

**Sabrina Thalita dos Reis**

**Avaliação de polimorfismos dos genes codificadores das  
Metaloproteinases da Matriz no câncer de próstata**

Dissertação apresentada a Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de mestre em  
ciências.

Área de Concentração: Urologia  
Orientadora: Dr<sup>a</sup> Kátia Ramos Moreira Leite

**São Paulo**

**2008**

**Sabrina Thalita dos Reis**

**Avaliação de polimorfismos dos genes codificadores  
das Metaloproteinases da Matriz no câncer de próstata**

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de mestre em ciências.

Área de Concentração: Urologia  
Orientadora: Dr<sup>a</sup> Kátia Ramos Moreira Leite

**São Paulo**

**2008**

“A Deus e aos meus queridos pais pelo apoio, carinho e paciência, por estarem sempre me acompanhando, motivando-me e torcendo pelo meu sucesso”

## **Agradecimentos**

A Dr<sup>a</sup> Kátia especialmente por ter me aceitado de braços abertos. Pela excelente orientação que sempre me deu, e por sempre se preocupar com meu bem estar pessoal. Pelos exemplos de atitude, iniciativa e otimismo. Pelas oportunidades que me proporcionou de melhorar enquanto pessoa, e impulsionar o meu início na pesquisa científica. E por ser meu maior exemplo ético e profissional. Ser orientada pela Dr<sup>a</sup> Kátia foi pra mim motivo de muito orgulho e felicidade.

Ao Prof. Miguel por sempre estimular nosso trabalho e reconhecer nosso valor. Pelo caráter incontestável, pelo carisma e carinho que sempre me tratou.

A Dr<sup>a</sup> Priscila e a Fabiola que se tornaram grandes amigas, pelos ensinamentos que certamente fizeram a diferença, pela convivência maravilhosa e pelo carinho dedicado a mim.

Ao Iran, a Célia e a Vanessa, meus queridos amigos, pelos ensinamentos, pela amizade e divertida convivência em laboratório.

A Cida, Iones, Elisa e a Inisabete pelo carinho e amizade.

Ao Alberto, ao José Pontes, ao Daher e a todos colegas da Urologia pelo companheirismo e amizade que sempre me deram.

A Adriana pela análise estatística e por ser sempre tão solícita, e por todo apoio dado a mim. A Todos do grupo Genoa Biotecnologia.

Aos meus amigos, como tenho que agradecer a eles, Carol, Marcelo, Core, Juninho, Patrícia, Tianinha, Marina, Poliana, Henrique, Renata, Kelly e muitos outros por me fazer esquecer todos os meus problemas quando estava na

presença deles, com histórias engraçadas, risadas e fazer esta fase da minha vida se tornar mais amena.

A meus irmãos, Sandro e Alessandra, pela amizade, companheirismo e apoio incondicional. As minhas sobrinhas, Geovana, Mariana e Valkíria, pela alegria. A todas as minhas tias e a minha madrinha Cida por sempre estarem presentes, torcendo, rezando e compartilhando de todos os momentos.

A Deus, por sempre estar presente, pelos auxílios em minhas escolhas e por ter me dado tudo que eu precisava para ser feliz.

Aos meus pais, Geraldo e Neuza, pelos ensinamentos, pelo carinho, exemplo, paciência, por serem meu porto seguro e minha base de vida. O amor que me dedicam é com certeza o fator principal de todas as minhas conquistas. Com certeza tudo o que consegui até hoje é reflexo da constante batalha deles. Muito obrigada por sempre me apoiar e acreditar na minha capacidade. AMO MUITO VOCÊS!!!!!!!

Muito obrigado!!!!!!!

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2<sup>a</sup> ed, São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005

Referências: adaptado de International Committe of Medical Journals Editors (Vancouver)

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

## Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	Introdução	1
1.1	Considerações Gerais	2
1.1.1	Câncer de Próstata	2
1.1.2	Metaloproteinases da Matriz	6
1.1.3	Polimorfismos de Nucleotídeo Único	19
1.1.3.1	Polimorfismos de MMP associados ao Câncer	20
2	Objetivos	23
3	Material e Métodos	25
3.1	Pacientes	26
3.2	Ética	28
3.3	Amplificação do segmento contendo o SNP	28
3.4	Análise Estatística	35
4	Resultados	36
4.1	Polimorfismos de MMP e predisposição ao câncer de próstata	37
4.2	Polimorfismos de MMP e prognóstico do câncer de próstata	44
4.2.1	Estádio Patológico	44
4.2.2	Escore de Gleason	50
4.3	Freqüência dos polimorfismos em MMP em relação a população de homens brasileiros	55
5	Discussão	57
6	Conclusões	67





## **Lista de abreviaturas**

CaP – Câncer de Próstata

DNA – Ácido Dextrorribonucleico

MB – Membrana Basal

MEC – Matriz extracelular

MMP – Metaloproteinases da Matriz

MMP-TM - Metaloproteinase da Matriz Tipo Membrana

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

PSA – Antígeno Prostático Específico

RNA<sub>m</sub> – Ácido Ribonucléico Mensageiro

SNP – Polimorfismos de Nucleotídeo Único

SNP<sub>ns</sub> – Polimorfismo de Nucleotídeo Único não-sinônimo

TIMP – Inibidor de Metaloproteinases da Matriz

TR – Toque Retal

TGF- $\alpha$  - Fator de Crescimento Transformante alfa

TGF- $\beta$  - Fator de Crescimento Transformante beta

IGF – Fator de Crescimento de Insulina

IGF-BP – Proteínas ligadas ao Fator de Crescimento de Insulina

Col I – Colágeno Tipo 1

Col IV – Colágeno Tipo 4

Col XVIII – Colágeno Tipo 18

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

FGF-2 – Fator de Crescimento de Fibroblastos 2

E-cad – E-caderina

Lam-5 – Laminina 5

IL-2R $\alpha$  - Receptores alfa de Interleucina 2

$\alpha$ 1-PI – Inibidor de Proteinase 1

TEM – Transição Epitélio Mesenquimal

$\mu$ PAR – Receptor Ativador Plasminogênio tipo Uroquinase

## Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura Geral das MMP	9
Figura 2 – Papel das MMP no Câncer	13
Figura 3 – Papel das MMP no Crescimento de células do câncer	15
Figura 4 – Papel das MMP na Sobrevida de células do câncer	16
Figura 5 - Papel das MMP na Angiogênese	16
Figura 6 - Papel das MMP na Invasão de células tumorais	17
Figura 7 - Papel das MMP na Transição epitélio-mesenquima	17
Figura 8 - Papel das MMP na Inflamação e Resposta Imune	18
Figura 9 - Sistema Taqman®	31
Figura 10 - Genotipagem Taqman® PCR em Tempo Real	32

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Dados clínico-demográficos de acordo com grupo	27
Tabela 2 - Seqüências de primers para amplificação e identificação dos SNP dos genes das metaloproteinases	34
Tabela 3 - Distribuição dos genótipos dos genes das MMP1, 2 7 e 9, entre pacientes com CaP e grupo controle	39
Tabela 4 - Ajuste do modelo multivariado para o genótipo	40
Tabela 5 - Distribuição dos alelos dos genes das MMP1, 2 7 e 9, entre pacientes e grupo controle	42
Tabela 6 - Ajuste do modelo multivariado para alelo	43
Tabela 7 - Dados clínico-demográficos de acordo com estágio patológico	44
Tabela 8 - Distribuição da frequência dos genótipos dos genes das MMP1, 2, 7 e 9 em relação ao estágio patológico	46
Tabela 9 - Ajuste do modelo multivariado para estágio patológico	47
Tabela 10 - Distribuição dos alelos dos genes das MMP1, 2 7 e 9, em relação ao estágio patológico	49
Tabela 11 - Dados clínico-demográficos de acordo com escore de Gleason	50
Tabela 12 - Distribuição da frequência dos genótipos dos genes das MMP em relação ao Escore de Gleason	52
Tabela 13 - Distribuição dos alelos dos genes das MMP1, 2 7 e 9, em relação ao Escore de Gleason	54

Tabela 14 - Freqüência dos genótipos dos polimorfismos nas MMP em nosso grupo controle comparado com uma população heterogênea de homens brasileiros\_\_\_\_\_56

Tabela 15 - - Descrições de polimorfismos das MMP associados ao desenvolvimento de neoplasias\_\_\_\_\_60

Tabela 16 - Relatos da literatura associando polimorfismos das MMP e comportamento de neoplasias\_\_\_\_\_64

## Resumo

Reis ST. Avaliação de polimorfismos dos genes codificadores das Metaloproteinases da Matriz no câncer de próstata [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007

**Introdução:** O Câncer de próstata (CaP) é o mais comum do homem brasileiro. É importante a identificação de alterações moleculares que possam prever o seu desenvolvimento e potencial biológico. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) são alterações da seqüência do DNA onde somente uma base é trocada com uma freqüência superior a 1% na população, que podem levar a modificações estruturais e funcionais na proteína, ou afetar a sua quantidade, e podem constituir marcadores de predisposição e prognóstico de neoplasias. Metaloproteinases (MMP) são proteínas da família de enzimas proteolíticas, que degradam a matriz extracelular, e SNP na sua estrutura têm sido associados ao comportamento de tumores. **Objetivos:** Avaliar a freqüência de SNP nos genes das MMP1, 2, 7 e 9, em pacientes com CaP e grupo controle, relacionando com suscetibilidade para o desenvolvimento da doença e previsão de seu potencial biológico. **Material e Métodos:** A amostra é constituída por tecido não tumoral de 100 indivíduos com CaP, e 100 amostras controle representadas por soro de indivíduos saudáveis, sem câncer de próstata. O DNA foi obtido utilizando protocolos convencionais de extração. Para genotipagem foi utilizada técnica de identificação de base única com uso de sondas marcadas com fluoróforos (Taqman®) pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real. As freqüências alélicas foram calculadas e a comparação entre os grupos foi feita utilizando-se o teste de qui-quadrado com valor de significância de 0,05. **Resultados:** Nos genes das MMP1 a

freqüência do genótipo homocigoto polimórfico esteve mais presente no grupo controle que no CaP ( $p > 0,001$ ). No gene da MMP9 o alelo polimórfico esteve mais presente em pacientes com CaP ( $p > 0,001$ ), e em tumores com escore de Gleason  $\leq 6$  ( $p = 0,003$ ). No gene da MMP2 de acordo com estadiamento patológico o alelo polimórfico foi mais freqüente em tumores pT3 ( $p = 0,026$ ) e Gleason maior ou igual a 7 ( $p = 0,042$ ). **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que o polimorfismo no gene da MMP1 está associado a um caráter de proteção aos indivíduos quanto ao desenvolvimento do CaP. O polimorfismo no gene da MMP9 está associado a um aumento no risco de desenvolvimento desta neoplasia, e quando analisamos as associações com os fatores prognósticos encontramos uma correlação com tumores de melhor prognóstico. Por outro lado o polimorfismo do gene da MMP2 se associa a tumores não órgão-confinados.

Descritores: Neoplasias Prostáticas; Metaloproteinases da matriz; Polimorfismo genético; Diagnóstico; Prognóstico

## Summary

Reis ST. Evaluation of Polymorphisms of Matrix Metalloproteinases genes in prostate cancer. [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007

**Introduction:** Prostate cancer (PCa) is the most frequent tumor in males in Brazil. Research has been directed for the identification of molecular markers that can predict the PCa predisposition and prognosis. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are genome variations, present in a frequency of 1% or more. The matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of enzymes responsible for the degradation of extracellular matrix. SNPs have been demonstrated in the promoter region of these genes and have been associated with development and progression of some cancers. **Objective:** To investigate the correlation between polymorphisms of MMP1, 2, 7, 9 with susceptibility and classical prognostic parameters in PCa. **Patients and methods:** The sample is constituted by normal tissue of 100 patients with PCa, and 100 healthy men as controls (serum). DNA genomic was extracted from paraffin blocks and serum using conventional protocols. The DNA sequence containing the polymorphic sites was amplified by Real-Time polymerase chain reaction, using fluorescent probes (Taqman®). The allelic frequency was calculated and the comparison between the groups was made using the qui-square test with value of significance of 0.05. **Results:** The polymorphic homozygote genotype of the MMP1 was more frequent in the control group than in the PCa ( $p < 0.001$ ). The polymorphic allele of MMP9 was more frequent in the PCa group ( $p < 0.001$ ), and in tumors Gleason  $\leq 6$  ( $p = 0,003$ ). The polymorphic allele of MMP2 was more frequent in tumors of higher stage (pT3) ( $p = 0.026$ ) and higher Gleason



Score ( $\geq 7$ ) ( $p=0.042$ ). **Conclusion:** We have shown that MMP1 polymorphism is more frequent in the control group, than in patients with PCa, it may be associated to protection for the development of PCa. The MMP9 polymorphism was related to higher risk for development of this neoplasia, but associated with lower Gleason score. MMP2 polymorphism was associated with non organ-confined disease.

Descriptors: Prostatic neoplasm; Matrix metalloproteinase; Polymorphism genetic; Diagnosis; Prognosis

# **1. Introdução**

## **1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1.1.1 Câncer de próstata**

O câncer de próstata (CaP) atualmente é o tumor mais freqüente do homem no Brasil sendo estimados mais de 49.000 novos casos para 2008, e o segundo como causa de óbito em homens ([www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)). No mundo, os casos esperados de CaP representam 15,3% de todos os cânceres. A incidência apresenta variações regionais e raciais, provavelmente, devido a condições genéticas e ambientais, principalmente alimentares distintas entre os indivíduos (Nelson et al., 2003). Histórico familiar de pai ou irmão com câncer de próstata antes dos 60 anos de idade aumenta o risco em 3 a 10 vezes em relação à população geral (Crawford, 2003).

O consumo de frutas, vegetais ricos em carotenóides como tomates e cenouras, e leguminosas como feijão, ervilha e soja; vitaminas do tipo A, D e E, e minerais como o selênio diminuem o risco de desenvolvimento do CaP. Um alto consumo energético total e ingestão de grande quantidade de carne vermelha, gorduras e derivados do leite tem sido relacionado a aumento da probabilidade de desenvolvimento do CaP. Aminas heterocíclicas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, fator de crescimento análogo à insulina

(IGF-1), consumo excessivo de álcool e tabagismo também são tidos como responsáveis pelo aumento do risco (Schulman et al., 2001).

A detecção precoce do CaP se dá pelo exame de toque retal (TR) e determinação da concentração sérica do antígeno prostático específico (PSA) (Carter, Person, 1999). É importante a associação da dosagem de PSA ao TR, já que o TR tem alta especificidade (94%), porém baixa sensibilidade (50%), assim como baixo valor preditivo positivo (21%-53%) (Greenlee et al., 2001; Perron et al., 1996). O nível de PSA no sangue se eleva em casos de hiperplasia prostática benigna (HPB), prostatite e CaP. Normalmente, é encontrado em baixos níveis, menor que 4,0ng/ml (Catalona et al., 1991). Elevados níveis séricos de PSA são indicação de biópsia prostática guiada pela ultra-sonografia transretal, único método diagnóstico da neoplasia (Gann et al., 1995).

O diagnóstico do CaP tem que ser feito na fase inicial, para que se possa obter maior sucesso no tratamento. O tratamento do carcinoma localizado na próstata é a prostatectomia radical e a radioterapia e, em doença avançada, metastática, a chance de cura é diminuta e o tratamento é baseado na supressão androgênica (Brawer et al., 2001).

O prognóstico depende do estágio (TNM) e grau histológico (Gleason). A progressão do CaP é variada; existem tumores de baixo grau que têm evolução indolente enquanto outros possuem alta capacidade de progressão (Konishi et al., 1995). Atualmente, não há nenhum teste que permita a diferenciação entre

estas formas de tumores Os principais fatores prognósticos para o CaP então estão descritos abaixo:

#### 1. Graduação histológica de Gleason:

Um dos mais importantes fatores prognósticos é a graduação histológica, sendo a graduação de Gleason a mais utilizada. Existem cinco padrões na escala de graduação de Gleason para o CaP considerando o padrão glandular e a sua relação com o estroma prostático. O diagnóstico final é dado pela soma dos valores dos dois focos neoplásicos mais representativos do tumor, de forma que as neoplasias serão classificadas em um escore de 2 a 10 (Gleason, 1992; Epstein et al., 2005). Tumores com escore de Gleason 2-6 são considerados bem diferenciados e têm um comportamento mais indolente enquanto os tumores com escore de 7 a 10 são mais agressivos (Gleason, 1992).

#### 2. Volume tumoral

Um segundo valor prognóstico importante é o volume tumoral, que pode ser avaliado na biópsia prostática ou na peça cirúrgica após a prostatectomia radical. Porém tumores de qualquer tamanho apresentando Gleason >7 tendem a evoluir agressivamente com recorrência à distância (Leite et al., 2005).

#### 3. Estádio Patológico:

O estadiamento patológico é um dos principais fatores prognósticos. A classificação TNM no câncer de próstata segue a recomendação da AJCC (2002).

Atualmente são estes os parâmetros que norteiam a escolha dos tratamentos adjuvantes, porém estes têm sido insuficientes para identificação

de indivíduos susceptíveis ao desenvolvimento bem como na definição do prognóstico destes tumores. Por isso pesquisas têm sido direcionadas para a identificação de alterações moleculares que possam prever o desenvolvimento e potencial biológico do câncer de próstata (Pashos et al., 2002).

### **1.1.2 Metaloproteinases da Matriz**

Metaloproteinases da matriz (MMP) são proteínas pertencentes a uma família de aproximadamente trinta enzimas proteolíticas ou endoproteinases que degradam vários componentes da matriz extracelular (MEC) (Nagase, Woessner, 1999).

A MEC é uma densa rede de colágeno e elastina, embutida em proteoglicans e glicoproteínas. Estas macromoléculas reúnem-se em duas organizações que são denominadas matriz intersticial (MI) e membrana basal (MB). A MI compreende todo o espaço existente entre as células mesenquimais, e a MB é representada pela matriz extracelular em forma de lâmina constituída por colágeno tipo IV e glicoproteínas que separa duas camadas celulares como o epitélio do endotélio e o epitélio do tecido conjuntivo. Durante o processo de invasão tumoral, as células neoplásicas atravessam os dois tipos de matriz, MB e MI, e reações bioquímicas entre células normais e a MEC têm influência no processo de invasão tumoral em neoplasias (Liotta, 1986). Células tumorais possuem a habilidade de invadir tecido através da produção de enzimas proteolíticas que clivam componentes da MEC (van-Kempen et al., 2002). As principais enzimas responsáveis por esta proteólise são as MMP (Stetler-Stevenson et al., 1989).

MMP estão presentes tanto em tecidos normais, onde estão envolvidas no remodelamento da matriz como em doenças, incluindo o câncer onde promovem a degradação de componentes da matriz extracelular permitindo a

migração das células tumorais (Vlerrincvkx, 1991). A detecção de sua expressão tem sido estudada como marcador sensível e específico de tumores de esôfago (Yu et al., 2004), pulmão (Su et al., 2005), cabeça e pescoço (O-Charoenrat et al., 2006), ovário (Li et al., 2006), cólon e reto (Zinzindohoue et al., 2005) e condrossarcoma (Fong et al., 2004).

As MMP estão subdivididas em cinco grupos, de acordo com sua estrutura e o seu substrato específico (figura 1):

- 1- Matrilisinas são as mais simples, possuem um domínio pro-peptídeo, peptídeo sinal e um domínio catalítico com o sítio ligante de zinco, fazem parte deste grupo MMP7 e MMP26 (Lynch, Matrisian, 2002).
- 2- Colagenases contêm um domínio simples de hemopexina conectado ao domínio catalítico através de uma região de dobradiça rica em prolina, estas MMP degradam a hélice nativa de colágeno tipo I, II e III entre outros. São estas: MMP1, MMP8 e MMP13 (Curran, Murray, 1999).
- 3- Estromelisinases são semelhantes as colagenases, mas como as matrilisinas possuem um substrato específico e degradam muitas proteínas da matriz extracelular, como os proteoglicans, fibronectina e laminina. São estas: MMP3, MMP10 e MMP12 (Nagase, Woessner, 1999).
- 4- Gelatinases contêm uma região adicional de três repetições de fibronectina tipo II, que possuem preferência por colágeno

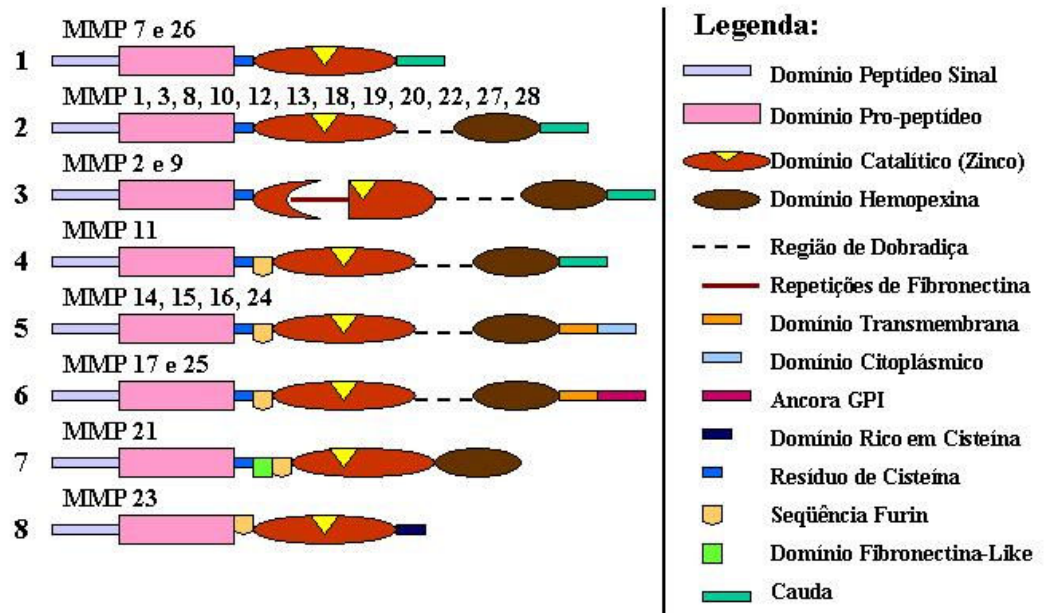


desnaturado (gelatinases) e também degradam colágenos tipos IV, V, VII e X, além de fibronectinas e lamininas. São estas: MMP2 e MMP9 (Kleiner, Stetler-Stevenson, 1999).

- 5- MMP tipo membrana (MMP-TM) é o quinto e maior grupo das metaloproteinases que degrada gelatina, fibronectina e agregam assim como outros substratos da matriz extracelular, estas MMP estão limitadas à superfície das células através de um domínio transmembrana c-terminal. São estas: MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24 e MMP25 (Seiki, 1999).

Existem ainda a MMP-19, MMP-23 e epilisina (MMP-28) que não estão em nenhum destes grupos (McCawley, 2001). Entre outras metaloproteinases estão as metaloelastase (MMP-12) e enamelisina (MMP-20) que possuem função especializada em migração e proteólise de macrófagos mediadores e formação do esmalte do dente respectivamente (Caterina et al., 2002).

## Estrutura Geral das MMP



**Figura 1.** Estrutura geral das MMP: neste estudo nós analisamos polimorfismos nas MMP7, MMP1, MMP2 e MMP9, pertencentes aos grupos das Matrilisinas, Colagenases e Gelatinases que estão representadas nos grupos 1, 2 e 3 respectivamente.

O pro-peptídeo de todas as metaloproteinasas contém um resíduo de cisteína conservado, unido ao íon zinco no sítio catalítico das MMP (Nagase, Woessner, 1999). O rompimento desta ligação zinco-cisteína por fatores físicos ou químicos é o primeiro passo para ativação das MMP (Stamenkovic, 2003). O domínio hemopexina forma uma estrutura propulsora de quatro hélices feitas de *Beta sheets*, que confere a propriedade colagenolítica das MMP (Lauer-Fields et al., 2002). O domínio Pex é necessário para ligar MMP a outras proteínas

como as integrinas, receptores de superfície celular e TIMP (Tecidos Inibidores de MMP) (Baker et al., 2002). O domínio fibronectina-like das gelatinases é importante por se ligar à gelatina (Lauer-Fields et al., 2002). Todas as MMP-TM, estromelisina-3 (MMP-11), MMP-23 e epilisina (MMP-28) têm também uma seqüência de reconhecimento furin entre o pro-peptídeo e o domínio catalítico, permitindo assim ativação e clivagem por enzimas convertase no aparelho de golgi (Lee et al., 2004).

Além da degradação de componentes da matriz extracelular e ativação de outras metaloproteinases, as MMP são responsáveis pela ativação de fatores de crescimento e citocinas (Stamenkovic, 2003). Por exemplo, a MMP9 cliva o sítio pro-inflamatório da citocina IL-8, aumentando sua atividade em 10 vezes, degradando e inativando assim o fator 4 de plaqueta que é um inibidor de angiogênese (Opdenakker et al., 2001).

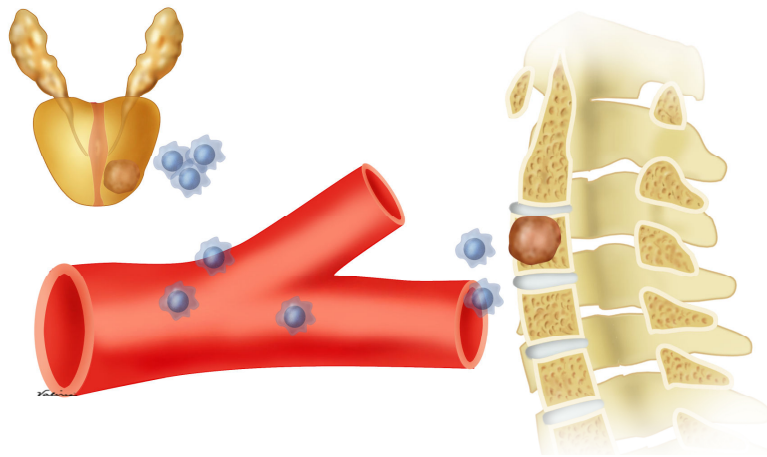
A atividade das MMP é regulada por inibidores endógenos. Primeiramente estão os quatro inibidores de metaloproteinases (TIMP), onde cada um consiste de um domínio N-terminal responsável pela atividade inibitória da MMP, e um domínio C-terminal. Embora todas as TIMP liguem-se firmemente a maioria das MMP, elas possuem diferente atividade inibitória contra diferentes MMP (Brew et al., 2001). Outra proteína inibidora de MMP é a RECK que é expressa em tecidos humanos. Em células normais, a secreção de MMP9 para o meio extracelular está bloqueada por sua ligação a proteína RECK, que por sua vez está ancorada na membrana plasmática. Durante o processo de transformação celular a expressão do gene RECK é inibida liberando MMP9,

contribuindo assim para o comportamento invasivo de células cancerosas (Baker et al., 2002). As MMP são também reguladas em níveis transcricional e pós transcricional. A expressão da maioria das MMP é baixa em tecido normal e acima do normal quando há remodelamento. A expressão pode ser induzida por citocinas, fatores de crescimento, agentes químicos, estresse físico, oncogenes e interações com a matriz extracelular (Westermarck et al., 1999).

Diferenças na expressão de várias MMP estão sendo encontradas em vários tipos de neoplasias e correlacionadas com desenvolvimento, estágio avançado, propriedades metastáticas, e invasivas, portanto pior prognóstico (Coussens et al., 2002) (Egeblad, Werb, 2002).

Um aumento na expressão na MMP acontece nas próprias células tumorais ou em células estromais vizinhas, que ajudam a remodelar a MEC de forma a providenciar um ambiente favorável para o estabelecimento do tumor primário. Estão também envolvidas na migração celular ajudando na remoção de sítios de adesão, e expondo novos sítios de migração, através da clivagem de receptores que promovem a ligação entre as células e destas com a MEC, além de degradar componentes da membrana basal permitindo que células tumorais invadam o estroma adjacente (McCawley, 2001). As MMP também participam do processo de angiogênese, facilitando a ligação aos receptores da membrana de fatores proangiogênicos e suprimindo a ligação de inibidores da angiogênese. Na circulação de células tumorais as MMP ajudam a quebrar a membrana basal associada com capilares e vasos linfáticos permitindo que células tumorais entrem na circulação, e depois saiam dos vasos sanguíneos

para sítios metastáticos (Chambers, Matrisian, 1997). Em sítios distantes, MMP são requeridas novamente para todos os processos descritos acima, migração, estabelecimento do microambiente necessário para crescimento metastático, e angiogênese. Enfim, as MMP contribuem em múltiplos estágios para o processo carcinogênico (Egeblad, Werb, 2002) (figura 2).



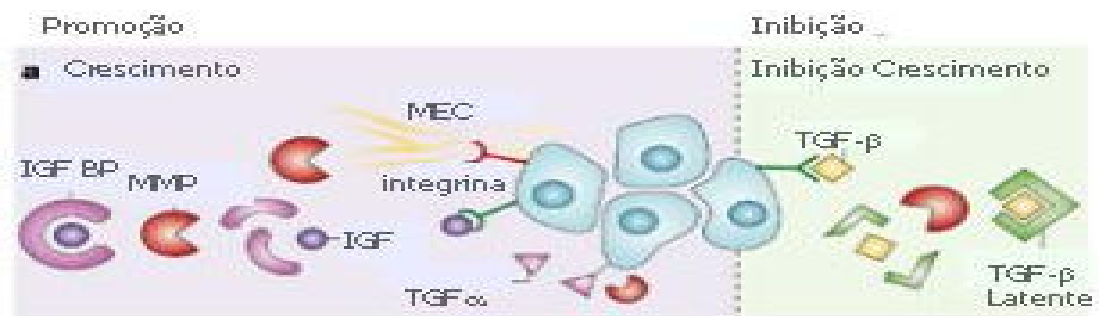
**Figura 2.** Papel das MMP no Câncer: MMP contribuem em várias etapas no processo carcinogênico, incluindo: o estabelecimento de um microambiente para o crescimento do tumor primário; em angiogênese tumoral e na habilidade de invasão e migração das células tumorais; na quebra da membrana basal de vasos sanguíneos permitindo a entrada (“intravasamento”) e saída (extravasamento) de células tumorais; modificação do microambiente em sítios distantes, permitindo o estabelecimento, sustentação e crescimento de células tumorais.

Alterações de várias MMP já foram associadas ao câncer. Os mecanismos de ação das MMP que foram analisadas neste trabalho e que já foram relacionadas com o desenvolvimento e progressão de neoplasias são:

- 1) Degradação de membrana basal promovida pelas MMP2 e a MMP9, além da ativação de citocinas e fatores de crescimento que contribuem para o processo de angiogênese (Kleiner, Stetler-Stevenson, 1999)(Edwards et al., 1998);
- 2) Degradação de colágeno I pela MMP1 pertence ao grupo das collagenases, facilitando a invasão dos tecidos devido a degradação da MB (Curran, Murray, 1999);
- 3) A MMP7 pertence ao grupo das matrilisinas, degrada elastina, proteoglicans e colágeno tipo IV, facilitando também a degradação da MB (Quantin et al., 1989). Cliva substratos que não fazem parte da matriz extracelular, mas estão envolvidas na interação entre as células e destas com a matriz como a E-caderina facilitando a migração celular (Noe et al., 2001).

Um aumento na expressão destas MMP foi identificado em várias neoplasias. Tem sido demonstrado que a expressão de MMP9 está aumentada em carcinomas colo-retais (Tutton et al., 2003) e pulmonares (Shou et al., 2001). Superexpressão de MMP1 foi demonstrada em carcinomas colo-retais (Murray et al., 1996) e de esôfago (Murray et al., 1998), MMP2 foi demonstrada no carcinoma de cabeça e pescoço (Franchi et al., 2002) e MMP7 no carcinoma pancreático (Li et al., 2005)

As figuras de 3 a 8 ilustram as ações promotoras e inibidoras das MMP no processo de carcinogênese (Egeblad and Werb, 2002).

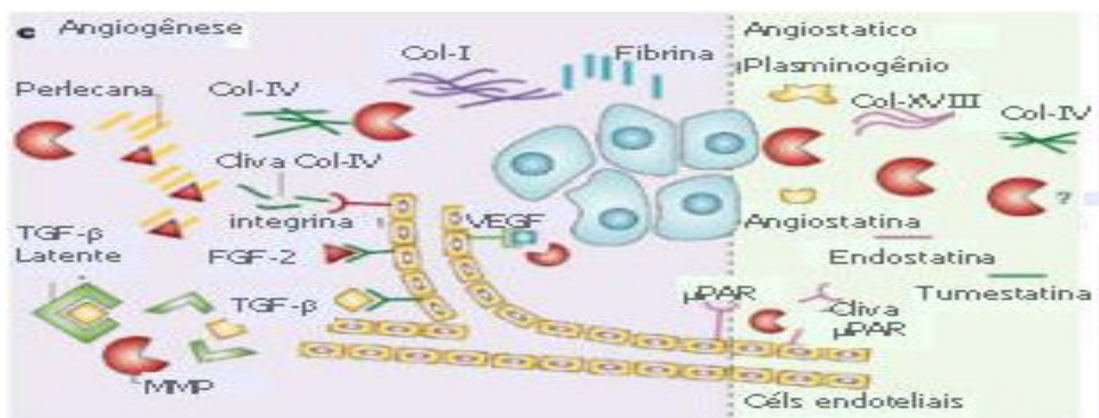


**Figura 3.** Papel das MMP no Crescimento de células do câncer: MMP promove o crescimento de células do câncer, clivando proteínas ligadas ao fator de crescimento de insulina (IGF-BP), liberando IGF e precursores de fatores de crescimento incluindo fator de crescimento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), e regulando moléculas da MEC e integrinas. MMP podem inibir o crescimento de células do câncer liberando fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) a partir do complexo latente de TGF- $\beta$ .

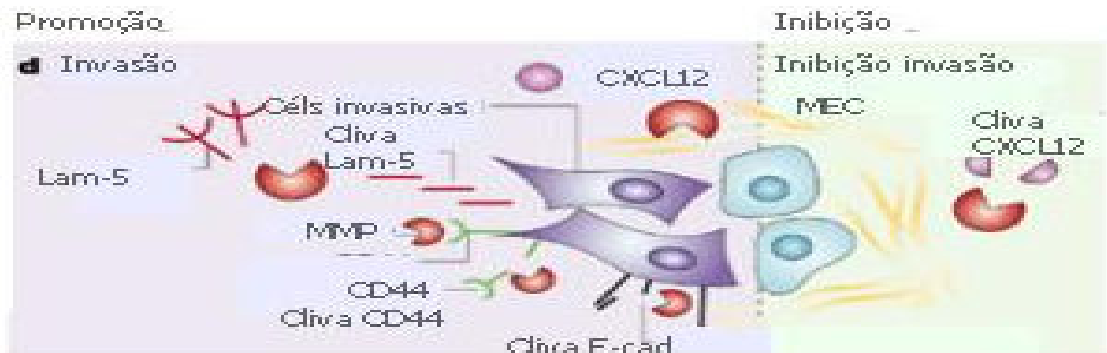




**Figura 4.** Papel das MMP na Sobrevivência de células do câncer: MMP promovem sobrevivência de células do câncer liberando IGF e clivando ligantes FAS (FASL). MMP também promovem apoptose, por mudar a composição da MEC, o que influencia na sinalização das integrinas.



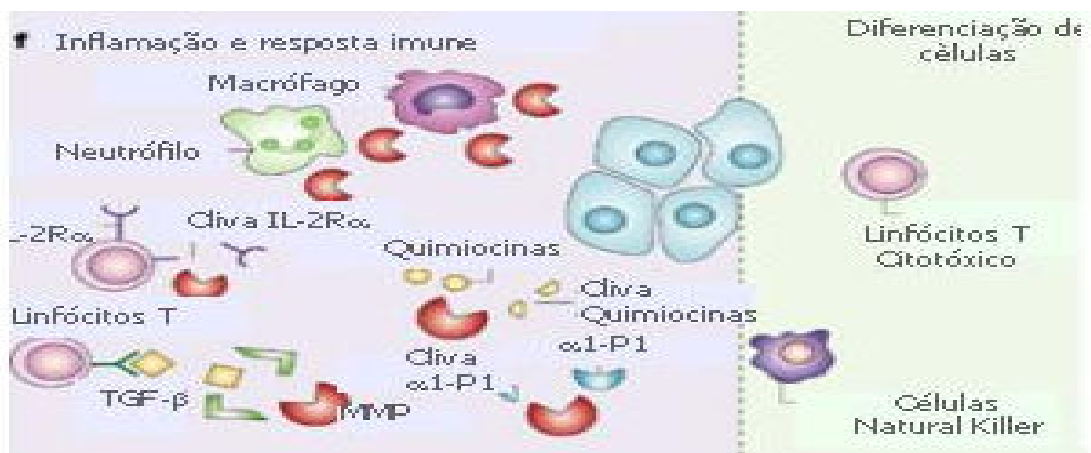
**Figura 5.** Papel das MMP na Angiogênese: MMP promove angiogênese aumentando a biodisponibilidade de fatores de crescimento pró-angiogênicos, como fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2), e TGF- $\beta$ . FGF-2 é liberado por clivagem da proteína perlecan da MEC, o mecanismo que é responsável pelo aumento de VEGF não é conhecido. Ainda, MMP promove invasão de células endoteliais clivando componentes estruturais da MEC, como colágeno tipo I (Col-I), IV (Col-IV) e fibrina. A Clivagem do Col-IV age a favor da angiogênese quando se liga a integrina  $\alpha v \beta 3$ . MMP agem inibindo a angiogênese através da clivagem de plasminogênio e Col-XVIII, resultando na liberação de angiostatina e endostatina que são fatores anti-angiogênicos. MMP participam também da liberação de tumostatina, um fragmento de Col-IV. A Clivagem de receptor ativador de plasminogênio tipo uroquinase ( $\mu$ PAR) na superfície celular de células endoteliais podem inibir angiogênese, pois  $\mu$ PAR é necessário para a invasão de células endoteliais *in vitro*.



**Figura 6.** Papel das MMP na Invasão de células tumorais: As MMP regulam a invasão através da degradação de componentes estruturais da MEC. As MMP promovem invasão e migração por clivarem Laminina 5 (Lam-5), além de clivarem moléculas de adesão como CD44 e E-caderina (E-cad). A liberação de fragmentos de E-cad podem então se ligar e inibir a função de outras moléculas de E-cad não clivadas. MMP podem inibir metástases clivando CXCL12, uma quimiocina da família CXC que promove metástase em câncer de mama.



**Figura 7.** Papel das MMP na Transição epitélio-mesênquimal: MMP influencia a transição epitélio-mesênquima (TEM), uma transição que é associada com comportamento maligno, através da clivagem da molécula de adesão E-cad e através da liberação de TGF- $\beta$ . MMP também promove diferenciação. Por exemplo, tumores em camundongos MMP9 nulos são menos diferenciados que tumores em camundongos tipo selvagem. O mecanismo não é conhecido, mas deve envolver mudanças na composição da MEC influenciando na sinalização de integrinas.



**Figura 8.** Papel das MMP na Inflamação e Resposta Imune: MMP também inibem reações imune contra as células do câncer. MMP clivam receptores- $\alpha$  de interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) em linfócitos T, inibindo assim sua proliferação, também liberam TGF- $\beta$ , um importante supressor de reações de células T contra células do câncer, Clivam também um inibidor de proteinase  $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1-P1), diminuindo a sensibilidade das células de câncer por células natural Killer, e clivam vários membros da família de quimiocinas CC e CXC, diminuindo assim a atração de leucócitos.

### 1.1.3 Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)

Polimorfismo de nucleotídeo único ou SNP, do inglês *Single nucleotide polymorphisms*, são polimorfismos de DNA onde somente uma base é alterada em uma frequência mínima de 1% em uma dada população (Brookes, 1999). Atualmente, mais de 7 milhões de SNPs já foram identificados no genoma humano (fonte: dbSNP, build 127 – 08/08/07).

Os SNP estão dispersos por todo o genoma humano podendo ocorrer tanto em regiões codificadoras como não codificadoras. SNP que ocorrem em regiões codificadoras podem ser denominados sinônimo ou não sinônimo (SNPs) este último ocorre quando há substituição de um aminoácido na seqüência protéica podendo haver modificações estruturais e funcionais na proteína e portanto tem um maior potencial de reflexo biológico. Entretanto, a maior parte dos SNP identificados em genes humanos não resulta em alterações na seqüência protéica, graças à sua localização em regiões não traduzidas da molécula de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) ou devido à redundância dos códons na codificação de aminoácidos. Estima-se que apenas 20% a 30% destes SNPs acarretem danos na função da proteína. Apenas uma pequena parcela de SNP classificados como sinônimos podem modificar a estrutura e estabilidade do RNA mensageiro e afetar a quantidade de proteína produzida (Chasman, Adams, 2001).

A identificação dos SNP pode ser empregada em diversas áreas. Na grande maioria das vezes é utilizada como marcador de patologias, dentre elas

o câncer (Cargill et al., 1999). As alterações mais freqüentes no DNA são as que envolvem bases nitrogenadas de mesma característica estrutural, ou seja, trocas entre duas purinas (A/G ou G/A) ou duas pirimidinas (C/T ou T/C) que são denominadas transições. As transversões são substituições de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa (Kwok et al., 1999).

Outros tipos de polimorfismos são também de grande importância para a fisiologia da célula. Alguns exemplos são os SNP localizados em regiões promotoras que podem alterar a expressão do gene, polimorfismos localizados em sítios de splicing que podem resultar na inserção ou exclusão ou modificação do tamanho de exons, podendo alterar a estabilidade do RNAm ou a própria proteína traduzida a partir desse RNAm, SNP que causam geração ou supressão de códons de terminação de tradução gerando proteínas com diferentes tamanhos, polimorfismos em regiões regulatórias existentes nas regiões 3' UTR ou SNP que causem adenilação alternativa ou alteração na estrutura e estabilidade do RNA.

### **1.1.3.1 Polimorfismos em MMP associados ao câncer**

Vários trabalhos já associaram SNP de MMP com neoplasias, Grieu et al. (2004) demonstraram uma relação entre os SNP -1306 C-->T presente na MMP2, e -1562C-->T presente na MMP9 e capacidade de invasão de células em câncer de mama. Matsumara et al. (2005) associaram o SNP -1562 C/T de MMP9 com fenótipo invasivo de câncer no estômago. Xu et al. (2004)

demonstraram haver associação entre o SNP -1306 C-->T no gene MMP2 e o desenvolvimento e invasão de câncer colo-retal. Zhang et al. (2005) demonstraram haver associação entre o SNP A-181G no gene MMP7 e desenvolvimento de câncer no esôfago, pulmão e estômago. Lai et al. (2005) demonstraram correlação entre o SNP 1607bp1G/2G no gene da MMP1 com fenótipo invasivo de carcinoma de colo uterino.

O polimorfismo Arg279Gln é uma troca de bases de G>A na posição 855 do RNAm (NM\_004994), alterando o códon cgg para cag conseqüentemente promovendo uma troca do aminoácido arginina (ou Arg, ou alelo G) para glutamina (ou Gln, ou alelo A) na posição 279 da proteína. Este polimorfismo na MMP9 está localizado no domínio catalítico da enzima, inserido em uma região envolvida na ligação da enzima com o seu substrato. Esta alteração promove a troca de um aminoácido carregado positivamente (arginina) por um aminoácido não carregado (glutamina), em uma região possivelmente associada à ligação do inibidor de MMP (TIMP) (Zhang et al., 1999). Este SNP já foi estudado por Hu et al. (2005), que concluíram haver uma relação do mesmo com desenvolvimento de metástases em câncer de pulmão, e por Awakura et al. (2006) que demonstraram uma associação do polimorfismo com maior grau histológico em carcinoma de células renais.

O SNP 1607bp 1G/2G está localizado no começo do sítio de transcrição do gene da MMP1 cujo alelo 2G cria um sítio de ligação para o fator de transcrição Ets, resultando em uma alta atividade transcricional no estado basal ou em resposta a um estímulo extracelular (Rutter et al., 1998). Vários trabalhos

têm associado este SNP com desenvolvimento e rápida progressão do carcinoma de ovário (Kanamori et al., 1999) e com processos de crescimento e metastatização do carcinoma colo-retal (Ghilardi et al., 2001).

O SNP 1306 C/T localizado na região promotora do gene da MMP2, rompe o sítio promotor tipo SP1, baixando a atividade promotora do alelo T (Price et al., 2001). O genótipo CC já foi associado ao risco de desenvolvimento do câncer de pulmão (Yu et al., 2002) e adenocarcinoma gástrico (Miao et al., 2003).

O SNP A-181-G localizado na região promotora do gene da MMP7 pode levar a um aumento na expressão deste gene promovendo o desenvolvimento de alguns tumores (Ghilardi et al., 2003), como pulmão (Lin et al., 2004) e ovário (Wang et al., 2004).

A capacidade de identificar polimorfismos em genes humanos e associá-los a diferentes graus de suscetibilidade ou evolução das principais doenças humanas pode representar um dos maiores progressos da pesquisa biológica recente. Trabalhos desta natureza, feitos com amostras de DNA associadas a bancos de dados complexos e completos, analisados com abordagem estatística adequada, podem revelar marcadores moleculares relevantes em relação à evolução clínica de várias doenças, assim como a previsão de resposta a diferentes tratamentos, ou seja, uma arma que possibilita um diagnóstico e tratamento personalizado, baseado na nossa individualidade genética. Neste trabalho serão estudados SNP dos genes das MMP 1, 2, 7 e 9 e sua relação com a predisposição e comportamento do câncer de próstata.

## **2. Objetivos**



**Objetivos:**

1. Identificar polimorfismos das metaloproteinases 1, 2, 7 e 9 e associá-los à predisposição ao desenvolvimento do câncer de próstata
2. Associar os polimorfismos das metaloproteinases 1, 2, 7 e 9 aos parâmetros prognósticos clássicos do carcinoma de próstata

## **3. Material e Métodos**

### 3.1 Pacientes

Amostras de sangue ou tecido parafinado normal, não tumoral, em geral o fragmento correspondente à margem vesical, sem representação de neoplasia, foram obtidas de 100 pacientes com câncer de próstata com média de idade igual a  $65 \pm 7$  anos, submetidos à prostatectomia radical no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo ou no Hospital Sírio Libanês de São Paulo entre 1993 e 2006 pela equipe do Prof. Dr. Miguel Srougi. O espécime cirúrgico foi fixado em formalina tamponada a 10% de 4 a 12 horas, processado na sua totalidade para avaliação dos fatores prognósticos clássicos.

O grau histológico de Gleason e o estadiamento patológico foram analisados para correlação com os resultados de polimorfismos das MMP. Os fatores prognósticos abordados neste trabalho foram estadiamento patológico, onde os tumores foram subdivididos em pT2 (tumor confinado a próstata) e pT3 (tumor não confinado a próstata) e grau histológico de Gleason, onde os tumores foram subdivididos em tumores de baixo grau (escore de Gleason  $\leq 6$ ), e tumores de alto grau (escore de Gleason  $\geq 7$ ).

O grupo controle constituiu-se de amostras de sangue obtidas de 100 indivíduos que apresentavam PSA baixo, menor que 2,5 ng/ml, com exame de toque retal normal, e sem antecedentes familiares de CaP, com média de idade  $54 \pm 7$  anos.

Tanto o grupo de casos como o grupo controle, procedem de centros de referência no tratamento do câncer urológico no Brasil.

De acordo com a tabela 1 observa-se que os dois grupos mostraram-se homogêneos em termos de raça ( $p=0,213$ ), entretanto o grupo câncer apresentou média de idade maior do que a apresentada pelo grupo controle ( $p<0,001$ ) sendo essa diferença estimada em  $8 \pm 1$  ano. Também foi observado que o grupo câncer apresentou mediana de PSA estatisticamente maior do que a apresentada pelo grupo controle ( $p<0,001$ ).

Entre os pacientes com câncer, pode-se observar que em 81% dos casos os tumores foram de baixo grau (escore de Gleason  $\leq 6$ ). Em 74% dos casos os tumores encontravam-se confinados a próstata (estádio pT2).

**Tabela 1.** Dados clínico-demográficos de acordo com grupo.

	Grupos		p
	Câncer	Controle	
<b>Idade</b> (anos)	$65 \pm 7$	$56 \pm 7$	$<0,001$
<b>Raça</b>			
Branco	86 (86%)	81 (81%)	0,213
Não Branco	14 (14%)	19 (19%)	
<b>PSA</b>			
Md (Q1 – Q3)	7,5 (4,9-10,3)	0,6 (0,5-0,8)	$< 0,001$
Mínimo – Máximo	1,6 - 120	0,04 - 1,10	

### **3.2 Ética**

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram codificadas, garantindo sua confidencialidade. Este projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisas do HCFMUSP, tendo sido aprovado na reunião de 23/11/2006 (protocolo nº 769/06).

### **3.3 Amplificação do segmento contendo o SNP**

O DNA genômico foi obtido utilizando protocolos convencionais de extração de ácidos nucléicos a partir de sangue e tecidos parafinados.

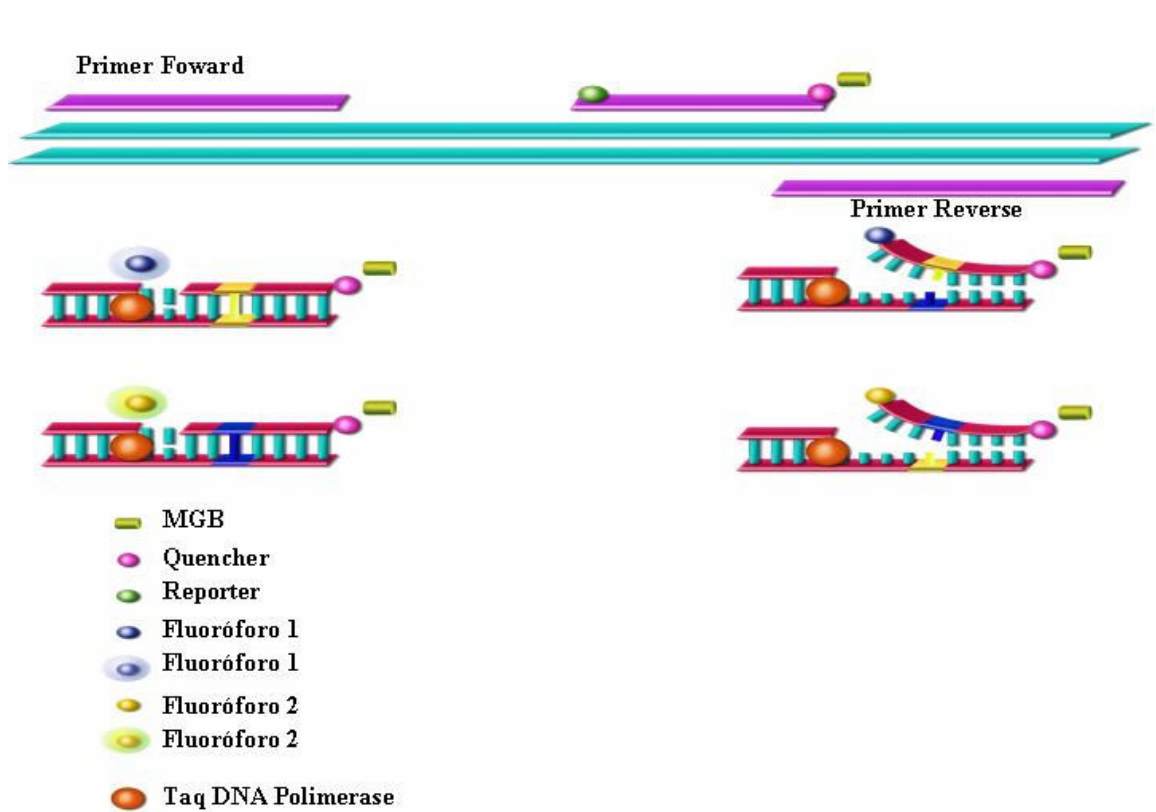
A extração do DNA dos blocos de parafina foi feita segundo Wright DK e Manos MM, (1990). Os blocos de parafina foram cortados em um micrótomo, aproximadamente dez fragmentos de 10 µm. Depois foram feitas três lavagens com xilol quente para retirada da parafina, nos intervalos destas lavagens as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5810R, Hamburgo, Alemanha) por 3 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente. Em seguida foram feitas duas lavagens com 500 µl de etanol absoluto, para retirada do xilol, centrifugando por 3 min a 13.000 rpm a 4°C. Para a digestão do tecido, adicionamos 30 µl de Proteinase K (20 ng/ml) e 470 µl de tampão para digestão, e as amostras foram incubadas a 37°C *overnight* em banho maria. No dia seguinte as amostras ficaram por 5 minutos a 100°C para inativação da Proteinase K. Foram feitas

então duas purificações com 500 µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), centrifugando por 2 minutos a 13.000 rpm e 4°C no intervalo das purificações. O sobrenadante foi retirado e adicionado em um novo microtubo estéril, onde foram adicionados 40 µl de acetato de sódio 3 M, pH 5.0, e 1 ml de etanol absoluto gelado. As amostras foram então invertidas delicadamente. Para precipitação eram deixadas no freezer por 30 minutos no mínimo. Após este período as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm e 4°C, decantadas e para a secagem foram deixadas à temperatura ambiente. A eluição foi feita com 50 µl de água Milli-Q autoclavada. Antes de serem usadas, as amostras foram quantificadas em um espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA).

As extrações do DNA do soro foram feitas utilizando Kit GFX (GE Healthcare, Reino Unido). O sangue total foi centrifugado (Eppendorf 5810R, Hamburgo, Alemanha) por 5 minutos a 3.000 rpm a temperatura ambiente, e o soro aliquoteado em microtubos de 1,5 ml. Para extração foram adicionados 100 µl de soro em um novo microtubo e 500 µl de solução de extração do Kit, que é uma solução tamponada contendo agente caotrópico e detergente, após 5 minutos esta solução era transferida para a coluna GFX e centrifugada a 7.300 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. A solução foi descartada e novamente foram adicionados 500 µl da solução de extração seguida de centrifugação a 7.300 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Novamente foi descartada a solução e foi adicionado 500 µl de uma solução de lavagem do

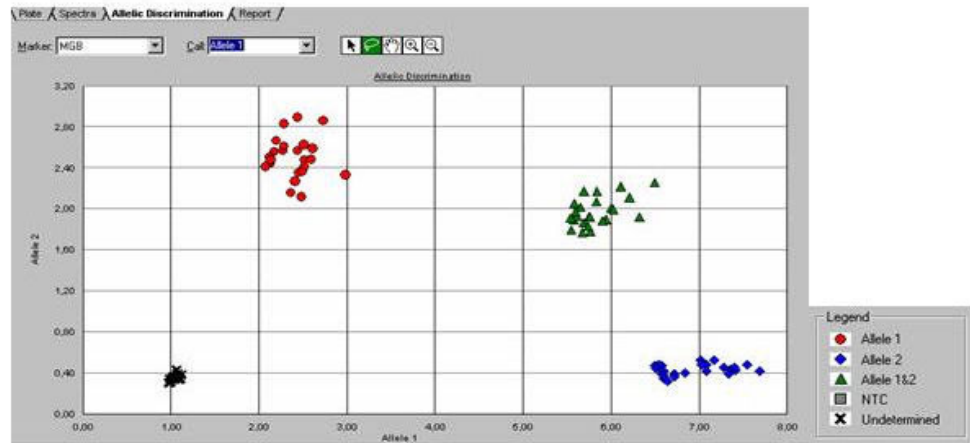
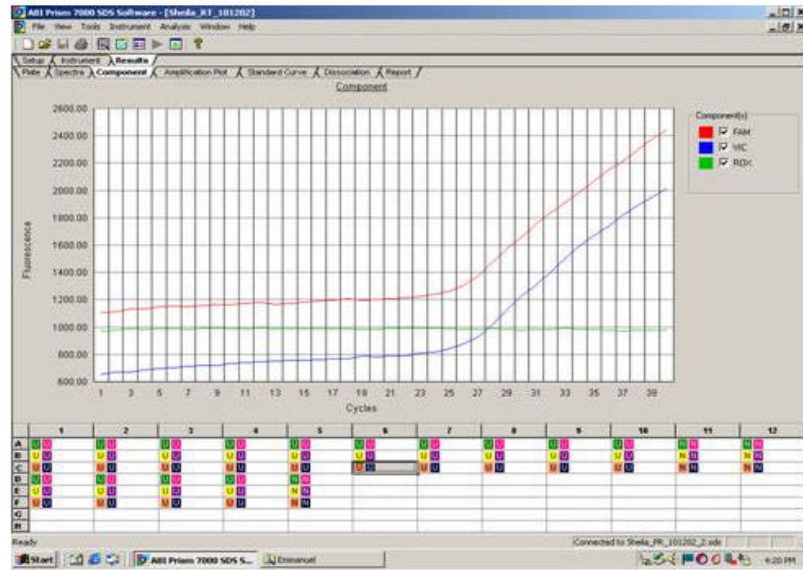
Kit, para obtenção de DNA puro, e centrifugados a 7.300 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Desta vez foi descartado todo o tubo e a coluna foi transferida para um novo microtubo sendo adicionada 50 µl de água pré-aquecida. Após 5 minutos os tubos foram centrifugados a 7.300 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Antes da amplificação as amostras foram também quantificadas em um espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA).

Utilizamos a técnica de identificação da base com uso de sondas marcadas com fluoróforos (Taqman®) (figura 9), amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise em tempo real (figura 10).



**Figura 9.** Sistema Taqman®: Identificação da base com uso de sondas marcadas com fluoróforos. Nesta abordagem além do primer foram desenhadas um par de sondas que se anelam sobre uma pequena seqüência de nucleotídeos que contém o polimorfismo, sendo cada uma específica para um dos alelos descritos (polimórfico e tipo selvagem). Em uma das extremidades de cada sonda está fixada uma molécula fluorescente (*dye reporter*), e na outra uma molécula não fluorescente, denominada *quencher*. Enquanto as sondas estão intactas, a interação entre os *dye reporters* e os *quenchers* impede que a fluorescência seja emitida. Durante a reação de PCR, a Taq DNA polimerase, por sua ação exonucleásica, quebra a sonda ligada ao fragmento, causando a liberação do *dye repórter* e a emissão de fluorescência.





**Figura 10.** Genotipagem Taqman® PCR em Tempo Real: O quadro superior representa resultado da genotipagem. As curvas azul e vermelha representam a amplificação de sinal de ambos os fluoróforos VIC e FAM, de acordo com o número de ciclos de PCR, caracterizando o genótipo de um heterozigoto. O quadro inferior representa um resultado geral para todos os indivíduos genotipados na ocasião. Pontos vermelhos representam homozigotos para alelo 1, verdes representam heterozigotos e azuis homozigotos para alelo 2.

Nessa abordagem foram desenhados oligonucleotídeos flanqueando a região polimórfica para amplificação dos produtos por PCR, além de duas sondas que se anelam sobre uma pequena seqüência de nucleotídeos que contém o polimorfismo, sendo cada uma específica para um dos alelos descritos. Em uma das extremidades de cada sonda está fixada uma molécula fluorescente (*dye reporter*), e na outra uma molécula não fluorescente, denominada *quencher*.

Enquanto as sondas estão intactas, a interação entre os *dye reporters* e os *quenchers* impede que a fluorescência seja emitida. Durante a reação de PCR, a Taq polimerase, por sua ação exonucleásica, quebra a sonda ligada ao fragmento, causando a liberação do *dye reporter* e a emissão de fluorescência. Como apenas a sonda específica para um determinado alelo é capaz de se ligar a ele, apenas a fluorescência emitida por ela será detectada. Como cada sonda é marcada com uma fluorescência diferente, através da leitura da fluorescência emitida é possível determinar o genótipo da amostra. É importante citar que além do *dye reporter* e da molécula *quencher*, uma molécula denominada MGB (*Minor Groove Binder*) também está afixada à sonda, tendo a função de elevar a sua temperatura de anelamento, permitindo uma ligação mais específica, e evitando que ela se ligue inespecificamente à seqüência correspondente ao outro alelo.

A detecção da fluorescência emitida na reação é feita por uma câmera CCD localizada no aparelho ABI7300 ou ABI7500 (Applied Biosystems), capaz de detectar diferentes comprimentos de onda e os genótipos são determinados

de acordo com o perfil de emissão das fluorescências ao final da reação de PCR. Os oligos e sondas foram preparados pela empresa Applied Biosystems.

Para amplificação dos fragmentos desejados utilizamos as seguintes condições de reação: 5 µl do master mix taqman (contendo a sonda marcada), 0,25 µl de primer (tabela 2), 3,75 µl de água destilada, deionizada e 1,0 µl de DNA, somando um total de 5 µl para cada reação. Para amplificação realizamos 40 ciclos de 95°C por 15" e 60°C por 1', precedidos por 2' a 50°C, e 10' a 95°C. O produto foi analisado por PCR em tempo real, que faz a discriminação alélica através da emissão de luz em um comprimento de onda característico.

**Tabela 2.** Seqüências de primers para amplificação e identificação dos SNP dos genes das metaloproteinases.

Gene	SNP	dbSNP	Primers 5' - 3'
MMP1	-1607 1G/2G	Rs 1799750	TGACTTTTAAAACATAGTCTATGTTCA TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTCATAGC
MMP2	-1306 C/T	Rs 243865	CTGACCCCCAGTCCTATCTGCC TGTTGGGAACGCCTGACTTCAG
MMP7	-181 A/G	Rs 11568818	TGGTACCATAATGTCCTGAATG TCGTTATTGGCAGGAAGCACACAATGAATT
MMP9	R279Q	Rs 17576	GAGAGATGGGATGAACTG GTGGTGGAAATGTGGTGT

### 3.4 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão para as variáveis quantitativas ou através da mediana, variação inter-quartil (Q1 – Q3) e valores de mínimo e máximo para as variáveis quantitativas que não se mostraram normalmente distribuídas. A comparação entre os grupos foi realizada através do teste t de Student ou Mann-Whitney.

As variáveis qualitativas foram representadas através do número e porcentagem e a comparação entre os grupos foi avaliada através do teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) ou Generalização do Teste Exato de Fisher nos casos em que uma ou mais células apresentaram valor esperado menor do que cinco.

Ainda na análise univariada foi avaliada a força de associação entre cada um dos polimorfismos e o grupo através do cálculo do *odds ratio* (OR) e seu respectivo intervalo de confiança a 95% (IC 95%).

Na análise multivariada foi utilizado um modelo de regressão logística não condicional sendo que as variáveis que compuseram tal modelo foram aquelas que, na análise univariada, apresentaram valor de p inferior a 20% ( $p < 0,20$ ). Após o ajuste inicial foram eliminadas uma a uma as que não apresentaram significância estatística ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada através do software SPSS 16.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). A Generalização do Teste Exato de Fisher foi realizada com o auxílio do software STATA 8.2 for Windows.

## **4. Resultados**

#### 4.1 Polimorfismos de MMP e predisposição ao câncer de próstata

A Tabela 3 apresenta a distribuição do DNA genômico de 100 pacientes com CaP e 100 indivíduos controles normais de acordo com os polimorfismos nos genes das MMP 1, 2, 7 e 9, de onde se pode observar que houve associação estatisticamente significante entre os grupos e os genótipos dos genes das MMP1, MMP2 e MMP9 ( $p < 0,05$ ). Não foi observada associação estatisticamente significante entre o gene da MMP7 e a predisposição ao câncer de próstata ( $p = 0,251$ ).

Para o gene MMP1 verificou-se que a chance de um indivíduo ser do grupo câncer entre aqueles com genótipo 2G/2G foi, aproximadamente, 0,3 vezes a chance observada entre indivíduos com genótipo 1G/1G ( $p = 0,001$ ), ou seja, pacientes com genótipo 1G/1G têm, aproximadamente 4 vezes mais chance de ser do grupo câncer do que aqueles com genótipo 2G/2G. Não foi observada diferença estatisticamente significante na distribuição dos genótipos 1G/1G e 1G/2G no gene da MMP1 ( $p = 0,608$ ).

Para o gene MMP2 verificou-se que a chance de um indivíduo ser do grupo câncer entre aqueles com genótipo CT foi, aproximadamente, 2 vezes a chance observada entre indivíduos com genótipo CC ( $p = 0,015$ ). Não foi observada diferença estatisticamente significante quando comparadas as distribuições dos genótipos CC e TT do gene da MMP2 ( $p = 0,335$ ).

Para o gene MMP9 verificou-se que a chance de um indivíduo ser do grupo câncer entre aqueles com genótipo GG foi 140 vezes a chance

observada entre indivíduos com genótipo AA ( $p < 0,001$ ). Apesar da grande significância estatística é importante ressaltar que devido à baixa frequência de pacientes com genótipo AA entre pacientes do grupo câncer os intervalos de confiança dos *odds ratio* apresentaram uma alta variabilidade. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos AA e AG no gene da MMP9 ( $p = 0,438$ ).

Conforme já foi observado anteriormente, a idade foi diferente nos dois grupos (tabela 1). Com o objetivo de verificar se essa diferença poderia modificar as significâncias estatísticas descritas acima, os valores dos *odds ratio* foram recalculados ajustando-se pela idade. Com base nesse ajuste pode-se verificar que não houve alteração das associações descritas acima conforme mostram os dados da tabela 3.

**Tabela 3.** Distribuição dos genótipos dos genes das MMP1, 2 7 e 9, entre pacientes com CaP e grupo controle.

	Grupos		OR [IC95%]	OR <sub>aj</sub> ** [IC95%]	p
	Câncer (n=100)	Controle (n=100)			
<b>MMP1</b>					
1G/1G*	21 (66%)	11 (34%)	1,00	1,00	
2G/2G	27 (33%)	55 (67%)	0,26 [0,11-0,61]	0,19 [0,07-0,53]	< 0,001
1G/2G	52 (61%)	34 (39%)	0,80 [0,34-1,87]	0,54 [0,20-1,47]	
<b>MMP2</b>					
CC*	50 (46%)	59 (54%)	1,00	1,00	
TT	12 (36%)	21 (64%)	0,67 [0,30-1,51]	0,69 [0,26-1,78]	0,012
CT	38 (66%)	20 (34%)	2,24 [1,16-4,34]	2,12 [0,99-4,56]	
<b>MMP7</b>					
AA*	33 (57%)	25 (43%)	1,00	1,00	
GG	26 (42%)	36 (58%)	0,55 [0,27-1,13]	0,50 [0,21-1,17]	0,251
AG	41 (51%)	39 (49%)	0,80 [0,40-1,57]	0,80 [0,36-1,77]	
<b>MMP9</b>					
AA*	1 (17%)	5 (83%)	1,00	1,00	
GG	56 (97%)	2 (3%)	140,0 [10,7-1827,0]	90,6 [5,9-1400,4]	< 0,001
AG	43 (32%)	93 (68%)	2,31 [0,26-20395,0]	1,3 [0,1-13,9]	

\* Homozigoto Selvagem

\*\* OR<sub>aj</sub> – Odds Ratio ajustado por idade



Com o objetivo de avaliar quais fatores mostravam-se independentemente associados aos dois grupos estudados foi realizado um ajuste multivariado através do modelo de regressão logística não condicional. As variáveis que compuseram tal modelo foi Idade, MMP1, MMP2 e MMP9. Através desse ajuste verificou-se que MMP1 não se mostrou independentemente associada a nenhum dos grupos na presença das demais variáveis (p=0,253).

**Tabela 4.** Ajuste do modelo multivariado para o genótipo.

	<b>Odds ratio</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p-valor</b>
<b>Idade</b>	1,16	[1,10 ; 1,23]	<0,001
<b>MMP2</b>			
TT x CC	1,57	[0,53 ; 4,65]	
CT x CC	2,83	[1,10 ; 7,28]	0,096
<b>MMP9</b>			
GG x AA	81,71	[5,28 ; 1265,25]	
AG x AA	1,07	[0,10 ; 11,01]	<0,001

A tabela 4 apresenta o resultado do modelo multivariado onde se pode observar que para o gene MMP2 verificou-se que a chance de um indivíduo ser do grupo câncer entre aqueles com genótipo CT foi, aproximadamente, 3 vezes a chance observada entre indivíduos com genótipo CC.

Para o gene da MMP9 verificou-se que a chance de um indivíduo ser do grupo câncer entre aqueles com genótipo GG foi, aproximadamente, 82 vezes a chance observada entre indivíduos com genótipo AA.

De acordo com a Tabela 5 pode-se observar que não houve associação estatisticamente significativa entre os alelos do gene da MMP2 e a predisposição ao desenvolvimento do CaP ( $p > 0,999$ ).

Para o gene da MMP7 observou-se associação marginalmente significativa entre os dois grupos ( $p = 0,057$ ), ou seja, apesar do alelo A ser mais freqüente entre o grupo câncer (55%) do que entre o grupo controle (45%), o teste estatístico não foi capaz de evidenciar tal diferença.

Para o gene da MMP1 verificou-se que a chance de um indivíduo ser do grupo câncer entre aqueles com alelo 2G foi, aproximadamente, 0,4 vezes a chance observada entre indivíduos com alelo 1G ( $p < 0,001$ ), ou seja, pacientes com alelo 1G têm, aproximadamente 2 vezes mais chance de ser do grupo câncer do que aqueles com alelo 2G.

Para o gene da MMP9 verificou-se que a chance de um indivíduo ser do grupo câncer entre aqueles com alelo G foi, aproximadamente, 4 vezes a chance observada entre indivíduos com alelo A ( $p < 0,001$ ). Portanto o alelo polimórfico representa uma chance 4 vezes maior no desenvolvimento de CaP comparado com os indivíduos que possuíam alelo selvagem.

**Tabela 5.** Distribuição dos alelos dos genes das MMP1, 2 7 e 9, entre pacientes e grupo controle.

	Grupos		OR [IC95%]	P
	Câncer (n=200)	Controle (n=200)		
<b>MMP1</b>				
1G*	94 (63%)	56 (37%)	1,00	< 0,001
2G	106 (42%)	144 (58%)	0,44 [0,29-0,66]	
<b>MMP2</b>				
C*	138 (50%)	138 (50%)	1,00	>0,999
T	62 (50%)	62 (50%)	1,00 [0,65-1,53]	
<b>MMP7</b>				
A*	108 (55%)	89 (45%)	1,00	0,057
G	92 (45%)	111 (55%)	0,68 [0,46-1,01]	
<b>MMP9</b>				
A*	45 (30%)	103 (70%)	1,00	<0,001
G	155 (62%)	97 (38%)	3,66 [2,37-5,64]	

\*Alelo Selvagem

Com o objetivo de avaliar quais genes mostravam-se independentemente associados aos dois grupos estudados foi realizado um ajuste multivariado através do modelo de regressão logística não condicional. As variáveis que compuseram tal modelo foram MMP1, MMP7 e MMP9. Através desse ajuste verificou-se que os três genes mostraram-se independentemente associados aos grupos na presença das demais variáveis ( $p < 0,05$ ).

A tabela 6 apresenta o resultado do modelo multivariado de onde se pode observar que nos genes das MMP1 e MMP7 indivíduos com os alelos 2G e G apresentam uma chance menor de desenvolverem CaP com relação a indivíduos com alelo 1G e A. Com relação ao gene da MMP9, demonstramos que indivíduos com o alelo G apresentam uma chance aumentada em 4 vezes de desenvolver CaP em relação a indivíduos com alelo A.

**Tabela 6.** Ajuste do modelo multivariado para alelo.

	Odds ratio	IC 95%	p-valor
<b>MMP1</b>			
2G x 1G	0,59	[0,37 ; 0,95]	0,030
<b>MMP7</b>			
G x A	0,37	[0,23 ; 0,59]	<0,001
<b>MMP9</b>			
G x A	4,34	[2,60 ; 7,24]	<0,001

## 4.2 Polimorfismos de MMP e prognóstico de câncer de próstata

### 4.2.1 Estádio Patológico

Inicialmente foi realizada a comparação de dados clínico-demográficos entre pacientes com doença órgão-confinada (pT2) e aqueles com doença localmente avançada (pT3) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Dados clínico-demográficos de acordo com estágio patológico.

	Estádio Patológico		
	pT3 (n=26)	pT2 (n=74)	p-valor
<b>Idade (anos)</b>	66 ± 6	65 ± 7	0,698
<b>Raça</b>			
Branca	18 (78,3%)	66 (90,4%)	
Não Branca	5 (21,7%)	7 (9,6%)	0,152
<b>PSA (ng/mL)</b>			
Mediana (Q1-Q3)	9,0 (7,5 – 15,4)	6,2 (4,5 – 9,3)	
Mínimo-Máximo	4,9 – 120,0	1,6 – 86,0	0,006
<b>Gleason</b>			
≤6	18 (69,2%)	63 (85,1%)	
≥7	8 (30,8%)	11 (14,9%)	0,088

De acordo com a Tabela 7 observa-se que a idade e a raça não se distribuí diferentemente entre os pacientes com estágio pT2 daqueles com estágio pT3 ( $p>0,05$ ). A mediana de PSA de pacientes com estágio pT3 foi estatisticamente maior do que a de pacientes com estágio pT2 ( $p=0,006$ ). Houve uma maior proporção de pacientes com escore de Gleason maior ou igual a 7 entre aqueles com estágio pT3, entretanto o teste estatístico não foi capaz de evidenciar diferença significativa ( $p=0,088$ ).

A tabela 8 apresenta a distribuição dos genótipos de acordo com o estágio patológico dos pacientes onde se pode observar que não houve nenhuma associação estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ). Para o polimorfismo no gene da MMP2 foi observada uma associação marginalmente significativa com estágio patológico ( $p=0,065$ ); estando os genótipos TT e CT relacionados a uma maior chance do indivíduo ser portador de tumor não-órgão confinado.

**Tabela 8.** Distribuição da freqüência dos genótipos dos genes das MMP1, 2, 7 e 9 em relação ao estágio patológico.

	Estádio Patológico		OR [IC95%]	P
	pT3 (n=26)	pT2 (n=74)		
<b>MMP1</b>				
1G/1G*	7 (33%)	14 (67%)	1,00	
2G/2G	4 (15%)	23 (85%)	0,35 [0,09-1,41]	0,278
1G/2G	15 (29%)	37 (71%)	0,81 [0,27-2,41]	
<b>MMP2</b>				
CC*	8 (16%)	42 (84%)	1,00	
TT	5 (42%)	7 (58%)	3,75 [0,95-14,8]	0,065
CT	13 (34%)	25 (66%)	2,73 [0,99-7,50]	
<b>MMP7</b>				
AA*	10 (30%)	23 (70%)	1,00	
GG	3 (11%)	23 (89%)	0,30 [0,07-1,23]	0,147
AG	13 (32%)	28 (68%)	1,07 [0,40-2,88]	
<b>MMP9</b>				
AA*	0	1 (100%)		
GG	12 (21%)	44 (79%)	Não estimável	0,383
AG	14 (33%)	29 (67%)		

\* Homozigoto Selvagem

Com o objetivo de avaliar quais variáveis poderiam mostrar-se independentemente associadas ao estágio patológico foi ajustado um modelo

multivariado com as variáveis que apresentaram p-valor inferior a 20%. Dessa forma foram selecionadas as variáveis raça, MMP2 e MMP7. Tanto o PSA como o escore de Gleason não foram selecionados para o ajuste multivariado porque eles estão diretamente relacionados com o estágio patológico. A Tabela 9 apresenta o ajuste multivariado de onde se pode observar que o gene da MMP7 não se mostrou associado ao estágio patológico quando ajustado por raça e na presença do gene da MMP2. Dessa forma foi feito um novo ajuste retirando-se o gene MMP7 do modelo e pode-se observar que nem a variável raça e nem o gene MMP2 apresentaram significância estatística nesse novo ajuste (p= 0,122 e p=0,099, respectivamente).

**Tabela 9.** Ajuste do modelo multivariado para estágio patológico.

	Odds ratio	IC 95%	p-valor
<b>Raça</b>			
Não Branco x Branco	3,75	[0,90 ; 15,66]	0,070
<b>MMP2</b>			
TT x CC	4,70	[0,98 ; 22,51]	0,099
CT x CC	2,48	[0,80 ; 7,72]	
<b>MMP7</b>			
GG x AA	0,25	[0,05 ; 1,17]	0,176
AG x AA	1,01	[0,31 ; 3,23]	



De acordo com a Tabela 10 nota-se que considerando o gene MMP2 observou-se que a chance de um indivíduo apresentar estágio patológico pT3 entre aqueles com alelo T foi, aproximadamente, 2 vezes a chance observada entre indivíduos com alelo C ( $p=0,026$ ). Considerando-se os alelos dos genes MMP1, MMP7 e MMP9 pode-se observar que não houve associação estatisticamente significativa entre os mesmos e o estágio patológico ( $p>0,05$ ).

**Tabela 10.** Distribuição dos alelos dos genes das MMP1, 2 7 e 9, em relação ao estágio patológico.

	Estádio Patológico		OR [IC95%]	p
	pT3 (n=52)	pT2 (n=148)		
<b>MMP1</b>				
1G*	29 (31%)	65 (69%)	1,00	0,189
2G	23 (22%)	83 (78%)	0,62 [0,33-1,17]	
<b>MMP2</b>				
C*	29 (21%)	109 (79%)	1,00	0,026
T	23 (37%)	39 (63%)	2,22 [1,15-4,28]	
<b>MMP7</b>				
A*	33 (31%)	74 (69%)	1,00	0,130
G	19 (20%)	74 (80%)	0,58 [0,30-1,10]	
<b>MMP9</b>				
A*	14 (31%)	31 (69%)	1,00	0,488
G	38 (25%)	117 (75%)	0,72 [0,35-1,49]	

\*Alelo Selvagem

#### 4.2.2 Escore de Gleason

Inicialmente foi realizada a comparação de dados clínico-demográficos entre pacientes com escore de Gleason maior ou igual a 7 versus aqueles com escore de Gleason menor ou igual a 6 (Tabela 11).

**Tabela 11.** Dados clínico-demográficos de acordo com escore de Gleason.

	Escore de Gleason		p-valor
	≥7 (n=19)	≤6 (n=81)	
<b>Idade</b> (anos)	64 ± 7	65 ± 7	0,458
<b>Raça</b>			
Branca	17 (89,5%)	67 (87,0%)	>0,999
Não Branca	2 (10,5%)	10 (13,0%)	
<b>PSA</b> (ng/mL)			
Mediana (Q1-Q3)	9,6 (5,7 – 18,2)	7,0 (4,9 – 10,0)	0,138
Mínimo-Máximo	3,8 – 120,0	1,6 – 86,0	

Os dois grupos mostraram-se homogêneos em termos dos dados clínico-demográficos ( $p>0,05$ ).

De acordo com a tabela 12 observou-se que não houve associação estatisticamente significativa entre escore de Gleason e os polimorfismos dos genes de MMP1, MMP2 e MMP7. Para o gene MMP9 observou-se associação

estatisticamente significativa entre o polimorfismo e o escore de Gleason ( $p=0,003$ ); os genótipos GG e AG foram mais freqüentes entre aqueles com escore de Gleason  $\leq 6$ , entretanto apesar do resultado significativo é importante ressaltar que foi observado apenas um único paciente com genótipo AA, não foi possível obter uma estimativa do *odds ratio* para esse genótipo.

Para o polimorfismo no gene da MMP2 observou-se mais uma vez um resultado marginalmente significativo ( $p=0,090$ ), mostrando uma tendência de associação entre o genótipo TT e o escore de Gleason  $\geq 7$ .

**Tabela 12.** Distribuição da frequência dos genótipos dos genes das MMP em relação ao Escore de Gleason.

	Escore de Gleason		OR [IC95%]	p
	≥7 (n=19)	≤6 (n=81)		
<b>MMP1</b>				
1G/1G*	3 (14%)	18 (86%)	1,00	
2G/2G	7 (26%)	20 (74%)	2,10 [0,47-9,36]	0,538
1G/2G	9 (17%)	43 (83%)	1,26 [0,30-5,18]	
<b>MMP2</b>				
CC*	7 (14%)	43 (86%)	1,00	
TT	5 (42%)	7 (58%)	4,39 [1,08-17,76]	0,090
CT	7 (18%)	31 (82%)	1,39 [0,44-4,36]	
<b>MMP7</b>				
AA*	7 (21%)	26 (79%)	1,00	
GG	5 (19%)	21 (81%)	0,88 [0,25-3,19]	0,903
AG	7 (17%)	34 (83%)	0,77 [0,24-2,45]	
<b>MMP9</b>				
AA*	1 (100%)	0		
GG	5 (9%)	51 (91%)	Não estimável	0,003
AG	13 (30%)	30 (70%)		

\* Homozigoto Selvagem

Neste caso não foi realizado o ajuste multivariado, pois apesar do gene MMP9 apresentar significância estatística a estimativa do odds ratio é não

estimável e dessa forma só restou o genótipo MMP2 com significância marginal para o escore de Gleason.

Expomos na tabela 13 que não houve associação estatisticamente significativa entre escore de Gleason e a distribuição dos alelos dos genes da MMP1 e MMP7 ( $p>0,05$ ). Foi observada associação estatisticamente significativa do escore de Gleason com os alelos dos genes MMP2 e MMP9 ( $p<0,05$ ). A chance de um indivíduo apresentar escore de Gleason  $\geq 7$  entre aqueles com alelo T do gene da MMP2 foi, aproximadamente, 2 vezes a chance observada entre indivíduos com alelo C, demonstrando mais uma vez a associação do alelo polimórfico com pior prognóstico (escore de Gleason  $\geq 7$ ). A chance de um indivíduo apresentar escore de Gleason  $\geq 7$  entre aqueles com alelo G do gene MMP9 foi, aproximadamente, 0,4 vezes a chance observada entre indivíduos com alelo A. Neste caso a presença do alelo polimórfico foi associada com tumores de melhor prognóstico (Gleason  $\leq 6$ ).

**Tabela 13.** Distribuição dos alelos dos genes das MMP1, 2 7 e 9, em relação ao Escore de Gleason.

	Escore de Gleason		OR	p
	≥7 (n=38)	≤6 (n=162)		
<b>MMP1</b>				
1G*	15 (16%)	79 (84%)	1,00	0,302
2G	23 (22%)	83 (78%)	1,46 [0,71-3,00]	
<b>MMP2</b>				
C*	21 (15%)	117 (85%)	1,00	0,042
T	17 (27%)	45 (73%)	2,10 [1,02-4,35]	
<b>MMP7</b>				
A*	21 (20%)	86 (80%)	1,00	0,809
G	17 (18%)	76 (82%)	0,92 [0,45-1,86]	
<b>MMP9</b>				
A*	15 (33%)	30 (67%)	1,00	0,005
G	23 (15%)	132 (85%)	0,35 [0,16-0,75]	

\*Alelo Selvagem

### **4.3 Frequência dos polimorfismos em MMP na população de homens brasileiros**

Devido a população avaliada ter origem hospitalar, relacionada a clínica de referência em urologia, pode-se questionar a validade das associações observadas. Assim, foi avaliada uma população masculina heterogênea, de base não hospitalar para termos comparativos.

Os mesmos polimorfismos avaliados anteriormente foram estudados nesses 147 indivíduos do sexo masculino e esses dados foram comparados ao grupo controle do estudo. Os resultados encontram-se na tabela 14. Os dois grupos mostraram-se homogêneos em termos dos polimorfismos nos genes da MMP2 e MMP7 ( $p > 0,05$ ). Para o polimorfismo no gene da MMP1 observou-se uma maior frequência do genótipo 2G/2G entre indivíduos do grupo controle enquanto que os outros dois genótipos foram mais frequentes entre indivíduos da população heterogênea.

Para o polimorfismo no gene da MMP9 observou-se uma diferença na distribuição do genótipo ( $p = 0,045$ ) havendo uma maior proporção de indivíduos da população heterogênea com genótipo AG enquanto no grupo controle a maior proporção foi do genótipo AA.



**Tabela 14.** Frequência dos genótipos dos polimorfismos nas MMP em nosso grupo controle comparado com uma população heterogênea de homens brasileiros.

	<b>Controle</b> (n=100)	<b>Freq. Brasil</b> (n=147)	<b>P</b>
<b>MMP1</b>			
1G/1G*	11 (28%)	29 (72%)	
2G/2G	55 (53%)	49 (47%)	0,003
1G/2G	34 (33%)	69 (67%)	
<b>MMP2</b>			
CC*	59 (41%)	85 (59%)	
TT	21 (52%)	19 (48%)	0,110
CT	20 (32%)	43 (68%)	
<b>MMP7</b>			
AA*	25 (36%)	44 (64%)	
GG	36 (51%)	35 (49%)	0,115
AG	39 (36%)	68 (64%)	
<b>MMP9</b>			
AA*	5 (83%)	1 (17%)	
GG	2 (67%)	1 (33%)	0,045
AG	93 (39%)	145 (61%)	

\*Homozigoto Selvagem

## **5. Discussão**

## 5. Discussão

Comparando indivíduos controle com pacientes com CaP, o alelo polimórfico 2G do gene da MMP1 foi mais freqüentes no grupo controle, este polimorfismo portanto pode estar associado com uma característica de proteção do indivíduo ao desenvolvimento desta neoplasia. Este polimorfismo é uma inserção de uma base nitrogenada Guanina na posição 1607 antes do códon de iniciação do gene MMP1 na região promotora, o que cria um sítio de ligação para o fator de transcrição Ets, podendo desta forma influenciar a expressão deste gene e diminuir o risco de desenvolvimento do CaP.

O alelo polimórfico A do gene da MMP9 foi mais freqüente no grupo de pacientes com câncer de próstata, estando associado com aumento no risco de desenvolvimento de CaP. Este polimorfismo está presente no éxon 6 do gene da MMP9, no seu domínio catalítico e causa a troca de um aminoácido carregado positivamente por um não carregado, o que interfere na ligação de inibidores de MMP como as TIMP, podendo estar relacionado a um aumento de sua expressão.

Naturalmente ocorrem polimorfismos de DNA ao longo do genoma humano, e vários polimorfismos derivados de inserções ou deleções de nucleotídeos, substituições, ou instabilidade de microssatélites são descritos em vários genes da família das MMP, influenciando suas características de expressão (Ye, 2000).

Atualmente existem mais de 20 MMP relatadas que podem ser categorizadas por seus substratos específicos, sendo que várias possuem polimorfismos funcionais que podem estar diretamente relacionados com o perfil de expressão destes genes, podendo servir como marcadores diagnósticos ou prognósticos de neoplasias (Zhou et. al., 2007; Hu et. al., 2005; Sfar et. al., 2007).

Outros trabalhos já associaram polimorfismos em MMP com o risco de desenvolvimento de neoplasias e estão resumidos na tabela 15. Woo et. al. (2007) associaram o SNP 1607 1G/2G da MMP1 com risco de desenvolvimento de câncer colo retal. Já Zinzindohoué et. al. (2004) associaram o alelo selvagem 1G do SNP 1607 1G/2G no gene da MMP1 conjuntamente com o alelo polimórfico 5A do SNP 1171 5A/6A no gene da MMP3 com maior risco de desenvolvimento de carcinoma de cabeça e pescoço. O genótipo CC do SNP 1306 C/T no gene da MMP2 foi associado com maior susceptibilidade ao desenvolvimento de carcinoma de nasofaringe (Zhou et. al., 2007). Zhang et al. (2005) demonstraram haver associação entre o SNP A181G no gene MMP7 e desenvolvimento de câncer no esôfago, pulmão e estômago. Hu et al. (2005) demonstraram que o polimorfismo R279Q no gene da MMP9 pode estar relacionado ao risco de desenvolvimento de câncer de pulmão, entretanto Woo et. al. (2007) não demonstraram associação deste mesmo polimorfismo como fator de risco para o desenvolvimento de câncer colo retal.

**Tabela 15.** Descrições de polimorfismos das MMP associados ao desenvolvimento de neoplasias

<b>Referência</b>	<b>MMP</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Neoplasia</b>
Woo et. al., 2007	MMP1	1607 1G/2G	Câncer colo retal
Zhou et. al., 2007	MMP2	1306 C/T	Carcinoma Nasofaríngeo
Zhang et. al., 2005	MMP7	181 A/G	Câncer de Esôfago Câncer de Pulmão Câncer de Estômago
Hu et. al., 2005	MMP9	R279Q	Câncer de Pulmão

O SNP 1562 C/T no gene da MMP9 já foi associado com risco de desenvolvimento de câncer colo retal (Woo et. al., 2007) e existe um único relato na literatura descrevendo a associação deste polimorfismo com o risco de desenvolvimento e progressão de CaP (Sfar et al., 2007). Em relação ao nosso estudo, este trabalho analisou o mesmo número de indivíduos, porém o polimorfismo estudado por eles é diferente do analisado por nós, devendo-se considerar ainda a população analisada que é de indivíduos tunisianos enquanto o nosso caracteriza a população miscigenada de brasileiros.

A frequência dos alelos do SNP 1607 1G/2G no gene da MMP1 e SNP 181 A/G no gene da MMP7 em nosso estudo foi semelhante àquela encontrada na

população africana. Enquanto a frequência dos alelos do SNP 1306 C/T no gene da MMP2 foi semelhante aos europeus. Já a frequência dos alelos do SNP R279Q da MMP9 em nossa população não foi similar a nenhuma outra população de acordo com o banco de dados do National Center for Biology information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Portanto a frequência dos genótipos do polimorfismo R279Q no gene da MMP9 no Brasil deve possuir uma caracterização particular que nos diferencia das outras populações.

A classificação étnica da população brasileira não tem correspondência com a carga genética individual. A grande taxa de miscigenação que ocorre há mais de 500 anos entre brancos, negros e índios resultou em uma falta de correlação entre os marcadores genéticos de etnia e a cor da pele (Clarizia et al., 2007).

Na Literatura existem poucos trabalhos de SNP em MMP na população Brasileira, portanto dados sobre a frequência destes polimorfismos em nossa população são escassos, destacando assim o ineditismo de nosso trabalho. Preocupados em estarmos avaliando uma população de natureza hospitalar, relacionadas a clínica de urologia, genotipamos 147 homens que denominamos “normais”, fora da área hospitalar para estabelecer a frequência destes polimorfismos na população de homens brasileiros e comparamos com o resultado de nosso grupo controle. Nós encontramos diferenças estatísticas significante apenas na distribuição dos genótipos do gene da MMP1, nos genes das MMP2, MMP7 e MMP9 as diferenças entre as frequências dos genótipos foram semelhantes mostrando que nossa população controle está em equilíbrio

com a população brasileira, não havendo viés neste achado que possa comprometer nossas conclusões (Tabela 14).

Quando avaliamos a associação destes mesmos polimorfismos com potencial biológico de CaP, estadiamento clínico e escore de Gleason, encontramos uma maior frequência dos genótipos e alelos polimórficos em pacientes que apresentavam estadiamento desfavorável para o comportamento do tumor no gene da MMP2, sugerindo assim que este polimorfismo pode estar associado a características de progressão da neoplasia. A diferença foi estatisticamente significativa quando comparamos a frequência alélica estando o alelo polimórfico da MMP2 presente em maior frequência em tumores pT3 ( $p=0.026$ ). De acordo com o escore de Gleason nós encontramos uma diferença estatística marginal, onde o alelo polimórfico T no gene da MMP2 foi mais frequente em tumores com Gleason  $\geq 7$  ( $p=0,066$ ) sugerindo assim a associação deste polimorfismo com tumores de pior prognóstico.

No Gene da MMP9 nós encontramos uma diferença estatisticamente significativa associando o genótipo ( $p=0,003$ ) e o alelo polimórfico ( $p=0,010$ ) com tumores de Gleason  $\leq 6$ , caracterizando assim tumores de baixo grau. Demonstramos assim que este polimorfismo está associado a tumores de melhor prognóstico.

MMP são metaloproteases importantes na remodelação de tecidos e estão envolvidas na reparação tissular, em processos inflamatórios e iniciação e progressão de tumores. MMPs podem alterar pontos de controle do ciclo

celular, promover instabilidade genômica, afetar a adesão celular (Tlsty, 1998) e contribuir para iniciação e progressão tumoral alterando o microambiente celular (Zhu et al., 2001). As MMPs como um grupo degradam, todos os componentes da ECM, que é uma formação dinâmica de proteínas estruturais, fatores de crescimento e enzimas latentes que afetam a interação entre as células e destas com a matriz, o que é extremamente importante para a invasão das células tumorais (Liotta et al., 1980). Além disso, estudos relacionam a atividade das MMP com o processo de angiogênese (Patterson, Sang, 1997).

Sabendo da importante participação destes genes no processo de carcinogênese, outros autores já associaram SNP em MMP com potencial biológico de neoplasias (Tabela16). O SNP 1607 1G/2G no gene da MMP1 já foi associado com pior prognóstico de carcinoma de cérvix uterina por Lai et al. (2004). Hu et al. demonstraram associação do polimorfismo R279Q no gene da MMP9 com potencial metastático de câncer de pulmão. Xu et al. (2004) demonstraram que o polimorfismo 1306 C – T do gene da MMP2 pode influenciar a habilidade de invasão de cacinoma colo-retal. Não existe na literatura nenhum trabalho associando o polimorfismo 181 A/G no gene da MMP7 com características metastáticas de tumores. Não existem na literatura relatos correlacionando os polimorfismos de MMP e os fatores prognósticos do CaP.



**Tabela 16.** Relatos da literatura associando polimorfismos das MMP e comportamento de neoplasias.

<b>Referência</b>	<b>MMP</b>	<b>polimorfismo</b>	<b>Comportamento do Tumor</b>
Lai et. al., 2004	MMP1	1607 1G/2G	Invasão do carcinoma de cérvix uterina
Xu et. al., 2004	MMP2	1306 C/T	Invasão do carcinoma Colo retal
Hu et. al., 2005	MMP9	R279Q	Metastatização de câncer de Pulmão

A expressão de MMP é baixa na maioria dos tecidos benignos, mas é substancialmente aumentada na maioria das neoplasias malignas humanas (Murray et al., 1998; Sier et al., 1996; Bramhall et al., 1997). A análise de tumores primários e metastáticos mostra um aumento relativo da expressão das MMP em sítios metastáticos, sugerindo seu papel na migração de células tumorais (Sutinen et al., 1998). Adicionalmente o aumento nos níveis de MMP é descrito no plasma e urina de pacientes portadores de uma variedade de neoplasias de alto grau (Zucker et al., 1999). Estudos em neoplasias mostram que o aumento na expressão das MMP está também relacionado com menor sobrevida de pacientes com câncer colo retal (Murray et. al., 1996).

No CaP, alteração de expressão de MMP foi descrita pela primeira vez usando hibridização in situ em 1991 (Pajouh et al., 1991). Um aumento na expressão das MMP foi relacionado à progressão do tumor por Boag et al

(1993) que mostraram um aumento nos níveis das MMP em carcinomas quando comparado com neoplasia intraepitelial prostática e hiperplasia prostática benigna.

Aumento na expressão da MMP7 foi associado com estágio patológico avançado e maior incidência de metástase (Hashimoto et al., 1998). Já Stearns et al. (1996) mostraram aumento da expressão de MMP2 associado a maior escore de Gleason.

Além disso, vários estudos avaliam a expressão de inibidores de MMP. TIMP são proteínas multifuncionais e os maiores reguladores endógenos destes genes. Inibem a tumorigênese e a invasão celular in vitro e o processo de metastatização in vivo (Gomez et al., 1997). Devido a este importante papel na invasão tumoral e metástase, a inibição de MMP tem sido investigada como um método de prevenção ou diminuição da invasão tumoral. Ensaios clínicos envolvendo batimastat (British Biotech) um potente inibidor de MMP 1, 2, 3 e 9, e marimastat (British Biotech) um inibidor de MMP sintético solúvel em água, foi associado com resposta clínica em carcinomas de origem pancreática, pulmonar, mamária e de ovário (Brown, Giavazzi, 1995). Em estudos pré-clínicos de CaP, efeitos anti-tumorais de inibidores de MMP (Doxiciclina e tetraciclina modificada quimicamente), tanto in vivo como in vitro, foram descritos (Lokeshwar, 1999).

Em publicação recente, Hong et al (2006) sugerem um efeito do curcumin sobre a invasão local e desenvolvimento de metástases em CaP, através da inibição de MMP2 e MMP9. Demonstraram a diminuição da expressão dessas

metaloproteinases em linhagens de células de CaP DU-145 quando expostas ao curcumin. Curcumin é o principal ingrediente extraído do rizoma da *Curcuma longa*, que possui efeito inibitório sobre o crescimento celular em linhagens tumorais in vivo e in vitro.

Concluimos então que o polimorfismo 1607 1G/2G no gene da MMP1 está associado a um menor risco de desenvolvimento de CaP, o polimorfismo R279Q no gene da MMP9 está associado com maior risco de desenvolvimento de CaP. Contraditoriamente este mesmo polimorfismo também se relaciona com tumores de baixo grau e o SNP 1306 C/T no gene da MMP2 está associado com tumores de pior prognóstico.

Estudos de associação, utilizando variantes genéticas, têm se mostrado ferramenta bastante útil para a compreensão dos processos de desenvolvimentos de doenças. Neste estudo nós investigamos a associação entre genótipos de polimorfismos funcionais nas MMP 1, 2, 7 e 9, e o risco de desenvolvimento e progressão de câncer de próstata.

Sabendo que níveis elevados de expressão e atividade de MMP estão associados à progressão e invasão de neoplasias nosso próximo projeto é avaliar a expressão dos genes MMP2, MMP9 além de inibidores e indutores de sua expressão, a fim de clarificar o seu papel no CaP.

## **6. Conclusões**

## **6. Conclusões**

1. Os polimorfismos 1607 1G/2G no gene da MMP1 e 1306 C/T no gene da MMP2 estão associados a um menor risco de desenvolvimento do CaP.
2. O polimorfismo R279Q no gene da MMP9 está associado a um aumento no risco de desenvolvimento de CaP.
3. O polimorfismo R279Q no gene da MMP9 está associado com tumores de baixo grau.
4. O polimorfismo 1306 C/T no gene da MMP2 está associado com tumores não-confinados e de alto grau.

## 7. Referências Bibliográficas

- Awakura Y., Nakamura F., Takahashi T., Kotani H., Mikami Y., Manabe T., Kamoto T., Habuchi T., Ogawa O. Matrix Metalloproteinase-9 and renal cell carcinoma in a Japanese population. *Cancer Lett* 20: 1-5, 2006
- Baker, A.H., Edwards D.R., Murphy G.: Metalloproteinase inhibitors: Biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Science* 115: 3719-27, 2002.
- 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* 58: 135-40, 2001
- Brew K., Dinakarpandian D., Nagase H.: Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477: 267-83, 2000
- Brookes, A.J.: The essence of SNPs. *Gene* 234: 177, 1999
- Cargill M., Altshuler D., Ireland J., Sklar P., Ardlie K., Patil N., Lane C.R., Lim E.P., Kalayanaraman N., Nemesh J., Ziaugra I., Friedland L., Rolfe A., Warrington J., Lipshutz R., Daley G.Q., Lander E.S.: Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22: 231-38, 1999
- Carter H.B., Pearson J.D.: Prostate-specific antigen testing for early diagnosis cancer: formulation of guidelines. *Urology* 54:780-6, 1999
- Catalona W.J., Smith D.S., Ratliff T.L. et al. Measurement of prostate specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med* 324: 1156-61, 1991
- Caterina J.J., Skobe Z., Shi J., Ding Y., Simmer J.P., Birkedal-Hansen H., Bartlett J.D.: Enamelysin (matrix metalloproteinase-20)- deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem* 277: 49598-604, 2002.

- Chambers A. F., Matrisian L.M.: Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89: 1260-70, 1997
- Chasman D., Adams R.M., Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms: structure-based assessment of amino acid variation. *J Mol Biol* 307: 683-706, 2001
- Clarizia AD, Bastos-Rodrigues L, Pena HB, Anacleto C, Rossi B, Soares FA, Lopes A, Rocha JC, Caballero O, Camargo A, Simpson AJ, Pena SD. Relationship of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism with microsatellite instability and promoter hypermethylation in sporadic colorectal cancer. *Genet Mol Res* 5: 315-22, 2007
- Crawford E.D. Epidemiology of prostate cancer. *Urology* 62: 3-12, 2003
- Coussens L.M., Fingleton B., Matrisian L.M.: Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295: 2387-92, 2002
- Curran, S., Murray, G.I.: Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *J Pathol* 189: 300-8, 1999
- Edwards, D.R., Murphy, G.: Cancer: Proteases - invasion and more. *Nature* 394: 527, 1998
- Egeblad M., Werb Z.: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161-74, 2002
- Epstein J.I., Allsbrook W.C. Jr. Amin M.B. et al. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 29: 1228-42, 2005
- Fong Y.C., Dutton C.M., Cha S.S., Garamszegi N., Sim F.H., Scully S.P.: Absence of a correlation between presence of single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase 1 promoter and outcome in patients of chondrosarcoma. *Clin Cancer Res* 10: 7329-34, 2004
- Franchi A., Santucci M., Masini E., Sardi I., Paglierani M., Gallo O.. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix

- metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer* 95: 1902-10, 2002
- Gann S.I., Hennekens C.H., Stampfer M.J.: A prospective evaluation of plasma prostate specific antigen for detection of prostate cancer. *JAMA* 273: 289-94, 1995
- Ghilardi G., Biondi M.L., Mangoni J., Leviti S., DeMonti M., Guagnellini E., et al. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasiveness. *Clin Cancer Res* 7: 2344–6, 2001
- Gleason D.F.: Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Hum Pathol* 23: 273-9, 1992
- Greene F.L., Page D., Morrow M., Balch C., Haller D., Fritz A., Fleming I., eds. *AJCC Cancer Staging Manual* 6th ed. New York: Springer; 2002
- Greenlee R.T., Hill-Harmon M.B., Murray T., Thun M.: Cancer Statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 51: 15, 2001
- Grieu F., Li W.Q., Iacopetta B.: Genetic polymorphism in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 88: 197-204, 2004
- Hu, Z., Huo, X., Lu, D., Qian, J., Zhou, J., Chen, Y., et al: Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. *Clin Cancer Res* 11: 5433, 2005
- INCA (Instituto Nacional do Câncer). Ministério da Saúde, Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Dados de 2006
- Kanamori Y., Matsushima M., Minaguchi T., Kobayashi K., Sagae S., Kudo R., et al. Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region. *Cancer Res* 59: 4225–7, 1999
- Kleiner, D.E., Stetler-Stevenson, W.G.: Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 43: S42, 1999



- Konish N., Hiasa Y., Hayashi I., Tao M., Matsuda H., Tsuzuki T., Kitahori Y., Shiraishi T., Yatani R., Shimazaki J., Lin J.C.: Intratumor cellular heterogeneity and alterations in ras oncogene and p53 tumor suppressor gene in human prostate carcinoma. *Am J Pathol* 147: 1112-22, 1995
- Kwok P.I., Gu Z.: Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them?. *Mol Med Today* 5: 538-43, 1999
- Lai H.C., Chu C.M., Lin Y.W., Chang C.C., Nieh S., Yu M.H., Chu T.Y.. Matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism as a prognostic predictor of invasive cervical cancer. *Gynecol Oncol* 96: 314-9, 2005
- Lauer-Fields J.L., Juska D., Fields G.B.: Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. *Biopolymers* 66:19-32, 2002
- Lee M.H., Murphy G.: Matrix metalloproteinases at a glance. *J Cell Science* 117: 4015, 2004
- Leite K.R., Srougi M., Kauffmann J.R., Bevilacqua R.G., Nesrallah L.J., Camara-Lopes L.H.: Well differentiated localized prostate carcinoma: prognostic relevance of tertiary Gleason pattern 4 and tumor volume. *Rev Assoc Med Bras* 51: 329-33, 2005
- Li y., Jin X., Kang S., Wang Y., Du H., Zhang J., Guo W., Wang N., Fang S.: Polymorphisms in the promoter regions of the matrix metalloproteinases-1, -3, -7, and -9 and the risk of epithelial ovarian cancer in china. *Gynecol oncol* 101: 92-6, 2005
- Li Y.J., Wei Z.M., Meng Y.X., Ji X.R.. Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis. *World J Gastroenterol* 11: 2117-23, 2005
- Lin T.S., Chiou, S.H., Wang, L.S., Huang, H.H., Chiang, S.F., Shih, A.Y., Chen, Y.L., Chen, C.Y., Hsu, C.P., Hsu, N.Y., Chou, M.C., Kuo, S.J. and Chow, K.C. Expression spectra of matrix metalloproteinases in metastatic non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 12: 717-23, 2004

- Liotta L.A., Tumor invasion and metastases – Role of extracellular matrix. *Cancer Res.* 46: 1-7, 1986
- Lynch C.C., Matrisian L.M., Matrix metalloproteinases: in tumor-host cell communication. *Differentiation* 70: 561-73, 2002
- 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* 131: 19-25, 2005
- McCawley L.J., Matrisian L.M.: Matrix metalloproteinases: They're not just for matrix anymore!: *Curr Opin Cell Biol* 13: 534-40, 2001
- Miao X., Yu C., Tan W., Xiong P., Liang G., Lu W., Lin D.: A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (\_1306C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma, *Cancer Res* 63: 3987–90, 2003
- Murray G.I., Duncan M.E., Oneil P., Melvin W.T., Forthergill J.E.. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med* 2: 461–2, 1996
- Murray G.I., Duncan M.E., Oneil P., Mckay J.A., Melvin W.T., Forthergill J.E. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. *J Pathol* 185: 256–61, 1998
- Nagase H., Woessner J.F.Jr.: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491-4, 1999
- Nelson W.G., De Marzo A.M., Isaacs W.B.: Prostate cancer. *NEJM* 349: 366-81, 2003
- Noe,V., Fingleton,B., Jacobs,K., Crawford,H.C., Vermeulen,S., Steelant,W., Bruyneel,E., Matrisian,L.M. and Mareel,M. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 114: 111–8, 2001

- O-Charoenrat P., Leksrisakul P., Saugruchi S.: A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 gene promoter is associated with susceptibility and aggressiveness of head and neck cancer. *Int J Cancer* 118: 2548-53, 2006
- Opdenakker G., Van Den Steen P.E., Van Damme J.: Gelatinase B: A tuner and amplifier of immune functions. *Trends immuno* 122: 571-9, 2001
- Perrer S.I., et al. *Cancer Statistics*, 1996. *Cancer J Clin* 46: 5-27, 1996
- Price S.J., Greaves D.R., Watkins H., Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J Biol Chem* 276: 7549–58, 2001
- Quantin,B., Murphy,G. and Breathnach,R.Pump-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry* 28: 5327–34, 1989
- Rutter J.L., Mitchell T.I., Buttice G., Meyers J., Gusella J.F., Ozelius L.J., et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res* 58: 5321– 5, 1998
- Schulman C.C., Ekane S., Zlotta R.A.: Nutrition and cancer prostate: Evidence or Suspicion? *Urology* 58: 318-34, 2001
- Seiki M.: Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS* 107:137-143, 1999
- Shou Y., Hirano T., Gong Y., et al.: Influence of angiogenetic factors and matrix metalloproteinases upon tumor progression in non-small-cell lung cancer. *Br J cancer* 85: 1706-12, 2001
- Stamenkovic I.: Extracellular matrix remodelling: The role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200: 448-64, 2003
- Steller-Stevenson W.G., Krutzsch H.C., Liota L.A.: Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 264: 17374-8, 1989

- Su L., Zhou W., Asomaning K., Lin X., Wain J.C., Lynch T.J., Liu G., Christiani D.C.: Genotypes and haplotypes of matrix metalloproteinase 1, 3 and 12 genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis* 27: 1024-29, 2005
- Tutton M.G., George M.L., Eccles S.A., Burton S., Swift R.I., Abulafi A.M.: Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumor expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 107: 541-50, 2003
- van Kempen L.C., Rhee J.S., Dehne K., Lee J., Edwards D.R., Coussens L.M.: Epithelial carcinogenesis: dynamic interplay between neoplastic cells and their microenvironment. *Differentiation* 70: 610-23, 2002
- Vlaminckx, K., Vakaet, L., JR Mareel, M., Fier, W., Van Roy, R.: Genetic Manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66: 108, 1991
- Xu E., Lai M., Lv B., Xing X., Huang Q., Xia X.: A Single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter is associated with colorectal cancer. *Biochem Biophys Commun* 324: 999-1003, 2004
- Wang, F.Q., So, J., Reierstad, S. and Fishman, D.A. Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int J Cancer* 114: 19–31, 2004
- Westmerck J., Kähäri V-M.: Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB* 13: 781-92, 1999
- Yu C., Pan K., Xing D., Liang G., Tan W., Zhang L, Lin D.: Correlation between a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer. *Cancer Res* 62: 6430–3, 2002
- Yu C., Zhou Y., Miao X., Xiong P., Tan W., Lin D.: Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res* 64: 7622-8, 2004
- Zhang B., Henney A., Eriksson P., Hamsten A., Watkins H., Ye S.: Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2 – 13.1. *Hum Genet* 105: 418-23, 1999

Zhang J., Jin X., Fang S., Wang R., Li Y., Wang N., Guo W., Wang Y., Wen D., Wei L., Dong Z., Kuang G. The functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-7 promoter increases susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma, gastric cardiac adenocarcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis* 26: 1748-53, 2005

Zinzindohoue F., Lecomte T., Ferraz J.M., Houllier A.M., Cugnene P.H., Berger A., Blons H., Laurent-Puig P.: Prognostic significance of MMP-1 and MMP-3 functional promoter polymorphisms in colorectal cancer. *Cin Cancer Res* 15: 594-9, 2005