



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

KARLA PATRÍCIA UCHÔA DA SILVA

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO *MMP-9 R279Q* COM A SUSCETIBILIDADE
E PROGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA EM PACIENTES DE ALTO
RISCO DO NORDESTE BRASILEIRO

PARNAÍBA – PI
2017

KARLA PATRÍCIA UCHÔA DA SILVA

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO *MMP-9* R279Q COM A SUSCETIBILIDADE
E PROGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA EM PACIENTES DE ALTO
RISCO DO NORDESTE BRASILEIRO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Medicina investigativa e marcadores epidemiológicos
Linha de pesquisa: Genética Humana e Médica

Orientador: Prof. Dr. Fábio José Nascimento Motta

KARLA PATRÍCIA UCHÔA DA SILVA

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO *MMP-9* R279Q COM A SUSCETIBILIDADE
E PROGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA EM PACIENTES DE ALTO
RISCO DO NORDESTE BRASILEIRO

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biomédicas da Universidade
Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis
Velloso, como requisito para a obtenção
do título de Mestre em Ciências
Biomédicas.

APROVADA EM 12/04/2017

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Baldomero Antonio Kato da Silva / Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto / Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Fábio José Nascimento Motta
Universidade Federal do Piauí
(Orientador)

PARNAÍBA – PI
2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

S586a Silva, Karla Patrícia Uchôa da.

Associação do polimorfismo MMP-9 R279Q com a suscetibilidade e prognóstico do câncer de próstata em pacientes de alto risco do Nordeste brasileiro [manuscrito] / Karla Patrícia Uchôa da Silva. – 2017.

46 f. : il.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Fábio José Nascimento Motta

Área de concentração: Medicina investigativa e marcadores epidemiológicos.

Linha de pesquisa: Genética Humana e Médica.

1. Câncer. 2. Câncer de Próstata. 3. Metaloproteinases de Matriz. 4. Polimorfismo. 4. Pacientes - Nordeste. I. Título.

CDD: 616.99

Aos meus pais, Francisco e Maria, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e me dedicando muito amor em cada passo da minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por sempre me dar forças e me guiar pelo melhor caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio José Nascimento Motta, pela disponibilidade, atenção, paciência, dedicação e profissionalismo durante todas as etapas da realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Velloso e a todos os seus servidores.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Piauí (FAPEPI) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos meus pais, Francisco e Maria, que sempre acreditaram no meu potencial, me incentivando e me apoiando em todas minhas decisões. Foram eles que inúmeras vezes abdicaram de suas necessidades para me proporcionarem as oportunidades necessárias para concluir essa etapa tão importante em minha jornada profissional e me deram apoio para continuar sempre em frente, mesmo diante dos obstáculos e momentos de fraqueza.

Ao meu irmão, Jefferson, que me ajudou bastante de diversas formas durante o período do mestrado.

Ao meu namorado, Paulo, que de forma carinhosa, sempre esteve ao meu lado, me dando apoio tanto momentos de alegria quanto nos momentos de dificuldade, com muita paciência e compreensão.

Aos meus amigos, que na verdade se tornaram uma família, Raynara, Samara, Thomaz e Valécia, agradeço por todos os momentos vividos durante esses dois anos. Ao lado de vocês, mesmo nos períodos de crise, sempre pude contar com muitos sorrisos, lições, abraços, carinho, compreensão e apoio.

Aos demais colegas de mestrado, por todos os momentos compartilhados e por ajudarem a fazer dessa jornada mais leve e feliz. Agradeço em especial aos colegas que fazem parte do Laboratório de Genética Humana e Médica, por todos os ensinamentos, companheirismo e trocas de experiências.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais essa etapa de minha vida, eu agradeço. Através do apoio de todos pude perceber que a superação dos obstáculos impostos durante nossa jornada se torna mais fácil quando estamos rodeados por quem amamos e que torcem verdadeiramente pelo nosso sucesso.

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é uma das neoplasias malignas mais comuns entre os homens com idade superior a 65 anos, possui distribuição mundial e etiologia bastante heterogênea. Diversos marcadores genéticos já foram descritos estando associados ao CaP, neste contexto encontram-se as metaloproteinases de matriz (MMPs) que são enzimas codificadas por genes *MMP* e desempenham papéis importantes nas etapas de desenvolvimento e progressão do CaP. Nas regiões promotoras dos genes *MMP*, existem variações genéticas específicas que afetam a sua expressão, sendo associadas à suscetibilidade ao câncer. A variante polimórfica *MMP-9* R279Q (rs17576) tem sido alvo de estudos por ter sido descrita estando associada com o desenvolvimento de algumas patologias multifatoriais, inclusive do CaP. O presente estudo caso-controle teve como objetivo verificar a associação do polimorfismo *MMP-9* R279Q com o CaP e com suas características clínicas e patológicas em uma população de alto risco nordeste brasileiro. Participaram do estudo 153 pacientes com CaP de alto risco e 193 controles do estado do Piauí. A análise foi constituída de quatro etapas: 1) Dicotomização dos dados dos prontuários dos pacientes; 2) Extração de DNA a partir das amostras dos casos e controles; 3) Genotipagem por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase seguida de digestão enzimática com endonucleases de restrição por meio da técnica Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP); e 4) Análise estatística, onde foram utilizados o teste qui-quadrado, teste de Kruskal Wallis e modelo de regressão logística binária *odds ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95% (IC) e valor de significância ($p < 0,05$). Observou-se que a população estudada, casos e controles, está em equilíbrio para o polimorfismo. Com relação a distribuição genotípica, verificou-se maior frequência (50,3%) do genótipo heterozigoto (AG) tanto no grupo dos casos quanto no grupo dos controles, sendo que o genótipo selvagem (AA) teve maior frequência (40,4%) no grupo dos controles e o genótipo mutante (GG) teve maior frequência (10,5%) no grupo dos casos. Observou-se ainda que o alelo A teve maior frequência tanto no grupo dos casos (64,4%) quanto no grupo dos controles (65,5%), entretanto não foi observada associação estatisticamente significativa ($p = 0,75$). Além disso, não houve evidências de associação significativa entre *MMP-9* R279Q e a idade de diagnóstico, PSA pré-operatório, estágio clínico e escore de Gleason no grupo dos pacientes. Portanto, o genótipo pareceu não exercer influência sobre a suscetibilidade, agressividade e prognóstico do CaP na população estudada. Entretanto, apesar deste estudo não ter mostrado associação estatisticamente significativa entre *MMP-9* R279Q e o CaP nesta população, acredita-se que este SNP seja um potencial marcador para prognóstico e que futuramente possa ser utilizado em estratégias de tratamento personalizado em CaP.

Palavras-Chave: Câncer, metaloproteinases de matriz, polimorfismo, próstata

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is one of the most common malignancies among men over 65 years of age, with a worldwide distribution and very heterogeneous etiology. Several genetic markers have already been described being associated with PCa, in this context are matrix metalloproteinases (MMPs) that are enzymes encoded by *MMP* genes and play important roles in the development and progression stages of PCa. In the promoter regions of the *MMP* genes, there are specific genetic variations that affect its expression and are associated with susceptibility to cancer. The polymorphic variant *MMP-9* R279Q (rs17576) has been the subject of studies since it has been described as being associated with the development of some multifactorial pathologies, including PCa. The present case-control study aimed to verify the association of the *MMP-9* R279Q polymorphism with PCa and its clinical and pathological characteristics in a Brazilian Northeast high-risk population. 153 patients with high-risk PCa and 193 controls from the Piauí state participated in the study. The analysis consisted of four steps: 1) Dichotomization of the patient's medical records; 2) Extraction of DNA from the samples of the cases and controls; 3) Genotyping by the Polymerase Chain Reaction technique followed by enzymatic digestion with restriction endonucleases by the Polymorphism in the Length of the Restriction Fragment (PCR-RFLP); and 4) Statistical analysis, using the chi-square test, Kruskal Wallis test and binary logistic regression model odds ratio (OR) 95% confidence interval (CI) and significance level ($p < 0,05$). It was observed that the studied population, cases and controls, is in equilibrium for the polymorphism. In relation to the genotypic distribution, the heterozygous genotype (AG) was more frequent (50,3%), both in the group of cases and in the control group. Wild genotype (AA) had a higher frequency (40,4%) In the control group and the mutant genotype (GG) had a higher frequency (10,5%) in the group of cases. It was also observed that the allele A had the highest frequency in both the group (64.4%) and the control group (65,5%), but no statistically significant association was observed ($p = 0,75$). In addition, there was no evidence of a significant association between *MMP-9* R279Q and diagnostic age, preoperative PSA, clinical stage and Gleason score in the patient group. Therefore, the genotype did not seem to influence the susceptibility, aggressiveness and prognosis of PCa in the studied population. However, although this study did not show a statistically significant association between *MMP-9* R279Q and PCa in this population, it is believed that this SNP is a potential marker for prognosis and that in the future it may be used in personalized treatment strategies in CaP.

Keywords: Cancer, matrix metalloproteinases, polymorphism, prostate

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaP	Câncer de próstata
CCR	Carcinoma de células renais
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido dextrorribonucleico)
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MMP-9	Metaloproteinase de matriz do tipo 9
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da Polimerase)
PSA	Antígeno prostático específico
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismos de nucleotídeo único)
TIMPs	Inibidores teciduais das metaloproteinases
χ^2	Qui-quadrado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Macromoléculas da matriz extracelular.....	15
Figura 2.	Matriz extracelular, invasão e metástase.....	16
Figura 3.	Papéis desempenhados pelas MMPs nas etapas de progressão do CaP.....	18
Figura 4.	Polimorfismos no gene <i>MMP-9</i>	21
Figura 5.	Simulação de padrão de bandas obtido após digestão com a enzima SmaI.....	26
Figura 6.	Padrão de bandas obtido após digestão com a enzima SmaI.....	27
Figura 7.	Gráficos de frequências de distribuição alélica de <i>MMP-9</i> R279Q em populações mundiais.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição de idade e PSA nos grupos caso e controle.....	28
Tabela 2.	Características da amostra quanto às variáveis clínicas.....	28
Tabela 3.	Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo <i>MMP-9</i> R279Q.....	29
Tabela 4.	Associação entre os parâmetros clínicos e patológicos e o polimorfismo <i>MM-P9</i> R279Q.....	30
Tabela 5.	Comparação das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo <i>MMP-9</i> R279Q entre duas populações com CaP do Brasil.....	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 O câncer de próstata.....	13
2.2 A matriz extracelular, invasão tumoral e metástase.....	15
2.3 Metaloproteinases de matriz.....	16
2.4 O gene <i>MMP-9</i> e o polimorfismo R279Q.....	19
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 População de estudo e processamento da amostra.....	24
4.2 Aspectos éticos.....	24
4.3 Extração do DNA e determinação do genótipo.....	25
4.4 Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS.....	28
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÃO.....	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é uma patologia de etiologia multifatorial, que possui distribuição mundial e é considerado um câncer da terceira idade, visto que a grande maioria dos casos ocorrem em homens com idade superior a 65 anos e é a segunda causa de morte por câncer nesta população. Frequentemente, sua evolução é lenta e agressiva. A grande maioria se expande de forma silenciosa e não chega a dar sinais durante a vida ou mesmo a ameaçar a saúde do homem. Entretanto, alguns desses tumores podem evoluir de forma rápida e se disseminar para outros órgãos, podendo levar à morte. De modo geral, o que se observa é que elevados índices de cura são possibilitados quando o diagnóstico ocorre precocemente (Ferlay et al., 2010; Reis et al., 2011; Saini, 2016).

No Brasil, o CaP é o segundo mais incidente entre os homens. Em valores absolutos é o sexto tipo mais comum no mundo e o mais prevalente, representando cerca de 10% do total de cânceres em homens (Sfar et al., 2007; INCA, 2015). Deste modo, com o crescimento exponencial da população idosa no Brasil prevista para os próximos anos a preocupação dos sistemas de saúde torna-se maior, visto que trata-se de uma população mais susceptível a diversas doenças, entre elas o CaP, fato que corrobora a importância de estudos feitos nessa área.

Nos últimos anos nota-se uma elevação nas taxas notificadas de incidência de CaP, o que pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida. Essas taxas de incidência apresentam variações regionais, provavelmente graças a fatores genéticos, ambientais e a hábitos inerentes a cada indivíduo (Reis, 2011; Leitzmann e Rohrmann, 2012).

A genética do indivíduo está intimamente envolvida no desenvolvimento e progressão do CaP. Dentre os fatores que fazem parte desse processo, podem ser citadas as metaloproteinases de matriz (MMPs) que são enzimas proteolíticas codificadas por genes *MMPs*. Acredita-se que a elevação da expressão gênica ocasionada por polimorfismos genéticos localizados na região promotora dos genes *MMPs* pode estar associada com predisposição genética a diversas doenças, incluindo o câncer (Marqui, 2012). Essas enzimas têm sido bem documentadas como sendo reguladoras essenciais do microambiente celular, por meio de seu controle da proteólise extracelular, e têm demonstrado funções importantes também na invasão e metástase do câncer, mediada principalmente pela sua atividade na degradação da matriz extracelular (MEC) e membrana basal (McCawley e Matrisian, 2001; Kader et al. 2006; Tang et al., 2008; Srivastava et al., 2010). É interessante citar que já que no CaP de grau elevado já foi observada uma elevação nos níveis de tais enzimas, demonstrando assim uma possível associação com a forma mais agressiva da doença (Moroz et al., 2013).

Existe um interesse crescente no esclarecimento do papel que as MMPs desempenham na susceptibilidade ao câncer. Um membro da família das MMPs que tem ganhado destaque na literatura é a MMP-9. Trata-se de uma endopeptidase sintetizada e secretada em forma monomérica como zimogênio,

pertencente à família das gelatinases (Chaudhary et al., 2010). Acredita-se que a hiperexpressão de *MMP-9* pode ser resultado de regulação genética, epigenética ou dos níveis fisiológicos sendo, por isso, provavelmente relevante na aquisição do fenótipo invasivo de diversas neoplasias malignas (Kondratiev et al., 2008; Tang et al., 2008).

Sabe-se que a expressão gênica pode ser alterada por polimorfismos genéticos. O polimorfismo *MMP-9* R279Q (rs17576), alvo deste estudo, tem significância funcional e pode ser potencial marcador molecular para a doença visto que estudos mostram uma hiperexpressão de *MMP-9* em tecidos e linhagens celulares de câncer invasivo, geralmente ligada a um prognóstico negativo, servindo como marcador de sobrevida em pacientes com câncer, incluindo CaP (Reis et al., 2009; Chang et al., 2015).

A investigação deste polimorfismo tem sido feita em pacientes com diferentes patologias multifatoriais, entretanto alguns estudos apresentam resultados discrepantes. É importante destacar que existe uma grande variabilidade de *MMP-9* R279Q entre as diferentes populações estudadas, fato que pode ser explicado principalmente pelas diferentes características étnicas de cada população. Sendo assim, a análise da distribuição desta variante em populações distintas é de grande importância.

Estudos realizados em outras populações apontam o polimorfismo *MMP-9* R279Q estando associado a uma elevação da chance de desenvolver alguns tipos de câncer (Hu et al., 2005; Awakura et al., 2006; Reis et al., 2009; Srivastava et al., 2010). Entretanto, apenas dois estudos de associação entre o *MMP-9* R279Q e o CaP foram encontrados, sendo que um desses estudos foi realizado no Brasil, mais precisamente na região sudeste, onde Reis et al. (2009) verificaram uma associação estatisticamente significativa entre *MMP-9* R279Q e a suscetibilidade ao CaP, bem como a um melhor prognóstico da doença.

Dessa forma, levando em consideração as características peculiares demonstradas entre as populações de cada região brasileira em função da miscigenação (Lopes et al., 2014), nota-se a importância da realização deste estudo em uma população do Nordeste do Brasil, visto que a união e comparação dos dados obtidos nos diferentes estudos pode auxiliar na definição do perfil de variabilidade deste polimorfismo. Além disso, a identificação de genes e polimorfismos diretamente relacionados ao desenvolvimento e progressão do CaP pode conduzir a possibilidade de intervenção precoce em indivíduos em risco com a finalidade de direcioná-los a um tratamento mais eficaz.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O câncer de próstata

O CaP, em valores absolutos, é o sexto tipo mais comum no mundo e o mais prevalente nos homens, representando cerca de 10% do total de cânceres. A incidência mundial de CaP varia amplamente entre os diferentes grupos étnicos e regiões geográficas. Mais de 300.000 homens em todo o mundo morrem anualmente devido a complicações do CaP e estima-se que essa taxa de mortalidade seja 2,4 vezes maior na população afro-americana se comparada à caucasianos. As maiores taxas de incidência foram medidas na Austrália, Nova Zelândia, Europa Ocidental e América do Norte. Estima-se que aproximadamente um em cada seis homens serão diagnosticados com algum tipo de neoplasia da próstata ao longo de sua vida, podendo ser de forma sintomática ou assintomática (Sfar et al., 2007; Dornas et al., 2008; Kolonel, 2009; Reis et al., 2009; Ferlay et al., 2015; Saini, 2016).

No Brasil, este é o segundo tipo mais comum de câncer entre os homens. Em 2013 foram notificadas quase 14 mil mortes por esse tipo de câncer. Ainda de acordo, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de próstata é o mais incidente entre os homens em todas as regiões do país, com 95,63/100 mil na região Sul, 67,59/100 mil na Centro-Oeste, 62,36/100 mil na Sudeste, 51,84/100 mil na Nordeste e 29,50/100 mil na Norte. Na divisão por estado, São Paulo lidera as estimativas para 2016 com 12.730 novos casos. Para o Piauí estima-se 890 (55,41/100 mil) novos casos, sendo 210 (53,60/100 mil) novos casos para a capital. A estimativa para o biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. O perfil epidemiológico observado mostra que o câncer de próstata (61 mil) em homens, representando cerca de 28,6% dos casos, e mama (58 mil) em mulheres, representando cerca de 28,1%, serão os mais frequentes (Chappell et al., 2015; INCA, 2015).

O CaP é tido como uma patologia de terceira idade, visto que, cerca de 65% dos casos de câncer de próstata são geralmente diagnosticados em pacientes com idade superior a 65 anos, sendo apenas 0,1% dos casos diagnosticados antes dos 50 anos de idade. Esta neoplasia possui etiologia indeterminada, multifatorial, portanto vários elementos são descritos como contribuintes para seu desenvolvimento e progressão, como fatores genéticos, etnia, o envelhecimento, metabolismo hormonal, estilo de vida, a história sexual, a exposição a patógenos e a substâncias químicas industriais, a urbanização e os hábitos alimentares. Dentre estes, os fatores genéticos, dietéticos e ambientais têm recebido maior destaque na literatura científica (Friedenreich et al., 2001; Dornas et al., 2008; Silva et al., 2015).

Sabe-se que os eventos neoplásicos tais como, crescimento tumoral, metástases, resposta a intervenções terapêuticas e sobrevida, são fortemente afetados pela genética do indivíduo. Neste contexto, supõe-se, portanto, que os fatores genéticos contribuam significativamente para o desenvolvimento e progressão do CaP. Estudos mostram que o histórico familiar é um fator bastante

relevante para se estimar o risco de desenvolver a doença. Por exemplo, se um parente de primeiro grau tem a doença, o risco é, no mínimo, duas vezes maior. Se dois ou mais parentes de primeiro grau são afetados, o risco aumenta 5 a 11 vezes. Porém, os genes responsáveis permanecem ainda não identificados. Neste contexto, estudos com gêmeos sugerem que até 50% do risco de câncer de próstata pode ser explicado por fatores genéticos (Gronberg et al., 1996; Aus et al., 2005; Sfar et al., 2009; Rhoden e Averbek, 2010; Santoni et al., 2015).

A detecção precoce do CaP é feita por meio da determinação da concentração sérica do antígeno prostático específico (PSA) e exame de toque retal (TR). O nível de PSA no sangue normalmente encontra-se em baixos níveis, menor que 4,0ng/ml, e se eleva em alguns casos, dentre eles hiperplasia prostática benigna (HPB), prostatite e CaP. Sendo assim, é de fundamental importância a associação da dosagem de PSA ao TR, visto que o TR tem alta especificidade (94%), apesar da baixa sensibilidade (50%) e baixo valor preditivo positivo (21%-53%) (Brawer et al., 2001; Ugarteburu et al., 2010).

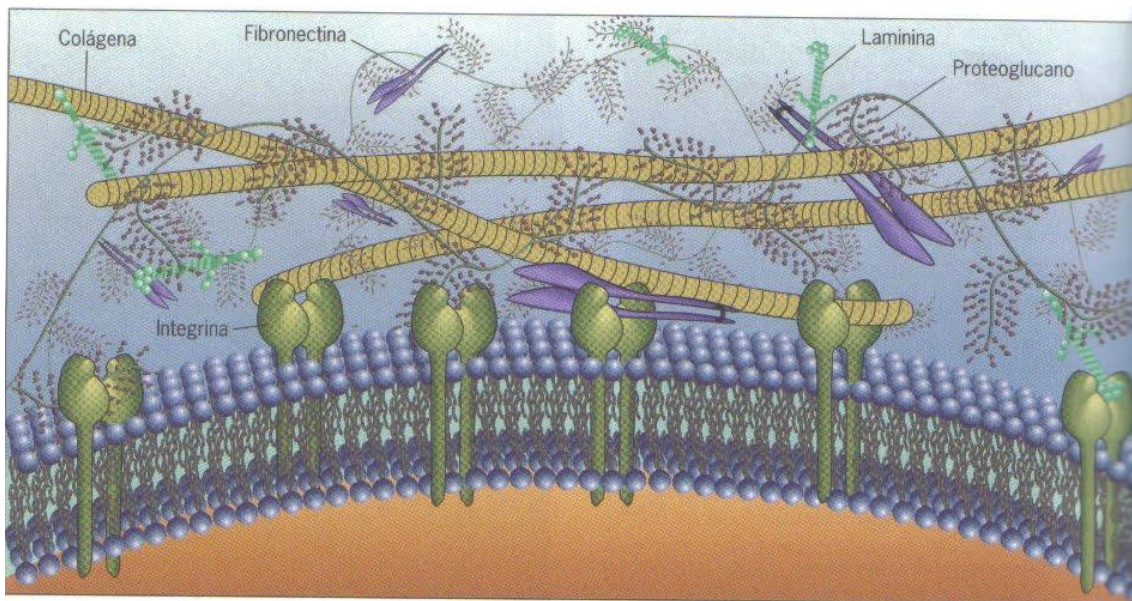
Elevados níveis séricos de PSA são indicação de biópsia prostática guiada pela ultra-sonografia transretal (BTRUS). Mas, devido à baixa especificidade do PSA, quando uma biópsia prostática é realizada em pacientes com níveis entre 3,0 e 10,0 ng/ml, são observadas taxas de resultados negativos de aproximadamente 70 a 80%. Devido à baixa sensibilidade do ultrassom, os protocolos convencionais de biópsia têm demonstrado taxas elevadas de resultados falso-negativos (Reis, 2011; Gilbert et al., 2015). Ou seja, a dosagem do PSA é amplamente utilizada no diagnóstico de suspeita de câncer de próstata. Porém, enquanto o PSA pode detectar tumores em fases muito precoces da doença, a sua utilização ampla produz alguns problemas devido a sua limitação quanto à especificidade. Um dos problemas é que o PSA gera um elevado número de falsos positivos. Visto que, menos da metade das biópsias da próstata confirmam o diagnóstico de câncer. Estima-se que apenas um em cada 5,4 casos de câncer de próstata identificados a partir da dosagem de PSA levam à morte dos doentes por isso é importante que se faça uso de um outro exame em conjunto para que se possa fechar o diagnóstico adequadamente (Ugarteburu et al., 2010; Jakobsen; Hamdy; & Bryant, 2016).

O tratamento do carcinoma localizado na próstata é a prostatectomia radical e a radioterapia e, em doença avançada metastática, onde a chance de cura é diminuta e o tratamento é baseado na supressão androgênica. Quanto mais cedo a doença for diagnosticada, maiores as chances de cura. Deste modo, existe a necessidade constante de aprimoramento dos métodos de diagnóstico. E, baseado na larga amplitude clínica do CaP, é interessante o estudo de possíveis marcadores moleculares para auxiliar no diagnóstico e determinação do prognóstico do CaP, além de ser um meio de facilitar o entendimento do mecanismo responsável pelo desenvolvimento e progressão dessa neoplasia. Neste contexto, na corrida científica para desenvolver novos marcadores diagnósticos e de prognóstico para CaP, as metaloproteinases de matriz (MMPs) têm sido estudadas há anos, com resultados significativos (Rodriguez et al., 2010; Reis et al., 2011; Saini, 2016).

2.2 A matriz extracelular, invasão tumoral e metástase

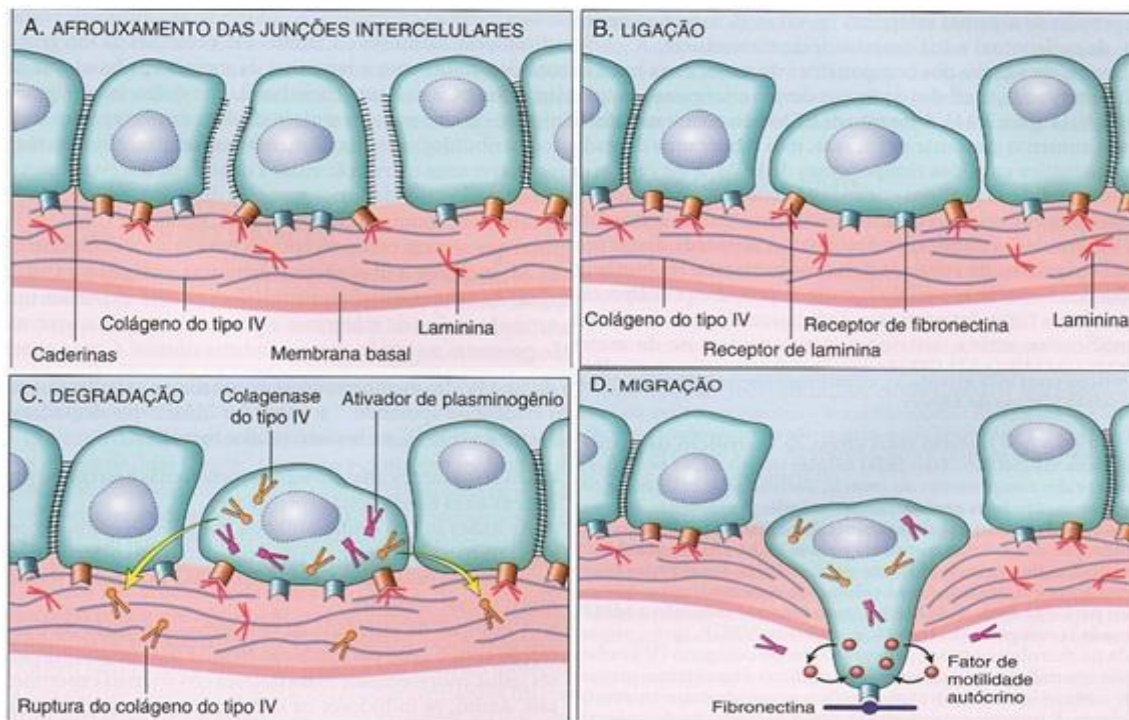
Antes de falar sobre as MMPs, é importante falar sobre a MEC e sua importância. Ela consiste em um conjunto de proteínas e polissacarídeos distribuídos em vários tecidos do corpo. É constituída por proteínas fibrosas, como o colágeno e elastina, glicoproteínas alongadas, tais como a fibronectina e laminina, que fornecem adesão à matriz celular (Figura 1). E está envolvida na morfogênese, diferenciação, reparo dos tecidos e serve como barreira física e biológica, além de estar relacionada à progressão e dinâmica das células neoplásicas (Karp, 2005; Baker et al., 2006; Clarke et al., 2009).

Figura 1. Macromoléculas da matriz extracelular (Adaptada de Karp, 2005).



O ambiente da MEC oferece condições adequadas para crescimento celular, diferenciação celular e sobrevivência dos tecidos. O papel da MEC no microambiente tumoral não está limitado a atuar como uma barreira física para neoplasia, a mesma compreende também um reservatório para fatores de crescimento, proteínas de adesão celular e proteases, que são produzidas tanto por células neoplásicas quanto não neoplásicas e, conseqüentemente, influenciam substancialmente no comportamento da neoplasia, no estabelecimento da invasão local e de metástase à distância (Figura 2). A metástase é um processo que envolve a libertação de células tumorais individuais, a migração destas células para um vaso sanguíneo, a penetração na corrente sanguínea ou no sistema linfático e, finalmente, a aderência ao endotélio dos vasos e extravasamento para o tecido onde se localizarão as metástases (DeClerck et al., 2004; Chaudhary et al., 2010; Klein e Bischoff, 2011; Felgueiras et al., 2014).

Figura 2. Matriz extracelular, invasão e metástase (Robbins & Conran, 2005).



Embora a iniciação dos carcinomas seja de origem celular epitelial, existem eventos adicionais que irão garantir a progressão tumoral envolvendo componentes estromais, que neste contexto tem sido denominado de estroma promotor do tumor. A degradação da MEC no tecido que envolve o tumor é um evento crítico no processo de invasão do câncer e metástases. Acredita-se que esta degradação seja provocada pela ação de enzimas proteolíticas, incluindo vários tipos de MMPs (Liabakk et al., 1996; Littlepage, 2005; Sharma et al. 2012; Oskarsson, 2013).

2.3 Metaloproteinases de matriz

As MMPs são uma família de enzimas dependentes de zinco com atividade proteolítica relacionada geneticamente (Ribeiro et al., 2008). Em humanos, já foram descritas 23 MMPs, dentre as quais 17 são MMPs solúveis. Muitas delas são extensivamente caracterizadas bioquimicamente, mas a função *in vivo* das MMPs solúveis ainda não foi bem compreendida, visto que, as enzimas ativas nos tecidos não podem ser facilmente detectadas. Uma vez que muitas delas são secretadas na forma de zimogênios inativos, e precisam ser ativados extracelularmente para realizar a sua função (Itoh, 2015). Elas podem ser divididas em subgrupos de acordo com a sua estrutura e especificidade do substrato *in vitro* (Chaudhary et al., 2010; Faba, 2012) em 7 grupos principais: 1) colagenases intersticiais, que clivam colágenos intersticiais tipos I-III; 2) as gelatinases, que clivam colágenos desnaturados (gelatinas) e proteínas da membrana basal; 3) estromelisinases, que clivam laminina e outras proteínas da membrana basal; 4) do tipo membrana que as MMPs são expressas na superfície das células e ligadas às membranas do plasma, quer por um

glicofosfatidilinositol (GPI) ou um domínio transmembrana; 5) matrilisinas, que não têm o domínio carboxiterminal e clivam proteoglicanos, laminina, elastina e colágeno do tipo IV; 6) metaloelastase, que cliva elastina e algumas proteínas da membrana basal; e 7) outras MMPs (Herszényi et al., 2008; Craig et al., 2015).

As MMPs desempenham papéis fundamentais em muitos processos fisiológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário, a morfogênese, remodelação de tecidos, crescimento celular, migração e apoptose, além de desempenhar papéis em estados patológicos tais como inflamação, artrite reumatóide, osteoartrite, doenças cardiovasculares, nefrite, feridas crônicas, doenças pulmonares e fibrose (Reis, 2011; Sharma et al. 2012; Yang et al. 2012; Chang et al. 2015; Yamamoto et al., 2015).

A elevação da expressão gênica ocasionada por polimorfismos genéticos localizados na região promotora dos genes *MMPs* pode estar associada com predisposição genética a diversas doenças, incluindo o câncer (Marqui, 2012). Estudos mostram que as MMPs podem exercer também importante papel no desenvolvimento e progressão do câncer, por promover a degradação de componentes da MEC permitindo a migração das células tumorais, além de promover interação com moléculas específicas de células e vias de sinalização necessárias para a manutenção do microambiente tumoral e promoção dos estágios iniciais do desenvolvimento e progressão tumoral (McCawley e Matrisian, 2001; Herszényi et al., 2008; Li et al., 2012; Vandooren et al., 2014; Chang et al., 2015; Yang e Rosenberg, 2015).

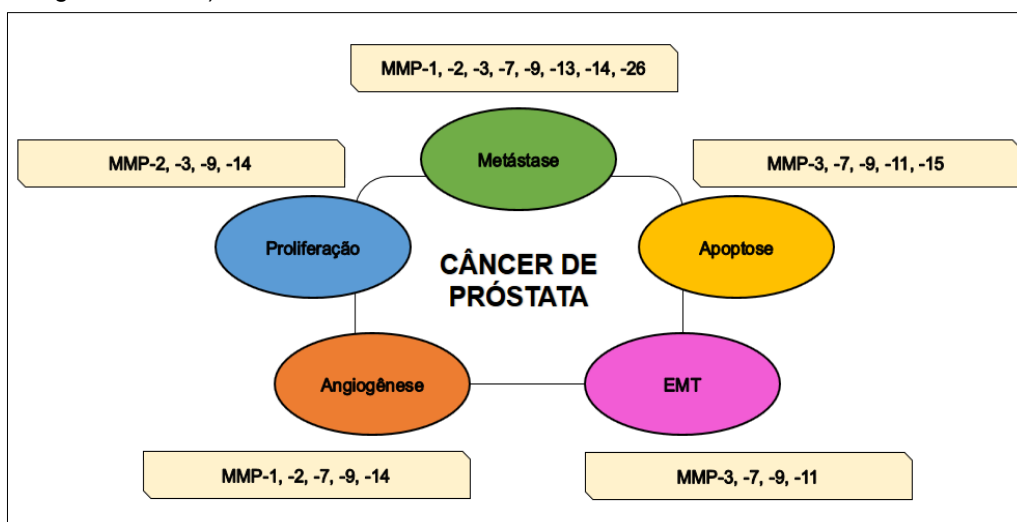
Nos epitélios, a matriz extracelular encontra-se, exclusivamente, abaixo das células epiteliais da camada basal, compondo uma estrutura especializada denominada lâmina basal que é constituída principalmente por colágeno do tipo IV, entactina, sulfato de heparina e laminina e adere-se ao tecido conjuntivo através do colágeno do tipo VII que compõe as fibrilas de ancoragem. Já nos tecidos conjuntivos, os principais componentes da matriz são o colágeno e outras moléculas, tais como a fibronectina, tenascina e integrinas, que interligam as fibras colágenas a células como fibroblastos. Portanto, as propriedades da família das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) em degradar a MEC são cruciais tanto na saída das células metastáticas a partir do tumor, bem como a sua entrada no local de metástase (Katchburian e Arana, 2004). Elas são descritas como responsáveis pela proteólise de tecido conjuntivo e de barreiras necessárias para a formação de novos vasos. (Brehmer et al., 2003; Sfar et al., 2009). A detecção de sua expressão tem sido estudada como marcador sensível e específico de tumores de esôfago, pulmão, cabeça e pescoço, ovário, próstata, cólon e reto, entre outros (Kader et al., 2006; Reis, 2011). Dessa forma, pode-se dizer que a atividade MMP descontrolada provoca danos nos tecidos e alterações funcionais podendo influenciar o desenvolvimento de várias doenças por meio de três mecanismos fisiopatológicos diferentes: destruição, fibrose e a degradação da matriz extracelular (Hopps et al., 2015).

As MMPs acentuam o processo de invasão tumoral, não só por meio da degradação das proteínas da MEC, como também ativando as cascatas de transdução de sinal que promovem motilidade e a solubilização de fatores de crescimento ligados à MEC. Um aumento na expressão de MMP acontece nas

próprias células tumorais ou em células estromais vizinhas, que auxiliam no remodelamento da MEC de forma a propiciar um ambiente favorável para que o tumor primário se estabeleça. Além desse processo, estão envolvidas na migração celular ajudando na remoção de sítios de adesão, e expondo novos sítios de migração, por meio da clivagem de receptores que promovem a ligação entre as células e destas com a MEC, e tem função também de degradar componentes da membrana basal permitindo que células tumorais se infiltrem no estroma adjacente (McCawley e Matrisian, 2001).

A participação ativa dessas enzimas, por exemplo, no processo de angiogênese facilita a ligação aos receptores da membrana de fatores pró-angiogênicos e suprimindo a ligação de inibidores da angiogênese. Além disso, as MMPs ajudam as células tumorais a entrar na circulação rompendo a membrana basal associada com capilares e vasos linfáticos, e permitem que essas células posteriormente saiam dos vasos sanguíneos para sítios metastáticos e continuem o processo de progressão tumoral (Reis, 2011; Ozden et al., 2013). Sendo assim, as MMPs têm se destacado por desempenhar papel importante nas diversas etapas do câncer, promovendo a progressão da doença, mas com diferenças sutis em seu padrão de expressão, função biológica e regulação (Gong et al., 2014). As funções específicas que as MMPs desempenham nas etapas de progressão do CaP são observadas na metástase, proliferação, apoptose, angiogênese e transição epitélio-mesenquimal. A Figura 3 ilustra quais MMPs estão envolvidas em cada etapa.

Figura 3. Papéis desempenhados pelas MMPs nas etapas de progressão do CaP (Adaptado de Gong et al., 2014).



A maioria das MMPs não são expressas constitutivamente pelas células, e a maioria das células (exceto polimorfonucleares) precisa ser ativada para expressar MMPs. A atividade *MMP* é estreitamente regulada nos níveis de transcrição e pós-tradução, e por localização celular (Craig et al., 2015). A inibição se dá por meio da ativação de enzimas proteolíticas de inibição de atividade das metaloproteinases teciduais (TIMPs) (Babichenko et al., 2014).

O mecanismo de ativação dessa enzima envolve uma complexa rede de interação com outras MMPs e TIMPs. A expressão de *MMP* está sob o controle de um mecanismo genético sofisticado. Em condições normais sua expressão é relativamente baixa, porém, há um aumento da expressão das MMPs devido a processos de remodelação da MEC, resultante de processos fisiológicos ou patológicos. Em algumas subfamílias de MMPs, a expressão é tecido específico. A regulação da expressão das MMPs ocorre por meio de três vias principais: I- regulação da transcrição das MMPs; II- ativação das pró-enzimas e III- Inibição pela ação dos TIMPs, sendo estes últimos mecanismos pós-transducionais de regulação (Nagase et al., 2006; Sharma et al., 2012).

A hiperexpressão de MMPs está envolvida no desenvolvimento e progressão de muitos tumores. Vários polimorfismos foram encontrados nos genes *MMP*, e há cada vez mais provas indicando que estes polimorfismos podem resultar na variabilidade de expressão de *MMP* e contribuir para a susceptibilidade a recaídas e agressividade de um grande número de tipos de câncer. Inclusive, já foi constatado que os níveis de MMPs foram significativamente mais elevados em alguns tipos de câncer quando em comparação com o tecido normal adjacente (Yang et al., 2012).

2.4 O gene *MMP-9* e o polimorfismo R279Q

A *MMP-9* é caracterizada como uma enzima de 90-110 kDa codificada na região 20q11.2-13.1 pelo gene *MMP-9*. Essa enzima é secretada como zimogênio, podendo ser armazenada na forma ativa ou latente no citosol. Trata-se do mais complexo e o maior membro em termos de estrutura de domínio entre as MMPs. Essa MMP tem geralmente baixa expressão em condições fisiológicas normais, porém se apresenta hiperexpressa em vários tipos de câncer. A expressão de *MMP-9* não é constitutiva e pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: fator de crescimento, citocinas, fatores de adesão célula-célula e célula-MEC. Trata-se de uma endopeptidase da família das MMPs extracelulares, é o principal componente estrutural da membrana basal e sua função principal é degradar compostos da MEC (Ugarteburu et al., 2010; Yang et al., 2012; Hu et al., 2015). Ela encontra-se expressa por todos os leucócitos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais. A proteína Pro-*MMP-9* é armazenada nos grânulos de polimorfonucleares terciários. Em outras células a expressão de *MMP-9* é regulada por fatores de transcrição (Wu et al., 2008; Craig et al., 2015).

Acredita-se que alterações genéticas podem alterar as funções do gene *MMP-9* contribuindo para suscetibilidade ao câncer e potencial metastático. Estudos experimentais com animais geneticamente modificados mostraram que o elevado nível de expressão constitutiva de *MMP-9* foi associado com susceptibilidade à formação de tumores e progressão tumoral (Hu et al., 2005). Isso pode ser verificado na Figura 3 que mostra a *MMP-9* presente em todas as etapas da progressão do CaP.

A hiperexpressão de *MMP-9* contribui para o desenvolvimento e progressão do câncer. Visto que esta encontra-se envolvida em muitas etapas, incluindo diminuição do potencial apoptótico celular, promoção da angiogênese

e regulação da resposta imune para o câncer. Trata-se de uma molécula pró-angiogênica e pró-metastática que tem sido associada com características de um pior prognóstico. Tem sido relatado também que a diminuição da expressão desta molécula *in vivo*, está diretamente correlacionada com a diminuição da neovascularização e metástase linfática (Sfar et al., 2009).

Um estudo foi realizado utilizando camundongos geneticamente modificados no qual foi promovida a mutação do gene *MMP-9*, impedindo que o mesmo fosse expresso da forma adequada com a finalidade de observar o que a falta desse gene pode causar no organismo. Foram verificadas as seguintes alterações fenotípicas: ossificação endocondral defeituosa, recrutamento de osteoclastos defeituoso, resistência a aneurismas aórticos, implantação embrionária anormal, proteção contra ruptura cardíaca após infarto, resistência a penfigoide bolhoso, redução no infiltrado de neutrófilos em glomerulonefrite, entre outras alterações, e no desenvolvimento tumoral foi visualizado que ocorreu redução da carcinogênese de pele e pâncreas e redução de metástases experimentais (Folgueras et al., 2004).

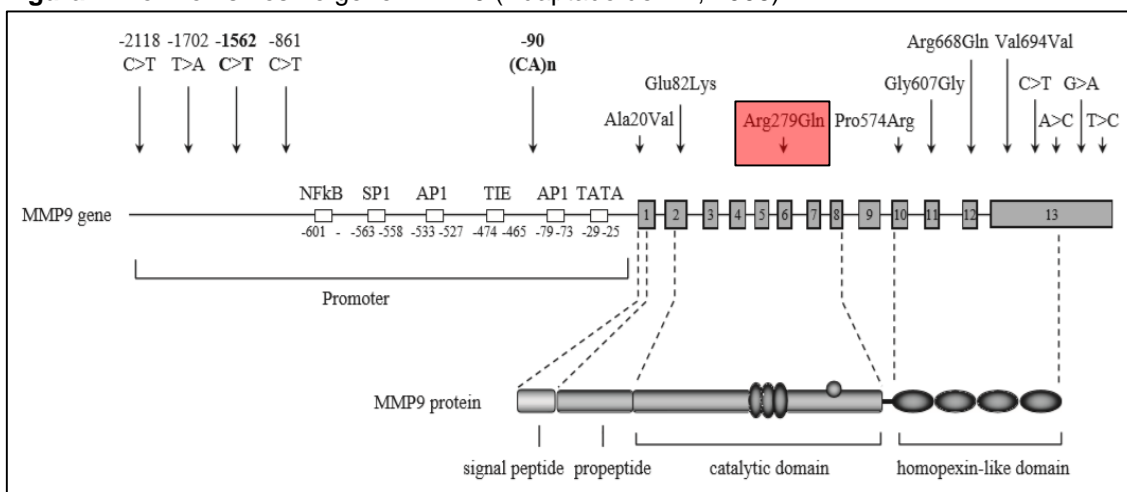
Um polimorfismo é uma variante genética que aparece em, pelo menos, 1% em uma população (Chaudhary et al., 2010). Alguns polimorfismos são conhecidos por influenciar na expressão gênica, na atividade e estabilidade da proteína, nas interações entre proteínas, e alguns deles estão associados com um risco aumentado para o câncer e outras doenças (Cotignola et al., 2007). Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) na região codificada, especialmente SNPs não sinônimos, podem influenciar a atividade da proteína e estar associados com o desenvolvimento de câncer e metástase. Neste contexto, estudos epidemiomoleculares envolvendo o SNP *MMP-9* R279Q têm se tornado bastante recorrentes nas diversas populações mundiais. Além disso, a variante em questão vem sendo amplamente analisada quanto a sua possível associação com diversas patologias (Hu et al., 2005; Matsumura et al., 2005; Yang et al., 2012).

Nos últimos anos, vários polimorfismos genéticos nos genes que codificam as gelatinases e que podem alterar a sua expressão e atividade têm sido estudados. Tem sido demonstrado ainda que, em pacientes com câncer de próstata, há uma elevação nos níveis sorológicos e teciduais de *MMP-9*, e aumento da atividade enzimática da *MMP-9* e expressão de RNAm, e por último uma ligação foi mostrada entre o nível sérico de *MMP-9* e o escore histológico do tumor da próstata (Ugardeburu et al., 2010; Moroz et al., 2013).

O R279Q, é uma variante funcional do gene *MMP-9*, localizado no éxon 6 (Figura 4). Este SNP leva à substituição do aminoácido arginina para glutamina (A>G) dentro de um domínio tipo fibronectina, responsável pelo reconhecimento ao colágeno tipo IV e ligação no sítio catalítico da enzima. Como esse domínio é altamente conservado, espera-se uma baixa afinidade da enzima pelo colágeno tipo IV quando ele é removido, não possibilitando sua atividade plena. Esta variante tem sido associada com a elevação da expressão do gene *MMP-9*, a presença da mesma reduz a capacidade de ligação de uma proteína repressora na região promotora de *MMP-9*, com o consequente aumento na

transcrição do gene em macrófagos cultivados (Allan et al., 1995; Zhang et al., 1999^a; Ye, 2006).

Figura 4. Polimorfismos no gene *MMP-9* (Adaptado de YE, 2006).



Os boxes abertos (caixas brancas) mostram os elementos cis no promotor: NFκB, fator de transcrição no sítio de ligação NFκB; SP1, fator de transcrição no sítio de ligação SP1; AP1, fator de transcrição no sítio de ligação AP1; TIE, elemento inibidor do fator transformador de crescimento β1; TATA, TATA box. Os boxes fechados (caixas escuras) referem-se aos éxons.

Os estudos de associação envolvendo *MMP-9* R279Q e a chance de desenvolver algumas neoplasias têm mostrado resultados controversos. Neste contexto, em se tratando de CaP, relatos de Ugarteburu et al. (2010) afirmam não haver associação estatisticamente significativa ($p= 0,264$) entre *MMP-9* R279Q e o risco de desenvolver CaP, nem com a agressividade desta neoplasia ($p= 0,373$) em uma população da Espanha. Em contrapartida, relatos de Reis et al. (2009) mostraram associação significativa ($p<0,001$) entre esta variante e uma elevação no risco de desenvolvimento desta neoplasia, porém com prognóstico significativamente melhor ($p= 0,003$) em uma população do sudeste brasileiro.

Um estudo caso-controle realizado na Índia, utilizando a técnica de PCR-RFLP, demonstrou em seus resultados, tendo como referência o genótipo AA, que a presença desse polimorfismo de forma isolada não está relacionada com maior susceptibilidade a desenvolver câncer na vesícula biliar [AG: OR (95%IC) = 1,17 (0,71-1,91), $P= 0,534$; GG: OR (95%IC) = 1,4 (0,7-2,5), $P= 0,198$], entretanto uma análise de haplótipo contendo este e mais dois polimorfismos do gene *MMP-9* mostrou associação estatisticamente significativa com o risco de desenvolver esse tipo de câncer na população estudada [OR (95%IC) = 2,75 (1,05-7,23), $P = <0.04$] (Sharma et al., 2012). Além disso, relatos de Srivastava et al. (2010) mostram o genótipo GG com associação estatisticamente significativa com risco de desenvolver câncer de bexiga em uma população do norte da Índia (OR=1.92; IC 95%=1.01–3.66; $p= 0.048$). Por outro lado, relatos de Cotignola et al. (2007) em um estudo realizado em uma população com melanoma dos Estados Unidos, mostraram que o genótipo GG foi significativamente mais frequente em pacientes com queimaduras de sol ($p<0,01$) e com metástases em trânsito ($p= 0,03$).

Resultados obtidos em um estudo caso-controle realizado no Japão, mostraram associação entre o genótipo GG e um histórico familiar de múltiplos casos de câncer gástrico, visto que, sua frequência foi mais observada em pessoas que tinham parentes de primeiro grau com câncer gástrico quando comparado àqueles que não tinham histórico familiar da doença [30,4% vs 11,6%; OR (95%IC) = 4,34 (1,45–13,0) e 16,7% vs 11,6%; OR (95%IC) = 2,26 (0,81–6,27)] (Okada et al., 2016). E, em outro estudo realizado com uma população japonesa, os resultados obtidos não mostraram associação significativa OR (95%IC) = 1,29 (0,86-1,93) do polimorfismo *MMP-9* R279Q com o risco de desenvolver carcinoma de células renais (CCR). No entanto, a distribuição de genótipos foi significativamente associada com o grau histológico ($p < 0,01$). Sugerindo que esse polimorfismo tem influência sobre o potencial de malignidade do CCR (Awakura et al., 2006). Isso provavelmente se deve ao fato de que sua presença eleva a expressão de *MMP-9* favorecendo o processo de malignização (Sun et al., 2011).

Em contrapartida, um estudo caso-controle realizado em uma população do sudoeste da China mostrou associação entre esse polimorfismo e a ocorrência de câncer colorretal. Visto que, foram encontradas diferenças significativas na frequência genotípica e alélica os grupos caso e controle. Entretanto, o que se observou foi que os indivíduos que carregavam o alelo A foram mais suscetíveis ao câncer colorretal (OR= 1.737, IC 95% = 1,323-2,281, $p < 0,001$). Além disso, o genótipo AA foi associado a um risco aumentado desse tipo de câncer em comparação com o genótipo GG (OR= 2,213, IC 95% = 1,248-3,926, $p = 0,006$) (Fang et al., 2010). Outro estudo, também realizado no sudoeste da China, relatou associação significativa do polimorfismo R279Q com a ocorrência e metástases em câncer de pulmão. Os resultados mostraram que, em comparação com o genótipo GG, o genótipo AA está associado com elevação significativa do risco de câncer de pulmão com metástase (OR ajustado=1,79; IC 95%=1,03-3,08) (Hu et al., 2005).

O polimorfismo *MMP-9* R279Q foi relatado também como sendo um novo e significativo (OR= 2,347, 95 % CI 1,431–3,849) marcador prognóstico em pacientes com carcinoma nasofaríngeo locorregionalmente avançado tratados com quimioterapia na China (Liu et al., 2013) e estando relacionado ao risco de desenvolver câncer esofágico de células escamosas e câncer de pulmão em populações chinesas (Wu et al., 2008; Sun et al., 2011), além disso, relatos de Tang et al. (2008) mostraram que este polimorfismo está relacionado a um risco significativamente maior de ocorrência de metástases linfonodais em pacientes com câncer gástrico ($P= 0,012$; OR=3,4 95%CI 1.29-9.17) mas não foi demonstrada associação do mesmo com o risco de ocorrência e invasão desse tipo de câncer em uma população chinesa.

Deste modo, apesar dos resultados controversos observados, nota-se uma possível influência de *MMP-9* R279Q em etapas da progressão tumoral, como na metástase e consequente elevação do grau patológico da doença observada. E diante disso, acredita-se que este *SNP* possa ser um potencial biomarcador de risco e prognóstico para o desenvolvimento e progressão de neoplasias.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a associação do polimorfismo *MMP-9* R279Q com o CaP e suas características clínicas e patológicas em uma população com CaP de alto risco do nordeste brasileiro.

3.2 Objetivos específicos

Verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg nas amostras dos grupos caso e controle.

Comparar genótipos dos grupos caso e controle.

Comparar as frequências obtidas nesse estudo com frequências observadas em outros estudos.

Verificar a possível associação entre o polimorfismo *MMP-9* R279Q e as variáveis clínicas e patológicas do CaP.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 População de estudo e obtenção das amostras

Trata-se de um estudo caso-controle, que compreendeu 153 pacientes diagnosticados com CaP no Departamento de Urologia do Hospital São Marcos, Teresina, Piauí (casos) e 193 indivíduos do sexo masculino, sem histórico pessoal ou familiar de câncer (controles).

Foram inclusos neste estudo voluntários com diagnóstico de CaP de alto risco de acordo com a classificação de D'Amico, sem distinção de cor e classe social e que constassem em seus registros médicos informações clínicas de estadiamento tumoral e PSA. Foram excluídos do estudo indivíduos que, por qualquer razão, tinham sua capacidade de autodeterminação reduzida, sobretudo no que se refere ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e indivíduos que já possuíam um parente de 1º grau participando da pesquisa, estratégia que visa diminuir a semelhança amostral e conseqüentemente, aumentar a significância dos resultados.

O grupo controle constituiu-se de 193 amostras de sangue periférico de homens piauienses com idade ≥ 60 anos e PSA $\leq 2,5$ ng/mL.

As amostras do grupo dos casos foram constituídas por 51 amostras de sangue periférico de pacientes com CaP no Hospital São Marcos, as quais foram colhidas no ato da prostatectomia, uma vez que tal procedimento já possui um acesso venoso, e não exclusivamente para a pesquisa, o que anula qualquer incômodo ou risco desnecessário. E 102 amostras frescas congeladas de tecido de carcinoma prostático, as quais foram fornecidas pelo Departamento de Patologia do hospital para análise. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas sob refrigeração no Departamento de Patologia do hospital, de onde as mesmas foram encaminhadas em caixas térmicas para o Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, para serem processadas.

Os parâmetros clínicos e patológicos do CaP, obtidos a partir dos prontuários, foram dicotomizados. O estágio clínico no momento do diagnóstico foi classificado de acordo com o sistema TNM em (i) o grupo localizado ($T_{1-2}N_0M_0$) e (ii) grupo avançado ($T_{3-4}N_0M_0$ e $T_{1-4}N_{0-1}M_1$ / $T_{1-4}N_1M_{0-1}$). O escore de Gleason para o grau histopatológico foi registrado em (i) o grupo de baixo grau com escore ≤ 7 , e (ii) o grupo de alta grau com escore >7 . A idade de diagnóstico foi categorizada em ≤ 65 e >65 anos, e os níveis de PSA pré-prostatectomia foram categorizados em ≤ 20 ng/mL e >20 ng/mL. Os outros parâmetros clínicos e patológicos como metástases à distância, extensão extracapsular, invasão da vesícula seminal, margem vesical, margem uretral, envolvimento dos linfonodos, invasão perineural e bilateralidade foram padronizados como (i) presente e (ii) ausente.

4.2 Aspectos éticos

As amostras que foram utilizadas nesse estudo são provenientes de um banco de tecido de CaP, estabelecido no laboratório de Genética Humana e

Médica da UFPI *Campus* Ministro Reis Velloso, decorrente da aprovação do projeto intitulado “Análise de polimorfismos genéticos associados ao câncer de próstata no Estado do Piauí”, sob coordenação do docente Giovanny Rebouças Pinto, na Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (Edital FAPEPI/MCT/ CNPq/CT-INFRA Nº 010/2009), cujo início efetivo se deu em 2011. As amostras de pacientes diagnosticados com CaP foram encaminhados pelo Departamento de Urologia do Hospital São Marcos, referência em tratamento oncológico no estado do Piauí, no período de 2011-2014. Atendendo à resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, que trata das normas para pesquisa envolvendo seres humanos, este projeto teve seu protocolo aprovado em 13 de julho de 2010, pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí – conforme protocolo do CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0140.0.045.000-10.

Os pacientes ou seus responsáveis legais foram informados da pesquisa e ao concordarem em participar assinaram um TCLE, autorizando a coleta da amostra durante ou após o procedimento cirúrgico.

4.3 Extração do DNA e determinação do genótipo

As amostras de sangue periférico e de tecido de carcinoma prostático foram processadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso.

O DNA das 51 amostras de sangue periférico dos pacientes com CaP e 193 amostras de sangue periférico do grupo controle foi extraído utilizando-se o Wizard® Genomic Kit (Promega Inc., USA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, os passos foram: 300µl de sangue total foram adicionados à 900µl de solução de lise celular e a mistura incubada por 10 minutos com movimentos de inversão constantes; em seguida, a mistura foi centrifugada e após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, as amostras foram levadas ao vórtex para evitar a formação de grumos nas etapas posteriores, que é a adição de uma mistura de 300µl de lise nuclear e 100µl de solução de precipitação de proteínas; centrifugou-se novamente e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 300µl de isopropanol, submetido novamente à centrifugação, seguida pelo descarte do sobrenadante e pela adição de etanol 70%; uma nova centrifugação foi feita e o sobrenadante foi então descartado e a amostra de DNA obtida, visível como uma massa branca (*pellet*) no fundo do tubo e foi incubada com 100µl de uma solução de reidratação em banho-maria por 1 hora a 65°C para que o DNA fosse eluído, ou seja, para que ficasse disperso em solução de forma homogênea.

Para a extração do DNA a partir das 102 amostras tecido de carcinoma prostático, fragmentos de tecido (aproximadamente 20 mg) foram mecanicamente homogeneizados (Homogeneizador manual, modelo D-130, Wiggenshouse SDN BHD) em solução de lise nuclear com o Wizard® Genomic Kit (Promega Inc., USA) e depois incubados com 20mg/mL de proteinase K a 65°C por 12 horas ou até que o fragmento estivesse completamente digerido. Subsequentemente, a proteinase K foi inativada a 95°C por 15 minutos e o produto total foi usado para a extração do DNA de forma semelhante ao procedimento de extração de DNA do sangue periférico.

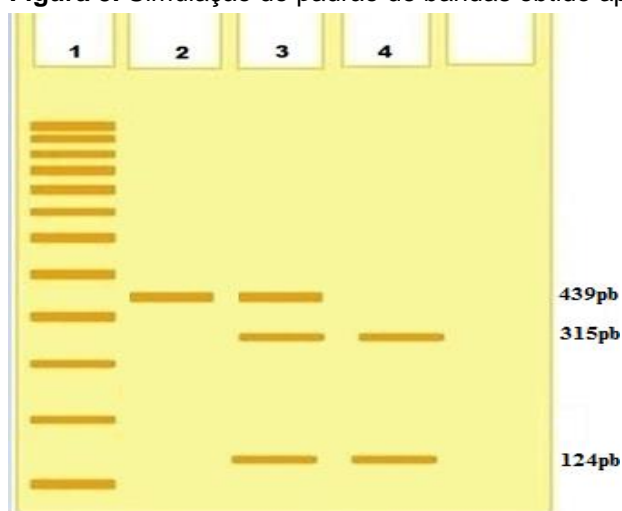
A pureza e concentração do DNA foram determinadas por eletroforese em gel de agarose a 0,2%, corado com GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) e em espectrofotômetro (Bioespec-nano, Shimadzu, Japan), por meio de comprimento de onda.

O DNA obtido foi utilizado para a amplificação do SNP *MMP-9* R279Q. Este polimorfismo foi detectado na amostra de DNA utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de digestão enzimática com endonucleases de restrição (Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição - RFLP).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25µL contendo 0,5µL de DNA genômico, 0,1µL de enzima Taq polimerase, 0,75µL de MgCl₂, 2,5µL de tampão 1x (100mM Tris-HCl; pH 8,5; 500 mM KCl), 1µL de cada iniciador, 4µL de dNTP, e 15,2µL de H₂O. E reação para o controle negativo (contendo todos os componentes, exceto o DNA) foi incluída em todas as corridas do gel, para confirmar a ausência de qualquer contaminação. As condições de ciclagem para amplificação da região deste polimorfismo foram: 10min a 94°C; 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 57°C, 30s a 72°C e uma extensão final a 72°C durante 7min. Posteriormente as reações de PCR foram aplicadas em gel de agarose 2%, corados com GelRed™ e visualizados em transiluminador, sob luz ultravioleta a partir do qual se realiza foto documentação do gel para análise visual subsequente. Após a visualização, os produtos foram submetidos a análise de RFLP.

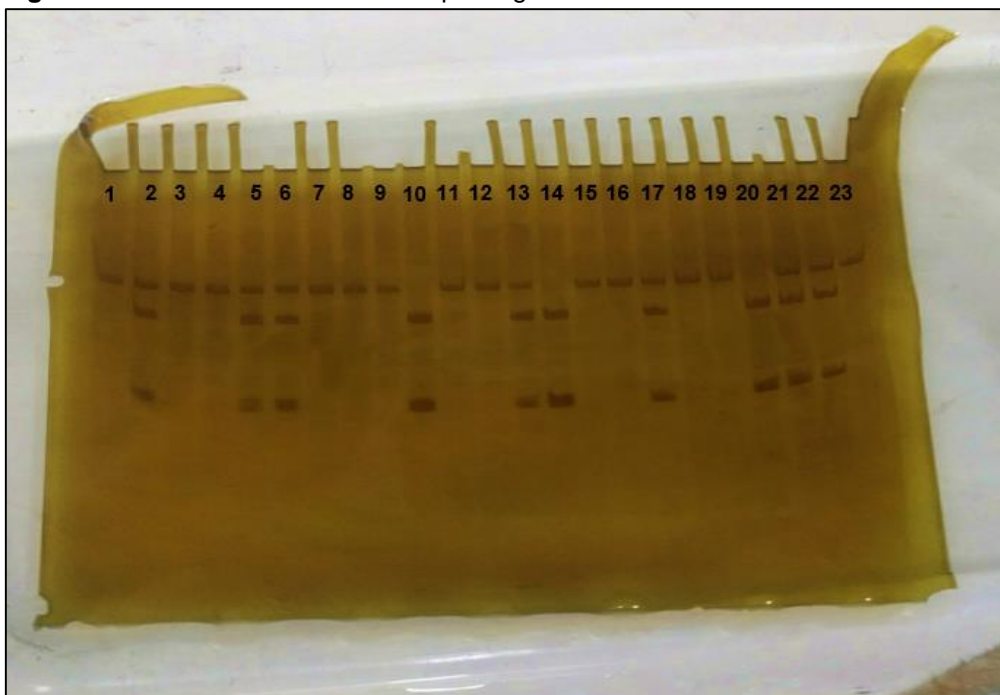
Os iniciadores desenhados para a realização da PCR foram os seguintes: 5'-GAGAGATGGGATGAACTG-3' (*Forward*) e 5'-GTGGTGGAAATGTGGTGT-3' (*Reverse*), gerando um produto de 439pb o qual foi digerido com a enzima *Sma*I a 30°C por 16 horas. Os fragmentos de SNP foram separados em gel de poliacrilamida a 10%, em cuba vertical, com uma corrente de 130 V por 2h30min, e visualizados por meio de revelação com nitrato de prata. A simulação do padrão de bandas obtido pode ser visualizada na Figura 5 e na Figura 6 a imagem real do padrão de bandas obtido.

Figura 5. Simulação do padrão de bandas obtido após digestão com a enzima *Sma*I.



Coluna 1: DNA *Ladder* (100pb); Coluna 2: genótipo homocigoto selvagem AA (439pb); Coluna 3: genótipo heterocigoto AG (439+315+124pb); Coluna 4: genótipo homocigoto mutante GG (315+124pb).

Figura 6. Padrão de bandas obtido após digestão com a enzima SmaI



Genotipagem por meio da técnica de PCR-RFLP. Fragmentos do SNP observados em gel de poliacrilamida a 10% revelado com nitrato de prata. Colunas 1, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 18, 19 e 23: Genótipo AA (439pb); Colunas 2, 5, 6, 13, 17, 21 e 22: Genótipo AG (439+315+124bp); Colunas 10, 14 e 20: Genótipo GG (315+124bp). Fonte própria.

4.4 Análise estatística

No estudo caso-controle, foram feitas comparações entre as distribuições genotípicas e frequências alélicas nos grupos dos indivíduos casos e controles. Diferenças nas distribuições genotípicas e nas frequências alélicas de polimorfismos de nucleotídeo único e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ou, quando necessário, teste exato de Fisher. Para verificar a distribuição dos genótipos entre as duas populações e das variáveis clínicas no grupo casos, foi utilizado o modelo de regressão logística binária ajustado por idade *odds ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95% (IC), e valor de significância ($P < 0,05$). Para determinação da distribuição das idades e nível de PSA pré-operatório entre os grupos caso e controle foi realizado o teste de variância não-paramétrico Kruskal Wallis. A análise dos dados foi realizada por meio do software SPSS statistics 20.0.0.

5. RESULTADOS

A distribuição genotípica do polimorfismo *MMP-9* R279Q está em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto no grupo dos controles quanto no grupo dos casos.

Na análise das médias de idade, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle ($p=0,107$). A média de idade para os casos foi de 67,6 anos, com desvio padrão de $\pm 8,5$ anos e variação de 44 – 90 anos e de 68,3 anos, com desvio padrão de $\pm 6,6$ anos e variação de 54 – 97 anos para os controles. Enquanto que, com relação ao PSA, a diferença das médias entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p=0,001$). Sendo que a média de PSA para o grupo dos casos foi de 54,42ng/mL com variação de 0,19 – 1238ng/mL e 1,09ng/mL com variação de 0,06 – 2,5ng/mL para o grupo dos controles (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição de idade e PSA nos grupos caso e controle

	Controles (193)	Casos* (153)
Média de idade \pm DP	68,3 \pm 6,6 anos	67,6 \pm 8,5 anos
Variação de idade	54 – 97 anos	44 – 90 anos
PSA inicial (amplitude)	1,09 (0,06 – 2,5) ng/mL	54,42* (0,19 – 1238) ng/mL

Teste Kruskal Wallis; *Dados disponíveis apenas para 122 amostras.

A distribuição das características clínicas e patológicas observadas nos pacientes com CaP pode ser visualizada na Tabela 2, onde verificou-se que houve predominância de pacientes com PSA pré-operatório ≤ 20 ng/mL (41,8%), tumor em estágio T3 (66,7%), sem comprometimento nodal (59,5%), com ausência de metástases (58,2%) e escore de Gleason ≤ 7 (60,1%).

Tabela 2 – Características da amostra quanto às variáveis clínicas

Variáveis clínicas		N (%)	Dados não disponíveis no prontuário N (%)
Estágio tumoral	T1	07 (4,6)	04 (2,6)
	T2	23 (15,0)	
	T3	102 (66,7)	
	T4	17 (11,1)	
Comprometimento nodal	N0	91 (59,5)	04 (2,6)
	N1	15 (9,8)	
	NX	43 (28,1)	
Metástase	M0	89 (58,2)	04 (2,6)
	M1	15 (9,8)	
	MX	45 (29,4)	
Escore de Gleason	≤ 7	92 (60,1)	04 (2,6)
	> 7	57 (37,3)	
PSA pré-operatório (ng/mL)	≤ 20	64 (41,8)	31 (20,3)
	> 20	58 (37,9)	

A regressão logística binária foi realizada com a finalidade de prever a associação do SNP *MMP-9* R279Q com a susceptibilidade de desenvolver CaP através da análise da diferença entre as frequências genóticas nos grupos caso e controle. O modelo de regressão logística foi estatisticamente significativo, $p < 0,0005$, com sensibilidade de 10%, especificidade de 90%.

O resultado obtido usando o genótipo homocigoto selvagem (AA) como referência, revelou que os genótipos heterocigoto (AG) e homocigoto mutante (GG) parecem não estar associados com o risco aumentado para CaP na população estudada, já que não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências genóticas nos grupos caso e controle (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo *MMP-9* R279Q

<i>MMP-9</i> R279Q	Frequência		Estatística			
	Controles n (%)	Casos n (%)	OR (95%IC)	P ¹	OR (95%IC)	P ²
Frequência genotípica						
AA	78 (40,4)	60 (39,2)	Referência		Referência	
AG	97 (50,3)	77 (50,3)	0,90 (0,58-1,38)	0,76	1,12 (0,53-2,34)	0,41
GG	18 (09,3)	16 (10,5)	1,07 (0,53-2,17)	0,70	1,15 (0,54-2,45)	0,46
AG+GG	115 (59,6)	93 (60,8)	1,07 (0,69-1,65)	0,75	1,00 (0,99-1,00)	0,57
Frequência alélica						
A	253 (65,5)	197 (64,4)	–	–	–	–
G	133 (34,5)	109 (35,6)	1,01 (0,76-1,44)	0,75	–	–

¹ Modelo de regressão logística binária normal; ² Modelo de regressão logística binária ajustado por idade; $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

Além disso, a regressão logística foi realizada com a finalidade de prever se o genótipo exerce efeito sobre a progressão e agressividade do CaP, com base na idade de diagnóstico, PSA pré-operatório, estágio clínico e escore de Gleason (Tabela 4). No entanto, também não foi verificada associação estatisticamente significativa.

Tabela 4 – Associação entre os parâmetros clínicos e patológicos e o polimorfismo *MMP-9* R279Q

Genótipo <i>MMP-9</i> R279Q	Parâmetros clínicos e patológicos			Estatística			
				OR (95%IC)	P ¹	OR (95%IC)	P ²
Idade de diagnóstico n (%)							
	*Dados perdidos	≤65	>65				
AA	00 (0,0)	41 (62,1)	36 (41,4)	Referência			
AG	00 (0,0)	06 (9,1)	10 (11,5)	2,45 (1,21-4,97)	0,12	–	–
GG	00 (0,0)	19 (28,8)	41 (47,1)	1,89 (0,62-5,74)	0,26	–	–
AG+GG	00 (0,0)	25 (37,9)	51 (58,6)	1,58 (0,82-3,05)	0,17	–	–
PSA pré-operatório n (%)							
	*Dados perdidos	≤20	>20				
AA	18 (58,1)	27 (42,2)	24 (41,4)	Referência			
AG	09 (29,0)	31 (48,4)	28 (48,3)	0,90 (0,26-3,12)	0,87	1,00 (0,99-1,02)	0,75
GG	04 (12,9)	06 (9,4)	06 (10,3)	0,89 (0,25-3,13)	0,86	1,00 (0,99-1,02)	0,77
AG+GG	13 (41,9)	37 (57,8)	34 (58,6)	1,20 (0,62-2,35)	0,53	–	–
Estágio clínico n (%)							
	*Dados perdidos	Localizado	Avançado				
AA	02 (40,0)	16 (53,3)	43 (36,1)	Referência			
AG	02 (40,0)	13 (43,3)	62 (52,1)	0,56 (0,24-1,29)	0,18	0,99 (0,98-1,00)	0,19
GG	01 (20,0)	01 (3,4)	14 (11,8)	2,93 (0,35-24,33)	0,31	1,01 (0,99-1,05)	0,30
AG+GG	03 (60,0)	14 (46,7)	76 (63,9)	1,76 (0,78-3,96)	0,16	–	–
Escore de Gleason n (%)							
	*Dados perdidos	Baixo	Alto				
AA	03 (75,0)	39 (42,4)	20 (35,1)	Referência			
AG	01 (25,0)	44 (47,8)	30 (52,6)	0,75 (0,37-1,15)	0,43	0,99 (0,98-1,00)	0,57
GG	00 (0,0)	09 (9,8)	07 (12,3)	1,14 (0,38-3,40)	0,81	1,00 (0,98-1,01)	0,75
AG+GG	01 (25,0)	53 (57,6)	37 (64,9)	0,60 (0,30-1,19)	0,14	–	–

¹ Modelo de regressão logística binária normal; ² Modelo de regressão logística binária ajustado por idade; p<0,05 estatisticamente significativo.

As frequências genóticas e alélicas observadas neste trabalho foram posteriormente comparadas com as frequências observadas em um estudo de associação entre *MMP-9* R279Q e o CaP, realizado por Reis et al. (2009) no sudeste do Brasil (Tabela 5), onde verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as frequências obtidas nos dois estudos (p<0,001).

Tabela 5. Comparação das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *MMP-9* R279Q entre duas populações com CaP do Brasil

<i>MMP-9</i> R279Q	Frequência				Estatística *P
	Nordeste do Brasil		Sudeste do Brasil		
	Casos n (%)	Controles n (%)	Casos n (%)	Controles n (%)	
Frequência genotípica					
AA	60 (39,2)	78 (40,4)	01 (1,0)	05 (5,0)	0,000
AG	77 (50,3)	97 (50,3)	43 (43,0)	93 (93,0)	0,000
GG	16 (10,5)	18 (09,3)	56 (56,0)	02 (2,0)	0,001
AG+GG	93 (60,8)	115 (59,6)	99 (99,0)	95 (95,0)	0,000
Frequência alélica					
A	197 (64,4)	253 (65,5)	45 (22)	103 (52,0)	0,000
G	109 (35,6)	133 (34,5)	155 (78)	97 (48,0)	0,001

Modelo de regressão logística binária. *P<0,05 para significância estatística.

6. DISCUSSÃO

Um dos fatores de risco mais bem definidos para o desenvolvimento do CaP é o aumento da idade. Cerca de 65% dos casos de câncer de próstata são geralmente diagnosticados em pacientes com idade superior a 65 anos, sendo apenas 0,1% dos casos diagnosticados antes dos 50 anos de idade (Dornas et al. 2008). Com relação a este fator, nossos resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p= 0,113$). A média de idade para os casos foi de 67,6 anos, com variação de 44 – 90 anos e de 68,3 anos, com variação de 54 – 97 anos para os controles. Este resultado sem significância estatística pode ser explicado pelo fato de que um dos critérios de inclusão para o grupo controle foi que o indivíduo tivesse idade superior a 50 anos.

Observou-se que a maioria dos pacientes (56,8%) foram diagnosticados com a doença após os 65 anos de idade. Com relação ao genótipo, observou-se que o grupo dos pacientes que foram diagnosticados com CaP antes dos 65 anos de idade o genótipo homocigoto selvagem foi mais frequente (62,1%), enquanto que no grupo dos pacientes diagnosticados após os 65 anos de idade genótipo homocigoto mutante foi mais frequente (47,1%), entretanto não houve uma diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$), sugerindo que, neste estudo, a idade de diagnóstico não foi influenciada pelo genótipo.

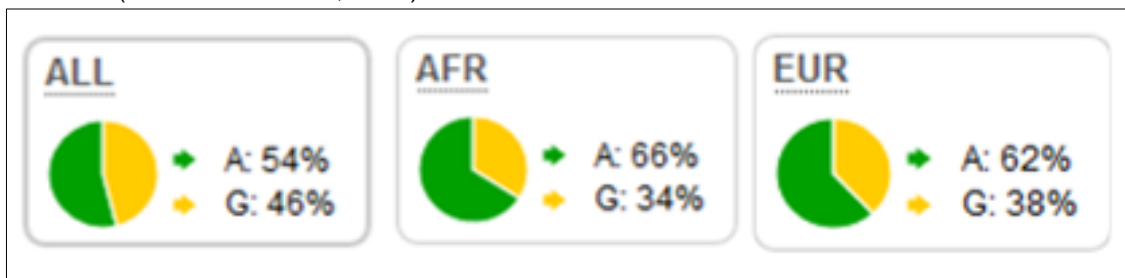
No que diz respeito à variação do PSA entre os grupos caso e controle, houve uma diferença estatisticamente significativa ($p= 0,001$). Tal diferença já era esperada, visto que um dos critérios de escolha para participar do grupo controle era que o indivíduo tivesse $PSA \leq 2,5\text{ng/mL}$. Um ponto interessante a se destacar é que, apesar da diferença significativa entre a variação do PSA dos grupos caso e controle, notou-se que no grupo dos casos a variação do PSA foi de 0,19-1238ng/mL, ou seja, indicando que mesmo indivíduos com o valor de PSA baixo ($<4\text{ng/mL}$) são susceptíveis a desenvolver CaP.

De modo geral, sabe-se que a elevação sérica do PSA demonstra alguma alteração na glândula prostática, embora não seja específica para a neoplasia. Ou seja, apesar do teste de PSA ser bastante sensível, existe a limitação referente à baixa especificidade. No entanto, um ponto que deve ser mencionado é que, apesar de ser algo bem menos frequente, é possível que a progressão do CaP ocorra na presença de um nível de PSA indetectável ou baixo. E tal evento parece não ter interferência alguma na agressividade da doença. Estima-se que aproximadamente 18% dos pacientes com câncer de próstata têm PSA normal, sendo o tumor detectado exclusivamente através do toque retal. Este fato sugere a necessidade de estudos aprofundados para que sejam propostos métodos com a finalidade de melhorar a sensibilidade e a especificidade do teste do PSA e obtenção de novos biomarcadores para um melhor diagnóstico em CaP. Neste contexto, os fatores genéticos têm ganhado grande destaque nos estudos na busca de novos biomarcadores que possam auxiliar no estabelecimento do diagnóstico, prognóstico e tomada de decisão terapêutica em CaP (Lee et al., 2010; Gilbert et al., 2015; Jakobsen et al., 2016).

Um importante ponto que se deve levar em consideração em estudos envolvendo SNPs é que sua frequência é variável de acordo com a etnia e região geográfica (Yang et al., 2012). No Brasil, apenas um estudo de associação entre variante *MMP-9* R279Q e o CaP foi encontrado, realizado por Reis et al. (2009) na região sudeste, entretanto na região nordeste acredita-se que este seja o primeiro estudo envolvendo esta variante e o CaP.

A distribuição alélica de *MMP-9* R279Q em algumas populações pode ser visualizada nos gráficos da Figura 7, onde se pode observar que o alelo A tem uma frequência média de 54% enquanto o alelo G tem uma frequência média de 46% na população mundial. A população piauiense, foco do nosso estudo, tem em maior parte de sua constituição genética contribuição de europeus (60%) e africanos (21,5%) (Lopes et al., 2014). No gráfico de distribuição alélica referente à população europeia (Figura 7), pode-se observar que a frequência média do alelo A é de 62% e do alelo G 34%, e no gráfico referente à população africana a frequência média é de 66% para o alelo A e 34% para o alelo G. Neste contexto, nota-se que as distribuições alélicas são semelhantes às observadas em nosso estudo, onde a presença do alelo A em 64,4% dos casos e 65,5% dos controles, enquanto que a presença do alelo G foi verificada em 35,6% dos casos e 34,5% dos controles. Já a com relação a distribuição genotípica, a média na população europeia é: AA – 38%, AG – 47% e GG – 14%, e na população africana é: AA – 42%, AG – 46% e GG – 11%. Essas frequências genotípicas também são semelhantes às frequências obtidas em nosso estudo: AA – 40,4%, AG – 50,3% e GG – 9,3% (Controles), AA – 39,2%, AG – 50,3% e GG – 10,5% (casos).

Figura 7. Gráficos de frequências de distribuição alélica de *MMP-9* R279Q em populações mundiais (Fonte: ENSEMBL, 2017).



No que diz respeito à distribuição genotípica entre casos e controles, nossos dados mostraram que tanto no grupo dos casos quanto no grupo dos controles o genótipo AG foi detectado em 50,3% dos indivíduos. E que, tendo o genótipo AA como referência não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição genotípica entre os grupos, AG: OR (95%IC)= 1,07 (0,53-2,17), $p=0,70$ e GG: OR (95%IC)= 1,07 (0,69-1,65), $p=0,75$. Ou seja, neste estudo não encontramos associação significativa entre o genótipo e a suscetibilidade ao CaP.

Além disso, nossos resultados não mostraram associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo e nenhuma das variáveis clínicas e patológicas do CaP como pode ser visto na Tabela 4. É importante

destacar que todos pacientes com CaP que participaram deste trabalho se encaixam no grupo de alto risco (pior prognóstico) de acordo com a classificação de risco de D'Amico, na qual leva-se em consideração o estágio tumoral, PSA pré-operatório e escore de Gleason. Nesse sentido, o que se observou é que tanto no grupo dos pacientes com PSA pré-operatório inferior a 20ng/ml quanto nos pacientes com PSA pré-operatório superior a 20ng/ml houve predominância do genótipo AG, 48,4% e 48,3% respectivamente. No que diz respeito ao estágio clínico verificou-se que no grupo localizado o genótipo AA foi mais frequente, presente em 53,3% dos indivíduos, enquanto que no grupo avançado o genótipo mais frequente foi o AG, presente em 52,1% dos indivíduos. E com relação ao escore de Gleason observou-se que no tanto no grupo com escore ≤ 7 (baixo) quanto no grupo com escore > 7 (alto), o genótipo AG foi mais frequente, 47,8% e 52,6% respectivamente. Entretanto, tendo como referência o genótipo AA, não houve diferença estatisticamente significativa, indicando que aparentemente o genótipo não exerce influência sobre a agressividade e prognóstico do CaP na população estudada.

Esses dados corroboram os dados obtidos por Ugarteburu et al. (2010) onde não foi verificada associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo *MM9 R279Q* e a chance de desenvolver CaP ($p= 0,264$) bem como com a agressividade tumoral em CaP ($p=0,373$). A semelhança entre nossos resultados e os resultados de Ugarteburu et al. (2010) em uma população espanhola, podem ser reflexo da composição étnica da nossa população de estudo, visto que, segundo relatos de Lopes et al. (2014) a população piauiense tem em sua maioria contribuição europeia em sua composição genética. No entanto, apesar do resultado concordante, o estudo feito por Ugarteburu et al. (2010) tem uma metodologia diferente da metodologia empregada neste trabalho, o que gera uma limitação na comparação entre os dados observados.

Por outro lado, nossos resultados divergem com os resultados obtidos por Reis et al. (2009), em um estudo realizado no sudeste do Brasil, no qual identificou-se associação estatisticamente significativa ($p<0,001$) entre a presença do genótipo GG e uma maior chance de desenvolver CaP, além de associação estatisticamente significativa entre a presença do genótipo GG e um melhor prognóstico da doença ($p= 0,003$). Além disso, fazendo a comparação entre as frequências alélicas e genotípicas dos casos e controles obtidas no nosso estudo e no estudo de Reis et al. (2009), pudemos observar que além dos resultados divergentes com relação à associação de *MMP-9 R279Q* e o CaP, a diferença da distribuição alélica e genotípica foram estatisticamente significativas ($p<0,001$) entre os dois estudos. Acredita-se que essa divergência de resultados se deva provavelmente a diferenças na metodologia empregada em ambos os estudos e diferenças nas características clínicas das populações estudadas, já que em nosso estudo a amostra foi constituída de pacientes com CaP de alto risco, enquanto que no estudo de Reis et al., essa classificação por grupo de risco não foi verificada.

No que diz respeito ao risco de desenvolver outras neoplasias, alguns estudos foram observados com resultados divergentes. Um estudo caso-controle realizado na Índia por Sharma et al. (2012), demonstrou em seus resultados,

tendo como referência o genótipo AA, que a presença desse polimorfismo de forma isolada não está relacionada com maior susceptibilidade a desenvolver câncer na vesícula biliar [AG: OR (95%IC) = 1,17 (0,71-1,91), P= 0,534; GG: OR (95%IC) = 1,4 (0,7-2,5), P= 0,198]. Enquanto que, relatos de Srivastava et al. (2010) mostram o genótipo GG com associação estatisticamente significativa com risco de desenvolver câncer de bexiga em uma população do norte da Índia (OR=1.92; IC 95%=1.01–3.66; p= 0.048).

Em um estudo realizado em uma população japonesa, os resultados obtidos não mostraram associação significativa OR (95%IC) = 1,29 (0,86-1,93) entre o polimorfismo *MMP-9* R279Q e o risco de desenvolver carcinoma de células renais (CCR) (Awakura et al., 2006). Outros resultados obtidos em um estudo caso-controle realizado também no Japão, mostraram associação entre o genótipo GG e um histórico familiar de múltiplos casos de câncer gástrico. Sua frequência foi mais observada em pessoas que tinham parentes de primeiro grau com câncer gástrico quando comparado àqueles que não tinham histórico familiar da doença [30,4% vs 11,6%; OR (95%IC) = 4,34 (1,45–13,0) e 16,7% vs 11,6%; OR (95%IC) = 2,26 (0,81–6,27)] (Okada et al., 2016).

Um estudo caso-controle realizado em uma população do sudoeste da China mostrou associação entre esse polimorfismo e a ocorrência de câncer colorretal. Estima-se que a frequência alélica média deste SNP na população chinesa seja de 25% para o alelo A e alelo 75% para o alelo G, e a frequência genotípica média seja de 7% para o genótipo AA, 36% para o genótipo AG e 57% para o genótipo GG. E, o que se observou nesse estudo foi que os indivíduos que carregavam o alelo A foram mais suscetíveis ao câncer colorretal (OR= 1.737, IC 95% = 1,323-2,281, p <0,001) e que o genótipo AA foi associado a um risco aumentado desse tipo de câncer em comparação com o genótipo GG (OR= 2,213, IC 95% = 1,248-3,926, p = 0,006) (Fang et al., 2010). Outro estudo, também realizado no sudoeste da China, relatou associação significativa do polimorfismo R279Q com a ocorrência e metástases em câncer de pulmão. Onde os resultados mostraram que, em comparação com o genótipo GG, o genótipo AA está associado com elevação significativa do risco de câncer de pulmão com metástase (OR ajustado=1,79; IC 95%=1,03-3,08) (Hu et al., 2005). Além disso, este polimorfismo foi descrito como estando relacionado ao risco de desenvolver câncer esofágico de células escamosas e câncer de pulmão em populações chinesas (Wu et al., 2008; Sun et al., 2011)

Levando em consideração a associação entre a presença do polimorfismo e a progressão e agressividade de outras neoplasias, um estudo realizado no Japão, mostrou que a distribuição genotípica foi significativamente associada com maior grau histológico em CCR (p <0,01). Sugerindo que esse polimorfismo tem influência sobre o potencial de malignidade do CCR (Awakura et al., 2006). Isso provavelmente se deve ao fato de que sua presença eleva a expressão de *MMP-9* favorecendo o processo de malignização (Sun et al., 2011). Em adição, relatos de Tang et al. (2008) sugerem que este polimorfismo esteja relacionado a um risco significativamente maior de ocorrência de metástases linfonodais em pacientes com câncer gástrico (P= 0,012; OR=3,4 95%CI 1.29-9.17) mas não foi demonstrada associação do mesmo com o risco de ocorrência

e invasão desse tipo de câncer em uma população chinesa. Além disso, o polimorfismo *MMP-9* R279Q foi relatado também como sendo um novo e significativo (OR= 2,347, 95 % CI 1,431–3,849) marcador prognóstico em pacientes com carcinoma nasofaríngeo locorregionalmente avançado tratados com quimioterapia na China (Liu et al., 2013).

Neste contexto, acredita-se que essa divergência de resultados possa ser ocasionada por diversos fatores, tais como diferentes metodologias aplicadas em cada estudo, diferenças étnicas inerentes a cada população e interações ambientais que podem se sobrepor ao genótipo. No entanto, embora os sejam verificados resultados controversos, pode-se observar a relevância do polimorfismo *MMP-9* R279Q na suscetibilidade a neoplasias, inclusive no desenvolvimento, progressão e agressividade do CaP. O que aponta este SNP como um possível biomarcador de risco e prognóstico em CaP e sugere a necessidade de estudos adicionais com a finalidade de melhor compreender a contribuição do mesmo nos processos neoplásicos.

7. CONCLUSÃO

Nossos achados revelaram uma ausência de associação estatisticamente significativa entre o SNP *MMP-9* R279Q e a suscetibilidade ao CaP, bem como com a agressividade e prognóstico em uma população com CaP de alto risco do nordeste brasileiro. No entanto, tendo como base dados da literatura, acredita-se que este SNP seja um potencial marcador para prognóstico em CaP. Diante disso, nossos dados podem contribuir para análises em potencial em estudos futuros para que se possa melhor compreender seu perfil de variabilidade, bem como preencher as lacunas que existem acerca de suas prováveis contribuições para a clínica e terapêutica do CaP, no intuito de que futuramente essas informações possam servir de auxílio em estratégias de tratamento personalizado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, J. A.; DOCHERTY, A. J.; BARKER, P. J.; HUSKISSON, N. S.; REYNOLDS, J. J.; MURPHY, G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. **Biochem Journal**, 309 (Pt 1): p. 299-306, 1995.

AUS, G.; ABOU, C. C.; BOLLA, M., HEIDENREICH, A.; SCHMID, H. P.; VAN POPPEL, H.; WOLFF, J.; ZATTONI, F. EAU Guidelines on Prostate Cancer. **European Urology**, v. 48, p. 546-551, 2005.

AWAKURA, Y., ITO, N.; NAKAMURA, E.; TAKAHASHI, T.; KOTANI, H.; MIKAMI, Y.; MANABE, T.; KAMOTO, T.; HABUCHI, T.; OGAWA, O. Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms and renal cell carcinoma in a Japanese population. **Cancer Lett**, v. 241, p. 59–63, 2006.

BABICHENKO, I. I.; ANDRIUKHIN, M. I.; PULBERE, S.; LOKTEV, A. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-9 and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in prostate adenocarcinoma. **Int J. Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 12, p. 9090-9098, 2014.

BAKER, E. A.; LEAPER, D. J.; HAYTER, J. P.; DICKENSON, A. J. The matrix metalloproteinase system in oral squamous cell carcinoma. **Brit. J. Oral Maxillofac. Surg**, v. 44, p. 482-486, 2006.

BRAWER, M. K.; STAMEY, T. A.; FOWLER, J.; DROLLER, M.; MESSING, E.; FAIR, W. R. Perspective on prostate cancer diagnosis and treatment: a roundtable. **Urology**, v. 58, p. 135-40, 2001.

BREHMER, B.; BIESTERFELD, S.; JAKSE, G. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 6, n. 3, p. 217-222, 2003.

CHANG, W. L.; YU C. C.; CHEN, C. S.; GUH, J. H. Tubulin-binding agents down-regulate matrix metalloproteinase-2 and -9 in human hormone-refractory prostate cancer cells – A critical role of Cdk1 in mitotic entry. **Biochemical Pharmacology**, v. 94, p. 12–21, 2015.

CHAPPELL, W. H.; ABRAMS, S. L.; LERTPIRIYAPONG, K.; FITZGERALD, T. L.; MARTELLI, A. M.; COCCO, L.; RAKUS D.; GIZAK, A.; TERRIAN, D.; STEELMAN, L. S.; MCCUBREY, J. A. Novel roles of androgen receptor, epidermal growth factor receptor, TP53, regulatory RNAs, NF-kappa-B, chromosomal translocations, neutrophil associated gelatinase, and matrix metalloproteinase-9 in prostate cancer and prostate cancer stem cells. **Advances in Biological Regulation**, p. 1-24, 2015.

CHAUDHARY, A.K.; SINGH, M.; BHARTI, A. C.; ASOTRA, K.; SUNDARAM, S.; MEHROTRA, R. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck. **Journal of Biomedical Science**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2010.

CLARKE, N.W., HART, C.A., BROWN, M.D. Molecular mechanisms of metastasis in prostate cancer. **Asian J. Androl.**, v. 11(1), p. 57-67, 2009.

COTIGNOLA, J.; REVA, B.; MITRA, N.; ISHILL, N.; CHUAI, S.; PATEL, A.; SHAH, S.; VANDERBEEK, G.; COIT, D.; BUSAM, K.; HALPERN, A.; HOUGHTON, A.; SANDER, C.; BERWICK, M.; ORLOW, I. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma. **BMC Med Genet**, v. 8, p. 1-10, 2007.

COTRAN, R. S.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.: Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

CRAIG, V. J.; ZHANG, L.; HAGOOD, J. S.; OWEN, C. A. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. **American Thoracic Society**. 2015.

D'AMICO, A. V.; WHITTINGTON, R.; MALKOWICZ, S. B.; COTE, K.; LOFFREDO, M.; SCHULTZ, D.; CHEN, M.; THOMASZEWSKI, J. E.; RENSHAW, A. A.; WEIN, A.; RICHIE, J. P. Biochemical outcome after radical prostatectomy or external beam radiation therapy for patients with clinically localized prostate carcinoma in the prostate specific antigen era. **Cancer**, v. 95, n. 2, p. 281-286, 2002.

DECLERCK, Y. A.; MERCURIO, A. M.; STACK, M. S.; CHAPMAN, H. A.; ZUTTER, M. M.; MUSCHEL, R. J.; RAZ, A.; MATRISIAN, L. M.; SLOANE, B. F.; NOEL, A.; HENDRIX, M. J.; COUSSENS, L.; PADARATHSINGH, M. Proteases, Extracellular Matrix, and Cancer. A Workshop of the Path B Study Section. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 4, p. 1131-1139, 2004.

DORNAS, M. C.; JÚNIOR, J. A. D. R.; E FILHO, R. T. F.; CARRERETTE, F. B.; DAMIÃO, R. Câncer de próstata. **Revista do hospital universitário Pedro Evaristo, UERJ**, p. 100-107, 2008.

FABA, O.R. Matrix metalloproteinases and bladder cancer: What is new?. **Barcelona: ISRN Urology**, 2012.

FANG, W. L.; LIANG, W. B.; HE, H.; ZHU, Y.; LI, S. L.; GAO, L. B.; ZHANG, L. Association of matrix metalloproteinases 1, 7, and 9 gene polymorphisms with genetic susceptibility to colorectal carcinoma in a han chinese population. **DNA and cell biology**, v. 29, n. 11, 2010.

FELGUEIRAS, J., SILVA, J. V., FARDILHA, M. Prostate cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets. **Journal Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)**. v.15, n.1, p. 16-42, 2014.

FERLAY, J.; SOERJOMATAIAN, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN, 2012. **Int J Cancer**, v. 136, p. 359-86, 2015.

FERLAY, J.; PARKIN, D. M.; STELIAROVA-FOUCHER, E. Estimatives of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. **European journal of cancer**, v. 46, p. 765-781, 2010.

FOLGUERAS, A. R.; PENDÁS, A. M.; SÁNCHEZ, L. M.; LÓPEZ-OTÍN, C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. **Int. J. Dev. Biol**, v. 48, p. 411-424, 2004.

FRIEDENREICH, C. M. Physical activity and cancer prevention: from observational to intervention research. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 10, p. 287-301, abr. 2001.

GILBERT, R., MARTIN, R. M., EVANS, D. M., TILLING, K., DAVEY SMITH, G., KEMP, J. P., LANE, J. A., HAMDY, F. C., NEAL, D. E., DONOVAN, J. L., METCALFE, C. Incorporating Known Genetic Variants Does Not Improve the Accuracy of PSA Testing to Identify High Risk Prostate Cancer on Biopsy. **PLoS ONE**, 2015.

GONG, Y.; CHIPPAD-VENKATA U.D.; OH, W.K. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1298-1327, 2014.

GRONBERG H, DAMBER L., DAMBER JE. Familial prostate cancer in Sweden. **A nationwide register cohort study**. *Cancer*: v. 77, p.138-143, 1996.

HOPPS, E.; CAIMI, G. Matrix metalloproteases as a pharmacological target in cardiovascular diseases. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 19, p. 2583-2589, 2015.

HU, Z.; HUO, X.; LU, D.; QIAN, J.; ZHOU, J.; CHEN, Y.; XU, L.; MA, H.; ZHU, J.; WEI, Q.; SHEN, H. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 15, p. 5433-5439, 2005.

HUMPHREY, P.A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. **Mod Pathol**, v. 17, n. 3, p. 292-306, 2004.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015

HERSZÉNYI, L.; SIPOS, F.; GALAMB, O.; SOLYMOSI, N.; HRITZ, I.; MIHELLER, P.; BERCZI, L.; MOLNÁR, B.; TULASSAY, Z. Matrix metalloproteinase-9 expression in the normal mucosa–adenoma–dysplasia–adenocarcinoma sequence of the colon. **Pathol. Oncol. Res**, v. 14, p. 31–37, 2008.

ITOH, Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. **Matrix Biol**, v. 44, n. 46, p. 207–223, 2015.

JAKOBSEN, N. A., HAMDY, F. C., & BRYANT, R. J. Novel biomarkers for the detection of prostate cancer. **Journal of Clinical Urology**, v. 9 (2 Suppl), p. 3–10, 2016.

KADER, A. K. SHAO, L.; DINNEY, C. P.; SCHABATH, M. B.; WANG, Y.; LIU, J.; GU, J.; GROSSMAN, H. B.; WU, X. Matrix Metalloproteinase Polymorphisms and Bladder Cancer Risk. **Cancer Res**, v. 66, n. 24. 15 de dezembro de 2006.

KARP, GERALD. *Biologia Celular e Molecular*. 3 ed. Manole Ltda, 2005.

KATCHUBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**: Texto – Atlas – Correlações clínicas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. **[S.I.]: Amino Acids**, v. 41, p. 271–290, 2011.

KOLONEL, L. N.; NOMURA, A. M. Y.; COONEY, R.V. Dietary fat and prostate cancer: current status. **J Natl Cancer Inst**, v. 91, p. 414-428, 1999.

KONDRATIEV, S; GNEPP, D. R.; YAKIREVICH, E.; SABO, E.; ANNINO, D. J.; REBEIZ, E.; LAVER, N. V. Expression and prognostic role of *MMP2*, *MMP9*, *MMP13*, and *MMP14* matrix metalloproteinases in sinonasal and oral malignant melanomas. **Human Pathology**, v.39, p. 337–343, 2008.

LEE, D. K.; PARK, J. H.; KIM, J. H.; LEE, S. J.; JO, M. K.; GIL, M. C.; SONG, K. H.; PARK, J. W. Progression of Prostate Cancer Despite an Extremely Low Serum Level of Prostate-Specific Antigen. **Korean Journal of Urology**, v. 51(5), p. 358–361, 2010.

LEITZMANN, M.F.; ROHRMANN, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. **Clinical Epidemiology**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2012.

LI, M.; SHI, J.; FU, L.; WANG, H.; ZHOU, B WU, X. Genetic polymorphism of MMP family and coronary disease susceptibility: A meta-analysis. **Gene**, v. 495, p. 36–41, 2012.

LIABAKK, N.B.; TALBOT, I.; SMITH, R. A.; WILKINSON, K.; BALKWILL, F. Matrix Metalloprotease 2 (MMP-2) and Matrix Metalloprotease 9 (MMP-9) Type IV Collagenases in Colorectal Cancer. **Cancer research**, v. 56, p. 190-196. 1 de janeiro 1996.

LITTLEPAGE, L.E.; EGEBLAD, M.; WERB, Z. Coevolution of cancer and stromal cellular responses. **Cancer cell**, 2005.

LIU, H.; HUANG, P. Y.; TANG, L. Q.; CHEN, Q. Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; GUO, L.; LUO, D. H.; MO, H. Y.; XIANG, Y. Q.; QIU, F.; SUN, R.; CHEN, M. Y.; HUA, Y. J.; LV, X.; WANG, L.; ZHAO, C.; GUO, X.; CAO, K. J.; QIAN, C. N.; HONG, M. H.; MAI, H. Q. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 and survival in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma treated with chemoradiotherap. **Med Oncol**, v. 30, n.685, 2013.

LOPES, T. R.; SANTOS, S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.; RESQUE, R. L.; PINTO, G. R.; YOSHIOKA, F. K. Population data of the 46 insertion–deletion (INDEL) loci in population in Piauí State, Northeastern Brazil. **Forensic Sci Int Genet**, v. 9, p. e13-e5, 2014.

MARQUI, A. B. T. Polimorfismos genéticos e endometriose: a contribuição dos genes que regulam a função vascular e o remodelamento de tecidos. **Rev Assoc Med Bras**, v. 58, n. 5, p. 620-632, 2012.

MATSUMURA, S.; OUE, N.; NAKAYAMA, H.; KITADAI, Y.; YOSHIDA, K.; YAMAGUCHI, Y.; IMAI, K.; NAKACHI, K.; MATSUSAKI, K.; CHAYAMA, K.; YASUI, W. A single nucleotide polymorphism in the *MMP-9* promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 131, n. 1, p. 19-025, 2005.

MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Curr Opin Cell Biol**, v. 13, n. 5, p. 534-40, 2001.

MOROZ, A. **Efeitos da finasterida sobre culturas de células epiteliais prostáticas normais e tumorais em diferentes sistemas in vitro**. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2013.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v.69, n. 3, p. 562-573, 2006.

OKADA, R.; NAITO, M.; HATTORI, Y.; SEIKI, T.; WAKAI, K.; NANRI, H.; WATANABE, M.; SUZUKI, S.; KAIRUPAN, T. S.; TAKASHIMA, N.; MIKAMI, H.; OHNAKA, K.; WATANABE, Y.; KATSUURA-KAMANO, S.; KUBO, M.; HAMAJIMA, N.; TANAKA, H. Matrix metalloproteinase 9 gene polymorphisms are associated with a multiple family history of gastric cancer. **Gastric cancer**, 2016.

OSKARSSON, T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. **The Breast**, v. 22, p. 66-72, 2013.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Envelhecimento ativo: uma política de saúde**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2005.

OZDEN, F.; SAYGIN, C.; UZUNASLAN, D.; ONAL, B.; DURAK, H.; AKI, H. Expression of MMP-1, MMP-9 and TIMP-2 in prostate carcinoma and their influence on prognosis and survival. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 139, p. 1373–1382, 2013.

REIS, S. T. R.; JUNIOR, J.P.; VILLANOVA, F. E.; ANDRADE, P. M.; ANTUNES, A. A.; DALL’OGLIO, M. F.; SROUGI, M.; MOREIRA LEITE, K. R. Genetic Polymorphisms of Matrix Metalloproteinases: Susceptibility and Prognostic Implications for Prostate Cancer. **The Journal of Urology**, v. 181, p. 2320-2325, 2009.

REIS, S. T. **Análise da Expressão de MMP-2, MMP-9, MT1-MMP (MMP-14), TIMP-1, TIMP-2, RECK, TGF-Beta e Interleucina-8 em Câncer de Próstata**. 2011. 190 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

RHODEN, E. L.; AVERBECK, M. A. Câncer de Próstata Localizado. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 54, n. 1, p. 92-99, 2010.

RIBEIRO, R. I. M. A.; JÚNIOR, P. C. B.; CARDOSO, S. V.; CANDELORI, I.; ESPÍNDOLA, F. S.; CASSALI, G. D.; LOYOLA, A. M. Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. Minas Gerais: **Bras Patol Med Lab**, v. 44, p. 115-121, 2008.

RODRIGUEZ, I. G.; DEL FRESNO, M. R.; UGARTEBURU, R. G.; ARRIAGA, P. G.; CIMA, F. L.; SAMOANO, A. F.; FERNÁNDEZ, V. M.; GARCÍA, I. F.; PÉREZ-CARRAL, J. R.; TARDÓN, A. Expression of matrix metalloproteinase-9 in prostate cancer. Preliminary experience. **Arch. Esp. Urol.** v. 63, n. 2, p. 119-124, 2010.

SAINI, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. **Cell Oncol (Dordr)**, v. 39, n.2, p. 97–106, 2016.

SANTONI, M.; PIVA, F.; SCARPELLI, M.; CHENG, L.; LOPEZ-BELTRAN A.; MASSARI, F.; IACOVELLI, R.; BERARDI, R.; SANTINI, D.; MONTIRONI, R. The origin of prostate metastases: emerging insights. **Cancer Metastasis Rev**, 2015.

SFAR, S.; SAAD, H.; MOSBAH, F.; CHOUCANE, L. *TSP1* and *MMP9* genetic variants in sporadic prostate cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 172, n. 1, p. 38-44, 2007.

SFAR, S.; SAAD, H.; MOSBAH, F.; CHOUCANE, L. Combined effects of the angiogenic genes polymorphisms on prostate cancer susceptibility and aggressiveness. **Mol Biol Rep**, v. 36, p. 37–45, 2009.

SHARMA, K. L.; MISRA, S.; KUMAR, A.; MITTAL, B. Higher risk of matrix metalloproteinase (MMP-2, 7, 9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2) genetic variants to gallbladder cancer. **Liver International**, 2012.

SHARMA, K. L.; RAI, R.; SRIVASTAVA, A.; SHARMA, A.; MISRA, S.; KUMAR, A.; MITTAL, B. A multigenic approach to evaluate genetic variants of *PLCE1*, *LXRs*, *MMPs*, *TIMP*, and *CYP* genes in gallbladder cancer predisposition. **Tumor Biol**, v. 35, p. 8597–8606, 2014.

SILVA, S. A.; GOBBO, M. G.; PINTO-FOCHI, M. E.; RAFACHO, A.; TABOGA, S. R.; ALMEIDA, E. A.; GÓES, R. M.; RIBEIRO, D. L. Prostate hyperplasia caused by long-term obesity is characterized by high deposition of extracellular matrix and increased content of MMP-9 and VEGF. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 96, p. 21–30, 2015.

SRIVASTAVA, P.; MANDHANI, A.; KAPOOR, R.; MITTAL, R. D. Role of *MMP-3* and *MMP-9* and Their Haplotypes in Risk of Bladder Cancer in North Indian Cohort. **Ann Surg Oncol**, v. 17, p. 3068–3075, 2010.

SUN, J.; YANG, X. X.; HU, N. Y.; LI, X.; LI, F. X.; LI, M. Genetic variants in *MMP9* and *TCF2* contribute to susceptibility to lung cancer. **Chin J Cancer Res**, v. 23, n. 3, p. 183-187, 2011.

TANG, Y.; ZHU, J.; CHEN, L.; CHEN, L.; ZHANG, S.; LIN, J. Associations of Matrix Metalloproteinase-9 Protein Polymorphisms with Lymph Node Metastasis but not Invasion of Gastric Cancer. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 9, p. 2870-2877, 2008.

UGARTEBURU, R. G.; DEL FRESNO, M. R.; RODRIGUEZ, I. G.; ARRIAGA, P. G.; CIMA, F. L.; SAMOANO, A. F.; GARCÍA, I. F.; FERNÁNDEZ, V. M.; TARDÓN, A. Matrix Metalloproteinase-9 polymorphisms in the diagnosis of prostate cancer. A preliminary experience. **Arch Esp Urol**, v. 63, n. 2, p. 125-132, 2010.

VANDOOREN, J.; STEEN, P.E.V.D.; OPDENAKKER, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol**, v. 48, n. 3, p. 222-272, 2013.

WU, J.; ZHANG, L.; LUO, H.; ZHU, Z.; ZHANG, C.; HOU, Y. Association of matrix metalloproteinases-9 gene polymorphisms with genetic susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma. **Dna and cell biology**, v. 27, n 10, 2008.

YAMAMOTO, K.; MURPHY, G.; TROEBERG, L. Extracellular regulation of metalloproteinases. **Matrix Biol**, v. 44, n. 46, p. 255–263, 2015.

YANG, Y.; ROSENBERG, G. A. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. **Brain research**, 2015.

YANG, Y.; LI, S. N.; LIU, J. X.; GUO, Q. X.; SUN, X. W. MMP-9 polymorphisms are related to serum lipids levels but not associated with colorectal cancer susceptibility in Chinese population. **Mol Biol Rep**, v. 39 p. 9399–9404, 2012.

ZHANG, B.; YE, S.; HERRMANN, S. M.; ERIKSSON, P.; DE MAAT, M.; EVANS, A.; ARVEILER, D.; LUC, G.; CAMBIEN, F.; HAMSTEN, A.; WATKINS, H.; HENNEY, A. M. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. **Circulation**, v. 99, n. 14, p. 1788-1794, 1999a.