

# NIVELES SÉRICOS DE METALOPROTEINASA 9 (MMP-9) Y DEL INHIBIDOR TISULAR DE MMP TIPO 1 (TIMP-1) EN PACIENTES VENEZOLANOS CON ASMA O CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)

Nancy Elizabeth Larocca G<sup>1</sup>, Dolores Moreno<sup>2</sup>, Jenny Garmendia<sup>3</sup>, Juan Bautista De Sanctis<sup>4</sup>

## RESUMEN

Los niveles séricos de la metaloproteinasa (MMP) 9, enzima involucrada en inflamación, y su contraparte, el inhibidor tisular de la metaloproteinasas tipo 1 (TIMP-1), se encuentran significativamente ( $P < 0,01$ ) incrementados en pacientes con asma o con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en comparación con los grupos control del mismo rango etario. El incremento de ambos parámetros se hace más significativo en los pacientes severos de ambos grupos ( $P < 0,0001$ ) y particularmente en los pacientes con EPOC severo en comparación con los asmáticos severos ( $P < 0,01$ ). El incremento en los niveles séricos de MMP-9 en relación con severidad es mayor que lo observado para TIMP-1 en ambas patologías. Se concluye que los niveles séricos de MMP-9 y TIMP-1 pueden ser un marcador importante para determinar severidad en estas enfermedades.

**Palabras clave:** Asma, EPOC, Metaloproteinasas (MMP), Metaloproteinasa 9 (MMP-9), Inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP-1).

## ABSTRACT

Serum levels of metalloproteinase (MMP) 9, an enzyme involved in inflammation, and its counterpart, the tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1) are significantly ( $P < 0.01$ ) increased in patients with asthma or with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) as compared with controls of the same age. The increase in both parameters is more significant ( $P < 0.0001$ ) in severe patients of both groups, and particularly in patients with severe COPD as compared to severe asthmatics ( $P < 0.01$ ). The increase in serum MMP-9 levels in relation with severity is higher than the observed values for TIMP-1 in both diseases. It is concluded that serum levels of MMP-9 and TIMP-1 may be important markers to establish severity in these diseases.

**Key words:** Asthma, COPD, Metalloproteinase, MMP-9, Inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1)

<sup>1</sup> MSc en Inmunología Clínica. Especialista Pediatría. Instructor contratado. Cátedra de Patología General y Fisiopatología. Escuela Luis Razetti. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup> Especialista en Neumonología. Profesor Asistente. Cátedra de Patología General y Fisiopatología. Escuela Luis Razetti. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela

<sup>3</sup> MSc Inmunología Clínica, Especialista Medicina Interna. Profesor Asistente. Instituto de Inmunología Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela

<sup>4</sup> Doctor en Ciencias Fisiológicas. Coordinador de Investigación. Profesor Titular. Instituto de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela

Trabajo financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela. PG 09.00.6785.07 y FONACIT G-2005000389

Recibido:03-05-10.

Aceptado:01-06-10.

## INTRODUCCIÓN

Las metalopreinasas de matriz (MMP) son una familia de endopeptidasas, dependientes de zinc que degradan proteínas de la matriz celular <sup>(1)</sup>. Ellas son secretadas como zimógenos (pro-MMP) que son activadas por una variedad de proteinasas. Ellas son inhibidas por inhibidores específicos de metaloproteinasas (TIMP) y por  $\alpha 2$  macroglobulina <sup>(1-2)</sup>. La regulación de la actividad de las MMP es importante en el modelaje tisular, crecimiento tumoral, metástasis y en enfermedades inflamatorias como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

La MMP 9 (también conocida como gelatinasa B) es secretada como un zimógeno de 92 kDa <sup>(3)</sup> que se activa por acción de la MMP-3 u otras proteinasas bacterianas <sup>(3)</sup>. La actividad de MMP-9 puede ser inhibida por la  $\alpha 2$  macroglobulina o por el inhibidor tisular de la metaloproteinasas tipo 1 (TIMP-1) que une la pro-MMP-9 así como la enzima activa <sup>(1-3)</sup>. La pro MMP-9 es secretada por monocitos, macrófagos, neutrófilos, keratinocitos, fibroblastos, osteoclastos, condrocitos, células endoteliales y células tumorales <sup>(1-3)</sup>. La expresión es regulada por IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ 1, PDGF y TNF $\alpha$ . Los substratos de MMP-9 incluyen colágeno tipo I (gelatina), colágenos nativos IV, V, VII, X y XI, fibrinógeno, vitronectina, IL-1 y enactina <sup>(1-3)</sup>.

Se han reportado niveles elevados de MMP-9 en suero de pacientes con asma así como en pacientes con EPOC <sup>(4-9)</sup>; sin embargo, pocos trabajos han analizado la relación entre los niveles de MMP-9 con TIMP-1 en ambas patologías. El objetivo del presente trabajo fue determinar los niveles séricos de MMP-9 total, TIMP-1 y su posible relación con la severidad de estas dos enfermedades respiratorias.

## MÉTODOS

Se realizó un estudio clínico de casos-controles, descriptivo, transversal prospectivo en el que se incluyeron 2 grupos de pacientes, 30 individuos adultos con diagnóstico de asma y 30 individuos adultos con diagnóstico de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Ambos grupos fueron seleccionados de una población de pacientes ambulatorios evaluados en la Consulta de Neumonología del Hospital Universitario de Caracas de la Universidad Central de Venezuela. Asimismo, se escogieron al azar 60 individuos adultos sanos de la misma área geográfica, no fumadores, sin

síntomas respiratorios o antecedentes de enfermedades respiratorias y con espirometría normal. Los controles se dividieron en dos grupos de edad similar a la de los dos grupos de pacientes. Todos los individuos que participaron en el estudio eran venezolanas mestizas.

Los pacientes reunieron los criterios clínicos y espirométricos para diagnóstico definitivo de Asma, según el Programa Nacional de Educación en Asma (NAEP, 2007 y GINA) <sup>(10)</sup> y de EPOC según el documento de consenso de la Asociación Americana del Tórax y la Sociedad Respiratoria Europea (ATS/ERS, 2004) <sup>(11)</sup>. Se usaron los criterios de estos programas para definir la severidad de los diferentes pacientes.

Acada uno de los participantes en el estudio (pacientes y controles sanos) se les realizó una espirometría (Espirómetro MedGraphics Cardiorespiratory Diagnostic, Medical Graphics Corporation EE.UU usando los valores predictivos de referencia de Crapo, con medición del volumen forzado en el primer segundo (VEF<sub>1</sub>), capacidad vital forzada (CVF) y la relación VEF<sub>1</sub>/CVF en condiciones basales y posterior a la administración de broncodilatador (200  $\mu$ g de salbutamol inhalado).

El protocolo de investigación para este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela y todos los individuos seleccionados para el estudio firmaron el consentimiento informado.

Se colectaron dos muestras de sangre, una para certificar valores hematológicos normales, y el otro para la obtención de suero. La MMP-9 y el TIMP-1 se cuantificaron empleando una técnica de ELISA en fase sólida (R & D Systems, Inc., Minneapolis, EE.UU). Los estándares y las muestras fueron colocados dentro de los pozos de la microplaca recubiertos con anticuerpos monoclonales específicos. Se cuantificó en una placa la MMP-9 total (MMP-9 activa más pro MMP-9) y en otra el TIMP-1 siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Se emplearon varios controles intra e inter ensayo resultado las diferencia entre lecturas inferior al 20 %.

Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía para el análisis de los resultados y se consideró significativa la diferencia cuando el valor de P, por el pos-test de Bonferroni era inferior a 0,05.

## RESULTADOS

Las características de los pacientes y controles se

describen en la Tabla 1. El grupo control se dividió en dos, un grupo con edad promedio semejante a la del grupo de pacientes con asma, y el grupo con edad promedio semejante a la de los pacientes con EPOC. Los valores de VEF1 % y VEF1/CVF fueron significativamente menores en los pacientes con respecto a sus respectivos controles ( $P < 0,010$ ). En contrapartida, los niveles de MMP9 y TIMP-1 fueron significativamente más elevados en asma ( $P < 0,001$  y  $P < 0,01$  respectivamente) y EPOC ( $P < 0,0001$  y  $P < 0,001$  respectivamente) con respecto a los grupos control. Los niveles de MMP9 y TIMP1 fueron significativamente más elevados en los pacientes con EPOC con respecto a los asmáticos ( $P < 0,05$ ). En ambos grupos, la relación MMP9/TIMP-1 fue similar.

Para tratar de analizar el posible efecto de la severidad, los grupos se dividieron según la clasificación de las Asociaciones Americana y Europea de Neumonología como se muestra en las tablas 2 (asmáticos) y 3 (EPOC). Como es de esperarse, los niveles de MMP9 incrementan con la severidad del paciente en ambos grupos. En los pacientes con asma moderada persistente, se comienza a observar un incremento en los niveles de MMP-9 y TIMP-1 manteniendo la relación MMP9/TIMP-1 similar a lo observado en pacientes con formas leves. Sin embargo, en el grupo de pacientes severos el incremento fue cercano al 300 % en MMP-9 y de 60 % en TIMP-1 y la relación entre ambos parámetros subió a 1,6.

En semejanza a lo que se reporta en la Tabla 2, en la Tabla 3, los niveles de MMP9 y TIMP-1 incrementan

**Tabla 1**

**La tabla representa las características generales de los grupos de controles y pacientes en el estudio. Se observaron diferencias significativas, reportadas por \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  entre pacientes y controles**

Variables	Condición clínica			
	Asma (n=30)	Controles (n=30)	EPOC (n=30)	Controles (n=30)
Edad	38,3 ± 16,1	35,1 ± 12,3	61,3 ± 8,4	63,6 ± 7,7
Mujeres (%)	70	67	60	60
VEF1 % pred	71,1 ± 12,3**	110,1 ± 15,2	55,2 ± 12,2**	98,3 ± 8,3
VEF1/CVF	60,1 ± 10,8**	85,5 ± 4,2	51,1 ± 9,8**	81,2 ± 6,9
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	28,2±4,3*	24,9±5,5	23,4±6,1	21,9 ± 3,3
# Paquetes cigarrillo /año	1,8±4,6		42,5±12,7	
Años de evolución	23,7±11,8		6,7±4,2	
MMP-9 (ng/mL)	279 ± 96**	128 ± 32	387 ± 148***	113 ± 92
TIMP-1 (ng/mL)	175 ± 25*	115 ± 28	262 ± 62**	96 ± 22

**Tabla 2**

**Análisis de los niveles de MMP-9 y TIMP-1 en los sueros de pacientes asmáticos con diferentes características clínicas de severidad. Se observaron diferencias significativas en ambos parámetros entre Moderada Persistente y Leve Persistente \*  $P < 0,01$  y Severa Persistente y Leve Persistente \*\*  $P < 0,001$**

Severidad del asma bronquial	Nº	MMP-9 (ng/mL)	TIMP-1 (ng/mL)	Relación MMP9/TIMP1
Leve intermitente	5	158 ± 42	147 ± 23	1,1 ± 0,3
Leve persistente	5	190 ± 75	160 ± 52	1,2 ± 0,2
Moderada persistente	10	256 ± 78*	208 ± 38*	1,2 ± 0,6
Severa persistente	10	418 ± 62**	255 ± 72**	1,6 ± 0,9
Total	30	279 ± 96	175 ± 25	1,3 ± 1,1

Tabla 3

**Análisis de los niveles de MMP-9 y TIMP-1 en los sueros de pacientes asmáticos con diferentes características clínicas de severidad. Se observaron diferencias significativas entre solo para MMP-9 entre EPOC Moderado y Leve  $P < 0,05$ , para ambos parámetros entre Grave y Leve \*  $P < 0,001$  y entre Muy Grave y Leve  $P < 0,0001$**

Severidad de la EPOC	Nº	MMP-9 (ng/mL)	TIMP-1 (ng/mL)	Relación MMP9/TIMP1
EPOC leve	5	135 ± 72	141 ± 23	0,9 ± 0,3
EPOC moderado	10	225 ± 115*	203 ± 76	1,1 ± 0,6
EPOC grave	10	436 ± 52**	308 ± 61**	1,4 ± 0,6
EPOC muy grave	5	525 ± 88***	385 ± 82***	1,4 ± 0,8
Total	30	387 ± 148	262 ± 62	1,3 ± 0,4

a partir del grupo con enfermedad moderada y en los grupos de mayor gravedad, los niveles de MMP9 incrementan más rápido que los de TIMP-1. Los grupos de pacientes al dividirse en dos según severidad muestran diferencias significativas entre ambas patologías ( $P < 0,01$  por ANOVA).

## DISCUSIÓN

Los niveles de metaloproteinasas han sido útiles para determinar el potencial efecto inflamatorio y de remodelación tisular en diversas patologías<sup>(1-4)</sup>. En asma y EPOC se han reportado niveles incrementados de diversas metaloproteinasas en el esputo de pacientes y se ha propuesto una relación directa entre la migración neutrofílica en pulmón con el incremento en metaloproteínas activas que es inversamente proporcional a la función pulmonar y los valores de FEV1<sup>(4-9)</sup>. Sin embargo, ambas patologías tienen un efecto sistémico ineludible y en consecuencia la determinación sérica de metaloproteínasa y de su inhibidor refleja el estado inflamatorio del paciente.

A pesar de que no se cuantificaron los niveles de proteína MMP9 activa específica, se pudo constatar un incremento de la proteína total en el suero de pacientes con asma o EPOC. Igualmente, se incrementaron los niveles de TIMP-1 disparando la respuesta fisiológica de control de esta proteasa. Llamativamente, los niveles de MMP-9 se incrementaron más rápido que TIMP-1

en pacientes con asma severa en comparación con los pacientes con EPOC. Esta diferencia, significativa en los pacientes severos, pareciera sugerir que los mecanismos de control en pacientes con EPOC, a pesar de la edad, están más conservados que su contraparte, pacientes asmáticos. Sería importante definir si el patrón de respuesta obedece a mecanismos de control propio a niveles transcripcional, pos transcripcional o transduccional para orientar, de modo más preciso, la eficiencia terapéutica en estas patologías. Estudios ulteriores son necesarios para demostrar este fenómeno.

## REFERENCIAS

1. Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*. 1992;14(7):455-463.
2. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477(1-2):267-283.
3. Vempati P, Karagiannis ED, Popel AS. A biochemical model of matrix metalloproteinase 9 activation and inhibition. *J Biol Chem*. 2007;282:37585-37596.
4. Zhang JY, Wenzel SE. Tissue and BAL based biomarkers in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007;27(4):623-632.
5. Cundall M, Sun Y, Miranda C, Trudeau JB, Barnes S, Wenzel SE. Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 is increased in severe asthma and poorly inhibited by glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:1064-1071.
6. Brajer B, Batura-Gabryel H, Nowicka A, Kuznar-Kamiska B, Szczepanik A. Concentration of matrix metalloproteinase in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and degree of airway obstruction and disease progression. *J Physiol*

- Pharmacol. 2008;59(Suppl 6): 145-152.
7. Higashimoto Y, Yamagata Y, Iwata T, Okada M, Ishiguchi T, Sato H, et al. Increased serum concentrations of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in COPD patients. *Eur Resp J.* 2005;25:885-890.
  8. Higashimoto Y, Iwata T, Okeda M, Satoh H, Fukuda K, Tohda Y. Serum biomarkers as predictors of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Rep Med.* 2009;103:1231-1238.
  9. Culpitt SV, Rogers DF, Traves SL, Barnes PJ, Donnelly LE. Sputum matrix metalloproteinases: comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Resp Med.* 2005;99:703-710.
  10. Lalloo U, Ainslie G, Wong M, Abdool-Gaffar S, Irusen E, Mash R, et al. Guidelines for the management of chronic asthma in adolescents and adults. *SA Fam Pract.* 2007;49(5):19-31.
  11. Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: A summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J.* 2004;23:932-946.

#### CORRESPONDENCIA

Dr. Juan B. De Sanctis. Instituto de Inmunología.  
Facultad de Medicina. Universidad Central de  
Venezuela. Teléfono 212-6934767, Fax 212 6932815.  
Correo electrónico: [juan.desanctis@ucv.ve](mailto:juan.desanctis@ucv.ve)