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), intercellular adhesion molecule (sICAM-1), and sP-selectin were measured by ELISA kits.

Results: We found higher sP-selectin, sICAM-1, MCP-1, and IL-6 (all $P < 0.05$) concentrations in MetS patients compared with healthy controls. No differences in pro-MMP-2, MMP-3, and TIMP-2 levels were found (all $P > 0.05$). However, we found higher pro-MMP-9, MMP-8, and TIMP-1 levels in MetS patients compared with healthy controls (all $P < 0.05$).

Conclusions: Patients with MetS have increased circulating concentrations of pro-MMP-9, MMP-8, and TIMP-1 that are associated with increased concentrations of pro-inflammatory mediators and adhesion molecules. These findings suggest that MMPs may have a role in the increased cardiovascular risk of MetS patients. Pharmacological interventions targeting MMPs, especially MMP-9 and MMP-8 deserve further investigation in MetS patients.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is defined as a clustering of risk factors associated with increased risk for diabetes and cardiovascular diseases [1,2]. Although many diagnostic criteria have been proposed for MetS, insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia, abdominal obesity, and hypertension are recognized as key features [3]. Importantly, the prevalence of MetS has increased significantly over the past two decades, and this increase is strongly associated with the global epidemic of obesity and diabetes [4–6].

A chronic inflammatory state associated with impaired nitric oxide formation and endothelial dysfunction has been described in patients with MetS, thus leading to the development of atherosclerosis in these patients [7–11]. Increased concentrations of pro-inflammatory mediators and growth factors also play a major role in the atherosclerotic

process and may lead to clinical events [12]. More recently, however, a few studies have suggested that imbalanced concentrations of members of the matrix metalloproteinase (MMPs) family and their inhibitors, the tissue inhibitors of MMPs (TIMPs), may play a role in the cardiovascular modifications associated with MetS [13,14]. This is very important because experimental and clinical studies have shown that altered expression or activity of MMPs and/or TIMPs are implicated in the pathophysiology of a variety of cardiovascular diseases [15–21]. However, very few studies have shown significant alterations of circulating MMPs/TIMPs concentrations in MetS patients and contrasting conclusions have been reported [13,14]. For example, while increased MMP-2 levels were reported in women with MetS [14], another study showed MMP-2 levels in MetS patients that were similar to those found in healthy controls [13]. In addition, there is only one study showing increased serum MMP-8 concentrations in MetS patients compared with those without MetS [22]. However, artificially higher MMP-8 concentrations are found in serum samples compared with plasma samples [23], thus casting doubts on the relevance of these previous MMP-8 results [22].

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 3163; fax: +55 16 3633 2301.
E-mail address: tanus@fmrp.usp.br (J.E. Tanus-Santos).

Table 1

Clinical and laboratorial characteristics of study subjects.

	Controls	Metabolic syndrome
N	25	25
Sex (M/F)	11/14	13/12
Age (years)	49.4 ± 2.3	45.5 ± 2.4
Waist Circumference (cm)	88 ± 2	107 ± 2*
BMI (kg/m ²)	24.3 ± 1	33.4 ± 1
SAP (mmHg)	119 ± 2	140 ± 2*
DAP (mmHg)	74 ± 2	91 ± 2*
HDL (mg/dl)	51 ± 2	38 ± 2*
LDL (mg/dl)	115 ± 5	123 ± 6
Total Cholesterol (mg/dl)	191 ± 6	201 ± 6
Triglycerides (mg/dl)	121 ± 7	213 ± 13*
Glycemia (mg/dl)	80 ± 1	107 ± 4*

Values are the mean ± S.E.M.; BMI = body mass index; SAP = systolic arterial pressure; DAP = diastolic arterial pressure.

* $P < 0.05$ vs. healthy controls.

Given the importance of MMPs, especially MMP-2, MMP-9, MMP-8, and MMP-3, to the pathological vascular remodeling associated with many cardiovascular diseases [24–26], and the increased cardiovascular risk of MetS patients [1,2], we examined in the present study whether there are significant alterations in the circulating levels of MMP-2, MMP-9, MMP-8, MMP-3, TIMP-1, and TIMP-2 in MetS patients compared with those found in healthy subjects. Moreover, to further confirm that these patients are at a pro-inflammatory state, we have also measured the circulating concentrations of inflammatory markers such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin 6 (IL-6), and cell adhesion molecules including intercellular adhesion molecule (sICAM-1), and sP-selectin.

2. Materials and methods

2.1. Subjects and study protocol

The study protocol was approved by the Institutional Review Board of the University of Sao Paulo Medical School, and each subject provided written informed consent. Fifty subjects were studied, including 25 patients (13 men and 12 women) with MetS selected from the routine outpatient clinic of the Heart Institute, and 25 healthy controls (11 men and 14 women) randomly selected from the local population and unrelated to the patients. All participants underwent a complete medical history and physical examination. The subjects were non smokers and abstainers or only moderate alcohol consumers (<25 g/d). Participants with evidence of cardiovascular, renal, hepatic, gastrointestinal, pulmonary, endocrine or oncological diseases were excluded. None was receiving antioxidant vitamin supplementation or drugs known to affect lipoprotein metabolism. Metabolic syndrome was defined according to the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement [27].

2.2. Laboratory tests

Blood samples for serum lipid profile and glycemia determinations were obtained after at least 12 h of fasting and always at the same period of the menstrual cycle in women. Total plasma cholesterol, triglycerides, glycemia and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels were measured by commercially available kits using standardized techniques. The low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated.

2.3. SDS-polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) gelatin zymography of MMP-9 and MMP-2

Gelatin zymography of MMP-9 and MMP-2 from plasma was performed as previously described [28–31]. 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 CaCl₂. 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,

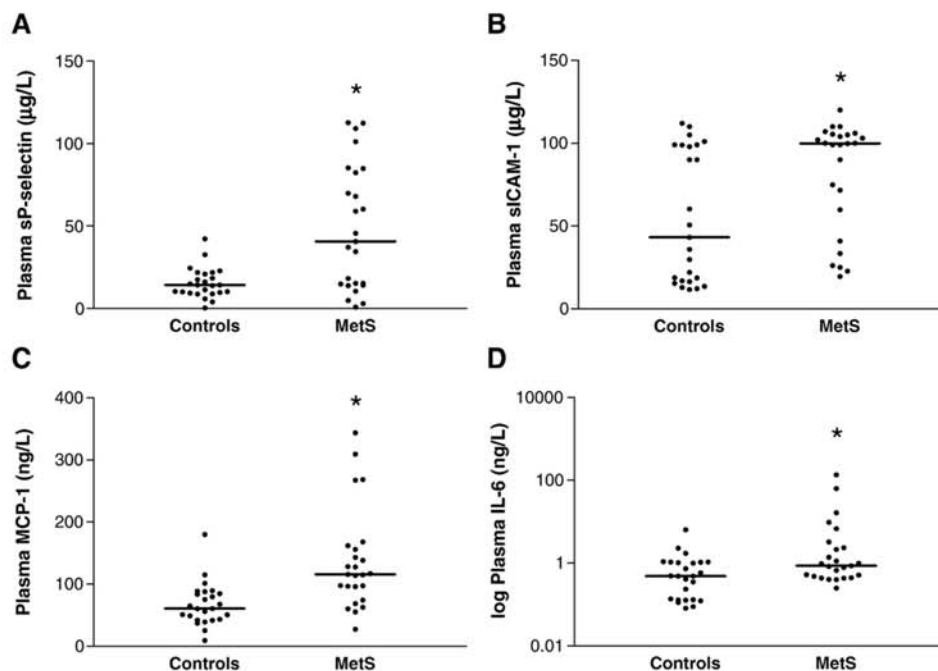


Fig. 1. Plasma sP-selectin (panel A), sICAM-1 (panel B), MCP-1 (panel C), and IL-6 (panel D) concentrations in controls (N=25) and in patients with metabolic syndrome (MetS; N=25). The bar shows the median value. sICAM-1: intercellular adhesion molecule 1; MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1; IL-6: interleukin-6. * $P < 0.05$ vs. controls.

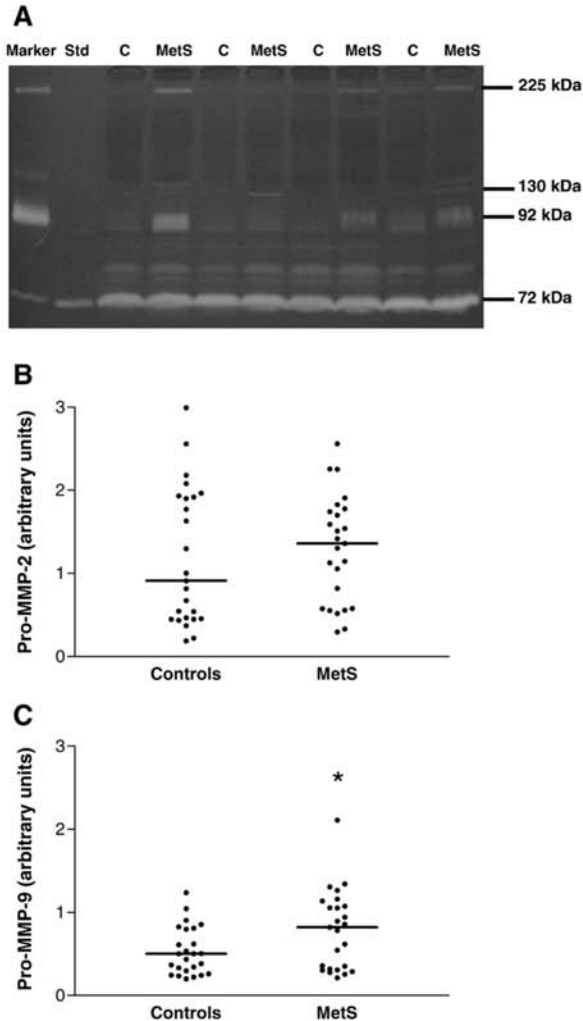


Fig. 2. Representative zymogram of plasma samples from controls (C) and from patients with metabolic syndrome (MetS). The marker lane shows the bands corresponding to gelatinases (225, 130, 92, and 72 kDa) from whole blood. Std shows the 72 kDa band (pro-MMP-2) from fetal bovine serum, which was used as a standard to normalize the data from all the gels, thus allowing between gel comparisons. Panels B and C show Pro-MMP-2 and Pro-MMP-9 concentrations, respectively, in controls ($N=25$) and in patients with metabolic syndrome (MetS; $N=25$). The bar shows the median value. * $P<0.05$ vs. controls.

respectively, by the relation of log Mr to the relative mobility of Sigma SDS-PAGE LMW marker proteins.

2.4. Enzyme immunoassays of MMP-8, MMP-3, TIMP-1, TIMP-2, sP-selectin, IL-6, sICAM-1, and MCP-1

The plasma concentrations of MMP-8, MMP-3, TIMP-1, TIMP-2, sP-selectin, IL-6, sICAM-1, and MCP-1 were measured with commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits according to manufacturer's instructions. The former 6 were from R&D Systems, Inc., Minneapolis MN, and the latter 2 were from BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA.

2.5. Statistical analysis

All the results were expressed as mean $\pm$ SEM (Table 1) or are shown as scatter plots and the median (Figs. 1–4). The clinical characteristics of study groups were compared by Student unpaired t test, and the biochemical parameters were compared by Mann–Whitney test. The Spearman's correlation (r_s , P) was calculated for

associations between plasma MMP-8, pro-MMP9, or TIMP-1 levels and the components of MetS [27]. A $P<0.05$ was considered the minimum level of statistical significance.

3. Results

Table 1 summarizes the clinical and laboratorial characteristics of all subjects enrolled in the present study. There were no statistically significant differences in age, BMI, LDL-cholesterol, and total cholesterol when controls were compared with MetS patients (all $P>0.05$; Table 1). As expected, increased waist circumference, arterial blood pressure, triglycerides, and glycemia were found in MetS patients compared with controls (all $P<0.05$; Table 1). Moreover, patients with MetS presented lower HDL-cholesterol levels than controls ($P<0.05$; Table 1).

Confirming previous studies, we found significantly higher circulating concentrations of inflammatory markers and of cell adhesion molecules in MetS patients compared with controls. We found higher sP-selectin ($P<0.05$; Fig. 1A), sICAM-1 ($P<0.05$; Fig. 1B), MCP-1 ($P<0.05$; Fig. 1C), and IL-6 ($P<0.05$; Fig. 1D) plasma levels in patients with MetS compared with those found in the control group.

A representative zymogram of plasma samples is shown in Fig. 2. Gelatin zymograms 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 mmol/l 1, 10-phenanthroline (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 phenanthroline and correspond to non-MMP gelatinases present in human plasma [32].

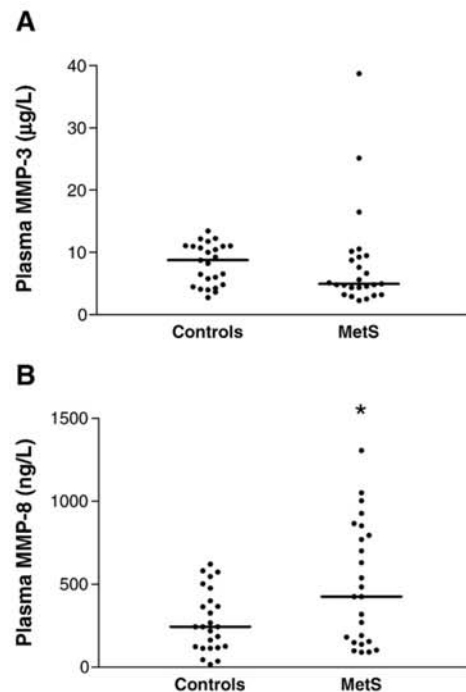


Fig. 3. Plasma MMP-3 concentrations (panel A) and MMP-8 (panel B) in controls ($N=25$) and patients with metabolic syndrome (MetS; $N=25$). The bar shows the median value. * $P<0.05$ vs. controls.

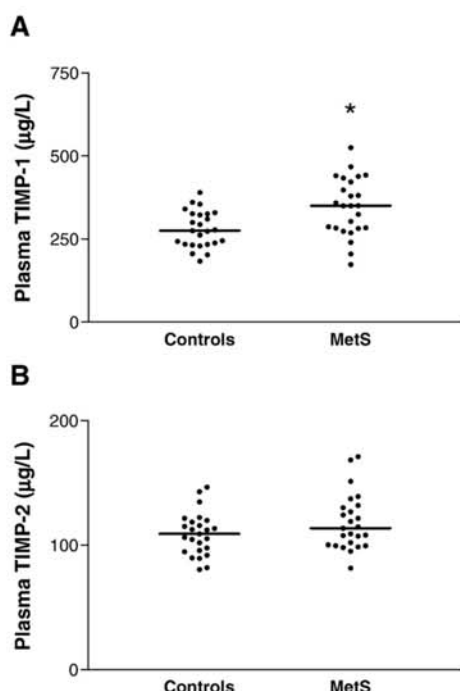


Fig. 4. Plasma TIMP-1 (panel A) and TIMP-2 (panel B) concentrations in controls ($N=25$) and patients with metabolic syndrome (MetS; $N=25$). The box and whiskers plots show range and quartiles. The bar shows the median value. * $P<0.05$ vs. controls.

While we found no significant differences in pro-MMP-2 ($P>0.05$; Fig. 2B), we found higher pro-MMP-9 levels in plasma from patients with MetS compared with healthy controls ($P<0.05$; Fig. 2C). In addition, while we found no significant differences in MMP-3 levels ($P>0.05$; Fig. 3A), we found higher MMP-8 plasma levels in MetS patients compared with healthy controls ($P<0.05$; Fig. 3B).

Patients with MetS had higher plasma TIMP-1 concentrations than those found in healthy controls ($P<0.05$; Fig. 4A). However, we found no significant differences in TIMP-2 plasma levels when patients with MetS were compared with controls ($P>0.05$; Fig. 4B). While we found significant positive correlation between the MMP-8 levels and HDL-cholesterol (Table 2; $P=0.026$, $r_s=0.443$), no other significant correlations were found (Table 2).

4. Discussion

The main findings reported here are that patients with MetS have increased circulating concentrations of pro-MMP-9, MMP-8, and TIMP-1 compared with healthy subjects. This is the first report showing increased plasma MMP-8 in MetS patients. These alterations were associated with increased concentrations of pro-inflammatory mediators including MCP-1, IL-6, sICAM-1, and sP-selectin. Moreover, this is the first report indicating that the plasma MMP-3 levels are not altered in MetS patients.

It is widely acknowledged that MetS is a pro-inflammatory condition associated with accelerated atherosclerosis and increased incidence of cardiovascular events [2,4,6,8]. The increased MCP-1, IL-6, sICAM-1, and sP-selectin concentrations in MetS patients reported here give support to this idea and confirm previous studies showing similar findings [8,33–36]. The altered concentrations of pro-inflammatory mediators and adhesion molecules in MetS patients may reflect major mechanisms involved in the development of atherogenesis [9,37]. Indeed, endothelial cells express P-selectin and ICAM-1,

which bind to circulating leukocytes that may transmigrate into the arterial wall, especially under the effects of chemoattractants such as MCP-1 [38]. Activated leukocytes, in turn, may release MMPs that will degrade matrix proteins and promote changes of vascular smooth muscle cells from an inactive phenotype to cells which are capable of migrating and proliferating [39]. In line with this idea, we found increased circulating pro-MMP-9 concentrations in MetS patients, and this finding confirms previous results showing increased MMP-9 levels in MetS patients [13]. Together, our findings indicate that patients with MetS are at increased risk of developing atherosclerosis.

We could speculate that the increased TIMP-1 (an endogenous inhibitor of MMP-9) levels in MetS patients reported here could imply that the increased pro-MMP-9 levels would be counteracted by the increased TIMP-1 concentrations. While this is a compelling possibility, mounting evidence indicates that the circulating levels of MMP-9 may be used as a blood-borne biochemical marker of cardiovascular risk [40,41]. Therefore, the prognostic value of MMP-9/TIMP-1 balance in MetS patients needs additional assessment.

We found similar pro-MMP-2 levels in MetS patients and in healthy subjects. While this finding confirms those previously reported [13], it contrasts with a previous study showing increased MMP-2 in women with MetS [14]. There is no clear explanation for this contrast. It is possible that gender differences or other methodological differences among studies may have affected the conclusions. The lack of significant alterations in pro-MMP-2 and in TIMP-2 (an endogenous inhibitor of MMP-2) concentrations suggests that an imbalance in MMP-2/TIMP-2 is probably not involved in the alterations associated with MetS. However, it is possible that the circulating levels of pro-MMP-2 and TIMP-2 may not reflect their tissue levels. This suggestion is based on experimental evidence showing significant alterations in MMP-2/TIMP-2 expression and activity in the vascular tissues of hypertensive and diabetic animals [42,43]. Whether MetS patients have altered MMP-2/TIMP-2 expression/activity in vascular tissues remains to be determined.

A major finding reported here is that MetS patients have higher MMP-8 (neutrophil collagenase) concentrations in their plasma compared with healthy subjects. While a previous study had reported increased serum MMP-8 concentrations in MetS patients [22], the use of serum samples to assess MMP-8 concentrations is not appropriate because artificially higher MMP-8 concentrations are found in serum samples compared with plasma samples [23]. Notwithstanding this methodological issue, our results using plasma samples support this previous finding [22] and suggest that MMP-8 may be involved in the cardiovascular alterations found in MetS patients. Importantly, MMP-8 levels were positively associated with the presence and the severity of coronary artery disease [25,44], and it is possible that the role played by MMP-8 in atherosclerotic plaques [45] may be relevant in MetS patients.

MMP-3 (stromelysin-1) activates many other MMPs and degrades a wide range of extracellular matrix components that have important roles in atherogenesis [46]. Despite the importance of MMP-3 and the fact that this MMP has been suggested as a marker of atherosclerosis

Table 2
Correlations between MMP-8, pro-MMP-9, or TIMP-1 and the components of metabolic syndrome.

	MMP-8		Pro-MMP-9		TIMP-1	
	r_s	P-value	r_s	P-value	r_s	P-value
Waist circumference	0.079	NS	0.015	NS	−0.118	NS
Triglycerides	0.348	NS	0.043	NS	−0.069	NS
HDL-cholesterol	0.443	0.026*	−0.362	NS	−0.161	NS
Fasting glucose	0.302	NS	0.131	NS	−0.151	NS
Blood pressure	−0.057	NS	0.190	NS	0.113	NS
Number of MetS components	−0.105	NS	0.134	NS	0.109	NS

r_s —Spearman's correlation.

* $P<0.05$.

[26], we found no significant alterations in MMP-3 levels when MetS patients were compared with healthy controls. While no previous study has examined this possibility, our findings suggest that MMP-3 is probably not a relevant marker of increased cardiovascular risk in MetS patients. Further studies are necessary to confirm this hypothesis.

We have no explanation for the weak correlation that we found between the MMP-8 levels and HDL-cholesterol, and for the lack of significant correlations between MMPs and the components of MetS [27]. However, these correlation results reported here should be interpreted with caution in the present study because we enrolled a relatively small number of patients.

In conclusion, patients with MetS have increased circulating concentrations of pro-MMP-9, MMP-8, and TIMP-1 that are associated with increased concentrations of pro-inflammatory mediators and adhesion molecules. These findings may shed some light on mechanisms involved in the increased cardiovascular risk of MetS patients. Pharmacological interventions focusing on MMPs, especially MMP-9 and MMP-8 may be justified in MetS patients.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Grundy SM, Brewer Jr HB, Cleeman Jr SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:e13–8.
- Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001;24:683–9.
- Shaw DL, Hall WL, Williams CM. Metabolic syndrome: what is it and what are the implications? *Proc Nutr Soc* 2005;64:349–57.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415–28.
- Azizi F, Salehi P, Etemadi A, Zahedi-Asl S. Prevalence of metabolic syndrome in an urban population: Tehran Lipid and Glucose Study. *Diabetes Res Clin Pract* 2003;61:29–37.
- Paoletti R, Bolego C, Poli A, Cignarella A. Metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Vasc Health Risk Manag* 2006;2:145–52.
- Deepa R, Velumuri K, Arvind K, et al. Serum levels of interleukin 6, C-reactive protein, vascular cell adhesion molecule 1, and monocyte chemoattractant protein 1 in relation to insulin resistance and glucose intolerance—the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES). *Metabolism* 2006;55:1232–8.
- Ingelsson E, Hulthe J, Lind L. Inflammatory markers in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest* 2008;38:502–9.
- Pischon T, Hu FB, Rexrode KM, Gorman CJ, Manson JE, Rimm EB. Inflammation, the metabolic syndrome, and risk of coronary heart disease in women and men. *Atherosclerosis* 2008;197:392–9.
- Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas AC, Tanus-Santos JE. Enhanced concentrations of relevant markers of nitric oxide formation after exercise training in patients with metabolic syndrome. *Nitric Oxide* 2008;19:345–50.
- Koh KK, Han SH, Quon MJ. Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1978–85.
- Gonzalez MA, Selwyn AP. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *Am J Med* 2003;115(Suppl 8A):99S–106S.
- Cicero AF, Derosa G, Manca M, Bove M, Borghi C, Gaddi AV. Vascular remodeling and prothrombotic markers in subjects affected by familial combined hyperlipidemia and/or metabolic syndrome in primary prevention for cardiovascular disease. *Endothelium* 2007;14:193–8.
- Mikszewicz V, Muzzio ML, Royer M, et al. Increased plasma activity of metalloproteinase 2 in women with metabolic syndrome. *Metabolism* 2008;57:1493–6.
- Altieri P, Brunelli C, Garibaldi S, et al. Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure. *Eur J Clin Invest* 2003;33:648–56.
- Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis* 2008;198:320–31.
- Derosa G, D'Angelo A, Scalise F, et al. Comparison between metalloproteinases-2 and -9 in healthy subjects, diabetics, and subjects with acute coronary syndrome. *Heart Vessels* 2007;22:361–70.
- Tayebjee MH, Lip GY, Tan KT, Patel JV, Hughes EA, MacFadyen RJ. Plasma matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, and CD40 ligand levels in patients with stable coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2005;96:339–45.
- Demacq C, Metzger IF, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Inverse relationship between markers of nitric oxide formation and plasma matrix metalloproteinase-9 levels in healthy volunteers. *Clin Chim Acta* 2008;394:72–6.
- 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.
- 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.
- Aquilante CL, Beitelshies 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.
- Jung K. Matrix metalloproteinase-8 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in serum do not reflect the analytes circulating in blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:e15–6.
- Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2008;75:346–59.
- Tuomainen AM, Nyyssonen K, Laukkanen JA, et al. Serum matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with cardiovascular outcome in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2722–8.
- Beaudeux JL, Giral P, Bruckert E, Bernard M, Foglietti MJ, Chapman MJ. Serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 as potential markers of carotid atherosclerosis in infraclinical hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2003;169:139–46.
- Grundy SM, Cleeman Jr SC, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005;112:2735–52.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kressel G, Trunz B, Bub A, et al. Systemic and vascular markers of inflammation in relation to metabolic syndrome and insulin resistance in adults with increased atherosclerosis risk. *Atherosclerosis* 2008;20:20.
- Gokulakrishnan K, Deepa R, Mohan V, Gross MD. Soluble P-selectin and CD40L levels in subjects with prediabetes, diabetes mellitus, and metabolic syndrome—the Chennai Urban Rural Epidemiology Study. *Metabolism* 2006;55:237–42.
- Kowalska I, Straczkowski M, Nikolajuk A, et al. Insulin resistance, serum adiponectin, and proinflammatory markers in young subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism* 2008;57:1539–44.
- Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C, et al. Impact of inflammatory markers on cardiovascular mortality in patients with metabolic syndrome. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008;15:278–84.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868–74.
- Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1876–90.
- Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 2005;85:1–31.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003;107:1579–85.
- Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008;54:24–38.
- Martinez ML, Castro MM, Rizzi E, et al. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-2 activity and reverses vascular dysfunction in renovascular hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2008;591:224–30.
- Martinez ML, Rizzi E, Castro MM, et al. Lercanidipine decreases vascular matrix metalloproteinase-2 activity and protects against vascular dysfunction in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2008;599:110–6.
- 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.
- Turu MM, Krupinski J, Catena E, et al. Intraplate MMP-8 levels are increased in asymptomatic patients with carotid plaque progression on ultrasound. *Atherosclerosis* 2006;187:161–9.
- Woessner Jr JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145–54.

4- DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram que pacientes com MetS possuem os níveis circulantes plasmáticos alterados de alguns marcadores pró-inflamatórios e moléculas de adesão, bem como de algumas MMPs e de TIMPs quando comparados com o grupo controle. Nossos resultados mostram um aumento significativo nos níveis circulantes das moléculas de adesão, sICAM-1 e sP-selectina, de MCP-1, da IL-6, da MMP-8, da pró-MMP-9 e do TIMP-1 em pacientes com MetS. Estes resultados sugerem haver um estado pró-inflamatório acompanhado de um desequilíbrio nas concentrações de MMPs e TIMPs nos pacientes com MetS que pode contribuir para o aumento do risco cardiovascular.

Estudos recentes sugerem uma condição pró-inflamatória bem acentuada na MetS que pode estar associada a um processo aterosclerótico acelerado e contribuir para o aumento de eventos cardiovasculares (Isomaa, et al., 2001; Paoletti, et al., 2006). Estudos prévios confirmam o aumento encontrado em nosso estudo em relação aos níveis circulantes dos marcadores inflamatórios MCP-1 (Aquilante, et al., 2008), IL-6 (Espinola-Klein, et al., 2008; Kowalska, et al., 2008; Van Guilder, et al., 2006; You, et al., 2008), sICAM-1 (Blanco-Colio, et al., 2007; Hsu, et al., 2009; Kressel, et al., 2009) e sP-selectina (Gokulakrishnan, et al., 2006; Lee, et al., 2006) em indivíduos com MetS quando comparados com o grupo controle.

Em contrapartida, alguns estudos mostraram não haver diferença significativa entre os níveis circulantes plasmáticos de sICAM-1 (Boero, et al., 2009), IL-6 (Ingelsson, et al., 2008; Matsushita, et al., 2006), sP-selectina (Ingelsson, et al., 2008) e MCP-1 (Blanco-Colio, et al., 2007; Ingelsson, et al., 2008) em pacientes com MetS em relação ao grupo controle. Diferenças entre as populações de estudo em relação ao sexo, idade, raça, tamanho amostral, entre outros parâmetros, bem como em relação às metodologias utilizadas para a quantificação dos marcadores pró-inflamatórios em cada estudo pode justificar esses resultados controversos.

Alguns marcadores inflamatórios vêm sendo fortemente correlacionados com o número de componentes da MetS presente em cada indivíduo (Kowalska, et al., 2008; Wannamethee, et al., 2007; You, et al., 2008). Por essa razão, alguns estudos sugerem a inclusão de alguns marcadores inflamatórios para a avaliação e diagnóstico da MetS (Grundy, et al., 2004).

As alterações nas concentrações plasmáticas desses marcadores pró-inflamatórios e moléculas de adesão nos pacientes com MetS pode refletir os mecanismos principais envolvidos no desenvolvimento de aterogênese nestes indivíduos (Libby, 2002; Pischon, et al., 2008). De fato, as células endoteliais expressam moléculas de adesão (P-selectina e ICAM-1) que, ao se ligarem aos leucócitos circulantes, os auxiliam na transmigração para a parede arterial, especialmente sob os efeitos de MCP-1 (Hansson, 2001). Esses leucócitos, uma vez ativados, podem contribuir para a ativação e liberação de algumas enzimas como as MMPs, que são capazes de degradar componentes da ECM e promover alterações nas células musculares lisas, as quais se tornam capazes de migrar e proliferar (Newby, 2005). Essas enzimas podem, ainda, digerir os componentes da capa fibrosa das placas ateroscleróticas, tornando-as vulneráveis à ruptura e, conseqüentemente, culminando em complicações trombóticas relevantes (Koh, et al., 2005; Libby, 2002).

Além do papel central das moléculas de adesão no recrutamento de células inflamatórias para o local de desenvolvimento do ateroma, o valor prognóstico da quantificação dessas moléculas em relação à incidência de eventos cardiovasculares deve ser cautelosamente considerado (Blake and Ridker, 2002; Koh, et al., 2005; Willerson and Ridker, 2004). Apesar do alto nível circulante de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias encontrados em indivíduos que desenvolveram doenças coronarianas, o papel dessas moléculas como marcadores de eventos cardiovasculares deve ser interpretado com cautela. Além do mecanismo de liberação dessas moléculas pelo endotélio não estar completamente elucidado, não se sabe exatamente se de fato a quantificação em uma única amostra de sangue é capaz de refletir sobre sua importância biológica no endotélio (Blake and Ridker, 2002).

Recentemente alguns estudos clínicos têm sugerido a importância de alterações da expressão e da atividade de alguns membros das MMPs e/ou TIMPs para a fisiopatologia de muitas doenças cardiovasculares (Altieri, et al., 2003; Castro, et al., 2008; Derosa, et al., 2007; Palei, et al., 2008; Souza-Costa, et al., 2007; Tayebjee, et al., 2005). As MMPs, especialmente a MMP-2 e a MMP-9, têm um papel relevante no remodelamento vascular dos processos ateroscleróticos, contribuindo em partes para a migração de células musculares lisas e espessamento da camada íntima (Johnson, 2007; Newby, 2005). Apesar disso, pouco se sabe a respeito do papel das MMPs e de seus inibidores, os TIMPs, na fisiopatologia da MetS.

Somado ao estado pró-inflamatório, encontramos nos pacientes com MetS um aumento significativo nos níveis plasmáticos circulantes de pró-MMP-9 e de TIMP-1 que pode contribuir ainda mais para o risco cardiovascular. O resultado encontrado aqui está de acordo com o único trabalho que existe na literatura até o presente momento avaliando MMP-9 e TIMP-1 em indivíduos com MetS (Cicero, et al., 2007). A MMP-9 está envolvida no remodelamento que ocorre nas lesões ateroscleróticas e um aumento nos níveis circulantes desta enzima pode aumentar a susceptibilidade das placas à ruptura (Brown, et al., 1995; Loftus, et al., 2000). Além disso, alguns estudos vêm sugerindo a avaliação dos seus níveis circulantes de MMP-9 como um marcador bioquímico importante para o risco cardiovascular (Blankenberg, et al., 2003; Garvin, et al., 2008).

Como o TIMP-1 é o inibidor endógeno preferencial da MMP-9, podemos especular que o aumento na concentração de TIMP-1 possa ter resultado de uma compensação aos elevados níveis de MMP-9 encontrados. De qualquer forma, o valor prognóstico da relação MMP-9/TIMP-1 necessita de outras avaliações nesses pacientes.

Em relação à MMP-2, níveis circulantes semelhantes de pró-MMP-2 foram observados nos pacientes com MetS e nos controles saudáveis. Esse resultado está de acordo com um estudo prévio (Cicero, et al., 2007), mas contrasta com outro que mostra haver um aumento nos níveis circulantes de

MMP-2 em mulheres com MetS (Miksztoicz, et al., 2008). Apesar de não haver uma explicação clara para esses dados contrastantes, acreditamos que a diferença encontrada nos resultados possa ser devido a diferença entre o sexo do grupo de estudo já que utilizamos em comum a técnica de zimografia para quantificar a atividade das MMP-2.

Os níveis circulantes do TIMP-2, que é considerado o inibidor endógeno preferencial da MMP-2, também foi semelhante entre pacientes com MetS e controles. A semelhança nos níveis plasmáticos de pró-MMP-2 e de TIMP-2 nos indivíduos com MetS quando comparados com o controle sugere que um desequilíbrio entre a relação MMP-2/TIMP-2 não esteja provavelmente envolvidas nas alterações associadas a MetS. Porém, é possível que os níveis circulantes de pró-MMP-2 e TIMP-2 encontrados não estejam refletindo, de fato, os níveis reais presentes nos tecidos, uma vez que evidências experimentais mostram haver que alterações na expressão e na atividade de MMP-2 e TIMP-2 no tecido vascular de animais hipertensos e diabéticos (Martinez, et al., 2008a; Martinez, et al., 2008b).

Neste estudo, mostramos pela primeira vez que pacientes com MetS possuem um aumento na concentração de MMP-8 no plasma comparados com o grupo controle. Apenas um estudo anterior avaliava a concentração de MMP-8 considerando amostras de soro desses pacientes (Aquilante, et al., 2007). No entanto, o trabalho de Aquilante et al não leva em consideração que as amostras de soro são inapropriadas para a medida da concentração real circulante das MMPs no sangue periférico. Isso ocorre, pois dependendo do procedimento de coleta utilizado, pode haver liberação de MMPs pelas plaquetas e leucócitos e, desta forma, as concentrações medidas seriam maiores do que as reais (Jung, 2008a; b). Porém, apesar das diferenças metodológicas, nossos resultados apóiam esses achados prévios e sugerem que a MMP-8 possa estar envolvida nas alterações cardiovasculares encontradas nos pacientes com MetS e que o papel desempenhado por ela nas placas ateroscleróticas possa ser relevante nesses pacientes.

A capa fibrosa das placas ateroscleróticas é composta predominantemente por colágeno tipo I e III os quais são degradados preferencialmente pelas collagenases (MMP-1, MMP-13 e MMP-8), sendo que a MMP-8 possui uma atividade enzimática três vezes maior pelo colágeno tipo I em relação as demais collagenases (Molloy, et al., 2004). A estabilidade da placa depende essencialmente do conteúdo de colágeno tipo I intacto e a degradação desse componente leva ao estreitamento da capa fibrosa, tornando-a vulnerável e, conseqüentemente, propensa à ruptura. (Herman, et al., 2001). Até certo tempo acreditava-se que apenas os neutrófilos, que não são comuns em lesões ateroscleróticas, eram capazes de expressar MMP-8 e, dessa forma, seu papel na ruptura das placas não era considerado importante. No entanto, atualmente sabe-se que células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos, comumente presentes nas lesões ateroscleróticas, também são capazes de expressar MMP-8 e hoje se sugere que essa enzima seja a principal envolvida na ruptura de placas. Isso é especialmente relevante porque a ruptura das placas ateroscleróticas é considerada o passo inicial para o desenvolvimento de infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico (Molloy, et al., 2004).

Além disso, o valor prognóstico da expressão da MMP-8 vem sendo considerado e seus níveis têm sido positivamente associados não apenas com a presença, mas também com a severidade de doença arterial coronariana (Kato, et al., 2005; Tuomainen, et al., 2007). O aumento da concentração plasmática de MMP-8 tem sido positivamente associado com a gravidade da estenose dos vasos (Kato, et al., 2005).

No nosso estudo os níveis plasmáticos de MMP-8 foram positivamente correlacionados com os níveis de HDL colesterol, mas não houve nenhuma outra correlação entre os níveis de MMP-8 e outros componentes utilizados para o diagnóstico da MetS.

Avaliamos também pela primeira vez os níveis circulantes de MMP-3 em pacientes com MetS e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrado entre os grupos considerados no estudo. Apesar disso, encontramos

que em indivíduos com MetS a concentração plasmática da MMP-3 apresenta uma tendência a estar diminuída em relação ao grupo controle. Apesar do papel da MMP-3 no desenvolvimento e progressão das lesões ateroscleróticas não estar completamente estabelecido, esse fato é especialmente importante baseado na hipótese de que a MMP-3 possa desempenhar um papel protetor nessas lesões. Dessa forma, a tendência em relação à diminuição da concentração de MMP-3 encontrada nos pacientes com MetS pode sugerir que esses possuem uma progressão mais acelerada das lesões ateroscleróticas e, conseqüentemente, um risco cardiovascular aumentado.

Nenhum outro estudo avaliou as concentrações de MMP-3 em indivíduos com MetS. Com base nos nossos resultados, podemos sugerir que a MMP-3 provavelmente não seja um marcador relevante do risco cardiovascular nesses pacientes. Porém, outros estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Uma limitação importante no nosso estudo deve ser considerada: o número de pacientes estudados foi relativamente pequeno, o que poderia limitar o poder de detectar as diferenças significativas entre os grupos. Além disso, esse número pequeno nos impede de estratificar pacientes em alguns grupos de acordo com cada componente da MetS.

5- CONCLUSÃO

Nossos dados mostram que pacientes com Síndrome Metabólica possuem um aumento das concentrações circulantes de pró-MMP-9, MMP-8 e TIMP-1 que vem acompanhado de um aumento nas concentrações de alguns marcadores pró-inflamatórios e moléculas de adesão. Esses achados podem auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos no aumento do risco cardiovascular em pacientes com Síndrome Metabólica. Além disso, poderíamos sugerir que intervenções farmacológicas visando inibir as MMPs, especialmente a MMP-8 e a MMP-9, poderiam ser relevantes nesses pacientes.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altieri P, Brunelli C, Garibaldi S, Nicolino A, Ubaldi S, Spallarossa P, Olivotti L, Rossettin P, Barsotti A and Ghigliotti G, (2003). 'Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure'. *Eur J Clin Invest*, 33 (8):648-656.

Aquilante CL, Beitelshes AL and Zineh I, (2007). 'Correlates of serum matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) concentrations in nondiabetic subjects without cardiovascular disease'. *Clin Chim Acta*, 379 (1-2):48-52.

Aquilante CL, Kosmiski LA, Knutsen SD and Zineh I, (2008). 'Relationship between plasma resistin concentrations, inflammatory chemokines, and components of the metabolic syndrome in adults'. *Metabolism*, 57 (4):494-501.

Beaudeau JL, Giral P, Bruckert E, Bernard M, Foglietti MJ and Chapman MJ, (2003). 'Serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 as potential markers of carotid atherosclerosis in infraclinical hyperlipidemia'. *Atherosclerosis*, 169 (1):139-146.

Blake GJ and Ridker PM, (2002). 'Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction'. *J Intern Med*, 252 (4):283-294.

Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL, de Teresa E, Farsang C, Gaw A, Gensini G, Leiter LA, Langer A, Martineau P and Egido J, (2007). 'Elevated ICAM-1 and MCP-1 plasma levels in subjects at high cardiovascular risk are diminished by atorvastatin treatment. Atorvastatin on Inflammatory Markers study: a substudy of Achieve Cholesterol Targets Fast with Atorvastatin Stratified Titration'. *Am Heart J*, 153 (5):881-888.

Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F and Tiret L, (2003). 'Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease'. *Circulation*, 107 (12):1579-1585.

Boero L, Manavela M, Rosso LG, Insua C, Berardi V, Fornari MC and Brites F, (2009). 'Alterations in biomarkers of cardiovascular disease (CVD) in active acromegaly'. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 70 (1):88-95.

Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C and Isner JM, (1995). 'Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina'. *Circulation*, 91 (8):2125-2131.

Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitol DL, Gerlach, RF and Tanus-Santos JE, (2008). 'Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats'. *Atherosclerosis*, 198 (2):320-331.

Ceska R, (2007). 'Clinical implications of the metabolic syndrome'. *Diab Vasc Dis Res*, 4 Suppl 3:S2-4.

Chacon MR, Fernandez-Real JM, Richart C, Megia A, Gomez JM, Miranda M, Caubet E, Pastor R, Masdevall C, Vilarrasa N, Ricard W and Vendrell J, (2007). 'Monocyte chemoattractant protein-1 in obesity and type 2 diabetes. Insulin sensitivity study'. *Obesity (Silver Spring)*, 15 (3):664-672.

Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A and Chakraborti T, (2003). 'Regulation of matrix metalloproteinases: an overview'. *Mol Cell Biochem*, 253 (1-2):269-285.

Chow AK, Cena J and Schulz R, (2007). 'Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature'. *Br J Pharmacol*, 152 (2):189-205.

Cicero AF, Derosa G, Manca M, Bove M, Borghi C and Gaddi AV, (2007). 'Vascular remodeling and prothrombotic markers in subjects affected by familial combined hyperlipidemia and/or metabolic syndrome in primary prevention for cardiovascular disease'. *Endothelium*, 14 (4-5):193-198.

Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, Van Pelt RE, Wang H and Eckel RH, (2008). 'The metabolic syndrome'. *Endocr Rev*, 29 (7):777-822.

Derosa G, D'Angelo A, Scalise F, Avanzini MA, Tinelli C, Peros E, Fogari E and Cicero AF, (2007). 'Comparison between metalloproteinases-2 and -9 in healthy subjects, diabetics, and subjects with acute coronary syndrome'. *Heart Vessels*, 22 (6):361-370.

Eckel RH, Grundy SM and Zimmet PZ, (2005). 'The metabolic syndrome'. Lancet, 365 (9468):1415-1428.

Egashira K, (2003). 'Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: special reference to monocyte chemoattractant protein-1'. Hypertension, 41 (3 Pt 2):834-841.

Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C, Lackner K, Genth-Zotz S, Post F, Munzel T and Blankenberg S, (2008). 'Impact of inflammatory markers on cardiovascular mortality in patients with metabolic syndrome'. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 15 (3):278-284.

Ford ES, (2005). 'Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S'. Diabetes Care, 28 (11):2745-2749.

Ford ES, Giles WH and Dietz WH, (2002). 'Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey'. Jama, 287 (3):356-359.

Galis ZS and Khatri JJ, (2002). 'Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly'. Circ Res, 90 (3):251-262.

Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW and Libby P, (1994). 'Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques'. J Clin Invest, 94 (6):2493-2503.

Garvin P, Nilsson L, Carstensen J, Jonasson L and Kristenson M, (2008). 'Circulating matrix metalloproteinase-9 is associated with cardiovascular risk factors in a middle-aged normal population'. PLoS ONE, 3 (3):e1774.

Gill SE and Parks WC, (2008). 'Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing'. Int J Biochem Cell Biol, 40 (6-7):1334-1347.

Gokulakrishnan K, Deepa R, Mohan V and Gross MD, (2006). 'Soluble P-selectin and CD40L levels in subjects with prediabetes, diabetes mellitus, and metabolic syndrome--the Chennai Urban Rural Epidemiology Study'. *Metabolism*, 55 (2):237-242.

Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas AC and Tanus-Santos JE, (2008). 'Enhanced concentrations of relevant markers of nitric oxide formation after exercise training in patients with metabolic syndrome'. *Nitric Oxide*, 19 (4):345-350.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H and Thorgeirsson UP, (1997). 'Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions'. *Eur J Cell Biol*, 74 (2):111-122.

Gonzalez MA and Selwyn AP, (2003). 'Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease'. *Am J Med*, 115 Suppl 8A:99S-106S.

Grundey SM, (2006). 'Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy'. *Nat Rev Drug Discov*, 5 (4):295-309.

Grundey SM, (2008). 'Metabolic syndrome pandemic'. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28 (4):629-636.

Grundey SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr and Lenfant C, (2004). 'Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition'. *Circulation*, 109 (3):433-438.

Grundey SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA and Costa F, (2005). 'Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement'. *Circulation*, 112 (17):2735-2752.

Hansson GK, (2001). 'Immune mechanisms in atherosclerosis'. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21 (12):1876-1890.

Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, Kilbride M, Breitbart RE, Chun M and Schonbeck U, (2001). 'Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling'. *Circulation*, 104 (16):1899-1904.

Hitsumoto T, Takahashi M, Iizuka T and Shirai K, (2007). 'Relationship between metabolic syndrome and early stage coronary atherosclerosis'. *J Atheroscler Thromb*, 14 (6):294-302.

Hsu LA, Ko YL, Wu S, Teng MS, Chou HH, Chang CJ and Chang PY, (2009). 'Association of soluble intercellular adhesion molecule-1 with insulin resistance and metabolic syndrome in Taiwanese'. *Metabolism*, 23:23.

Hu J, Van den Steen PE, Sang QX and Opdenakker G, (2007). 'Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases'. *Nat Rev Drug Discov*, 6 (6):480-498.

Ingelsson E, Hulthe J and Lind L, (2008). 'Inflammatory markers in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome'. *Eur J Clin Invest*, 38 (7):502-509.

Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR and Groop L, (2001). 'Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome'. *Diabetes Care*, 24 (4):683-689.

Johnson JL, (2007). 'Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability'. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 5 (2):265-282.

Jung K, (2008a). 'Blood sampling and the measurement of circulating matrix metalloproteinase-8'. *Clin Chim Acta*, 390 (1-2):156-157, author reply 158.

Jung K, (2008b). 'Matrix metalloproteinase-8 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in serum do not reflect the analytes circulating in blood'. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28 (3):e15-16; author reply e17.

Kato R, Momiyama Y, Ohmori R, Taniguchi H, Nakamura H and Ohsuzu F, (2005). 'Plasma matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with the presence and severity of coronary artery disease'. *Circ J*, 69 (9):1035-1040.

Koh KK, Han SH and Quon MJ, (2005). 'Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions'. *J Am Coll Cardiol*, 46 (11):1978-1985.

Kowalska I, Strackowski M, Nikolajuk A, Adamska A, Karczewska-Kupczewska M, Oziomek E, Kinalska I and Gorska M, (2008). 'Insulin resistance, serum adiponectin, and proinflammatory markers in young subjects with the metabolic syndrome'. *Metabolism*, 57 (11):1539-1544.

Kressel G, Trunz B, Bub A, Hulsman O, Wolters M, Lichtinghagen R, Stichtenoth DO and Hahn A, (2009). 'Systemic and vascular markers of inflammation in relation to metabolic syndrome and insulin resistance in adults with elevated atherosclerosis risk'. *Atherosclerosis*, 202 (1):263-271.

Lambert E, Dasse E, Haye B and Petitfrere E, (2004). 'TIMPs as multifacial proteins'. *Crit Rev Oncol Hematol*, 49 (3):187-198.

Lee WL, Lee WJ, Chen YT, Liu TJ, Liang KW, Ting CT and Huey-Herng Sheu W, (2006). 'The presence of metabolic syndrome is independently associated with elevated serum CD40 ligand and disease severity in patients with symptomatic coronary artery disease'. *Metabolism*, 55 (8):1029-1034.

Lemaitre V and D'Armiento J, (2006). 'Matrix metalloproteinases in development and disease'. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 78 (1):1-10.

Libby P, (2002). 'Inflammation in atherosclerosis'. *Nature*, 420 (6917):868-874.

Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crowther M, Jones L, Bell PR and Thompson MM, (2000). 'Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption'. *Stroke*, 31 (1):40-47.

Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR and Williams GR, (2004). 'Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults'. *Circulation*, 110 (10):1245-1250.

Martinez ML, Castro MM, Rizzi E, Fernandes K, Demacq C, Bendhack LM, Gerlach RF and Tanus-Santos JE, (2008a). 'Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-2 activity and reverses vascular dysfunction in renovascular hypertensive rats'. *Eur J Pharmacol*, 591 (1-3):224-230.

Martinez ML, Rizzi E, Castro MM, Fernandes K, Bendhack LM, Gerlach RF and Tanus-Santos JE, (2008b). 'Lercanidipine decreases vascular matrix metalloproteinase-2 activity and protects against vascular dysfunction in diabetic rats'. *Eur J Pharmacol*, 599 (1-3):110-116.

Mathieu P, Pibarot P and Despres JP, (2006). 'Metabolic syndrome: the danger signal in atherosclerosis'. *Vasc Health Risk Manag*, 2 (3):285-302.

Matsushita K, Yatsuya H, Tamakoshi K, Wada K, Otsuka R, Takefuji S, Sugiura K, Kondo T, Murohara T and Toyoshima H, (2006). 'Comparison of circulating adiponectin and proinflammatory markers regarding their association with metabolic syndrome in Japanese men'. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (4):871-876.

McEver RP, (1991). 'Leukocyte interactions mediated by selectins'. *Thromb Haemost*, 66 (1):80-87.

Miksztoicz V, Muzzio ML, Royer M, Prada M, Wikinski R, Schreier L and Berg G, (2008). 'Increased plasma activity of metalloproteinase 2 in women with metabolic syndrome'. *Metabolism*, 57 (11):1493-1496.

Molloy KJ, Thompson MM, Jones JL, Schwalbe EC, Bell PR, Naylor AR and Loftus IM, (2004). 'Unstable carotid plaques exhibit raised matrix metalloproteinase-8 activity'. *Circulation*, 110 (3):337-343.

Nagase H, (1997). 'Activation mechanisms of matrix metalloproteinases'. Biol Chem, 378 (3-4):151-160.

Nagase H, Visse R and Murphy G, (2006). 'Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs'. Cardiovasc Res, 69 (3):562-573.

Nagase H and Woessner JF Jr, (1999). 'Matrix metalloproteinases'. J Biol Chem, 274 (31):21491-21494.

Newby AC, (2005). 'Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture'. Physiol Rev, 85 (1):1-31.

Ninomiya JK, L'Italien G, Criqui MH, Whyte JL, Gamst A and Chen RS, (2004). 'Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey'. Circulation, 109 (1):42-46.

Noji Y, Kajinami K, Kawashiri MA, Todo Y, Horita T, Nohara A, Higashikata T, Inazu A, Koizumi J, Takegoshi T and Mabuchi H, (2001). 'Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis'. Clin Chem Lab Med, 39 (5):380-384.

Ohbayashi H, (2002). 'Matrix metalloproteinases in lung diseases'. Curr Protein Pept Sci, 3 (4):409-421.

Palei AC, Sandrim VC, Cavalli RC and Tanus-Santos JE, (2008). '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, 41 (10-11):875-880.

Paoletti R, Bolego C, Poli A and Cignarella A, (2006). 'Metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis'. Vasc Health Risk Manag, 2 (2):145-152.

Pischon T, Hu FB, Rexrode KM, Girman CJ, Manson JE and Rimm EB, (2008). 'Inflammation, the metabolic syndrome, and risk of coronary heart disease in women and men'. Atherosclerosis, 197 (1):392-399.

Ra HJ and Parks WC, (2007). 'Control of matrix metalloproteinase catalytic activity'. *Matrix Biol*, 26 (8):587-596.

Raffetto JD and Khalil RA, (2008). 'Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease'. *Biochem Pharmacol*, 75 (2):346-359.

Schram MT and Stehouwer CD, (2005). 'Endothelial dysfunction, cellular adhesion molecules and the metabolic syndrome'. *Horm Metab Res*, 37 Suppl 1:49-55.

Shaw DI, Hall WL and Williams CM, (2005). 'Metabolic syndrome: what is it and what are the implications?' *Proc Nutr Soc*, 64 (3):349-357.

Silence J, Lupu F, Collen D and Lijnen HR, (2001). 'Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1 (MMP-3) gene inactivation'. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21 (9):1440-1445.

Souza-Costa DC, Sandrim VC, Lopes LF, Gerlach RF, Rego EM and Tanus-Santos JE, (2007). 'Anti-inflammatory effects of atorvastatin: modulation by the T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene'. *Atherosclerosis*, 193 (2):438-444.

Stamenkovic I, (2003). 'Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases'. *J Pathol*, 200 (4):448-464.

Sutherland JP, McKinley B and Eckel RH, (2004). 'The metabolic syndrome and inflammation'. *Metab Syndr Relat Disord*, 2 (2):82-104.

Tayebjee MH, Lip GY, Tan KT, Patel JV, Hughes EA and MacFadyen RJ, (2005). 'Plasma matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, and CD40 ligand levels in patients with stable coronary artery disease'. *Am J Cardiol*, 96 (3):339-345.

Tuomainen AM, Nyyssonen K, Laukkanen JA, Tervahartiala T, Tuomainen TP, Salonen JT, Sorsa T and Pussinen PJ, (2007). 'Serum matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with cardiovascular outcome in men'. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27 (12):2722-2728.

Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL and Desouza CA,(2006). 'Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults'. *Obesity (Silver Spring)*, 14 (12):2127-2131.

Visse R and Nagase H, (2003). 'Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry'. *Circ Res*, 92 (8):827-839.

Wannamethee SG, Whincup PH, Rumley A and Lowe GD, (2007). 'Inter-relationships of interleukin-6, cardiovascular risk factors and the metabolic syndrome among older men'. *J Thromb Haemost*, 5 (8):1637-1643.

Willerson JT and Ridker PM, (2004). 'Inflammation as a cardiovascular risk factor'. *Circulation*, 109 (21 Suppl 1):II2-10.

You T, Nicklas BJ, Ding J, Penninx BW, Goodpaster BH, Bauer DC, Tylavsky FA, Harris TB and Kritchevsky SB, (2008). 'The metabolic syndrome is associated with circulating adipokines in older adults across a wide range of adiposity'. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 63 (4):414-419.

7- ANEXOS

TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TCLE para Portadores de Síndrome Metabólica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL:**

1- NOME DO PACIENTE:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... **SEXO:** M _ F _

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:.....**Nº:**.....**APTO:**

BAIRRO:.....**CIDADE:**.....

CEP:.....**TELEFONE:DDD(.....)**.....

2- RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....**SEXO:** M _ F _

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:**Nº** **APTO:**

BAIRRO:.....**CIDADE:**.....

CEP: **TELEFONE: DDD(.....)**.....

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

1- TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Influência do exercício físico nas lipoproteínas e no endotélio de pacientes com Síndrome Metabólica

2- PESQUISADOR: Antonio Casella Filho

CARGO/FUNÇÃO: INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 20746

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade Clínica de Aterosclerose-InCor

3- AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO _ RISCO MÍNIMO: X RISCO MÉDIO _

RISCO BAIXO _ RISCO MAIOR _

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4- DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos

REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

- 1- Você está sendo convidado a participar, de forma completamente voluntária, de um estudo que tem por objetivo conhecer as alterações que o exercício promove no sangue, no chamado colesterol bom, assim como nos vasos de pacientes que tem um conjunto de doenças que provocam aterosclerose assim como infarto do coração, chamada de Síndrome Metabólica.

- 2- Este é somente um convite e de forma alguma você está obrigado a participar.

- 3- Caso você aceite, você deverá comparecer ao InCor, por sua própria conta, 3 vezes por semana durante 4 meses no mínimo, onde você realizará exercícios numa bicicleta, que não sai do lugar, e quando você poderá ficar um pouco cansado com este exercício. Neste período também serão realizados tanto exame de ultra-som de vaso do seu braço, que é como fazer ultra-som para ver bebê na barriga de mulher grávida só que é para ver o vaso do seu braço, e exames de urina assim como serão colhidos amostras de sangue do seu braço para exames laboratoriais.

O ultra-som do vaso do braço é realizado em duas fases: na primeira fase é colocada a braçadeira de pano do aparelho de medir a pressão arterial em volta do seu braço e ele será apertado por 5 minutos, como se estivesse sendo medida sua pressão arterial, só que de maneira um pouco mais prolongada. . Na segunda fase será novamente realizado o ultra-som do vaso do seu braço após você colocar um comprimido embaixo da sua língua, chamado isordil, e você poderá sentir um pouco de tontura e, se isto ocorrer, as suas pernas serão erguidas para o alto para você melhorar. Também você poderá ter um pouco de dor de cabeça que, entretanto é aliviada com analgésico.

- 4- É importante você saber que as informações que forem obtidas com esta pesquisa poderão ajudar no futuro a melhorar a assistência médica aos pacientes portadores de Síndrome Metabólica, que é a doença que você tem.

ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

O paciente terá acesso, no momento que desejar, à todas as informações sobre a pesquisa incluindo sobre os exames, os riscos e benefícios que terá, para não ter dúvidas alguma.

Como a participação é voluntária o paciente tem o direito de interrompê-la em qualquer momento, sem que isto traga qualquer transtorno, sendo assistido pela equipe de médicos da Unidade de Aterosclerose do InCor-HC FMUSP durante todo o decorrer da pesquisa.

As informações obtidas serão estritamente utilizadas apenas para fins científicos e nenhuma informação individual será divulgada sendo que os resultados somente serão apresentados em eventos e publicações científicas.

INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

Qualquer informação que necessitar, e quando necessitar, será fornecida por meio do telefone 30695352 ou pessoalmente na Unidade Clínica de Aterosclerose-InCor na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 44 - São Paulo-SP.

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 20 .

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(Antonio Casella Filho)

TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TCLE para Participantes Normais servindo como Controle

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL:

1- NOME DO PACIENTE:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... **SEXO:** M _ F _

DATA NASCIMENTO:...../...../.....

ENDEREÇO:.....**Nº**.....**APTO:**.....

BAIRRO:.....**CIDADE:**.....

CEP:.....**TELEFONE:DDD(.....)**.....

2- RESPONSÁVEL LEGAL:.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....**SEXO:** M _ F _

DATA NASCIMENTO:...../...../.....

ENDEREÇO:.....**Nº**..... **APTO:**.....

BAIRRO:.....**CIDADE:**.....

CEP:..... **TELEFONE: DDD(.....)**.....

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

1- TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA.

Influência do exercício físico nas lipoproteínas e no endotélio de pacientes com Síndrome Metabólica

2- CARGO/FUNÇÃO: INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 20746

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade Clínica de Aterosclerose-InCor

3- AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO _ RISCO MÍNIMO: X RISCO MÉDIO _

RISCO BAIXO _ RISCO MAIOR _

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4- DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos

REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

- 1-** Você está sendo convidado a participar, de forma completamente voluntária, como uma pessoa que possa servir de Controle Normal para um estudo que tem por objetivo conhecer as alterações que o exercício promove no sangue, no chamado colesterol bom, assim como nos vasos de pacientes que tem um conjunto de doenças que provocam aterosclerose assim como infarto do coração, chamada de Síndrome Metabólica.

- 2-** Este é somente um convite e de forma alguma você está obrigado a participar.

- 3-** Caso você aceite, você deverá comparecer ao InCor, por sua própria conta, 3 vezes por semana durante 4 meses no mínimo, onde você realizará exercícios numa bicicleta, que não sai do lugar, e quando você poderá ficar um pouco cansado com este exercício. Neste período também serão realizados tanto exame de ultra-som de vaso do seu braço, que é como fazer ultra-som para ver bebê na barriga de mulher grávida só que é para ver o vaso do seu braço, e exames de urina assim como serão colhidos amostras de sangue do seu braço para exames laboratoriais.

O ultra-som do vaso do braço é realizado em duas fases: na primeira fase é colocado a braçadeira de pano do aparelho de medir a pressão arterial em volta do seu braço e ele será apertado por 5 minutos, como se estivesse sendo medido sua pressão arterial, só que de maneira um pouco mais prolongada. Na segunda fase será novamente realizado o ultra-som do vaso do seu braço após você colocar um comprimido embaixo da sua língua, chamado isordil, e você poderá sentir um pouco de tontura e, se isto ocorrer, as suas pernas serão erguidas para o alto para você melhorar. Também você poderá ter um pouco de dor de cabeça que, entretanto é aliviada com analgésico.

- 4- É importante você saber que as informações que forem obtidas com esta pesquisa poderão ajudar no futuro a melhorar a assistência médica aos pacientes portadores de Síndrome Metabólica.

ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

O paciente terá acesso, no momento que desejar, à todas as informações sobre a pesquisa incluindo sobre os exames, os riscos e benefícios que terá, para não ter dúvidas alguma.

Como a participação é voluntária o paciente tem o direito de interrompê-la em qualquer momento, sem que isto traga qualquer transtorno, sendo assistido pela equipe de médicos da Unidade de Aterosclerose do InCor-HC FMUSP durante todo o decorrer da pesquisa.

As informações obtidas serão estritamente utilizadas apenas para fins científicos e nenhuma informação individual será divulgada sendo que os resultados somente serão apresentados em eventos e publicações científicas.

INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

Qualquer informação que necessitar, e quando necessitar, será fornecida por meio do telefone 30695352 ou pessoalmente na Unidade Clínica de Aterosclerose-InCor na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 44 - São Paulo-SP.

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 20 .

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(Antonio Casella Filho)