

FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANATOMIA PATOLÓGICA

ADRIANA VIAL ROEHE

**Detecção de Polimorfismos na Região Promotora
dos Genes das Metaloproteinases 2 e 9 no
Carcinoma de Mama**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Patologia

Profa. Dra. Márcia S. Graudenz
Orientador

Prof. Dr. Antônio A. Hartmann
Orientador

Porto Alegre, março de 2006.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

R713d Roehe, Adriana Vial

Detecção de polimorfismos na região promotora dos genes das metaloproteinases 2 e 9 no carcinoma de mama / Adriana Vial Roehe; orient. Márcia S. Graudenz; Antonio A. Hartmann. Porto Alegre: FFFCMPA, 2006. 100 f. : il. : tab.

Tese (Doutorado) - Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica.
Área de concentração: Patologia.

1. Neoplasia mamária. 2. Metaloproteinases. 3. Polimorfismos. I. Graudenz, Márcia S. II. Hartmann, Antonio A. III. Título.

CDD 616.994 49

Ruth B. F. Oliveira
Bibliotecária. CRB10/501

Não existe vento favorável para o marinheiro que não sabe aonde ir.

Lucius Annaeus Sêneca

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Profa. Dra. Márcia Silveira Graudenz e Prof. Dr. Antônio Atalábio Hartmann.

Ao Prof. Dr. Cláudio Osmar Pereira Alexandre, Pró-Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação da FFFCMPA e chefe do Laboratório de Biologia Molecular do Programa de Pós-Graduação em Patologia.

À Profa. Dra. Marilda da Cruz Fernandes, chefe do Laboratório de Patologia do Programa de Pós-Graduação em Patologia.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Micologia e Patologia do Hospital Santa Rita - Complexo Hospitalar Santa Casa.

Às pacientes e aos voluntários que participaram desta pesquisa.

A todos professores, colegas, estagiários, familiares e amigos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado, em especial:

Andrea Pires Souto Damin

Grasiela Agnes

Cláudia Bica

Rosalva Tereza Meurer

Teresinha Stein

Ivonice Santos

Cristiano André da Costa

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço e dedico esta tese à *Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon*, exemplo de postura ética, responsável e sensata diante da pesquisa.

Pelos ensinamentos, pela dedicação e perseverança incansáveis, pela paciência e por todo carinho e apoio, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	7
Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas	10
Resumo.....	11
Abstract	12
I. Introdução.....	13
II. Revisão Bibliográfica	14
II.1. Carcinoma da mama	14
II.1.1. Epidemiologia.....	14
II.1.2. Fatores de risco.....	15
II.1.3. Tipos histológicos.....	17
II.1.4. Fatores prognósticos e preditivos	17
II.2. Metaloproteínas.....	22
II.2.1. Estrutura e função	22
II.2.2. Expressão, produção e ativação/inibição	23
II.2.3. Regulação da atividade das metaloproteínas.....	25
II.2.4. Metaloproteínas e as doenças.....	29
II.3. Gelatinases e câncer de mama.....	31
II.4. Polimorfismos da região promotora das metaloproteínas	33
III. Justificativa	38
IV. Objetivos.....	39
IV.1. Objetivo geral.....	39
IV.2. Objetivos específicos	39
V. Aspectos Éticos	40
VI. Referências Bibliográficas.....	41
VII. Artigo Científico.....	55
VII.1. Resumo	55
VII.2. Introdução	56
VII.3. Metodologia	57
VII.3.1. Amostra.....	57
VII.3.2. Análise Molecular.....	58
VII.3.3. Análise Estatística.....	59
VII.4. Resultados	59
VII.5. Discussão	61
VII.6. Referências Bibliográficas	63
VIII. Artigo Científico em Inglês	68
VIII.1. Abstract.....	68
VIII.2. Introduction.....	68
VIII.3. Methods	70
VIII.3.1. Subjects	70

VIII.3.2. Molecular Analysis	70
VIII.3.3. Statistical Analysis.....	72
VIII.4. Results.....	72
VIII.5. Discussion	73
VIII.6. References.....	75
Anexo A – Graduação histológica.....	80
Anexo B – Reações Imuno-histoquímicas	82
Anexo C – Análise Molecular	83
Anexo D – Análise Estatística.....	86
Anexo E – Tabelas.....	87
Anexo F – Termo de Consentimento.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ADAM	Adamalinas
AP	Activator protein
ARES	Adenyl-uridyl-rich elements
ATF	Activating transcription factor
C	Citosina
C/EBP	CCAAT enhancer binding protein
CHSCPA	Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre
CREB	cAMP response element-binding
EGF	Epithelial growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMMPRIN	Extracellular MMP Inducer
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
G	Guanina
HDA	Hiperplasia ductal atípica
IC	Intervalo de confiança
IMQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JNK	Jun N-terminal kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MB	Membrana basal
MEC	Matriz extracelular
MMP	Matrix Metalloproteinase
MT-MMP	Metaloproteinase transmembrana
NST	Tipo não especial (carcinoma ductal infiltrante)
OMS	Organização Mundial da Saúde

OR	Odds ratio
pb	Pares de base
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PEA-3	Polyomavirus enhancer activator-binding protein-3
RE	Receptor de estrógeno
RFLP	Restriction fragment length polymorphisms
RH	Receptor hormonal
RNAm	RNA mensageiro
RP	Receptor de progesterona
RS	Rio Grande do Sul
RT-PCR	Real time- Polymerase chain reaction
SAPK	Stress-activated protein kinase
SNP	Single nucleotide polymorphism
T	Timidina
TGF- β	Transforming growth factor β
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TRH	Terapia de reposição hormonal
U	Uracila
UTR	Untranslated region
VEGF	Vascular endothelial growth factor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regulação da Atividade das Metaloproteinases	30
Figura 2. Seqüenciamento de DNA da Região Promotora da <i>MMP2</i> (Senso).....	85
Figura 3. Gel de Agarose PCR-RFLP (<i>SphI</i>) da Região Promotora da <i>MMP9</i>	85
Figura 4. Seqüenciamento de DNA da Região Promotora da <i>MMP9</i> (Antisenso)	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das Metaloproteinases.	24
Tabela 2. Características demográficas da amostra.	87
Tabela 3. Genótipos e frequências alélicas.	87
Tabela 4. Genótipos e características fenotípicas das pacientes.....	88

RESUMO

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas responsáveis pela maior parte da degradação da matriz extracelular (MEC), sendo capazes de lisar todos seus componentes. Estão envolvidas em diversos processos patológicos, incluindo invasão tumoral e surgimento de metástases. Polimorfismos funcionais em um único nucleotídeo (SNPs) na região promotorada genes das MMPs 2 (C-1306T) e 9 (C-1562T) têm sido associados a alterações na atividade transcricional desses genes e ao risco de desenvolvimento de câncer. Neste estudo de casos e controles foi examinada a frequência destes SNPs numa população com alta incidência de câncer de mama. Foram analisadas 96 pacientes em acompanhamento no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA) e 100 mulheres hígdas, doadoras do Banco de Sangue da mesma instituição. Os genótipos observados para *MMP2* foram: 70% CC, 24% CT e 6% TT nas pacientes e 66% CC, 32% CT e 2% TT nos controles ($p=0,22$) e para *MMP9*: 80% CC, 20% CT e 0% TT nas pacientes e 83% CC, 15% CT e 2% TT nos controles ($p=0,23$). Os polimorfismos foram ainda correlacionados com características clinicopatológicas das pacientes, tais como: idade no momento do diagnóstico, menarca antes dos 11 anos, história familiar de câncer de mama, tipo e grau histológicos, invasão vascular, estadiamento (TNM) e reatividade imunohistoquímica (IMQ) para receptores de estrógeno (RE) e de progesterona (RP), p53 e c-erbB-2. Não foi observada associação estatística entre os SNPs e as características fenotípicas. Na presente amostra, os polimorfismos *MMP2* C-1306T e *MMP9* C-1562T não foram associados com risco de desenvolvimento de câncer de mama e nem com as características clinicopatológicas analisadas.

Palavras-chave: metaloproteinases, polimorfismos, carcinoma da mama

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in the control of the extracellular matrix (ECM) proteolytic balance. They are involved in tumor invasion and metastasis. Functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoters of *MMP2* (C-1306T) and *MMP9* (C-1562T) have been associated with abnormal transcriptional activity of these genes and with cancer risk development. In this study we examined the frequencies of these polymorphisms in a population with high incidence of breast cancer and compare them with patients' phenotypic features. The study sample was 96 women diagnosed of primary breast cancer, by histological exam of surgical specimen, and under oncological treatment at the Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA) and 100 control healthy women, blood donors at the same institution. *MMP2* genotype distribution was 70% CC, 24% CT and 6% TT for patients and 66% CC, 32% CT and 2% TT for controls ($p=0.22$). Concerning to *MMP9* the genotypes detected were 80% CC, 20% CT and 0% TT for patients and 83% CC, 15% CT and 2% TT for controls ($p=0.23$). No association was found between these polymorphisms and breast cancer occurrence. Comparing *MMP2* C-1306T and *MMP9* C-1562T with patients' age at diagnosis, menarche before 11 years old, familiar history, histological grade and type, vascular invasion, TNM stage, and immunohistochemical (IHC) reactivity for hormone receptors (ER; PR), p53 and c-erbB-2 no correlation was showed. We conclude that *MMP2* C-1306T and *MMP9* C-1562T SNPs were not associated with breast cancer risk development, neither with clinicopathological features in our population.

Keywords: matrix metalloproteinases, polymorphisms, breast cancer

I. INTRODUÇÃO

No Brasil, o câncer de mama é a neoplasia responsável pelo maior número de mortes entre as mulheres, sendo que, Porto Alegre é a primeira capital do país em casos incidentes da neoplasia. Assim, é intensa a pesquisa de possíveis fatores que possam contribuir para essas altas taxas de incidência e mortalidade.

Nos últimos 15 anos, foi ampliado o estudo das metaloproteinases da matriz: uma família de enzimas com atividade proteolítica sobre os componentes da matriz extracelular. Após a caracterização da estrutura e função destas enzimas, as pesquisas partiram para a análise do seu papel na gênese e progressão dos processos patológicos, concentrando-se nas doenças do tecido conjuntivo, arteriais e neoplásicas.

O presente estudo é focado na análise dos polimorfismos na região promotora dos genes das metaloproteinases 2 (C-1306T) e 9 (C-1562T) em casos de carcinoma de mama e em controles hígidos. São considerados aspectos como: detecção das frequências genotípicas e alélicas na amostra, associação com o risco de câncer e com as características clinicopatológicas das pacientes.

O texto constitui-se, inicialmente, de uma revisão bibliográfica. Esta aborda o carcinoma de mama, englobando epidemiologia, aspectos histopatológicos, fatores de risco, fatores prognósticos e preditivos. A seguir são caracterizadas as metaloproteinases, sua estrutura, função, mecanismos regulatórios e relação com as doenças. A porção final da revisão considera o estudo dos polimorfismos na região promotora dos genes das metaloproteinases 2 (C-1306T) e 9 (C-1562T) nos carcinomas, incluindo o câncer de mama. A revisão bibliográfica é seguida pelos objetivos e justificativa da pesquisa. Por fim é apresentado um artigo científico, no formato tradicional, onde estão expostos os resultados e a discussão do estudo.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. Carcinoma da mama

II.1.1. Epidemiologia

O câncer de mama é uma das principais causas de morte entre as mulheres. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas décadas de 60 e 70 registrou-se um aumento de 10 vezes nas taxas de incidência da doença nos diversos continentes. Dados de uma estimativa mundial de câncer, no ano de 2002 (1), apontavam para uma incidência, em mulheres, de 1.151.298 casos e de 410.712 mortes. No mesmo levantamento, a prevalência da doença, em 5 anos, foi de 4.406.080. No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres, sendo responsável no ano de 2002 por 9.004 registros de óbito. A última estimativa de incidência realizada pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) prevê o surgimento de 48.930 novos casos para o ano de 2006, o que corresponde a 51,66 casos a cada 100.000 mulheres (2). A mesma estimativa prevê 4.960 casos novos de carcinoma de mama para o Rio Grande do Sul (RS), sendo 1.140 na capital do estado (2). Essas taxas tornam Porto Alegre a primeira capital do país em casos incidentes da neoplasia, com uma taxa bruta de 146,83/ 100.000 habitantes (2).

O Ministério da Saúde constatou em 2003, uma tendência, no país, de aumento do número de mortes por câncer de mama, em mulheres abaixo de 49 anos (3). Conforme estatísticas da Secretaria Estadual da Saúde do RS, em 1999 o câncer de mama foi a principal causa de morte por neoplasia maligna em mulheres, tanto nas cidades do interior do estado, como em Porto Alegre (4).

Os carcinomas da mama são 200 vezes mais comuns nas mulheres do que nos homens. Podem ocorrer em qualquer idade, apresentando pico de incidência entre os 45 e 60 anos (5). As taxas de mortalidade vêm diminuindo, desde 1990, no oeste europeu, na Austrália e nas Américas, devido à melhoria dos métodos de diagnóstico e tratamento da

doença (6,7,8). No entanto, a frequência da doença vem aumentando, especialmente em mulheres mais jovens. Não se pode creditar este fato inteiramente ao aumento da incidência da neoplasia; deve-se considerar também o incremento dos programas de rastreamento e diagnóstico precoce (5).

II.1.2. Fatores de risco

Considerando a magnitude do câncer de mama em nosso meio, e o ônus que dele decorre, a identificação dos seus fatores de risco assume fundamental importância. Estes podem fornecer informações a respeito da etiologia da doença, além de ajudarem nas estratégias de prevenção. Ao longo dos anos, alguns fatores tiveram seu papel estabelecido na carcinogênese, enquanto outros ainda permanecem questionáveis. A análise dos fatores de risco deve ser cautelosa, uma vez que estes podem interagir, tornando a avaliação do risco, para cada paciente, desafiadora. São eles:

- **idade:** o risco de desenvolver a neoplasia aumenta proporcionalmente à idade. Setenta e sete por cento dos casos ocorrem após os 50 anos (6,9,10,11);
- **história familiar:** a presença de parentes em primeiro grau com carcinoma mamário aumenta o risco em 2 ou 3 vezes em relação à população em geral. Em especial, se a neoplasia ocorrer bilateralmente e em mulheres jovens (10,12). Convém ressaltar, no entanto, que a grande maioria dos casos de carcinoma se apresenta em mulheres sem história familiar positiva. Somente 5,5% e 13% das pacientes com, respectivamente, um e dois parentes em primeiro grau afetados irão desenvolver a neoplasia (10,12);
- **menarca precoce** (≤ 11 anos), **menopausa tardia** (após 54 anos): estão associadas ao aumento do risco relativo em 3 e 2 vezes, respectivamente (6,10,13);
- **idade da primeira gestação:** mulheres que tiveram a primeira gestação a termo antes dos 18 anos apresentam menor risco do que as demais (11,13,15). Em relação à nuliparidade, esta parece ter o mesmo impacto sobre o risco, do que a primeira gestação a termo aos 30 anos ou após (13). O risco relativo aumenta cerca de 3 vezes, caso a primeira gestação ocorra após os 40 anos. O aborto, induzido ou espontâneo, não está associado à elevação do risco (6);
- **paridade:** o número de gestações a termo tem efeito protetor sobre o risco,

quando estas ocorrem até os 25 anos. Gestações após os 30 anos associam-se com aumento do risco de carcinoma da mama (13);

- **amamentação:** o aleitamento materno reduz o risco de desenvolvimento de carcinoma de mama (14);
- **uso de estrógenos exógenos:** o estrógeno exógeno é considerado carcinógeno humano pelo *National Toxicology Program*, estando associado principalmente com o carcinoma do tipo lobular (15). Em relação à terapia de reposição hormonal (TRH) ocorre incremento do risco em relação direta ao tempo de uso, acentuando-se após 5 anos de tratamento (16,17). No entanto, este decresce após o término da TRH, desaparecendo após 5 anos (17);
- **consumo de álcool:** a ingestão diária de bebidas alcoólicas associa-se a maior risco de câncer de mama (6,10,11);
- **hiperplasia ductal atípica (HDA):** existe grande controvérsia a respeito do potencial pré-neoplásico da HDA e do diagnóstico diferencial entre esta e o carcinoma *in situ*. Entretanto, a HDA parece estar associada ao aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma (18).
- **exposição à radiação ionizante:** provoca aumento do risco relativo em, aproximadamente 3 vezes, quando acontece durante o período de desenvolvimento da glândula mamária (6,11,19);
- **história pessoal de carcinoma da mama:** a ocorrência de carcinoma em uma mama aumenta de 4 a 5 vezes a chance de ter uma lesão contralateral (6,8). O diagnóstico de carcinoma na mama contralateral está associado a menores taxas de sobrevida livre de doença em 5 e 8 anos (20);
- **mutação nos genes *BRCA1* e *2*:** o carcinoma hereditário da mama corresponde a cerca de 5% dos casos. Dentre estes, 90% estão relacionados com mutações nos genes *BRCA1* e *2* (21). Algumas mutações ocorrem com maior frequência em determinadas populações, como a de judeus Ashkenazi. Estima-se que 2% desta população seja portadora de mutações nestes genes (10). A presença de mutação em um destes genes está associada a um risco de carcinoma estimado em 56% aos 70 anos (22). A média de idade no momento do diagnóstico nestes casos é cerca de 20 anos menor do que a média etária das mulheres com carcinomas esporádicos (11,15);

- **obesidade:** mulheres obesas pós-menopáusicas apresentam maior risco de carcinoma (23).

Parâmetros como índices antropométricos, ingestão de gorduras, frutas e verduras, atividade física, influência geográfica e raça ainda têm papel controverso como fatores de risco.

II.1.3. Tipos histológicos

Tradicionalmente o carcinoma da mama é dividido em duas grandes categorias histopatológicas: carcinoma *in situ* e carcinoma invasor. O carcinoma *in situ* distingue-se do invasor pela ausência de invasão do estroma através do rompimento da membrana basal (MB).

O carcinoma *in situ* pode ser do tipo ductal (papilar, comedo, sólido, cribriforme, micropapilar, cístico hipersecretor, *clinging*) ou lobular e apresenta freqüência em torno de 5 a 30%, dependente da utilização de mamografia para rastreamento (5,24,25). A taxa de cura das pacientes tratadas com mastectomia é de 98 a 100%. Ressecções parciais da mama mostram maiores taxas de recorrência (26). Isto aumenta o interesse em fatores que auxiliem na detecção de pacientes com maior risco de recorrência. A opção terapêutica deve considerar aspectos, como o Índice Prognóstico de Van Nuys, presença de multicentricidade e de microcalcificações difusas, dificuldade de determinação de margens cirúrgicas, entre outros (26,27).

O carcinoma invasor por muito tempo foi considerado como uma entidade única. Nas últimas décadas, no entanto, a caracterização de subtipos histopatológicos e a sua relação com o prognóstico têm sido cada vez mais valorizadas. O tipo mais freqüente é o chamado carcinoma ductal infiltrante, ou carcinoma ductal de tipo não especial (NST), que compreende 47 a 75% dos casos (5,15,29). Este é seguido pelo carcinoma lobular infiltrante, com incidência variando de 1 a 20% dos casos e pelas formas mais raras, como os carcinomas ductais de tipo especial (tubular, cribriforme, mucinoso, medular, papilar, apócrino, secretor, metaplásico), carcinomas mistos e outros (5,15,28,29).

II.1.4. Fatores prognósticos e preditivos

Acompanhando o incremento do diagnóstico precoce do câncer de mama, vêm as pesquisas sobre fatores prognósticos e preditivos. Define-se como fator prognóstico um

parâmetro mensurável no momento do diagnóstico, que se correlaciona com sobrevida total ou com tempo livre de doença. O fator prognóstico está relacionado à história natural da doença. Fator preditivo é definido como qualquer parâmetro mensurável relacionado à resposta terapêutica (30). Além da aferição dos fatores anatomopatológicos tradicionais (tamanho, grau e tipo histológico tumorais, envolvimento linfonodal, invasão vascular e avaliação estromal) cresce a investigação de fatores moleculares. Estes seriam capazes de ajudar, sobretudo, pacientes com doença potencialmente curável, baseada nos indícios tradicionais, que evoluem mal e que poderiam se beneficiar de terapêutica agressiva. Incluem-se neste grupo, pacientes em estágio inicial, que apresentam doença micrometastática (ainda não detectável) no momento do diagnóstico (30).

Variáveis como: presença de metástases à distância, comprometimento linfonodal axilar, tamanho do tumor e expressão imuno-histoquímica (IMQ) para receptores de estrógeno (RE) e de progesterona (RP) são consideradas fatores prognósticos independentes (30). Outros fatores incluem graduação e tipo histológicos, invasão vascular, características do estroma tumoral, idade, etnia, reatividade IMQ para c-erbB-2 e p53, marcadores de proliferação celular e perfil genético (5,6,11,15,10,31).

Fatores prognósticos e/ou preditivos para o carcinoma da mama:

- **Presença de metástases à distância:** o câncer de mama metastático é considerado incurável e está associado a menores taxas de sobrevida (32,33). Entretanto, o progresso no tratamento da doença e o desenvolvimento de novas drogas têm prolongado a sobrevida livre de doença (33,34) e até a sobrevida total das pacientes (32);
- **Comprometimento linfonodal:** é o fator prognóstico mais importante, na ausência de doença metastática à distância. Cerca de 40 a 50% dos casos apresentam comprometimento linfonodal no momento do diagnóstico (15). A sobrevida livre de doença em 10 anos é reduzida de 70% em pacientes sem metástases linfonodais para 25-30% nos casos positivos (31). Quanto maior o número de linfonodos envolvidos e, quanto mais distante do nível axilar, pior o prognóstico (31,35). Atualmente, a análise de linfonodo (s) sentinela é altamente preditiva do *status* linfonodal axilar (36). Entretanto, a detecção de micrometástases (focos de células tumorais, medindo até 0,2cm) (36), através de métodos IMQ ou moleculares têm relevância clínica incerta (15). A última edição do TNM - Classificação de Tumores Malignos classifica as mesmas

como pN0(i+) (37), ou seja, não são consideradas e nem tratadas como verdadeiras metástases;

- **Tamanho do tumor:** tem boa correlação com a incidência de metástases nodais e com a taxa de sobrevida (31,38,39). O tamanho tumoral é considerado fator prognóstico independente, tendo especial importância nas pacientes sem doença linfonodal axilar (29,31,40,41). O ponto de corte mais influente no prognóstico fica entre 1,0 a 2,0cm de diâmetro tumoral (28,30,31,40,41);
- **Tipo histológico:** em geral, os tipos ductais especiais costumam estar associados a melhores prognósticos, quando comparados com carcinoma ductal NST. Os subtipos tubular, medular e mucinoso puro relacionam-se com maiores taxas de sobrevida (29,30). Entre as características desfavoráveis está a presença de células em anel de sinete e o diagnóstico de carcinoma inflamatório. Este último associa-se à sobrevida média de 2,9 anos (42);
- **Grau:** é considerado importante fator prognóstico (31,39). O sistema de graduação histológica recomendado pela OMS e amplamente aceito por patologistas é o chamado Scarff-Bloom-Richardson. Publicado no ano de 1957, baseia-se principalmente em características arquiteturais e nucleares. Posteriormente, visando obter maior reprodutibilidade inter-observadores, o método foi aprimorado por Elston e Ellis (43) e passou a ser conhecido pela Modificação de Nottingham do sistema de Bloom-Richardson. Estabeleceram-se critérios mais objetivos, baseados no percentual de formação tubular, no pleomorfismo nuclear e no índice mitótico (anexo A). Para cada um destes parâmetros é determinado um escore de 1 a 3 pontos. A graduação final é dada pelo somatório dos pontos, do seguinte modo: 3-5 pontos = grau I; 6-7 pontos = grau II; 8-9 pontos = grau III. A classificação de Nottingham pode ser aplicada para qualquer carcinoma invasor, com exceção do medular (31), no entanto, muitos especialistas relutam em utilizá-la nos tipos histológicos ductais especiais e no carcinoma lobular;
- **Invasão angiolinfática:** a presença de células neoplásicas em espaços vasculares (linfáticos ou capilares sangüíneos) adjacentes ao tumor é preditiva de recidiva local e de menor sobrevida total (30,31). O comprometimento angiolinfático é fator de mau prognóstico e deve ser considerado, em especial,

nos pacientes com linfonodos negativos (30). Ainda, a detecção de invasão vascular, após a realização de quimioterapia neoadjuvante está relacionada com presença de metástases linfonodais (44);

- **Invasão da pele e mamilo:** estão associadas à sobrevida pobre. O acometimento de vasos linfáticos da derme, característicos do carcinoma inflamatório é particularmente vinculado a mau prognóstico (15,42);
- **Presença de necrose:** a presença de necrose está associada a parâmetros como tamanho e grau tumorais (45). Estudo recente demonstrou que a presença de necrose no exame anatomopatológico, após quimioterapia neoadjuvante é preditiva de resposta ao tratamento (44);
- **Estroma:** a presença de infiltrado inflamatório peritumoral está associada a características estromais, como: fibrose, necrose e elastose e parece, ainda, atuar negativamente sobre o prognóstico (45);
- **Densidade de microvasos:** o número de microvasos, nas áreas de intensa neovascularização, nos carcinomas invasores correlaciona-se com presença de metástases linfonodais e à distância (46);
- **Marcadores de proliferação celular:** a proliferação celular pode ser inferida através do índice mitótico, de reações IMQs (MIB1/Ki-67, ciclinas), ou pela determinação da fração de células na fase S do ciclo celular por citometria de fluxo. Devido a sua importância na determinação do prognóstico (10), o índice mitótico (anexo A) foi incorporado no sistema de graduação tumoral de Nottingham (31). A determinação da fração da fase S tem importância prognóstica em pacientes sem doença linfonodal. Quanto maior a fração, menor a sobrevida livre de doença e total (40);
- **Gestação:** carcinomas da mama diagnosticados durante a gestação ou lactação costumam ser mais agressivos, apresentam-se em estágio mais avançado e, geralmente, não expressam receptores hormonais (47);
- **Idade e raça:** em relação à idade no momento do diagnóstico, alguns autores encontraram associação entre prognóstico desfavorável e idade abaixo dos 35 anos (6,30,48). A avaliação do papel da raça no prognóstico é bem mais complexa. Segundo a maioria dos estudos, pacientes negras e hispânicas teriam menores taxas de sobrevida, comparadas com as de cor branca (30);

- **Receptores de estrógeno e de progesterona:** a expressão tumoral de receptores hormonais (RH) é considerada fator prognóstico e preditivo (30). Mulheres com RHs positivos têm taxas de sobrevida livre de doença discretamente maiores em 5 anos, do que as RH negativas, independentemente de tratamento adjuvante (30,49). Em contraste com a tênue influência prognóstica, a expressão de RHs é preditiva de resposta à terapêutica adjuvante com tamoxifen (6,11,30,31,49,50,51). A resposta à terapia hormonal é maior, quando os dois receptores são positivos; a taxa de resposta cai para cerca de metade, caso a neoplasia expresse somente um tipo de RH, sendo que o RE tem peso maior (49). Em relação ao tratamento adjuvante com tamoxifen, estudos demonstraram que a manutenção da droga por 5 anos, reduz o risco de recorrência e morte em 47% e 26%, respectivamente, e em 47% o risco de carcinoma na mama contralateral, em pacientes com RE positivo (30). A expressão de RE é ainda fator preditivo de resposta ao uso de inibidores da aromatase, em pacientes pós-menopáusicas, após a utilização de tamoxifen, ou caso este seja contra-indicado (52);
- **ERBB2:** é um proto-oncogene que codifica uma proteína transmembrana, com atividade tirosina-quinase análoga ao receptor do fator de crescimento epidérmico (53). Ele está amplificado ou superexpresso em 20 a 30% dos carcinomas da mama (30,54), estando associado a tumores agressivos e a maiores taxas de recorrência e mortalidade (30,31). É ótimo preditor de resposta ao tratamento com trastuzumab, especialmente na presença de metástases (54). O efeito pode ser potencializado, se o trastuzumab for administrado em conjunto com agentes citotóxicos (6,30,54,55). Em relação aos métodos de detecção, parece haver o seguinte consenso entre a IMQ e a hibridização *in situ* fluorescente (FISH): estes são equivalentes nos casos, onde a expressão IMQ é negativa (1+) ou fortemente positiva (3+). Entretanto, quando a expressão IMQ é classificada como moderada (2+), a técnica de FISH mostra-se mais fidedigna (56);
- **TP53:** classicamente a mutação deste gene supressor tumoral foi associada à redução de sobrevida (57). Entretanto, estudos subseqüentes, em pacientes com linfonodos negativos, não demonstraram associação segura entre reação IMQ positiva para p53 e prognóstico, sugerindo que esta não atuaria como um

fator prognóstico independente (39,58);

- **perfil genético:** a determinação do perfil de expressão gênica é promissora, podendo fornecer informações prognósticas e preditivas (6,7,30,59,60). Van de Vijver et al (2002) analisaram a expressão de 70 genes em 295 casos de carcinoma de mama, pela técnica de *microarray*, estabelecendo perfis genéticos de bom e mau prognóstico (59). Após 7,8 anos de tempo médio de seguimento, o perfil da expressão gênica mostrou-se altamente preditivo de desenvolvimento de metástases à distância em 5 anos, em pacientes abaixo dos 53 anos, com e sem doença linfonodal. Segundo os autores, a classificação em grupos de alto e baixo risco, de acordo com o perfil genético, poderá auxiliar na indicação de terapia adjuvante (59,60).

II.2. Metaloproteinasas

II.2.1. Estrutura e função

As metaloproteinasas pertencem a uma superfamília de endopeptidases zinco-dependentes, com função proteolítica, denominada metzincinas. Estas apresentam em comum, no domínio catalítico, três resíduos de histidina e uma metionina, formando uma estrutura denominada *met-turn* e garantindo a integridade estrutural do sítio ativo, onde se liga o íon zinco (61). As metzincinas abrangem, classicamente, quatro famílias:

- **astacinas:** cujo protótipo é a astacina, principal enzima colagenocítica do trato digestivo do lagostin;
- **serralisinas:** enzimas proteolíticas secretadas por bactérias dos gêneros *Serratia Spp*, *Pseudomonas Spp* e *Erwinia Spp*;
- **adamalisinas (ADAM):** enzimas extremamente agressivas, constituintes do veneno de cobras da família *Crotalidae*, que produzem hemorragia e necrose tecidual;
- **matricinas:** modernamente chamadas de metaloproteinasas da matriz (MMPs); são enzimas de vertebrados, envolvidas no remodelamento da matriz extracelular (MEC).

Alguns autores (62,63) ainda acrescentam duas subfamílias ao grupo das

metzincinas:

- **ADAMTS:** enzimas que processam precursores do colágeno e que apresentam estrutura semelhante à ADAM, porém contêm repetidos domínios trombospondina (TS);
- **inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs):** os principais inibidores teciduais endógenos das MMPs.

As MMPs são responsáveis pela maior parte da degradação da MEC, sendo capazes de lisar todos seus componentes. De acordo com sua estrutura e especificidade classificam-se em: colagenases, gelatinases, estromalinas, matrilisinas, MMPs ativadas por furinas, MMPs transmembrana (MT-MMP), MT-MMPs de tipo II, MT-MMPs com domínio GPI e outras MMPs (Tabela 1). Há, pelo menos, 24 MMPs identificadas. Exceto algumas MMPs ativadas por furinas, as demais são sintetizadas como pró-enzimas e secretadas de forma inativa, como pró-enzimas, com domínios N e C-terminal bloqueando o sítio de atividade. Um resíduo de cisteína, chamado de cisteína-*switch*, parece ser o responsável pela manutenção da forma pró-enzimática, pois mantém o íon zinco acoplado ao sítio catalítico, conservando a enzima em latência. A ativação enzimática só ocorre com a quebra da ligação cisteína-zinco (64,65,66,67,68,24).

As MMPs são compostas por multidomínios, com algumas variações entre os subgrupos, responsáveis pela especificidade de substratos. De modo geral, constituem-se de um peptídeo sinal, um pró-peptídeo, um domínio catalítico e um domínio hemopexina (67,69,70,71,72). Este último está ausente nas matrilisinas, as menores MMPs, e nas MT-MMPs de tipo II, que contêm ainda um domínio *Ig-like*. As MT-MMPs possuem um domínio transmembrana acoplado ao final da molécula. As gelatinases apresentam três repetições fibronectina-tipo II no domínio catalítico (70). As MMPs ativadas por furinas possuem um sítio de clivagem furina entre o pró-peptídeo e o domínio catalítico. Os domínios catalíticos das MMPs apresentam ainda, além do íon zinco, 2-3 íons cálcio, que atuam na estabilidade da molécula e na atividade enzimática (70).

II.2.2. Expressão, produção e ativação/inibição

As MMPs têm expressão dependente da necessidade de remodelamento tecidual (70,71,72), participando das etapas de proliferação celular, diferenciação, vascularização e migração celular através da MEC (73). Elas apresentam papel importante em processos

fisiológicos, como: implantação placentária, organogênese, crescimento e cicatrização, e ainda, em processos patológicos. Estes últimos incluem reações inflamatórias, doenças do tecido conjuntivo e aneurismáticas, ruptura de placas ateroscleróticas, invasão neoplásica, angiogênese e metastatização (70,71,72,73). Sua produção é rapidamente estimulada por agentes exógenos, que irão atuar na sua maioria, sobre a transcrição gênica (72,74), como citocinas (interleucinas, interferons), fatores de crescimento (EGF, TGF- β , PDGF, VEGF), componentes da MEC, organomercuriais, oxigênios reativos, estresse físico, radiação ultravioleta e transformação celular oncogênica (64,65,66,67,70,71,75). Entre os supressores das MMPs estão: retinóides, glicocorticóides, e, em especial, os TIMPs (70,76,77).

Tabela 1. Classificação das Metaloproteinases.

Colagenases
Colagenase 1 (MMP-1)
Colagenase 2 (MMP-8)
Colagenase 3 (MMP-13)
Gelatinases
Gelatinase A (MMP-2)
Gelatinase B (MMP-9)
Estromalisinas
Estromalisina 1 (MMP-3)
Estromalisina 2 (MMP-10)
Matrilisinas
Matrilisina 1 (MMP-7)
Matrilisina 2 (MMP-26)
MMPs ativadas por furinas
Estromalisina 3 (MMP-11)
Epilisina (MMP-28)
MMP-21
MMPs transmembrana
MT 1-MMP (MMP-14)
MT 2-MMP (MMP-15)
MT 3-MMP (MMP-16)
MT 5-MMP (MMP-24)
MMPs transmembrana de tipo II
MMP 23 A
MMP 23 B
MMPs transmembrana com domínio GPI
MT 4-MMP (MMP-17)
MT 6-MMP (MMP-25)
Outras MMPs
Metaloelastase (MMP-12)
MMP 19
Enamelisina (MMP-20)
MMP-27

A relação com a MEC, não somente por meio de fatores solúveis, mas através de interações célula-célula e célula-matriz é um ponto importante referente aos mecanismos de controle das MMPs. O antigo conceito de função da MEC como um simples tecido de

sustentação, foi substituído pela idéia de uma estrutura dinâmica, um reservatório de células e moléculas capazes de emitir sinais ativadores de rotas intracelulares (69,78,79). Peptídeos provenientes da proteólise de macromoléculas da MEC, como a elastina, a fibronectina e glicoproteínas do tecido conjuntivo, assim como derivados de membrana basal (lamininas e colágeno tipo IV), podem agir como estimuladores ou inibidores de MMPs, atuando sobre células tumorais, estromais e endoteliais (78). Entre as moléculas de adesão célula-célula e célula-matriz, receptores para caderinas e integrinas apresentam expressão variável durante a evolução tumoral e têm capacidade de transmitir sinais intracelulares, que poderão modular a expressão de MMPs (79,80). Células malignas também podem expressar moléculas reguladoras de MMPs. Um exemplo é a produção de MMPs 1, 2 e 3 por fibroblastos, via indutor extracelular de MMPs (EMMPRIN), uma glicoproteína transmembrana expressa na superfície de células neoplásicas (81).

II.2.3. Regulação da atividade das metaloproteinases

A regulação da atividade das metaloproteinases ocorre, basicamente, através de três mecanismos (68,71,72,75):

1. controle da expressão gênica, que é centrado em nível transcricional (68,71,75), mas pode sofrer modulação por alguns agentes que atuam sobre a estabilidade do RNA mensageiro (RNAm), via proteína-quinase p38 (82,83,84);
2. ativação das formas latentes, pró-enzimáticas;
3. inibição da forma ativa via TIMPs, proteínas análogas e α -2-macroglobulina (77).

Constituem exceções, referentes aos mecanismos regulatórios, a MMP-8, que não é secretada imediatamente após a síntese, permanecendo estocada nos grânulos intracelulares dos neutrófilos, onde é produzida (72); e as MMPs 2 e 11, que apresentam elementos distintos das demais MMPs na região promotora (71,75).

II.2.3.1. Transcrição gênica

A maioria dos genes das MMPs, após interação na superfície celular, com os agentes estimuladores, apresenta fosforilação dos seus fatores de transcrição, via proteínas com atividade quinase: MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) e serina/treonina quinases

(67,71). Pelo menos cinco rotas MAPK são conhecidas: a ERK1,2 ativada por agentes mitogênicos; e as vias JNK/SAPK, p38, ERK5 e ERK6 estimuladas principalmente por estresse e citocinas (71).

Os promotores das *MMPs* (excluindo as *MMPs* 2 e 11) apresentam várias seqüências reguladoras comuns (*cis*), nas quais se ligam os complexos proteicos que irão dar início à transcrição do gene. Os principais elementos, que se ligam às seqüências *cis* das *MMPs* são: *activator protein-1* (AP-1) e *polyomavirus enhancer activator-binding protein-3* (PEA-3).

A família AP-1 se liga à seqüência consenso 5'-TGAG/CTCA-3' (sítio de ligação AP-1), localizada na posição entre -65 e -79 pb (pares de base) do promotor (75), através de homo ou heterodímeros. Esses dímeros são compostos, principalmente, pelas famílias de proto-oncogenes Jun e Fos ou pelos *activating transcription factors* (ATFs) (85). A atividade do complexo AP-1 pode ser modulada pela variedade de heterodimerização, por proteínas-quinase e por co-fatores transcrpcionais (71,75,85). Estes elementos moduladores irão intervir na afinidade de ligação no sítio de ligação AP-1, resultando em diferentes efeitos biológicos.

Localizada proximalmente ao sítio de ligação AP-1, encontra-se a seqüência PEA-3, à qual se ligam fatores de transcrição da família dos oncogenes *ETS* (71,75). Tais fatores reconhecem a seqüência invariável 5'-GGA,A/T-3' (domínio-ETS), pela qual têm afinidade. As seqüências adjacentes ao domínio irão definir a especificidade de ligação de cada membro da família dos *ETS* (86,87). Além de atuarem diretamente como fatores de transcrição, os *ETS* funcionam como coativadores, formando complexos com a proteína AP-1 (86).

Embora, estruturalmente semelhantes, os promotores das *MMPs* apresentam algumas diferenças, em especial, referentes ao número e ao arranjo espacial dos sítios transativadores (75). O PEA-3 é a região mais variável. Porém, determinadas metaloproteinases possuem dois sítios AP-1 e sítios AP-2. Ou ainda, apresentam discreta alteração de bases na seqüência AP-1 sem, no entanto, comprometer sua função (75). Existem ainda outros elementos *cis*, como o CREB e o C/EBP, que apresentam maior variabilidade entre os genes das *MMPs* (75).

A região promotora da *MMP2*, assim como seus mecanismos de controle, divergem das demais *MMPs*. Elementos regulatórios *cis*, incluindo AP-1 e PEA-3 estão presentes no promotor; entretanto, seu potencial regulatório ainda não é totalmente compreendido. Estudo

feito em células de astroglioma revelou que deleções nestas regiões não afetavam a atividade promotora (88). Recentemente, Hong et al (2005) contrariaram a idéia anterior de refratariedade do promotor da *MMP2* ao sítio AP-1. Analisando células de melanoma humano, esses autores demonstraram, que a expressão gênica da *MMP2* pode ser mediada pela ativação, via proteínas-quinase, de um sítio AP-1 funcional (89). É consenso, na literatura, que a região promotora do gene da *MMP-2* não possui o TATA-box e nem um elemento iniciador (75,88). TATA-box é uma seqüência altamente conservada, situada a cerca de 30 pb à montante do sítio de início da transcrição, encontrada em genes eucarióticos rapidamente transcritos (90), como os das metaloproteinases. Alguns genes de eucariotos, contêm, ao invés do TATA-box, um elemento iniciador: uma seqüência consensual variável com função semelhante ao TATA-box (90). A presença dessas seqüências garante que a transcrição gênica tenha início num sítio bem definido no promotor. Na situação contrária, a transcrição poderá iniciar em qualquer ponto ao longo de uma extensa região, com 20 a 200 pb, gerando longos RNAs e resultando em uma baixa velocidade de transcrição. Genes com essa característica são chamados de genes de manutenção ou *housekeeping* (90). A maioria dos genes de manutenção apresenta um trecho rico em GC de 20 a 50 nucleotídeos, ou de seqüências relacionadas (GT- e CCACC-boxes), que é reconhecido pela família de fatores de transcrição Sp1 (89,90,91,92,93,94). É o que ocorre com o gene da *MMP-2* (75,88). Duas regiões são de fundamental importância para a expressão constitucional deste gene: o sítio de ligação Sp1 e a seqüência AP-2 (75,87). A esses elementos da região promotora, se ligam, respectivamente, os fatores de transcrição Sp1 e Sp3 e AP-2 (88,93). O resultado final desta interação é influenciado pela correlação entre as seqüências cis presentes no promotor. Os fatores AP-2 e Sp1 têm função estimuladora. O Sp3 pode ativar, ou inibir a transcrição, porém parece ter papel predominantemente repressor (88, 91,92,93).

II.2.3.2. A estabilidade do RNAm

Parte do controle pós-transcricional da expressão gênica é regulada pelos mecanismos de estabilização do RNAm. A degradação seletiva da molécula de RNAm, em diversos genes induzíveis, incluindo várias metaloproteinases, é modulada por seqüências ricas em adenina e uracila (AU-ricas ou elementos ricos em AU – AREs). Essas AREs estão localizadas nas regiões 3' não traduzidas (UTRs) do gene (82,84) e atuam no RNAm via proteína-quinase p38 MAPK (82,83).

II.2.3.3. Ativação das formas latentes

Considerando que a maioria das MMPs é secretada como zimogênio inativo, na forma de pró-peptídio, sua ativação ocorrerá no meio extracelular. O processo tem início com a quebra de uma região do pró-peptídio, que desestabiliza a ligação cisteína-zinco, no cisteína-*switch*, permitindo a interação de uma molécula de H₂O com o íon zinco. Esta é capaz de desencadear a clivagem, auto-catalítica, do restante do pró-peptídio (65,66,67,69).

As pró-enzimas podem ser ativadas por proteases endógenas (plasmina, calicreína, ativador do plasminogênio tipo uroquinase), por agentes alquilantes e oxidantes, mercuriais e por outras metaloproteinases (64,65,66,68,69).

As MMPs ativadas por furinas apresentam ativação intracelular, através do seu sítio de clivagem furina, localizado na porção final do pró-peptídio. As MT-MMPs e a MMP-27 parecem ter uma estrutura semelhante, possuindo ativação análoga (76).

II.2.3.3.1. Ativação da Pró-MMP-2

A MMP-2 possui ativação na superfície celular, mediada por MT-MMPs e pelo TIMP-2. Entre as MT-MMPs, a MT 4-MMP é a única que não participa do processo (76).

O mecanismo da ativação mais estudado é o formado pelo complexo MT1-MMP/TIMP-2/MMP-2. Inicialmente, o TIMP-2 liga-se, através do seu domínio N-terminal, à MT1-MMP (localizada na membrana celular), permanecendo com o domínio C-terminal livre. Estabelecido o complexo MT1-MMP/TIMP-2, esse servirá de receptor para o acoplamento do domínio hemopexina da pró-MMP-2 na porção C-terminal. O passo seguinte é clivagem da pró-MMP-2 por uma molécula de MT1-MMP livre (76,95).

O TIMP-2 apresenta, ainda, função reguladora da ativação da MMP-2, uma vez que níveis elevados de TIMP-2 podem saturar todas as moléculas livres de MT1-MMP, necessárias para a quebra do pró-peptídio de MMP-2. Assim, níveis baixos a moderados de TIMP-2 são ativadores, ao passo que, altas concentrações de TIMP-2 têm papel inibitório (67,76,95).

II.2.3.4. Inibidores teciduais das metaloproteinases

Existem quatro TIMPs isolados até o momento. Na sua maioria são proteínas secretadas, mas podem ser encontradas na superfície celular, associadas a MT-MMPs (77).

A transcrição dos *TIMPs* também é regulada por citocinas e fatores de crescimento (68). Os *TIMPs* são compostos por domínios N e C-terminal, cada um com três ligações dissulfeto (96). Todos eles possuem capacidade de inibir qualquer MMP, pois, através do domínio N-terminal se ligam ao sítio catalítico da MMP, formando um complexo estável e inativo (70,97). No entanto, os *TIMPs* diferem entre si em alguns aspectos, conferidos pelo domínio C-terminal, que caracterizam habilidades específicas (77,96). Eles podem atuar sobre o crescimento de diversos tipos celulares, apoptose, angiogênese e progressão tumoral. O *TIMP-1* induz à proliferação de precursores eritróides, mas não de fibroblastos, como o *TIMP-2* e nem de células musculares lisas, como o *TIMP-3*. O *TIMP-4* promove apoptose em fibroblastos cardíacos e, tal como o *TIMP-1*, pode estimular a metastatização (77). O *TIMP-2* participa ainda da ativação da pró-MMP-2, detalhada acima (96).

Além da inibição tecidual, via *TIMPs*, as MMPs podem ser inativadas, em menor grau, por moléculas com seqüências semelhantes ao domínio N-terminal dos *TIMPs* e ainda pela α -2-macroglobulina. Esta é a maior responsável pela inibição plasmática das metaloproteinases (77).

A regulação da atividade das metaloproteinases está sumarizada na Figura 1.

II.2.4. Metaloproteinases e as doenças

Vários estudos têm associado alterações das MMPs com doenças do tecido conjuntivo (98), cardiovasculares (77,98,99) e com os processos que envolvem o desenvolvimento e a progressão tumorais (67,71,72,73). Estes requerem uma cascata de eventos que incluem mecanismos similares ao que as células normais utilizam para migração e quebra das barreiras teciduais (MB, estroma extracelular) (68,74).

Desequilíbrios na expressão destas enzimas e aumento da atividade proteolítica estão presentes em tumores invasores e metastáticos. Ao que parece, as células malignas são capazes de produzir MMPs e utilizar as MMPs produzidas pelas células estromais e inflamatórias vizinhas (68,73,78,79). Do mesmo modo essas podem expressar e controlar o funcionamento dos *TIMPs*. Vários estudos mostram maior concentração e atividade de MMPs na periferia da lesão e no estroma, em relação à porção interna do tumor (79). Assim, a capacidade de invasão tecidual depende da habilidade das células tumorais de alterar o metabolismo ao seu redor, otimizando e economizando seus recursos próprios, através do controle e da utilização dos recursos do hospedeiro (79). Em última análise, o sucesso das

células tumorais depende de uma resposta direta ou indireta do hospedeiro à neoplasia (100).

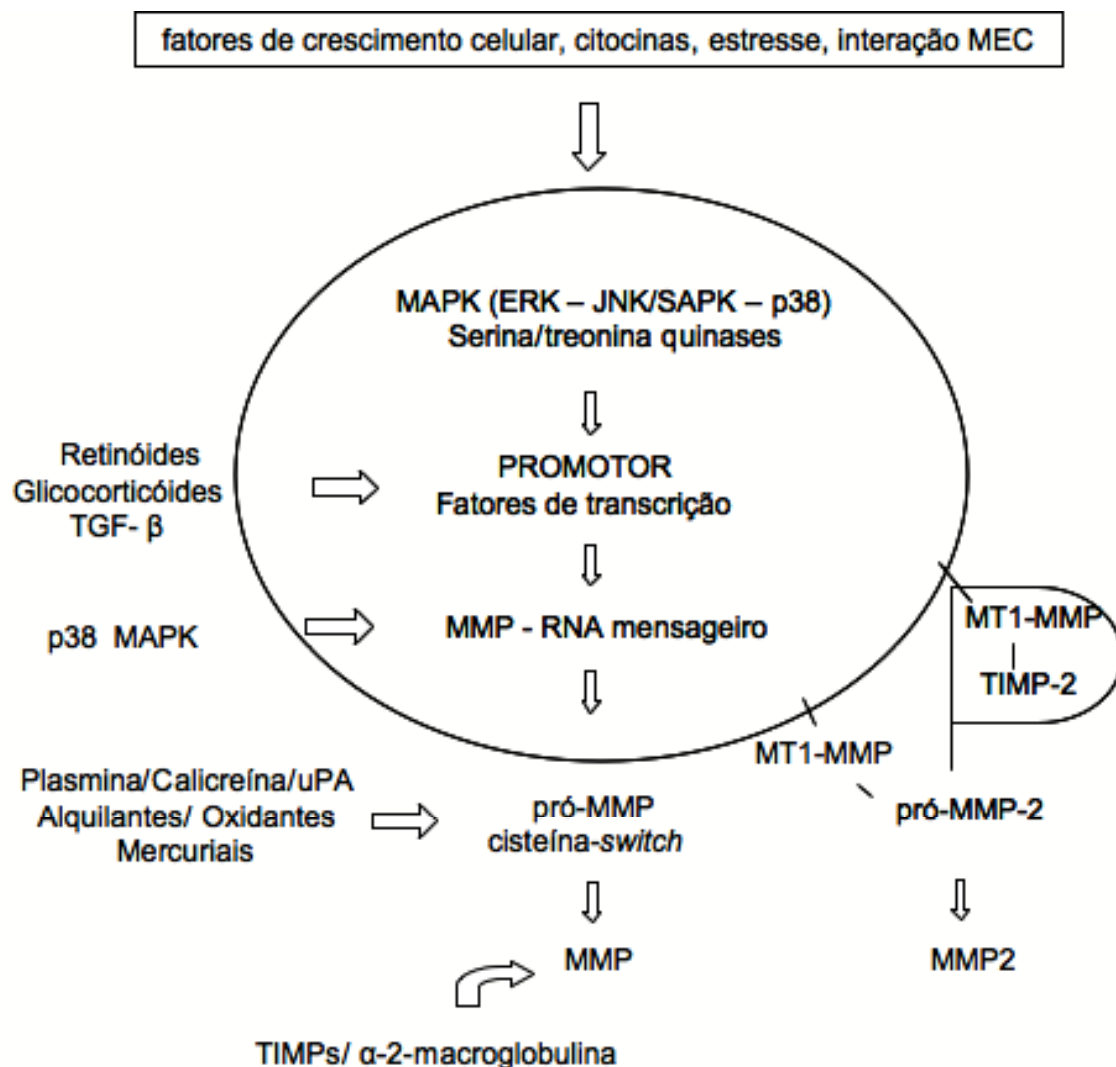


Figura 1. Regulação da Atividade das Metaloproteínases

A relação metaloproteínases/câncer tem sido largamente explorada nos últimos 15 anos. Algumas pesquisas apontam para uma maior atividade das MMPs, enquanto outras mostram alterações nos seus mecanismos inibitórios. Estudos empregando metodologias distintas mostram associação de praticamente todas as MMPs com processos neoplásicos de diversos sítios, abrangendo sistema nervoso, pele, cavidade oral, mama, pulmão, ossos, trato gastrointestinal e geniturinário (76,88,101,102,103,104,105,106,107).

Na glândula mamária normal, a expressão de metaloproteínases é baixa, exceto durante os períodos de crescimento, gestação, lactação e involução da glândula, quando o

processo de remodelamento tecidual é intenso (68,108). As MMPs são expressas por vários tipos celulares na glândula mamária, incluindo fibroblastos, adipócitos e linfócitos (108). Segundo Benaud et al (1998), a integridade da MB é fundamental para expressão de genes relacionados à diferenciação celular, como o da proteína do leite, β -caseína. Alterações na estrutura da MB levam à proliferação celular e, sua degradação, à involução da glândula, através da apoptose (68). Sabendo que as MMPs desempenham papel crítico no remodelamento da MEC e que atuam sobre a MB, fica clara a importância dessas enzimas no processo de desenvolvimento da mama. Também foi constatado, que durante o ciclo menstrual, existem alterações na composição da MEC mamária, com degradação de laminina, proteoglicanos e colágeno tipo IV (68). Sendo assim, oscilações nos níveis das MMPs poderiam ocorrer em diferentes fases do ciclo. Em 1994, Rodgers et al demonstraram alterações no padrão e no local (epitélio, estroma, tipos celulares) de expressão de MMPs, em amostras de endométrio, em diferentes fases do ciclo menstrual, sugerindo uma interação com hormônios esteróides (109). A influência de mecanismos hormonais foi comprovada, posteriormente por Lee et al (2001) (110).

Considerando que o sucesso da célula que sofreu transformação oncogênica é dependente da sua capacidade de invasão e rompimento de barreiras teciduais, é possível traçar um paralelo entre o *turnover* fisiológico e patológico da MEC na mama. Fundamentadas nesta teoria, pesquisas em câncer de mama têm focado na expressão das MMPs. O resultado dos estudos demonstra níveis aumentados de metaloproteinases nas células tumorais e no estroma adjacente, em relação à glândula mamária normal e/ou com doença benigna (68,100,107,111,112). A expressão e a atividade dessas enzimas têm sido avaliadas também no sangue e na urina das pacientes (113). As MMPs 1, 2, 3, 7, 8, 9, 11, 13, MT-MMPs 1, 2 e 3 e TIMPs 1 e 2 apresentaram expressão alterada em diversos modelos de pesquisa envolvendo carcinoma mamário (68,100,101,107,111,112,114,115).

II.3. Gelatinases e câncer de mama

As gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9, respectivamente) caracterizam-se, estruturalmente, por possuírem três repetições fibronectina-tipo II inseridas no domínio catalítico (70). Estas repetições conferem capacidade de interação e degradação dos seus principais substratos: colágenos tipo IV, V, VII, IX, X e gelatinas (colágeno desnaturado) (67,68,69). A MB, considerada o primeiro obstáculo para a invasão neoplásica, tem como componente abundante o colágeno tipo IV; fato que a torna alvo importante das gelatinases.

Porém, apesar da similaridade de substratos, convém ressaltar, que as duas enzimas diferem, amplamente, em relação aos seus mecanismos regulatórios. Além disso, ambas não são expressas simultaneamente e nem pelos mesmos tipos celulares (116). Pesquisas em câncer de mama mostraram expressão de MMP-2 predominantemente nas células neoplásicas e em fibroblastos, e de MMP-9 no infiltrado inflamatório peritumoral e no endotélio (68,100,115). Loo et al (2004), estudando subpopulações celulares de carcinoma mamário em um sistema de cultura tridimensional, demonstraram que, proporcionalmente à migração das células através de uma esponja de gel, havia aumento da produção de metaloproteinases, incluindo as MMPs 2 e 9 (114). Jones et al (1999) investigaram uma possível correlação entre a expressão IMQ das gelatinases e parâmetros clinicopatológicos em carcinoma de mama. Nesse estudo a MMP-2 foi expressa, nas células tumorais e no estroma, em mais de 90% dos 129 casos analisados e mostrou-se significativamente associada à presença de metástases linfonodais. A reação IMQ para MMP-9 foi positiva em 68% dos casos, em fibroblastos, macrófagos e nas células neoplásicas. A expressão nas células epiteliais neoplásicas foi maior nos casos de carcinoma lobular infiltrante, quando comparada com o tipo ductal ($p=0,0004$) (112). Garbett et al (2000) encontraram maior presença das MMPs 2 e 9, através de zimografia, na lesão tumoral, em relação ao parênquima mamário adjacente e a amostras de mama normal. Foi constatada ainda, correlação positiva entre a presença das MMPs 2 e 9 e a graduação histopatológica (111).

Níveis séricos e/ou expressão elevados de MMP-2 têm sido classicamente associados a parâmetros de doença desfavoráveis. Garibyan et al (2004) demonstraram que níveis séricos pré-operatórios elevados da enzima estão correlacionados com comprometimento linfonodal e estágio avançado (113). Nakopoulou et al (2003) encontraram relação positiva entre expressão IMQ de MMP-2 e lesões com tamanho acima de 2,0cm e relação inversa com a expressão de p53 e ki-67. No entanto, não foi possível estabelecer associação com a sobrevida total (117). Da mesma forma, Hirvonen et al (2003) falharam em demonstrar associação entre a expressão IMQ da MMP-2 e sobrevida total, em pacientes $T_{1-2}N_0$; entretanto, todas as pacientes MMP-2 negativas continuavam vivas após 10 anos, enquanto que, a sobrevida nas pacientes MMP-2 positivas, no mesmo período, foi de 87% (118). Posteriormente, Li et al (2004), acompanhando 270 pacientes, sem doença linfonodal, durante o período médio de 61 meses, demonstraram associação entre a expressão IMQ da MMP-2 e tumores maiores e com maior graduação histopatológica (119).

Considerando o estudo da MMP-9, as pesquisas apresentam resultados pouco mais

controversos. Garibyan et al (2004) detectaram relação entre atividade enzimática aumentada, medida por meio de zimografia, no momento do diagnóstico, e diminuição da sobrevida total (113). Pesquisa realizada por Pacheco et al (1998) mostrou que a expressão aumentada de MMP-9, medida por Northern blot, estaria associada com presença de invasão vascular, necrose e negatividade para RP (120). No mesmo estudo, altos níveis de MMP-9 e de MMP-2 foram inversamente relacionados com o número de sobreviventes, durante o período médio de seguimento de 40 meses (120). No estudo de Li et al (2004), a positividade IMQ para MMP-9 apresentou relação estatisticamente significativa com alto grau tumoral. Além disso, as duas enzimas isoladamente e a co-expressão de MMP-2/MMP-9 estiveram relacionadas com menor tempo de sobrevida livre de recorrência de doença (119). Contrariando os dados anteriores, estudo recente, com tempo médio de seguimento de 10 anos (121), demonstrou que pacientes com baixos níveis séricos pré-operatórios de MMP-9, detectados por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) apresentam chance de recorrência três vezes maior. Ainda, baixos níveis de MMP-9 foram indicativos de menor sobrevida livre de doença em pacientes sem comprometimento linfonodal, em estágios I-II, com RP negativos e com menos de 50 anos (121). Finalmente, Vijver et al (2002), estudando genes associados à classificação prognóstica, sugeriram que o perfil da expressão gênica poderia ser capaz de prever com mais eficácia o desenvolvimento de metástases à distância em 5 anos, em pacientes jovens, do que os critérios clinicopatológicos usuais (59). Entre os genes analisados, o da MMP-9 foi um dos associados à categoria de mau prognóstico (59,60).

A maioria dos estudos tem mostrado que alterações na expressão dessas MMPs nos carcinomas de mama representam um indício de maior potencial de malignidade e pior prognóstico, no entanto, os resultados não são unânimes. A relação com parâmetros clinicopatológicos, tais como tipo e grau histológico da neoplasia, estágio, comprometimento linfonodal e expressão IMQ para RE, RP, p53, Ki-67 e c-erbB-2 ainda apresenta pontos controversos. Possíveis explicações para estas divergências podem ser: a variabilidade étnica e racial entre as populações analisadas e a diversidade dos métodos utilizados pelos pesquisadores - estudos *in vivo/vitro*, medida de níveis séricos por ELISA, IMQ, FISH, zimografia, reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real (RT-PCR).

II.4. Polimorfismos da região promotora das metaloproteínases

Um dos alvos de pesquisa atual no estudo da influência das metaloproteínases sobre

a patogênese são os mecanismos moleculares que podem intervir na expressão gênica destas enzimas. Aspectos como a produção destas proteinases tanto pelas células cancerígenas, como pelas integrantes do estroma e por células endoteliais, sugerem que a superexpressão enzimática se deva a alterações transcricionais (122). Portanto, deve-se considerar o estudo da região promotora do gene, uma vez que esta é seqüência de DNA, onde a RNA polimerase inicia a transcrição (90).

Polimorfismos no DNA são variações naturais na seqüência do DNA, em mais de um alelo, que ocorrem com freqüência maior do que 1% na população (123). Estudos têm mostrado que polimorfismos da região promotora dos genes das MMPs podem resultar em diferenças na expressão gênica entre indivíduos. Polimorfismos em um único nucleotídeo (SNPs) têm sido associados a doenças coronarianas, aneurismáticas e neoplasias malignas. Variações no promotor dos genes das MMPs 2, 3, 9 e 12 e dos TIMPs 1 e 2 já foram relacionados a aneurismas intracranianos, coronarianos e de aorta, à ruptura de placas ateroscleróticas e à insuficiência cardíaca (124,125,126,127,128,129,130,131). O mesmo ocorre com as MMPs 1, 2, 3, 9, 13 e MTMMPs e tumores, como carcinomas de cabeça e pescoço, mama, ovário, endométrio, do trato gastrointestinal, renal, pulmonar e melanoma (122,132-146).

O gene da MMP-2 está localizado no cromossomo 16 (16q13-q21). Price et al (2001) identificaram seis seqüências, na região promotora da *MMP2*, onde podem ocorrer variações: - 1575, - 1306, -955, -790, -787 e -168. Duas variantes, nas posições -1306 e -790 possuem 100% de homologia com seqüências cis já descritas. Contudo, a troca de uma citosina por uma timidina (C/T) na posição - 1306 mostrou-se funcionalmente importante, pois altera o sítio de ligação do fator de transcrição Sp1 (CCACC box) no promotor. A presença do alelo T gera uma atividade transcricional duas vezes menor, do que a do alelo C (147). Posteriormente, Vasku et al (2002) estudaram um novo SNP no promotor da *MMP2*: -735 C/T (148). Este polimorfismo também é capaz de atuar sobre a atividade transcricional, via alteração da seqüência consenso Sp1 CCCTCC (132).

O SNP -1306C/T no gene da MMP-2 tem sido freqüentemente estudado, devido à sua influência sobre os processos neoplásicos. Miao et al (2003), estudando casos e controles chineses, demonstraram que indivíduos com o genótipo CC apresentam três vezes mais risco de desenvolverem adenocarcinoma de cárdia, quando comparados aos portadores dos genótipos CT e TT (OR: 3,36; IC 95%: 2,34-4,97) (133). Estudo similar realizado por Yu et al (2002) detectou que carreadores do genótipo CC apresentam chance duas vezes maior de

desenvolverem câncer pulmonar (OR: 2,18; IC 95%: 1,70-2,79) (134). Ainda em câncer de pulmão, Zhou et al (2005) encontraram risco similar ao anterior para portadores do genótipo CC (OR: 2,12; IC 95%: 1,64-2,72) e também um efeito sinérgico sobre o risco dos SNPs -1306C/T e -735C/T (OR: 5,01; IC 95%: 2,57-9,78) (135). Seguindo a mesma linha de pesquisa, Yu et al (2004) ratificaram a associação do genótipo CC (-1306), com risco de carcinoma de células escamosas do esôfago (OR: 1,52; IC 95%: 1,17-1,96) e identificaram que o haplótipo C-1306C-735 aumenta a chance de desenvolver a neoplasia em 6 vezes (OR: 6,53; IC 95%: 2,78-15,33), assim como o risco de metástases à distância (OR: 3,34; IC 95%: 1,16-9,63) (132). Xua et al (2004), analisando casos de carcinoma colorretal e controles, na China, demonstraram associação leve entre o genótipo CC (-1306), versus CT e TT, e risco de câncer (OR: 1,959; CI 95%: 1,055-3,637). Pacientes CC também apresentaram maior envolvimento da serosa e da adventícia, quando comparados aos CT e CC (136). O mesmo genótipo esteve significativamente relacionado à carcinogênese oral ($p < 0,05$) (137) e a tumores de cabeça e pescoço (OR: 1,97; IC 95%: 1,23-3,15) (138). Nas neoplasias de cabeça e pescoço, o genótipo CC foi mais freqüente em pacientes com lesões de espessura maior do que 10mm, comprometimento linfonodal e estadiamento avançado (137).

Em câncer de mama, dois autores estudaram o SNP -1306C/T. Zhou et al (2004), através de estudo de casos e controles, encontraram associação entre a presença do alelo T (CT + TT versus CC) e diminuição do risco de câncer (OR: 0,46; IC 95%: 0,34-0,63) (122). O efeito protetor do alelo T foi mais pronunciado em mulheres que obtiveram diagnóstico antes dos 55 anos. Não houve associação estatisticamente significativa entre os genótipos, o estadiamento e a expressão de RE e RP (122). Já o estudo australiano, não controlado, de Grieu et al (2004), analisou a relação do polimorfismo com parâmetros clinicopatológicos, incluindo a sobrevida total. Foi observado que, portadoras do genótipo TT (versus CT e CC) apresentaram tumores significativamente menores ($p=0,006$), porém, com baixa concentração (fmol/ μ g) de RE ($p=0,0024$). As pacientes com o genótipo TT e tumores RE negativos apresentaram menor sobrevida, durante o período médio 87 meses, em relação às CT e CC ($p=0,002$). Enquanto que, pacientes TT com tumores RE positivos apresentaram maior taxa de sobrevida (100% versus 83%), quando comparadas àquelas com genótipos CT e CC. Segundo os autores, embora não tenha atingido significância estatística, estes últimos dados seriam sugestivos de que o SNP -1306C/T teria influência prognóstica dependente do nível de expressão de RE (139).

Alguns polimorfismos (5 no promotor, 5 na região codificadora e 1 na seqüência 3' não traduzida) já foram identificados no gene da MMP-9, localizado no braço longo do cromossomo 20 (20q11.2-q13.1) (128,149,150). Na região promotora foram localizadas as seguintes seqüências variáveis: -2118, -1702, -1562, -861, -55 a -13.

Dentre os polimorfismos conhecidos, o multi-alélico microssatélite citosina e adenina (CA)_n e o SNP na posição – 1562 C/T são funcionalmente importantes. No primeiro observa-se que a distribuição da freqüência dos alelos apresenta dois picos: um no alelo (CA)₁₄ e outro nos alelos (CA)₂₁, (CA)₂₂ e (CA)₂₃. As evidências atuais são de que promotores com 14 repetições CA têm 50 a 60% da atividade dos promotores com 21 e 23 repetições CA. Esses achados foram observados em células de carcinoma esofágico e em fibroblastos (125,150,151). No caso da troca C/T na posição – 1562, foi demonstrado que, a seqüência de 9pb GCGCA**C**GCC (-1567 a -1559), a qual inclui o sítio polimórfico, parece funcionar como um elemento cis (sítio de ligação) para uma proteína com função repressora da transcrição. A substituição do C pelo T impede a interação da proteína repressora com o DNA, resultando em maior atividade transcricional (128). Estudos de transfecção, em macrófagos, para análise da expressão gênica, mostraram que genes com o alelo T no promotor apresentam expressão 1,5 vezes maior do que os com o alelo C ($p < 0,001$) (128). Corroborando estes achados, os mesmos autores, através de estudo de casos e controles, demonstraram associação entre pacientes com os genótipos CT e TT (versus CC) e presença de doença aterosclerótica coronariana severa ($p < 0,04$) (128). Esta associação pode ser fundamentada na maior intensidade de degradação da MB, gerada pelo alelo T, facilitando a migração e proliferação das células musculares lisas vasculares durante o processo de aterogênese (152). Posteriormente, Pöllänen et al (2001), estudando casos de morte súbita, na Finlândia, através de autópsias, encontraram relação entre a presença do alelo T e maior tamanho de área de lesão coronariana complicada, em homens acima de 53 anos ($p = 0,008$) (126). Jones et al (2003), em estudo de casos e controles neozelandês, detectaram que indivíduos com os genótipos CT e TT apresentam maior risco de desenvolver aneurisma de aorta abdominal, do que portadores do genótipo CC (OR: 2,41; IC 95%: 1,44-4,02) (127). Em contraponto, Blakenberg et al (2003), estudando 1127 pacientes com doença coronariana, não conseguiram estabelecer associação significativa entre esse SNP e morte por causas cardiovasculares, embora tenham demonstrado que pacientes com o alelo T apresentam maiores níveis plasmáticos da enzima MMP-9 ($p = 0,004$) (129).

A pesquisa do polimorfismo -1562 C/T nas neoplasias ainda é incipiente. Estudo

chinês, em carcinoma de pulmão de tipo não-pequenas células, não identificou diferenças entre as frequências dos genótipos nos casos e nos controles. Do mesmo modo, não foi encontrada associação entre os genótipos e o risco para o carcinoma após estratificação, conforme variáveis clinico-patológicas (140). Paralelamente, realizou-se, no Japão, estudo deste SNP em casos de câncer gástrico e controles hígidos. Não houve associação com risco de desenvolvimento de câncer. Porém, pacientes com os genótipos CT e TT (versus CC) apresentaram lesões com maior profundidade de invasão da parede gástrica (OR: 2,61; IC 95%:1,07-6,34), maior índice de invasão linfática (OR: 2,27; IC 95%: 1,09-4,73) e estadiamento avançado (OR: 2,26; IC 95%: 1,12-4,54). Segundo os autores, estes dados sugerem que a presença do alelo T no promotor seria relevante nos processos de invasão tecidual e progressão tumoral, e não na carcinogênese (141). Os únicos dados em carcinoma de mama pertencem ao mesmo estudo australiano, não controlado de Grieu et al (2004), onde a presença do alelo T foi estatisticamente ($p < 0,05$) relacionada às seguintes características fenotípicas: tipo histológico não-ductal, RE positivo e ausência de mutação no gene *TP53*. Pacientes com os genótipos CT e TT, após os 87 meses de acompanhamento, apresentaram uma tendência de maior tempo de sobrevida, em relação às com o genótipo CC ($p = 0,06$) (139). Estes achados sugerem que o alelo T pode estar associado a características de bom prognóstico.

III. JUSTIFICATIVA

O estudo dos polimorfismos das metaloproteinases da matriz representa um passo em direção à compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos processos de gênese e progressão neoplásicos. O entendimento dos eventos moleculares que resultam na alteração da expressão das MMPs pode auxiliar, futuramente, no desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas. A simples detecção dos polimorfismos, caso se confirme a relação dos mesmos com o carcinoma de mama, pode ser considerada um fator de risco/proteção para o desenvolvimento da neoplasia. Se houver associação estatisticamente significativa entre a presença/ausência dos alelos polimórficos e os fatores prognósticos e preditivos, as pacientes terão informações adicionais e poderão obter acompanhamento diferenciado. Pois, quanto maior o número de informações referentes à fisiopatogenia da doença e à sua progressão, mais próximos estaremos do desenvolvimento de técnicas capazes de fornecer elementos precisos sobre a evolução de cada paciente.

Deve-se considerar ainda, que este será o primeiro estudo de casos e controles, na literatura indexada consultada, envolvendo os dois polimorfismos em questão e o carcinoma de mama e, também, a primeira análise destes SNPs, em câncer de mama, no continente americano. Já que, as pesquisas na China e na Austrália, apresentaram contribuições relevantes para o estudo do carcinoma mamário, e que os polimorfismos variam entre as populações, é interessante averiguar se tais SNPs podem atuar sobre a nossa população.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo geral

Detectar os polimorfismos nas regiões promotoras dos genes *MMP2* (– 1306 C/T) e *MMP9* (- 1562 C/T) em casos de carcinoma de mama e em controles hígidos.

IV.2. Objetivos específicos

1. Utilizar a técnica de PCR seguida por análise do comprimento dos fragmentos de restrição - *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), através da enzima de restrição *SphI* para detectar o polimorfismo - 1562 C/T na região promotora do gene *MMP9*;
2. Utilizar a técnica de PCR seguida por seqüenciamento de DNA para detectar o polimorfismo na região promotora – 1306 C/T do gene *MMP2*;
3. Analisar a freqüência dos polimorfismos em questão em casos de câncer de mama e nos controles hígidos;
4. Avaliar se há relação entre os genótipos e os casos, observando quais são os alelos mais freqüentes no carcinoma de mama;
5. Comparar a presença destes polimorfismos com as seguintes características clinicopatológicas das pacientes: idade no momento do diagnóstico, menarca antes dos 11 anos, menopausa após os 54 anos, nuliparidade, história familiar, tipo e grau histológico da neoplasia, invasão angiolinfática, estágio (TNM), comprometimento linfonodal e expressão IMQ para RE, RP, p53 e c-erbB-2.

V. ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospital Santa Casa (protocolo número: 1051/05).

Todas as participantes do estudo foram voluntárias e assinaram termo de consentimento informado (Anexo F).

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

1. GLOBOCAN 2002 database. Disponível em [www <http://www-dep.iarc.fr>](http://www-dep.iarc.fr) Acesso em nov. 2005.
2. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Ministério da Saúde. Disponível em [www <http://www.inca.gov.br>](http://www.inca.gov.br). Acesso em nov. 2005.
3. BRITO C. A epidemiologia do câncer de mama e a sobrevida. In: *Avaliação do Tratamento à Paciente com Câncer de Mama nas Unidades Oncológicas do Sistema Único de Saúde no Estado do Rio de Janeiro*. 2004. cap. 3, p.21-24. Dissertação (Mestrado em Ciências - Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.
4. PRINCIPAIS causas de mortalidade no Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul: Secretaria do Estado da Saúde. Disponível em [www <http://www.saude.gov.br>](http://www.saude.gov.br) Acesso em nov. 2005.
5. ELLIS I.O.; Pinder S.E.; Lee A.H.S.; Elston C.W. Tumors of the breast. In: FLETCHER C.D.M. *Diagnostic histopathology of tumors*. 2 ed. New York: Churchill Livingstone, 2000. vol. 1. cap. 16., p. 865-930.
6. VERONESI U.; Boyle P.; Goldhirsch A. et al. Breast cancer. *Lancet*, London, vol. 365, p.1727-1741, May 2005.
7. SCHAIRER C.; Mink P. J.; Carroll L.; Devesa S. S. Probabilities of death from breast cancer and other causes among female breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 96, n. 17, p. 1311-1321, Sep. 2004.
8. PETO R.; Boreham J.; Clarke M. et al. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20–69 years. *Lancet*, vol. 355, p. 1822, May 2000.
9. MORRIS C. R.; Wright W. E.; Schlag R. D. The risk of developing breast cancer within the next 5, 10, or 20 years of a woman's life. *American Journal of Preventive*

¹ As referências bibliográficas seguem os padrões técnicos especificados na norma NBR 6023:2002 da Associação Brasileira de Normas Técnicas.

- Medicine*, vol. 20, n. 3, p. 214-218, 2001.
10. MCPHERSON K.; Steel C. M.; Dixon J. M. Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *British Medical Journal*, vol. 321, n. 9, p. 624-628, Sep. 2000.
 11. ARMSTRONG K.; Eisen A.; Weber B. Primary care: assessing the risk of breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, Waltham, vol. 342, n. 8, p. 564-571, Feb. 2000.
 12. COLLABORATIVE Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *Lancet*, vol. 358, p.1389–1399, Oct. 2001.
 13. MACMAHON, B. Reproduction and cancer of the breast. *Cancer*, vol. 71, n. 10, p. 3185-3188, May 1993.
 14. COLLABORATIVE Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*, vol. 360, p.187-195, Jul. 2002.
 15. ROSAI J. Breast. In: ROSAI J. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. 9 ed. London: Mosby, 2004. vol. 2. cap. 20, p. 1763-1876.
 16. MILLION Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, vol. 362, p. 419-427, Aug. 2003.
 17. COLLABORATIVE Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer. *Lancet* vol. 350, p.1047-1059, Oct. 1997.
 18. SCHNITT S. J. Benign breast disease and breast cancer risk, morphology and beyond. *The American Journal of Surgical Pathology*, Philadelphia, vol. 27, n. 6, p. 836–841, 2003.
 19. CLEMONS M.; Loijens L.; Goss P. Breast cancer risk following irradiation for Hodgkin's disease. *Cancer Treatment Reviews*, vol. 26, p. 291–302, 2000.
 20. HERON D. E.; Komarnicky L. T.; Hyslop T et al. Bilateral breast carcinoma. Risk factors and outcomes for patients with synchronous and metachronous disease. *Cancer*, vol. 88, n. 12, p. 2739-2750, Jun. 2000.
 21. CARTER R. F. BRCA1, BRCA2 and breast cancer: a concise clinical review. *Clinical and Investigative Medicine*, vol. 24, n. 3, p. 147-57, Jun. 2001.

22. STRUEWING J. P.; Hartge P.; Wacholder S. et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among ashkenazi jews. *The New England Journal of Medicine*, Waltham, vol. 336, n. 20, p. 1401-1408, May 1997.
23. HUANG Z.; Hankinson S.; Colditz G. A. et al. Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *JAMA*, Chicago, vol. 278, n. 17, p. 1407-1411, Nov. 1997.
24. ERNSTER V. L.; Barclay J.; Kerlikowske K. et al. Incidence of and treatment for ductal carcinoma in situ of the breast. *JAMA*, Chicago, vol. 275, n.12, p. 913-918, Mar. 1996.
25. ROSEN P. P. Intraductal Carcinoma. In: ROSEN P. P. *Rosen' Breast Pathology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. cap. 14, p. 227-273.
26. MORROW M.; Strom E. A.; Bassett L. W. et al. Standard for the Management of Ductal Carcinoma In Situ of the Breast (DCIS). *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, Atlanta, vol. 52, n. 5, p. 256-276, 2002.
27. SILVERSTEIN M. J.; Poller D. N.; Waisman J. R. et al. Prognostic classification of breast ductal carcinoma-in-situ. *Lancet*, vol. 345, p.1154-57, May 1995.
28. ROSEN P. P.; Saigo P. E.; Braun D. W. et al. Predictors of recurrence in stage I (T1N0M0) breast carcinoma. *Annals of Surgery*, vol. 193, n. 1, p. 15-25, Jan. 1981.
29. ROSEN P. P. Invasive Duct Carcinoma and Morphological Prognostic Markers. In: ROSEN P. P. *Rosen' Breast Pathology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. cap. 15, p. 275-293.
30. CIANFROCCA M., Goldstein L.J. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *The Oncologist*, Durham, vol. 9, p. 606-616, 2004.
31. FITZGIBBONS P. L.; Page D. L.; Weaver D. et al. Prognostic factors in breast cancer. College of american pathologists consensus statement. *Archives of Pathology and Laboratorial Medicine*, vol. 124, p. 966-978, Jul. 2000.
32. TAI P.; Yu E.; Vinh-Hung V. et al. Survival of patients with metastatic breast cancer: twenty-year data from two SEER registries. *BioMed Central*, vol. 4., p. 60-67, Sep. 2004.
33. MUSS H. B.; Case D.; Richards F. et al. Interrupted versus continuous chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, Waltham, vol. 325, n. 19, p. 1342-1348, Nov. 1991.
34. NORTON L. Metastatic breast cancer. Length and quality of life. *The New England Journal of Medicine*, Waltham, vol. 325, n. 19, p. 1370-1371, Nov. 1991.
35. VINH-HUNG V.; Verschraegen C.; Promish D. et al. Ratios of involved nodes in

- early breast cancer. *Breast Cancer Research*, vol. 6, n. 6. p. R680-R688, 2004.
36. VERONESI U.; Paganelli G.; Viale G. et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, Waltham, vol. 349, n. 6, p. 546-553, Aug. 2003.
 37. SOBIN L. H.; Wittekind C. *TNM classificação de tumores malignos*. 6 ed. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer, 2004.
 38. SAY C. C.; Donegan W. Invasive carcinoma of the breast: prognostic significance of tumor size and involved axillary lymph nodes. *Cancer*, vol. 34, n. 2, p. 468-471, Aug. 1974.
 39. REED W.; Hannisdal E.; Boehler P. J. et al. The prognostic value of p53, and c-erb B-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer*, vol. 88, n. 4, p. 804-813, Feb. 2000.
 40. SIGURDSSON H.; Baldertorp B.; Borg A. et al. Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, Waltham, vol. 322, n. 15, p. 1045-1053, Apr. 1990.
 41. REGER V.; Beito G.; Jolly P. C. Factors affecting the incidence of lymph node metastases in small cancers of the breast. *The American Journal of Surgery*, vol. 157, p. 501-502, May 1989.
 42. BOSCH X. Unique features of inflammatory breast carcinoma. *Lancet Oncology*, vol. 6, p. 549, Aug. 2005.
 43. ELSTON C. W.; Ellis I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, vol.19, n.5, p. 403-410, 1991.
 44. PU R. T.; Schott A. F.; David E. Sturtz D. E. et al. Pathologic features of breast cancer associated with complete response to neoadjuvant chemotherapy. Importance of tumor necrosis. *American Journal of Surgical Pathology*, vol. 29, n. 3, p. 354–358, Mar. 2005.
 45. CARLOMAGNO C; Perrone F.; Lauria R. et al. Prognostic and significance of necrosis, elastosis, fibrosis and inflammatory cell reaction in operable breast cancer. *Oncology*, vol. 52, n. 4, p. 272-277, 1995.
 46. WEIDNER N.; Semple J. P.; Welch W. R.; Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, Waltham, vol. 324, n. 1, p. 1-8, Jan. 1991.
 47. RING A. E.; Smith I. E.; Ellis P. A. Breast cancer and pregnancy. *Annals of*

- Oncology*, vol. 16, p. 1855–1860, Jul. 2005.
48. HAN W.; Kim S.; Park I. et al. Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer. *BioMed Central*, vol. 4, p. 82-90, Nov. 2004.
 49. BARDOU V.; Arpino G.; Elledge R. M. et al. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone adjuvant endocrine therapy in larger breast cancer databases. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 21, n. 10, p.1973-1979, May 2003.
 50. MOLINA R.; Barak V.; Dalen A. et al. Tumor markers in breast cancer – european group on tumor markers recommendations. *Tumor Biology*, vol. 26, p. 281-293, Oct. 2005.
 51. BARNES D. M.; Hanby A. M. Oestrogen and progesterone receptors in breast cancer: past, present and future. *Histopathology*, vol. 38, p. 271-274, 2001.
 52. WINER E. P.; Hudis C.; Burstein H. J. et al. American society of clinical oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor–positive breast cancer: status report 2004. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, n. 3, p. 619-629, Jan. 2006.
 53. LUPU R.; Colomer R.; Kannan B. et al. Medical sciences characterization of a growth factor that binds exclusively to the erbB-2 receptor and induces cellular responses (oncogene/growth factor/breast carcinomas). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 89, p. 2287-2291, Mar. 1992.
 54. SLAMON D. J.; Leyland-Jones B.; Shak, S. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England Journal of Medicine*, Waltham, vol. 344, n. 11, p. 783-792, Mar. 2001.
 55. MUSS H. B.; Thor A. D.; Berry D. A. et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, Waltham, vol. 330, n. 18, p. 1260-1266, May 1994.
 56. YAZIJI H.; Goldstein L.C.; Barry T.S. et al. HER-2 Testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA* vol. 291, p.1972-1977, 2004.
 57. BARNES D.; Dublin E. A.; Fisher C. J. et al. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? *Human Pathology*, vol. 24, n. 5, p. 469-476, May 1993.
 58. ROSEN P. P.; Lesser M. L.; Arroyo C. D. et al. p53 in node-negative breast

- carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features and prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 13, n. 4, p. 821-830, Apr. 1995.
59. VAN DE VIJVER M.J.; He Y. D.; van 't Veer L. J. Gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, Waltham, vol. 347, n.25, p.1999-2009, Dec. 2002.
 60. VAN 'T VEER L. J.; He Y.D.; van de Vijver M. J. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, New York, vol. 415, p. 503-36, Jan. 2002.
 61. STOCKER W.; Grams F.; Baumann U. et al. The metzincins -Topological and equential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc peptidases. *Protein Science* vol. 4, p.823-840, 1995.
 62. LAPIÈRE C.M. Tadpole collagenase, the single parent of such a large family. *Biochimie*, vol.87, p. 243–247, 2005.
 63. WALLACH J. Matrix Metalloproteases and cancer. Novel perspectives in the role and control of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Biochimie*, vol. 87, p. 241, 2005.
 64. BLASER J.; Triebei S.; Reinke H.; Tschesche H. Formation of a covalent Hg-Cys-bond during mercurial activation of PMNL procollagenase gives evidence of a cysteine-switch mechanism. *FEBS*, vol. 313, p. 59-61, Nov.1992.
 65. SPRINGMAN E.; Angleton E.; Birkedal-Hansen H.; van Wart H. E. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 87, p. 364-368, Jan. 1990.
 66. NAGASE H.; Enghild J.; Suzuki K.; Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminopheny1) mercuric acetate7. *Biochemistry*, vol. 29, n.24, p. 5783-5789, 1990.
 67. CHAU I.; Rigg A.; Cunningham D. Matrix metalloproteinase inhibitors – an emphasis on gastrointestinal malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 45, p. 151-176, 2003.
 68. BENAUD C.; Dickson R.B.; Thompson E.W. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 50, n. 2, p. 97-116, Jul. 1998.
 69. VISSE R.; Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of

- metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, Dallas, vol. 92, p.827-839, May 2003.
70. NAGASE H.; Woessner F. Matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n. 31, p. 21491-21494, Jul. 1999.
 71. WESTERMARCK J.; Kahari V. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB Journal*, vol. 13, p. 781–792, 1999.
 72. ALA-AHO R.; Kähäri V. Collagenases in cancer. *Biochimie*, vol. 87, p. 273–286, 2005.
 73. CHANG C.; Werb Z. The many faces of matrix metalloproteinases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastases. *Trends in Cell Biology*, vol. 11, n. 11, p.S37-S43, Nov. 2001.
 74. JOHNSEN M.; Lundt L.R.; Remer J. et al. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 10, p. 667-671, 1998.
 75. BENBOW U.; Brinckerhoff C.E. The AP-1 Site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biology*, vol.15, p. 519-526, 1997.
 76. STERNLICHT M.D.; Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 17, p. 463–516, 2001.
 77. BAKER A.; Edwards D.; Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science* vol.115, p. 3719-27, 2002.
 78. MAQUART F.X.; Bellon G.; Pasço S.; Monboisse J.C. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie*, vol. 87, p. 353–360, 2005.
 79. ZIGRINO P.; Loffek S.; Mauch C. Tumor-stroma interactions: their role in the control of the tumor cell invasion. *Biochimie*, vol. 87, p. 321–328, 2005.
 80. IYER V.; Pumiglia K.; DiPersio M. $\alpha 3\beta 1$ integrin regulates MMP-9 mRNA stability in immortalized keratinocytes: a novel mechanism of integrin-mediated MMP gene expression. *Journal of Cell Science*, vol.118, p. 1185-1195, 2005.
 81. GUO H.; Zucker S.; Gordon M.K. et al. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected chinese hamster ovary cells. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, n.1, p. 24–27, Jan. 1997.
 82. FREVEL M.E.; Bakheet T.; Silva A.M. et al. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and – independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 23, n. 2, p. 425–436,

Jan. 2003.

83. DENKERT C.; Siegert A.; Leclere A. et al. An inhibitor of stress-activated MAP-kinases reduces invasion and MMP-2 expression of malignant melanoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, vol. 19, p. 79–85, 2002.
84. AKOOL E.; Kleinert H.; Hamada F. et al. Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 23, n. 14, p. 4901–4916, Jul. 2003.
85. KARIN M.; Liu Z.; Zandi E. AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 9, p.940-246, 1997.
86. SHARROCKS A.D.; Brown A.L.; Ling Y.; Yates P.R. The ETS-domain transcription factor family. *International Journal of Biochemical and Cellular Biology*, vol. 29, n. 12, p. 1371- 1387, 1997.
87. BARRETT J.M.; Puglia M.A.; Singh G.; Tozer R. Expression of ETs-related transcription factors and matrix metalloproteinases genes in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 72, n. 3, p. 227-232, Apr. 2002.
88. QIN H.; Sun Y., Benveniste E.N. The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n. 41, p. 29130-37, Oct. 1999.
89. HONG I.; Kim Y.; Jeoung D. et al. Tetraspanin CD9 induces MMP-2 expression by activating p38 MAPK, JNK and c-Jun pathways in human melanoma cells. *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 37, n. 3, p. 230-239, Jun. 2005.
90. LODISH H.; Berk A.; Zipursky S.L. et al. Regulação da Iniciação da Transcrição. In: LODISH H.; Berk A.; Zipursky S.L. et al. *Biologia Celular e Molecular*. 4 ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2002. cap. 10. p. 342-403.
91. KANG S.; Brown D.A.; Kitajima I.; Xu X.; Heidenreich O. Binding and functional effects of transcriptional factor Sp1 on the murine interleukin-6 promotor. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, n.13, p. 7330–7335, Mar. 1996.
92. LANIA L.; Majello B.; De Luca P. Transcriptional regulation by the Sp family proteins. *International Journal of Biochemical and Cellular Biology*, vol. 29, n. 12, p. 1313-1323, 1997.
93. TURNER J.; Crossley M. Mammalian krüppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends in Biochemical Science*, vol. 24, p. 236-240, Jun. 1999.
94. HUHTALA P.; Chow L.T.; Tryggvason K. Structure of the human type IV collagenase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, n. 19, p. 11077-

- 11082, Jul. 1990.
95. KINOSHITA T.; Sato H.; Okada A. et al. TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.273, n. 26 p. 16098–16103, Jun. 1998.
 96. BREW K.; Dinakarpanthian D.; Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1477, p. 267-283, 2000.
 97. MURPHY G.; Houbrechts A.; Cockett M.I. et al. The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity? *Biochemistry*, vol. 30, n. 33, p. 8097-8102, Aug.1991. Errata. Corrections. *Biochemistry*, vol. 30, n.42, p. 10362, 1991.
 98. SEGURA A.M.; Luna R.E.; Horiba K. et al. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. *Circulation*, vol. 98, p. II-331-II-338, 1998.
 99. GALIS Z.S.; Khatri J.J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. The good, the bad and the ugly. *Circulation Research*, vol. 90, p. 251-262, Feb. 2002.
 100. HEPNER K.J.; Matrisian L.M.; Jensen R.A.; Rodgers W. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *American Journal of Pathology*, vol. 149, n. 1, p. 273-282, Jul. 1996.
 101. GIAMBERNARDI T.A.; Gant G.M.; Klebe R.J. et al. Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biology*, vol. 16, p. 483-496, 1998.
 102. THOMAS G.T.; Lewis M.P.; Speight P.M. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncology*, vol. 35, n. 3, p. 227-233, May 1999.
 103. TURPEENNIEMI-HUJANEN T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie*, vol. 87, p. 287–297, 2005.
 104. HOFMANN U.B.; Houben R.; Bröcker E.; Becker J. C. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie*, vol. 87, p. 307–314, 2005.
 105. SCHMALFELDT B.; Prechtel D.; Harting K. et al. Increased expression of matrix

- metalloproteinases (MMP-2), MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, vol. 7, p. 2396-2404, 2001.
106. BRINCKERHOLL C.; Rutter J.L.; Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clinical Cancer Research*, vol.6, p. 4823-30, 2000.
 107. BARTSCH J.E.; Staren E.D.; Appert H.E. Matrix metalloproteinase expression in breast cancer. *Journal of Surgical Research*, vol. 110, p. 383-92, 2003.
 108. SORRELL D.A.; Szymanowska M.; Boutinaud M. et al. Regulation of genes encoding proteolytic enzymes during mammary gland development. *Journal of Dairy Research*, vol. 72, p. 433–441, 2005.
 109. RODGERS W.H.; Matrisian L.M.; Giudice L.C. et al. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 94, p. 946-953, Sep. 1994.
 110. LEE P.P.; Hwang J.J.; Mead L.; Ip M.M. Functional role of matrix metalloproteinases (MMPs) in mammary epithelial cell development. *Journal of Cell Physiology*, vol. 188, p. 75–88, 2001.
 111. GARBETT E.A.; Reed M.W.; Stephenson T.J.; Brown N.J. Proteolysis in human breast cancer. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology*, vol. 53, p. 99-106, 2000.
 112. JONES J.L.; Glynn P.; Walker R.A. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *Journal of Pathology*, vol.189, p. 161-68, 1999.
 113. GARIBYAN L.; Lenahan C.; Pories S. et al. Metalloproteinases: promising tumor markers for breast cancer management. *Current Surgery*, vol. 61, n.3, p. 255-59, 2004.
 114. LOO W.T.; Cheung M.N.; Chow L.W. Production of matrix metalloproteinases in specific subpopulations of human-patient breast cancer invading in three dimensional culture system. *Life Sciences*, vol. 76, n.7, p. 743-752, Dec. 2004.
 115. TOI M.; Ishigaki S.; Tominaga T. Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 52, n. 1-3, p. 113-124, Nov.1998.
 116. HUHTALA P.; Tuuttila A.; Chow L.T. et al. Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 226, n. 25,

- p. 16485-490, Sep. 1991.
117. NAKOPOULOU L.; Tsirmpa I.; Alexandrou P. et al. MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol.77, n. 2, p. 145-155, Jan. 2003.
 118. HIRVONEN R.; Talvensaari-Mattila A.; Paakko P.; Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in T1-2N0 breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 77, n. 1, p. 85-91, Jan. 2003.
 119. LI H.C.; Cao D.C.; Liu Y. et al. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 88, n. 1, p. 75-85, Nov. 2004.
 120. PACHECO M.; Mourão M.; Mantovani E.B. et al. Expression of gelatinases A and B, stromelysin-3 and matrilysin genes in breast carcinomas: clinico-pathological correlations. *Clinical and Experimental Metastasis*, vol.16, p. 577–585, 1998.
 121. TALVENSAARI-MATTILA A.; Turpeenniemi-Hujanen T. Preoperative serum MMP-9 immunoreactive protein is a prognostic indicator for relapse-free survival in breast carcinoma. *Cancer Letters*, vol. 217, n.2, p. 237-242, Jan. 2005.
 122. ZHOU Y.; Yu C.; Miao X. et al. Substantial reduction in risk of breast cancer associated with genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 genes. *Carcinogenesis*, vol. 25, n. 3, p. 399-404, 2004.
 123. THOMPSON M.; McInnes R. R.; Willard H. F. Variação Genética, Polimorfismo e Mutação. In: THOMPSON M.; McInnes R. R.; Willard H. F. *Thompson & Thompson Genética Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, cap. 6, p. 82-99.
 124. VASKU A.; Goldbergova M.; Holla L.I. et al. Two MMP-2 promoter polymorphisms (-790T/G and -735C/T) in chronic heart failure. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 41, n. 10, p.1299-303, Oct. 2003.
 125. PETERS D.G.; Kassam A.; Jean P.A. et al. Functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter as a potential risk factor for intracranial aneurysm. *Stroke*, vol. 30, p. 2612 – 2616, 1999.
 126. PÖLLÄNEN P.J.; Karhunen P.J.; Mikkelsen J. et al. Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene (an autopsy study). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 21, p. 1446-1450, 2001.
 127. JONES G.T.; Phillips V.L.; Harris E.L. et al. Functional matrix metalloproteinase-9

- polymorphism (C-1562T) associated with abdominal aortic aneurysm. *Journal of Vascular Surgery*, vol. 38, p. 1363-1367, Dec. 2003.
128. ZHANG B.; Ye S.; Herrmann S. et al. Functional polymorphism in the regulatory region of the gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*, vol.99, p.1788-94 Apr. 1999.
 129. BLANKENBERG S.; Rupprecht H.J.; Poirier O. et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase-9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*, vol.107, n. 12, p.1579-85, Apr. 2003.
 130. VASKU A.; Goldbergova M.; Holla L.I. et al. A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease. *Matrix Biology*, vol. 22, p. 585-591, 2004.
 131. LAMBLIN N.; Bauters C.; Hermant X. et al. Polymorphisms in the promoter regions of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-12 genes as determinants of aneurysmal coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 40, p.43-8, 2002.
 132. YU C.; Zhou Y.; Miao X. et al. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Research*, vol. 64, n. 20, p. 7622–7628, Oct. 2004.
 133. MIAO X.; Yu C.; Tan W. et al. A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (-136C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Research*, vol. 63, n.14, p. 3987-3990, Jul. 2003.
 134. YU C.; Pan K.; Xing D. et al. Correlation between a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer. *Cancer Research*, vol. 62, n.22, p. 6430-6433, Nov. 2002.
 135. ZHOU Y.; Yu C.; Miao X. et al. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 and lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, vol. 26, p.1117-1121, Jun. 2005.
 136. XUA E.; Laia M.; Lva B. et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter is associated with colorectal cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 324, p. 999–1003, 2004.
 137. LIN A.; Lo S.; Liu C. et al. Functional genotype in matrix metalloproteinase-2 promoter is a risk factor for oral carcinogenesis. *Journal of Oral Pathology and Medicine* vol. 33, n. 7, p. 405-409, Aug. 2004.

138. PORNCHAI O.; Patchariya K. The role of genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes in head and neck cancer. *Oral oncology* 2005 – article *in press*.
139. GRIEU F.; Li W.Q.; Iacopetta B. Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 88, n.3, p. 197-204, Dec. 2004.
140. WANG Y.; Fang S.; Wei L. et al. No association between the C-1562T polymorphism in the promoter of matrix metalloproteinase-9 gene and non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, vol. 49, n.2, p.155-161, Aug. 2005.
141. MATSUMURA S.; Oue N.; Nakayama H. et al. A single nucleotide polymorphism in MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol.131, n. 1, p.19-25, Jan. 2005.
142. ZHANG J.; Jin X.; Fang S. et al. The functional SNP in the matrix metalloproteinase-3 promoter modifies susceptibility and lymphatic metastases in esophageal squamous cell carcinoma but not in gastric adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, vol. 25, n. 12, p. 2519 – 2524, Dec. 2004.
143. DUNLEAVEY L.; Beyzade S.; Ye S. Rapid genotype analysis of the matrix metalloproteinase-1 gene 1G/2G polymorphism that is associated with risk of cancer. *Matrix Biology*, vol. 19, p. 175-177, 2000.
144. KANAMORI Y.; Matsushima M.; Minaguchi T. et al. Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region. *Cancer Research*, vol. 59, n. 17, p.4225-27, Sep. 1999.
145. NOLL W.W.; Belloni D.R.; Rutter J.L. et al. Loss of heterozygosity on chromosome 11q22-23 in melanoma is associated with retention of the insertion polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter. *American Journal of Pathology*, vol. 158, n.2, p.691-697, 2001.
146. HIRATA H.; Naito K.; Yoshihiro S. et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter is associated with conventional renal cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, vol. 106, n.3, p. 372-374, 2003.
147. PRICE S.J.; Greaves D.R.; Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n.10, p.7549-7558, Mar. 2001.

148. VASKU V.; Vasku A.; Tschöplová S. et al. Genotype association of C(-735)T polymorphism in matrix metalloproteinase 2 gene with G(8002)A endothelin 1 gene with plaque psoriasis. *Dermatology*, vol. 204, n. 4, p. 262-265, 2002.
149. ZHANG B.; Henney A.; Eriksson P. et al. Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13-1. *Human Genetics*, vol.105, p. 418-423, 1999.
150. ST. JEAN P.L.; Zhang X.C.; Hart B.K. et al. Characterization of a dinucleotide repeat in the 92 kDa type IV collagenase gene, localization of CLG4B to chromosome 20 and the role of CLG4B in aortic aneurysmal disease. *Annals of Human Geneics*, vol.59, p.17–24, 1995.
151. SHIMAJIRI S.; Arima N.; Tanimoto A. et al. Shortened microsatellite d(CA)21 sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *FEBS Letters*, vol. 455, n. 1, p. 70-74, Jul. 1999.
152. YE S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biology*, vol. 19, p. 623-629, 2000.

VII. ARTIGO CIENTÍFICO

Análise de polimorfismos na região promotora dos genes das metaloproteinases 2 e 9 no carcinoma de mama. Estudo de casos e controles.

VII.1. Resumo

As metaloproteinases (MMPs) são enzimas responsáveis pela maior parte da degradação da matriz extracelular (MEC), sendo capazes de lisar todos seus componentes. Elas estão envolvidas em diversos processos patológicos, incluindo invasão tumoral e surgimento de metástases. Polimorfismos funcionais em um único nucleotídeo (SNPs) na região promotora das MMPs 2 (C-1306T) e 9 (C-1562T) estão associados a alterações na atividade transcricional desses genes e ao risco de desenvolvimento de câncer. Neste estudo de casos e controles foi examinada a frequência destes SNPs numa amostra de uma população com alta incidência de câncer de mama. Foram analisadas 96 pacientes em acompanhamento no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA) e 100 mulheres hípidas, doadoras do Banco de Sangue da mesma instituição. Os genótipos observados para *MMP2* foram: 70% CC, 24% CT e 6% TT nas pacientes e 66% CC, 32% CT e 2% TT nos controles ($p=0,22$) e para *MMP9*: 80% CC, 20% CT e 0% TT nas pacientes e 83% CC, 15% CT e 2% TT nos controles ($p=0,23$). Os polimorfismos foram ainda correlacionados com características clinicopatológicas das pacientes, tais como: idade no momento do diagnóstico, menarca antes dos 11 anos, história familiar de câncer de mama, tipo e grau histológicos, invasão vascular, estadiamento (TNM) e reatividade imunohistoquímica (IMQ) para receptores de estrógeno (RE) e de progesterona (RP), p53 e c-erbB-2. Não foi observada associação estatística entre os SNPs e as características fenotípicas. Na presente amostra, os polimorfismos *MMP2* C-1306T e *MMP9* C-1562T não apresentaram associação significativa com risco de desenvolvimento de câncer de mama e nem com as características fenotípicas analisadas.

Palavras-chave: metaloproteinases, polimorfismos, carcinoma da mama.

VII.2. Introdução

A capacidade de invasão tumoral e o desenvolvimento de metástases à distância são as principais causas de falha no tratamento do câncer. Para atingir este objetivo, as células neoplásicas necessitam romper barreiras teciduais e migrar através da MEC (1,2). A MEC é uma estrutura complexa, cuja estabilidade depende do equilíbrio entre a proteólise, por meio de enzimas catalíticas, e seus mecanismos inibitórios (3,4). A maior parte da degradação da matriz é realizada pelas MMPs: uma família de 24 enzimas zinco-dependentes, com atividade proteolítica sobre proteínas do tecido conjuntivo (3,5,6,7). Alterações das MMPs têm sido relacionadas com os processos de proliferação celular, invasão tumoral, angiogênese e metastatização (6,7,8,9,10).

Estudos têm mostrado que a expressão das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) está alterada nas neoplasias malignas, incluindo o câncer de mama (1,2,8,11,12). Recentemente, pesquisas têm analisado o papel de SNPs na região promotora das gelatinases, como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama (13,14).

Dentre os polimorfismos identificados no promotor da *MMP2*, um SNP na posição – 1306 altera um sítio de ligação Sp1 (CCACC box), diminuindo a atividade transcricional. No estudo de Price et al, a troca de uma citosina (C) por uma timidina (T) resultou na diminuição da expressão da MMP-2 em macrófagos e células epiteliais (15). Yu et al, analisando uma amostra chinesa, encontraram risco de desenvolver carcinoma de pulmão duas vezes menor em indivíduos com os genótipos CT ou TT (16). O mesmo grupo de pesquisadores demonstrou uma diminuição de 3 vezes no risco de desenvolver adenocarcinoma de cárdia em portadores do alelo T (17). Ainda, estudos na China, Taiwan e Tailândia encontraram associações de risco semelhantes em relação à carcinogênese esofágica, colorretal, oral e nos tumores de cabeça e pescoço (18,19,20,21). Considerando o carcinoma de mama, Zhou et al detectaram que a presença do alelo T confere efeito protetor sobre o risco de câncer. No entanto, não houve associação entre os genótipos, o estadiamento e a expressão de RE (14). Por outro lado, Grieu et al, estudando indivíduos caucasianos, mostraram associação significativa entre o genótipo TT e tumores menores e RE negativos. Na mesma amostra, pacientes com o genótipo TT e RE negativas apresentaram menores taxas de sobrevida ($p < 0,001$) (13).

Um SNP específico na região promotora da *MMP9* foi descrito por Zhang et al (22). A substituição do alelo C pelo T, na posição -1562 resulta na perda de um sítio de ligação de uma proteína repressora da transcrição, gerando um aumento de 1,5 vezes na atividade do promotor. Este polimorfismo já foi relacionado com doenças cardiovasculares por vários autores (22,23,24,25). Entretanto, existem poucos estudos sobre a troca *MMP9* C-1562 T e neoplasias malignas. Matsumura et al demonstraram associação entre o alelo T, invasão tecidual e linfática e estágio clínico em pacientes japoneses com carcinoma gástrico (26). Porém, neste mesmo estudo, não foi estabelecida associação entre o polimorfismo e o risco de câncer. Wang et al, estudando casos de carcinoma pulmonar do tipo não-pequenas células e controles hígidos, na China, não observaram diferença nas freqüências dos genótipos CC, CT e TT (27). Até o momento, somente o estudo de Grieu et al avaliou o SNP *MMP9* C-1562 T em carcinoma mamário. Estes autores, analisando um grupo de pacientes caucasianas, mostraram que, portadoras dos genótipos CT ou TT apresentaram uma tendência de melhor prognóstico, quando comparadas com portadoras do genótipo CC ($p=0,06$). Foi detectada ainda, correlação entre a presença do alelo T e tumores de tipo histológico não ductal, RE positivos e ausência de mutação no gene *TP53* ($p<0,05$) (13).

Porto Alegre é a cidade brasileira com maior incidência e maior taxa de mortalidade por neoplasia de mama (28). Em 2006, na cidade de Porto Alegre, são estimados 146,83 novos casos da doença para cada 100.000 habitantes (28).

O objetivo deste estudo foi analisar as freqüências dos polimorfismos *MMP2* C-1306 T e *MMP9* C-1562 T em pacientes com câncer de mama e em controles hígidos, provenientes de uma população brasileira com alta incidência desta neoplasia, e correlacioná-las com as características fenotípicas das pacientes.

VII.3. Metodologia

VII.3.1. Amostra

A amostra foi constituída de 96 mulheres com carcinoma de mama e 100 controles hígidos. Foram considerados casos, mulheres com diagnóstico de carcinoma primário da mama, através de exame anatomopatológico de espécime cirúrgico e sob acompanhamento oncológico no CHSCPA. Os casos foram alocados consecutivamente, no Ambulatório de Mastologia entre janeiro e maio de 2005. As informações clínicas e histopatológicas das

pacientes são referentes ao momento do diagnóstico e seguem os procedimentos padronizados pela instituição. As pacientes foram estadiadas conforme a Classificação de Tumores Malignos - TNM (29) para neoplasias da mama. Dentre as 96 pacientes, 19 foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante. Os controles foram mulheres híginas, sem história pessoal e familiar de carcinoma de mama, doadoras do Banco de Sangue do CHSCPA. Todas as participantes do estudo assinaram termo de consentimento informado. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CHSCPA (protocolo número 1051/05).

VII.3.2. Análise Molecular

VII.3.2.1. Extração de DNA

DNA genômico foi extraído de sangue periférico dos casos e controles, através do UltraClean® DNA Blood Spin kit- MO BIO Laboratories Inc. (Solana Beach, CA - US).

VII.3.2.2. Determinação dos Genótipos - *MMP2*

Os genótipos para *MMP2* foram determinados por reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de seqüenciamento de DNA. Os *primers* e as condições do PCR foram semelhantes aos utilizados por Zhou et al (14). O fragmento de 295 pb de DNA englobando o sítio do polimorfismo foi amplificado com os seguintes *primers*: senso 5'-CTG ACC CCC AGT CCT ATC TGC C e antisenso 5'- TGT TGG GAA CGC CTG ACT TCA G. As condições do PCR foram: etapa inicial de 2 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 64°C, 45 s a 72°C e uma etapa final de 7 min a 72°C. Em todas as reações foi utilizada Taq DNA polymerase Platinun – Invitrogen/Life Technologies (São Paulo, BR). O produto de PCR foi purificado, através do Concert® Rapid PCR Purification System kit - GibcoBRL/Life Technologies (Germany, US, UK). As amostras foram seqüenciadas com Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems (Foster City, CA - US) para analisar a posição – 1306. Foi utilizado o ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

VII.3.2.3. Determinação dos Genótipos - *MMP9*

O polimorfismo *MMP9* C-1562T foi determinado por PCR-RFLP (*restriction fragment*

length polymorphism). Os *primers* utilizados foram: sentido 5'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC e antisenso 5'- CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC. As condições do PCR foram: etapa inicial de 2 min a 94°C seguida por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 1,5 min a 72°C, e uma etapa final de 10 min a 72°C. Nas reações foi utilizada a enzima Taq DNA polymerase Platinun - Invitrogen/Life Technologies (São Paulo, BR). O fragmento amplificado de 435 pb foi submetido à digestão *overnight*, a 37 °C, com a enzima de restrição *SphI* - New England Biolabs (Beverly, MA – US). Após a digestão, os fragmentos foram separados em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídeo. Na presença do alelo T a endonuclease cliva o fragmento, observando-se duas bandas (188 e 247 pb). Na situação contrária, o fragmento amplificado permanece inteiro, observando-se uma banda (435 pb). Dez por cento dos genótipos foram confirmados, randomicamente, através de seqüenciamento de DNA, conforme as condições descritas acima.

VII.3.3. Análise Estatística

Foi realizado cálculo do tamanho amostral, considerando $p\alpha \leq 0,05$ e $p\beta = 20\%$.

O teste Exato de Fisher foi aplicado para avaliar a variação das freqüências dos genótipos entre casos e controles e para determinar a relação entre os genótipos e as características clinicopatológicas. O teste T Student foi utilizado para analisar as diferenças etárias entre os grupos. O ajuste etário foi realizado através de um modelo de regressão logística. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado e as freqüências dos genótipos observadas e esperadas foram comparadas, aplicando-se o teste Qui-quadrado. Todos os testes utilizados foram bi-caudais. Consideraram-se estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada através do SPSS 11.0 *software package* (Chicago, IL, US).

VII.4. Resultados

Os dados referentes às características demográficas (idade e cor) da amostra estão sumarizados na Tabela 2 (Anexo E).

Houve uma diferença significativa na distribuição etária entre casos e controles. Entre os controles, a idade média foi de 34,06 anos (18-59 anos) *versus* uma média de 55,21 anos nos casos (37-89 anos) $p < 0,000$. Esta diferença foi ajustada através de um modelo de regressão logística.

As frequências observadas dos genótipos para *MMP2* e *MMP9* estão expressas na Tabela 3 (Anexo E).

O polimorfismo *MMP2* C-1306T foi investigado em 89 pacientes e em 100 controles. A frequência do alelo C, nos casos e nos controles, foi de 0,82. Em relação ao alelo T, as frequências observadas foram: 0,17 nos casos e 0,18 nos controles. Estes números encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,23$ e $p=0,70$). Os genótipos apresentaram as seguintes distribuições: 70% CC, 24% CT e 6% TT entre as pacientes e 66% CC, 32% CT e 2% TT nos controles. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0,22$). Esse polimorfismo também não mostrou correlação com as características fenotípicas das pacientes (Tabela 4, Anexo E). Devido à raridade do genótipo TT na amostra, foi realizada uma análise conjunta dos genótipos TT e CT, para averiguar o impacto da presença do alelo T sobre os desfechos estudados. Da mesma forma, a análise dos genótipos combinados não apresentou relação significativa com risco de desenvolver carcinoma da mama ($p=0,53$), e tampouco com o perfil clinicopatológico das pacientes.

O polimorfismo *MMP9* C -1562 T foi estudado em 96 pacientes e 100 controles. Os resultados da genotipagem de 10% da amostra, randomicamente selecionados, através de seqüenciamento de DNA, confirmaram os encontrados pela técnica de PCR-RFLP em 100% dos casos. As frequências observadas nos casos e nos controles foram, respectivamente, 0,89 e 0,90 para o alelo C e 0,10 e 0,09 para o alelo T. Essas frequências estão de acordo com a Lei de equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,52$ e $p=0,44$). A distribuição dos genótipos nas pacientes foi de 80% CC, 20% CT e 0% TT e, entre os controles, foi de 83% CC, 15% CT e 2% TT (Tabela 3, Anexo E). Não houve associação entre o polimorfismo e o risco de carcinoma mamário nas análises individuais dos genótipos ($p=0,23$), e nem na combinada (CT+TT *versus* CC) ($p=0,58$). Assim como para o gene da MMP-2, não foi detectada correlação com as características fenotípicas das pacientes (Tabela 4, Anexo E).

Foi analisada ainda, a possibilidade de correlação entre os polimorfismos e alguns fatores de risco para desenvolvimento da neoplasia (30), como história familiar de câncer de mama (parentes em primeiro grau) e menarca precoce (antes dos 11 anos). Entretanto, não foi detectada associação alguma. Nuliparidade e menopausa tardia (após os 54 anos) ocorreram somente em 5 pacientes da amostra, impossibilitando a aplicação de testes estatísticos. Informações a respeito da idade da primeira gestação a termo, amamentação, uso de esteróides exógenos, exposição à radiação ionizante, medidas antropométricas,

consumo de álcool e dieta não foram obtidas.

Considerando as 19 pacientes (19,7%) submetidas à quimioterapia neoadjuvante, somente 3 obtiveram regressão no estadiamento. As alterações (IIIA→IIB; IIIB→IIA; IIIB→IIB) não influenciaram os resultados.

Por fim, foi investigada a possibilidade de relação entre os dois polimorfismos. A chance de ter ambas as variações nos genes das MMPs 2 e 9 não apresenta correlação estatística ($p=0,54$), sugerindo que tais polimorfismos são independentes entre si.

VII.5. Discussão

SNPs na região promotora de genes de MMPs e suas relações com o risco de câncer e com características clinicopatológicas têm sido investigados por vários grupos de pesquisadores.

Neste estudo foram analisadas as freqüências de dois polimorfismos funcionais nos promotores das *MMPs* 2 e 9 em casos e câncer de mama e controles hígidos. Estes também foram comparados com aspectos fenotípicos das pacientes, tais como: idade no momento do diagnóstico, menarca antes dos 11 anos, história familiar, tipo e grau histológicos, invasão vascular, estadiamento (TNM), *status* linfonodal, e reatividade IMQ para RE, RP, p53 e c-erbB-2.

Considerando os genótipos para *MMP2* nos controles, a freqüência encontrada para o alelo T foi menor do que a observada por Lamblin et al e Price et al em populações caucasianas (0,18 *versus* 0,23/0,26) (31,15), entretanto, foi semelhante à publicada por Zhou et al na China (14). Já, nos casos a freqüência observada para o alelo T foi maior do que a freqüência nas pacientes chinesas (0,17 *versus* 0,09) (14). No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos nos casos e nos controles. É importante ressaltar que a amostra estudada provém de uma população com características raciais e étnicas distintas das acima citadas e isto pode se refletir nos padrões genéticos e na suscetibilidade em relação às neoplasias. Em concordância com este aspecto, Grieu et al (13), em um estudo australiano não controlado encontraram, em pacientes com câncer de mama, uma freqüência para o alelo T similar à demonstrada por Price et al, em uma amostra de caucasianos hígidos (15). De acordo com Mason et al, pacientes caucasianas e afro-americanas com carcinoma de mama possuem padrões distintos de expressão de MMPs (32). A população brasileira apresenta considerável heterogeneidade étnica e racial, com

influências caucasianas, africanas e indianistas. Este fato poderia explicar a prevalência do polimorfismo *MMP2* C-1306 T encontrada. Até o momento, este é o primeiro estudo latino-americano e o segundo mundial, abordando a associação deste polimorfismo com o risco de desenvolvimento de câncer de mama. Mais pesquisas são necessárias, especialmente em populações latino-americanas e com amostras maiores. Outro aspecto que poderia explicar nossos resultados seria o método molecular utilizado. Neste estudo, as seqüências de DNA foram investigadas diretamente por seqüenciamento, técnica considerada padrão ouro para detectar variações em genes conhecidos. Isto contrasta com os métodos de menor sensibilidade e especificidade utilizados em estudos prévios: *fluorescent strand conformation polymorphism* (F-SSCP), *denaturing high-performance liquid chromatography* (DHPLC) e *allele-specific oligonucleotide hybridization*.

Não foi encontrada associação entre os genótipos *MMP2* e as características fenotípicas das pacientes. Resultados semelhantes foram previamente descritos em câncer de mama (estadiamento, RE e RP) e adenocarcinoma de cárdia (metástases) (14,17). Grieu et al não demonstraram relação entre os genótipos e comprometimento linfonodal, tipo e graduação histológicos, ploidia e mutação no gene *TP53* (13). Contudo, no mesmo estudo, foi observada uma correlação inesperada entre portadoras do genótipo TT e baixa concentração de RE. Ainda, pacientes RE-positivas/TT apresentaram maior sobrevida do que pacientes RE-positivas/CC-CT e RE-negativas/TT (13). A expressão IMQ de MMP-2 parece ser capaz de agregar informação prognóstica (33,34,35), contudo, o mesmo não parece ocorrer com o polimorfismo *MMP2* C-1306 T. Os escassos estudos existentes relacionando este SNP com a expressão de RE e curvas de sobrevida não apresentam dados consistentes para acreditar que este SNP seja um marcador de prognóstico.

A freqüência da variação *MMP9* C- 1562 T nos controles neste estudo foi menor do que a publicada por Zhang et al, analisando as variações genéticas da *MMP9* (0,09 x 0,19) em 188 indivíduos hígidos, caucasianos (22). A freqüência, nas pacientes com câncer de mama, também mostrou-se menor do que a encontrada em casos de carcinoma gástrico no Japão e de carcinoma pulmonar na China (26,27). Uma possível explicação poderia ser o tamanho amostral de 100 controles. No entanto, considerando que as freqüências observadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi realizada uma simulação estatística, inferindo-se um tamanho amostral superior a 4000. Estes dados sugerem que a presença do alelo T, na posição -1562 tende a ter impacto restrito, pelo menos na amostra estudada. Além disso, em concordância com as publicações existentes, não foi observada diferença

nas frequências dos genótipos entre casos e controles.

A alteração da seqüência regulatória de 9-pb (- 1567 a - 1559) na região promotora da *MMP9*, foi analisada em apenas dois estudos em carcinogênese (gástrica e pulmonar). Nenhum deles mostrou relação entre o polimorfismo *MMP9* -1562 C/T e o risco de câncer (26,27). Resultado semelhante foi encontrado neste estudo em câncer de mama.

Embora a enzima MMP-9 apresente níveis séricos, urinários e expressão IMQ elevados na maioria dos estudos em carcinoma de mama (1,33,35) e esteja associada a características fenotípicas agressivas, a troca C/T não parece contribuir com esse fato. Assim como Wang et al, em estudo de casos de carcinoma de pulmão de tipo não-pequenas células, no presente estudo não foi evidenciada relação entre os genótipos e as características clinicopatológicas (27). A influência esperada do alelo T, no promotor da *MMP 9*, sobre a presença de doença linfonodal e metastática pode não ocorrer.

Em resumo, neste estudo, não foi encontrada associação entre os polimorfismos na região promotora *MMP2* C-1306 T e *MMP9* C-1562 T, risco de carcinoma de mama e nem entre características clinicopatológicas das pacientes. Outros fatores que contribuam para nossa alta incidência e mortalidade por câncer de mama devem ser pesquisados.

VII.6. Referências Bibliográficas

1. Toi M, Ishigaki S, Tominaga T: Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Breast Cancer Res Treat* 52: 113-124, 1998.
2. Garbett EA, Reed MWR, Stephenson TJ, Brown NJ: Proteolysis in human breast cancer. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 53: 99-106, 2000.
3. Zigrino P, Loffeck S, Mauch C: Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochimie* 87: 321-328, 2005.
4. Maquart FX, Bellon G, Pasço S, Monboisse JC: Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie* 87: 353-360, 2005.
5. Nagase H, Woessner F: Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 31: 21491-21494.

6. Westermarck J, Kahari V: Regulation of matrix metalloproteinases expression in tumor invasion. *FASEB J* 13:781-792, 1999.
7. Ala-aho R, Kahari V: Collagenases in cancer. *Biochimie* 87: 273-286, 2005.
8. Giambernardi TA, Gant GM, Klebe RJ et al: Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biol* 16: 483-496, 1998.
9. Curran S, Murray GI: Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36: 1621-1630, 2000.
10. Chang C, Werb Z: The many faces of matrix metalloproteinases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastases. *Trends Cell Biol* 11: S37-S43, 2001.
11. Bartsch JE, Staren ED, Appert HE: Matrix metalloproteinase expression in breast cancer. *J Surg Res* 110:383-392, 2003.
12. Loo WTY, Cheung MNB, Chow LWC: Production of matrix metalloproteinases in specific subpopulations of human-patient breast cancer invading in three dimensional culture system. *Life Sciences* 76:743-752, 2004.
13. Grieu F, Li WQ, Iacopetta B: Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 88: 197-204, 2004.
14. Zhou Y, Yu C, Miao X et al: Substantial reduction in risk of breast cancer associated with genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 genes. *Carcinogenesis* 25(3): 399-404, 2004.
15. Price SJ, Greaves DR, Watkins H: Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene. *J Biol Chem* 276:7549-7558, 2001.
16. Yu C, Pan K, Xing D et al: Correlation between a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer. *Cancer Res* 62(22): 6430-6433, 2002.

17. Miao X, Yu C, Tan W et al: A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (-136C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res* 63: 3987-3990, 2003.
18. Yu C, Zhou Y, Miao X et al: Functional haplotypes in the promoter of the matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res* 64:7622-7628, 2004.
19. Xu E, Lai M, Lv B et al: A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter is associated with colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 999-1003, 2004.
20. Lin A, Lo S, Liu C et al: Functional genotype in matrix metalloproteinase-2 promoter is a risk factor for oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 33: 405-409, 2004.
21. Pornchai O, Patchariya K: The role of genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes in head and neck cancer. *Oral Oncol*, 2005 – article in press.
22. Zhang B, Ye S, Herrmann S et al: Functional polymorphism in the regulatory region of the gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 99:1788-1794, 1999.
23. Jones GT, Philips VL, Harris EL et al: Functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C-1562T) associated with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 38:1363-1367, 2003.
24. Pöllänen PJ, Karhunen PJ, Mikkelsen J et al: Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene (an autopsy study). *Arterioscler, Thromb Vasc Biol* 21:1446-1450, 2001.

25. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O et al: Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase-9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 107:1579-1585, 2003.
26. Matsumura S, Oue N, Nakayama H et al: A single nucleotide polymorphism in MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 131:19-25, 2005.
27. Wang Y, Fang S, Wei L et al: No association between the C-1562T polymorphism in the promoter of matrix metalloproteinase-9 gene and non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 49:155-161, 2005.
28. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Ministério da Saúde. Available by <http://www.inca.gov.br> (Nov. 2005).
29. UICC: União Internacional Contra o Câncer. TNM Classificação de Tumores Malignos. 6 ed. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer, 2004.
30. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, et al: Breast Cancer. *Lancet* 365:1727-1741, 2005.
31. Lamblin N, Bauters C, Hermant X et al: Polymorphisms in the promoter regions of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-12 genes as determinants of aneurysmal coronary artery disease. *J Amer Col Cardiol* 40:43-48, 2002.
32. Mason JA, Fancy HF, Lashley K et al: Comparative study of matrix metalloproteinase expression between african american and caucasian women. *J Carcinogenesis* 3:15-20, 2004.
33. Li HC, Cao DC, Liu Y et al: Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 88: 75-85, 2004.

34. Turpeenniemi-Hujanen T: Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 87: 287-297, 2005.
35. Garibyan L, Lenahan C, Pories S: Metalloproteinases: promising tumor markers for breast cancer management. *Cur Surg* 61: 255-259, 2004.

VIII. ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS

Analysis of polymorphisms in the promoters of matrix metalloproteinases 2 and 9 genes in breast cancer. A case-control study.

VIII.1. Abstract

Matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in the control of the extracellular matrix (ECM) proteolytic balance. They are involved in tumor invasion and metastasis. Functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoters of *MMP2* (C-1306T) and *MMP9* (C-1562T) have been associated with these genes transcriptional activity and with cancer risk development and phenotypic features. In this study we examined the frequencies of these polymorphisms in a population with high incidence of breast cancer. The study sample was 96 breast cancer patients and 100 control healthy women. *MMP2* genotype distribution was 70% CC, 24% CT and 6% TT for patients and 66% CC, 32% CT and 2% TT for controls ($p=0.22$). Concerning to *MMP9* the genotypes detected were 80% CC, 20% CT and 0% TT for patients and 83% CC, 15% CT and 2% TT for controls ($p=0.23$). No association was found between these polymorphisms and breast cancer occurrence. Comparing *MMP2* C-1306T and *MMP9* C-1562T with patients' age at diagnosis, menarche before 11 years old, familiar history, histological grade and type, vascular invasion, TMN stage, and immunohistochemical (IHC) reactivity for hormone receptors (HR), p53 and c-erbB-2 no correlation was showed. We conclude that *MMP2* C-1306T and *MMP9* C-1562T SNPs may not be associated with breast cancer risk development, neither with clinicopathological features in our population.

Key words: matrix metalloproteinases, polymorphisms, breast cancer

VIII.2. Introduction

Tumor invasion and metastasis formation are the first causes of cancer treatment

failure and death. To get these, neoplastic cells require proteolytic degradation of the ECM (1, 2). The ECM is a complex structure, which stability depends on the balance between catalytic proteinases and their inhibitors mechanisms (3,4). The majority of matrix degradation is mediated by MMPs: a family of 24 zinc-dependent enzymes, with proteolytic activity against connective tissue proteins (3,5,6,7). It's well documented that MMPs' overexpression is related with cell proliferation, cancer cell invasion, angiogenesis and metastasis (6,7,8,9,10).

Studies have shown that gelatinases (MMP-2 and MMP-9) expression is altered in various neoplastic processes, including breast cancer (1,2,8,11,12). Recently, studies have been focused on SNPs in gelatinases' promoter region and its role as a risk factor for breast cancer (13,14).

Some SNPs were identified in the *MMP2* promoter. A specific functional SNP in the position – 1306 abolishes a Sp1 binding site (CCACC box), resulting in lower promoter activity. The transition of the wild-type cytosine (C) allele by the thymidine (T) allele showed that the *MMP2* gene expression was diminished in both epithelial cells and macrophages (15). Yu et al, analyzing a Chinese sample, found that individuals with the CT or TT genotypes have 2-fold diminished risk for developing lung cancer (16). The same researchers group demonstrated a diminished risk (3-fold) to T allele carriers for gastric cardia adenocarcinoma (17). Yet, researches in China, Taiwan and Thailand found similar risk association, concerning esophageal, colorectal, oral and head and neck carcinogenesis (18,19,20,21). For breast cancer, in spite of the similar polymorphism protecting effect, found by Zhou et al, no association was detected between its and TNM stage or estrogen receptor (ER) status (14). On the other hand, Griebel et al, in a case-series of Caucasian individuals showed significant association between TT genotype and small and ER negative tumors. In the same sample TT homozygous patients with ER negative tumors had poor survival rates ($p < 0.001$) (13).

In 1999, Zhang et al reported a functional SNP in the *MMP9* promoter region (22). A C to T substitution, at position -1562, results in the loss of a binding site for a transcription repressor protein and in a consequential 1.5-fold increase in promoter activity. This polymorphism was related with vascular diseases by various authors (22,23,24,25). There are few and controversial studies about *MMP9* C-1562 T and malignancies. Matsumura et al demonstrated association between the T allele and invasive phenotype (tumor and lymphatic invasion and clinical stage) of gastric cancer in Japanese people (26). However, in the same study, no increase in risk of cancer development was linked to this allele. Wang et al studying

patients with non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and healthy controls, in China, found no different frequencies in CC, CT and TT genotypes (27). So far, just Grieu et al evaluated this *MMP9* promoter polymorphism in breast cancer. In this study, Caucasian patients with CT or TT genotypes had marginally, but not statistically significant, better prognosis compared to CC ones ($p=0.06$). Besides, the presence of T allele was associated with non-ductal type histology, positive ER status and lack of *TP53* mutation ($p<0.05$) (13).

Porto Alegre (South Brazil) has the highest breast cancer incidence and mortality of the country (28). For 2006, it is estimated a rate of 146.83 new cases for 100,000 inhabitants (28). For this reason we performed a case-control study to analyse the frequencies of *MMP2* C-1306 T and *MMP9* C-1562 T polymorphisms in breast cancer patients and healthy controls and compare it with clinicopathological features.

VIII.3. Methods

VIII.3.1. Subjects

The sample studied included 96 women with breast carcinoma and 100 healthy matched controls. Women diagnosed of primary breast cancer, by histological exam of surgical specimen, and under oncological treatment at the Complexo Hospitalar Santa Casa (CHSC), in Porto Alegre were considered eligible for this study. The 96 consecutive cases were allocated between January 2005 and May 2005. Information about clinical and histochemical features of the patients were assessed at the time of diagnosis, according to standard diagnostic classification. The patients were staged in accordance with the UICC Tumor-Node-Metastasis (TNM) (29) classification for breast cancer. Nineteen patients were submitted to neoadjuvant chemotherapy. The controls were healthy women blood donors, randomly assigned, at the same institution, with no familiar history of cancer. All participants signed a consent document. The study was approved by the Research Ethics Committee of CHSC (protocol number 1051/05).

VIII.3.2. Molecular Analysis

VIII.3.2.1. DNA extraction

Genomic DNA was extracted from peripheral whole blood of patients and controls

using a UltraClean® DNA Blood Spin kit- MO BIO Laboratories Inc. (Solana Beach, CA - US).

VIII.3.2.2. *MMP2* genotyping

MMP2 genotypes were screened by polymerase chain reaction (PCR) followed by DNA sequencing. The primers and PCR conditions were similar those described by Zhou et al. (14). A 295 bp DNA fragment of an area surrounding the polymorphism site was amplified with the following primers: *sense* 5'-CTG ACC CCC AGT CCT ATC TGC C and *antisense* 5'-TGT TGG GAA CGC CTG ACT TCA G. The PCR conditions were: after an initial step of 2 min at 94°C, there were 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 64°C, 45 s at 72°C and a final elongation of 7 min at 72°C. All reactions were conducted with Taq DNA polymerase Platinun – Invitrogen/Life Technologies (São Paulo, BR). The PCR product was purified using the Concert® Rapid PCR Purification System kit - GibcoBRL/Life Technologies (Germany, US, UK). The samples were sequenced to asses the – 1306 position with the Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems (Foster City, CA- US). It was used an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

VIII.3.2.3. *MMP 9* genotyping

The *MMP9* C-1562T polymorphism was determined by PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). The primers utilized were *sense* 5'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC and *antisense* 5'- CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC. The PCR analysis consisted of an initial step of 2 min at 94°C followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C, 1.5 min at 72°C, and an elongation step of 10 min at 72°C. The reactions were carried out using Taq DNA polymerase Platinun - Invitrogen/Life Technologies (São Paulo, BR). The amplified 435 bp DNA fragment was submitted to a digestion with the restriction enzyme *SphI* - New England Biolabs (Beverly, MA – US) at 37°C overnight and separated on an ethidium bromide-stained 2.5% agarose gel. If the T allele is present the endonuclease cleaves the fragment, resulting in two bands (188 and 247 bp). On the contrary, the PCR fragment remains entire. The genotypes were confirmed at random analysis of 10% of the samples by DNA sequencing, following the same procedures described above.

VIII.3.3. Statistical Analysis

Fisher's Exact test was used to evaluate the variation in the genotypes frequencies between cases and controls and to access the relation between the genotypes and the clinicopathological features. Student' T test was applied to analyze the age differences in the groups. A logistic regression model was used to the age adjustment. Hardy-Weinberg equilibrium was calculated comparing the genotype frequencies observed and expected using Chi-Square test. All tests were two-tailed. P-values < 0.05 were considered significant. Statistical analyses were performed using SPSS 11.0 software package (Chicago, IL, US).

VIII.4. Results

Sample's age and race are summarized in Table 2 (Anexo E).

There was a significant difference in age distribution between the groups. Controls' age median was 34.06 years (18-59 years) versus patients' age median of 55.21 years old (37-89 years) $p < 0.000$.

The genotypes frequencies for *MMP2* and *MMP9* polymorphisms in the study subjects are expressed in Table 3 (Anexo E).

MMP2 genotypes were analysed in 89 patients and 100 healthy controls. The cases and controls frequencies were, respectively, 0.83 and 0.82 for C allele and 0.17 and 0.18 for T allele. These numbers are in Hardy-Weinberg equilibrium ($p = 0.23$ and $p = 0.70$). Genotypes distributions were 70% CC, 24% CT and 6% TT for patients and 66% CC, 32% CT and 2% TT for controls. There was no significant difference in genotypes between the groups ($p = 0.22$). The *MMP2* -1306C/T polymorphism did not correlate with patients' clinicopathological features (Table 4) (Anexo E).

Since the TT genotype was very rare in our sample, we combined the TT and CT genotypes to study the role of the T allele in breast cancer development and in patients' phenotypic features. The combined analyses did not show significant influence on tumor risk development ($p = 0.53$), neither on phenotypic features.

MMP9 -1562 C/T polymorphism was assessed in 96 patients and 100 controls. The results from the 10% re-genotyped, using DNA sequencing, completely matched the PCR-RFLP ones. The frequencies for cases and controls were, respectively, 0.89 and 0.90 for C

allele and 0.10 and 0.09 for T allele. These frequencies also fitted with Hardy-Weinberg equilibrium law ($p=0.52$ and $p=0.44$). Genotypes distribution in patients was 80% CC, 20% CT and 0% TT. Among controls we had 83% CC, 15% CT and 2% TT (Table 3, Anexo E). No association was found between the polymorphism and cancer susceptibility ($p=0.23$), neither in combined (CT+TT versus CC) analyses ($p=0.58$). No correlation was detected either, when we compared the genotypes with patients clinicopathological features (Table 4) (Anexo E).

We also analysed the possibility of linkage between the polymorphisms and some known risk factors (30), like having first-degree relatives with history of breast cancer and menarche before 11 years old, but no association was founded. Nulliparity and menopause after 54 years old occurred both in only 5 patients; a small amount for applying statistic methods. We had no information about other risk factors like: age at first full pregnancy, breastfeeding, use of exogenous hormones, exposure to ionizing radiation, anthropometric indices, alcohol consumption and dietary factors.

The chance of having both *MMP 2/MMP 9* polymorphisms was also investigated. A lack of association was seen ($p=0.54$), suggesting that these genetic variations are independent from each other.

VIII.5. Discussion

SNPs in promoter region of MMPs genes have been investigated by research groups and have been associated with cancer risk and phenotypic features.

In the present study we analysed the frequencies of two functional SNPs in promoter region of *MMPs 2* and *9* genes in breast cancer women and healthy controls. We also compared them with patients' clinicopathological characteristics, including age at diagnosis, menarche before 11 years old, familiar history, histological grade and type, vascular invasion, TNM stage, lymph node status, and IHC reactivity for ER, PR, p53 and c-erbB-2.

Concerning to *MMP2* genotypes in controls, the T allele frequency observed was lower than the number reported by Lamblin et al and Price et al in a healthy Caucasian population (0.18 versus 0.23/0.26) (31,15) and was similar to that published by Zhou et al in Chinese people (14). However, our cases had a higher T allele frequency than Chinese patients (0.17 versus 0.09) (14). We found no significant difference in genotypes between cases and controls. It is important to remember that we have studied a distinct ethnic population and this

may reflect on the genetic patterns and susceptibility to malignancies, which includes breast cancer. In agreement with that, Grieu et al (13), which analysed a group of predominantly Caucasian breast cancer patients, in Australia, showed a T allele frequency closer to that found in healthy Caucasians by Price (15). According to Mason et al, Caucasian and African American breast cancer women have distinct patterns of MMPs' expression (32). Brazilian people are a very heterogeneous racial and ethnical population, with Caucasian, African and Indian influences. For this reason, the *MMP2* -1306 C/T polymorphism may have a distinct prevalence here. An additional aspect may explain the diverse results we had. Our nucleotide sequences were assessed by DNA sequencing, the gold standard assay to detect mutations in known genes. It contrasts with less sensitive and specific methods used in previous studies: fluorescent strand conformation polymorphism (F-SSCP), denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) and allele-specific oligonucleotide hybridization.

No association was found when we compared the *MMP2* genotypes with patients' phenotypic features. The same results were previously described in breast cancer (TNM status, ER and PR) and gastric adenocarcinoma (metastasis) (14,17). Grieu et al showed no linkage either among genotypes and nodal involvement, tumor type, histological grade, ploidy and *TP53* mutation (13). Nevertheless, in the same study, an unexpected relation between TT carriers and lower concentrations of tumor ER was found. ER-positive/TT patients had a longer survival than ER-positive/CC-CT and ER-negative/TT patients (13). In spite of the MMP-2 IHC expression studies have been showing that it can provide prognostic information (33,34,35), the same doesn't happen with the *MMP2* C-1306 T polymorphism. The few studies relating this with ER status and patient outcome so far don't provide consistent data to believe that it may act as a prognostic marker.

The *MMP9* – 1562 T frequency for controls in this study was lower than that published by Zhang et al, analysing the *MMP9* genetic variations (0.09 x 0.19) in 188 Caucasian healthy subjects (22). This frequency was also lower for our breast cancer patients than those obtained in gastric cancer patients (Japan) and in NSCLC patients (China) (26,27). This result suggests that the polymorphic T allele tends to have a little magnitude, at least, in South Brazil. Besides, in agreement with recent publications, we showed no difference between genotype frequencies in cases and controls.

The alteration of a 9-bp regulatory sequence (- 1567 to - 1559) in the *MMP9* promoter region C-1562 T and its relation with tumorigenesis was previously analysed in only two

studies: in gastric carcinoma and NSCLC (26,27). None of them showed a linkage between *MMP9* C-1562 T and cancer risk. The same was demonstrated by our results, in breast carcinoma.

Despite the MMP-9 protein enhanced serum and urine levels and high IHC expression found in breast cancers (1,33,35) and its association with aggressive phenotypic features, the allelic change C/T doesn't seem to have a key role in this setting. Just like Wang et al, studying NSCLC, we found no association between the genotypes and patients' clinicopathological characteristics (27). The expected influence of the T promoter in lymph node and metastatic disease may not occur, in breast cancer.

To our knowledge, this is the first case-control study concerning to these two SNPs and breast cancer. Further and larger researches are needed to provide more information about the relation between these polymorphisms and breast carcinoma, especially in occidental population.

In conclusion, our results suggest that *MMP2* C-1306 T and *MMP9* C-1562 T frequencies may differ around the world, mainly according to ethnical and racial population' characteristics and that these promoter polymorphisms have a little impact in breast cancer development in South Brazil. Other factors may contribute to our high breast cancer incidence, which must be pursued.

VIII.6. References

1. Toi M, Ishigaki S, Tominaga T: Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Breast Cancer Res Treat* 52:113-124, 1998.
2. Garbett EA, Reed MWR, Stephenson TJ, Brown NJ: Proteolysis in human breast cancer. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 53: 99-106, 2000.
3. Zigrino P, Loffeck S, Mauch C: Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochimie* 87: 321-28, 2005.
4. Maquart FX, Bellon G, Pasço S, Monboisse JC: Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie* 87: 353-360, 2005.

5. Nagase H, Woessner F: Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 31: 21491-21494, 1999.
6. Westermarck J, Kahari V: Regulation of matrix metalloproteinases expression in tumor invasion. *FASEB J* 13:781-792, 1999.
7. Ala-aho R, Kahari V: Collagenases in cancer. *Biochimie* 87: 273-286, 2005.
8. Giambernardi TA, Gant GM, Klebe RJ et al: Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biol* 16: 483-496, 1998.
9. Curran S, Murray GI: Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36: 1621-1630, 2000.
10. Chang C, Werb Z: The many faces of matrix metalloproteinases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastases. *Trends Cell Biol* 11: S37-S43, 2001.
11. Bartsch JE, Staren ED, Appert HE: Matrix metalloproteinase expression in breast cancer. *J Surg Res* 110:383-392, 2003.
12. Loo WTY, Cheung MNB, Chow LWC: Production of matrix metalloproteinases in specific subpopulations of human-patient breast cancer invading in three dimensional culture system. *Life Sciences* 76:743-752, 2004.
13. Grieu F, Li WQ, Iacopetta B: Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 88: 197-204, 2004.
14. Zhou Y, Yu C, Miao X et al: Substantial reduction in risk of breast cancer associated with genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 genes. *Carcinogenesis* 25(3): 399-404, 2004.
15. Price SJ, Greaves DR, Watkins H: Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene. *J Biol Chem* 276:7549-7558, 2001.

16. Yu C, Pan K, Xing D et al: Correlation between a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer. *Cancer Res* 62(22): 6430-6433, 2002.
17. Miao X, Yu C, Tan W et al: A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (-136C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res* 63: 3987-3990, 2003.
18. Yu C, Zhou Y, Miao X et al: Functional haplotypes in the promoter of the matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res* 64:7622-7628, 2004.
19. Xu E, Lai M, Lv B et al: A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter is associated with colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 999-1003, 2004.
20. Lin A, Lo S, Liu C et al: Functional genotype in matrix metalloproteinase-2 promoter is a risk factor for oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 33: 405-409, 2004.
21. Pornchai O, Patchariya K: The role of genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes in head and neck cancer. *Oral Oncol*, 2005 – article in press.
22. Zhang B, Ye S, Herrmann S et al: Functional polymorphism in the regulatory region of the gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 99:1788-1794, 1999.
23. Jones GT, Philips VL, Harris EL et al: Functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C-1562T) associated with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 38:1363-1367, 2003.

24. Pöllänen PJ, Karhunen PJ, Mikkelsen J et al: Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene (an autopsy study). *Arterioscler, Thromb Vasc Biol* 21:1446-1450, 2001.
25. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O et al: Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase-9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 107:1579-1585, 2003.
26. Matsumura S, Oue N, Nakayama H et al: A single nucleotide polymorphism in MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 131:19-25, 2005.
27. Wang Y, Fang S, Wei L et al: No association between the C-1562T polymorphism in the promoter of matrix metalloproteinase-9 gene and non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 49:155-161, 2005.
28. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Ministério da Saúde. Available by <http://www.inca.gov.br> (nov. 2005).
29. UICC: União Internacional Contra o Câncer. TNM Classificação de Tumores Malignos. 6 ed. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer, 2004.
30. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, et al: Breast Cancer. *Lancet* 365:1727-1741, 2005.
31. Lamblin N, Bauters C, Hermant X et al: Polymorphisms in the promoter regions of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-12 genes as determinants of aneurysmal coronary artery disease. *J Amer Col Cardiol* 40:43-48, 2002.
32. Mason JA, Fancy HF, Lashley K et al: Comparative study of matrix metalloproteinase expression between african american and caucasian women. *J Carcinogenesis* 3:15-20, 2004.

33. Li HC, Cao DC, Liu Y et al: Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 88: 75-85, 2004.
34. Turpeenniemi-Hujanen T: Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 87: 287-297, 2005.
35. Garibyan L, Lenahan C, Pories S: Metalloproteinases: promising tumor markers for breast cancer management. *Cur Surg* 61: 255-259, 2004.

ANEXO A – GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA

Sistema de Graduação Histológica de Nottingham (esquema de Scarff, Bloom e Richardson modificado por Elston e Ellis) (43)

Formação tubular:

- score = 1, a maior parte do tumor forma túbulos (> 75%);
- score = 2, a formação de túbulos é moderada (10% a 75%);
- score = 3, a formação de túbulos é pouca ou nenhuma (< 10%).

Pleomorfismo nuclear:

- score = 1, os núcleos são regularmente uniformes, com mínima variação (discreto);
- score = 2, moderada variação no tamanho e formato nuclear (moderado);
- score = 3, marcada variação na forma e no tamanho nuclear (acentuado).

Atividade mitótica

É avaliada em dez campos de grande aumento (cga), conforme tabela padrão, dependente do tamanho do campo do microscópio utilizado:

- score = 1, até sete figuras de mitoses em 10cga (pouca);
- score = 2, de oito a 15 figuras de mitoses em 10cga (moderada);
- score = 3, mais que 15 figuras de mitoses em 10cga (acentuada).

A soma dos escores obtidos em cada um destes itens gera um escore final que varia de 3 a 9, correspondendo aos seguintes graus de diferenciação histológica:

- grau I (baixo) – bem diferenciado – 3 a 5;

- grau II (intermediário) – moderadamente diferenciado –6 a 7;
- grau III (alto) – pouco diferenciado –8 a 9.

ANEXO B – REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

Os cortes histológicos foram distendidos em lâminas silanizadas, desparafinados, submetidos à recuperação antigênica com solução de citrato de sódio, em banho maria, e incubados com os anticorpos primários. Posteriormente, utilizou-se o método L. V. DAKO LSAB+kit, complexo estreptavidina-peroxidase (StreptABC/HRP) com o cromógeno diaminobenzidina (DAB).

Os anticorpos utilizados foram os seguintes:

- **Receptor de Estrógeno:** clone 6F11, diluição 1:200, Novocastra Laboratories®, New Castle, UK. Considerado positivo na presença de reatividade no tumor $\geq 1\%$.
- **Receptor de Progesterona:** clone 16, diluição 1:150, Novocastra Laboratories®, New Castle, UK. Considerado positivo na presença de reatividade no tumor $\geq 1\%$.
- **P53:** clone DO-7, diluição 1:200, DakoCytomation®, Glostrup, Dinamarca. Considerado positivo, na presença de reatividade no tumor $\geq 10\%$;
- **c-erbB-2:** policlonal, diluição 1:500, DakoCytomation®, Glostrup, Dinamarca. Considerado positivo, na presença de reatividade tumoral forte (+++), e negativo nas demais condições: reatividade moderada/fraca ou ausente (++/+/zero).

ANEXO C – ANÁLISE MOLECULAR

Extração de DNA

DNA genômico foi extraído de sangue periférico dos casos e controles, através do UltraClean® DNA Blood Spin kit- MO BIO Laboratories Inc. (Solana Beach, CA - US).

Determinação dos Genótipos - *MMP2*

Os genótipos para *MMP2* foram determinados por reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de seqüenciamento de DNA. O fragmento de 295 pb de DNA englobando o sítio do polimorfismo foi amplificado com os seguintes *primers*: senso 5'-CTG ACC CCC AGT CCT ATC TGC C e antisenso 5'- TGT TGG GAA CGC CTG ACT TCA G. As condições do PCR foram: etapa inicial de 2 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 64°C, 45 s a 72°C e uma etapa final de 7 min a 72°C. Em todas as reações foi utilizada Taq DNA polymerase Platinun – Invitrogen/Life Technologies (São Paulo, BR). O produto de PCR foi purificado, através do Concert® Rapid PCR Purification System kit - GibcoBRL/Life Technologies (Germany, US, UK). As amostras foram seqüenciadas para acessar a posição – 1306 com Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems (Foster City, CA- US). Foi utilizado o ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

A Figura 2 mostra o resultado do seqüenciamento de DNA do gene da *MMP2*, enfocando o sítio do polimorfismo na região promotora (-1306).

Determinação dos Genótipos - *MMP9*

O polimorfismo *MMP9* C-1562T foi determinado por PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). Os *primers* utilizados foram senso 5'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC e antisenso 5'- CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC. As condições do PCR foram: etapa inicial de 2 min a 94°C seguida por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 1,5 min a 72°C, e uma etapa final de 10 min. a 72°C. Nas reações foi utilizada a enzima Taq DNA polymerase Platinun - Invitrogen/Life Technologies (São Paulo, BR). O fragmento amplificado

de 435 pb foi submetido à digestão *overnight*, a 37 °C, com a enzima de restrição *SphI* - New England Biolabs (Beverly, MA – US). Após a digestão, os fragmentos foram separados em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídeo. Na presença do alelo T a endonuclease cliva o fragmento, observando-se duas bandas (188 e 247 pb). Na situação contrária, o fragmento amplificado permanece inteiro, observando-se uma banda (435 pb), como mostra a Figura 3. Dez por cento dos genótipos foram confirmados, randomicamente, através de seqüenciamento de DNA, conforme as condições descritas acima. A Figura 4 mostra o resultado do seqüenciamento de DNA do gene da *MMP9*, englobando o sitio do polimorfismo da região promotora (-1562).

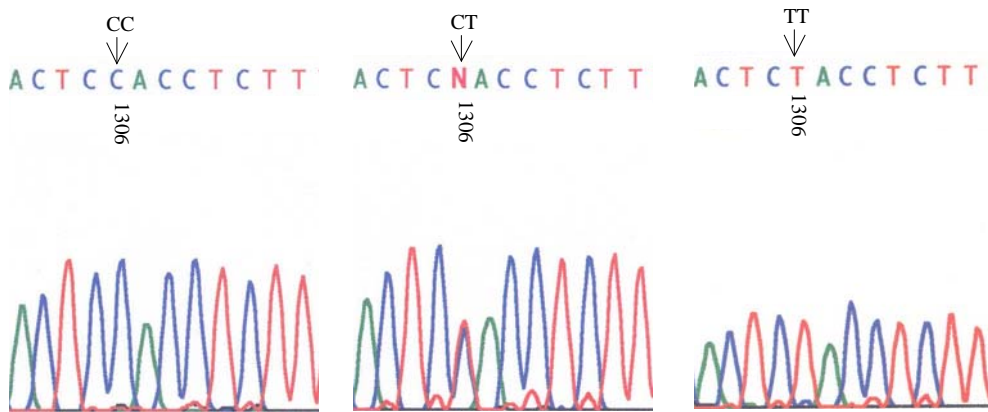


Figura 2. Seqüenciamento de DNA da Região Promotora da *MMP2* (Senso)

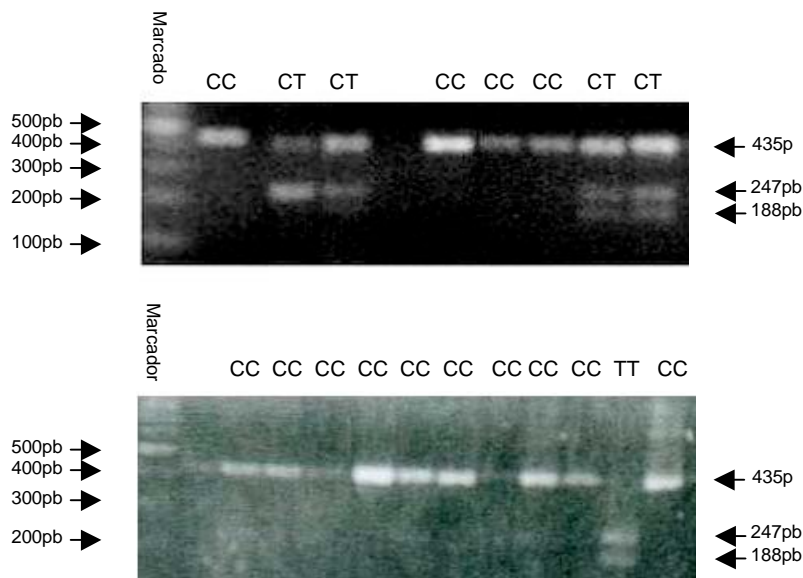


Figura 3. Gel de Agarose PCR-RFLP (*SphI*) da Região Promotora da *MMP9*

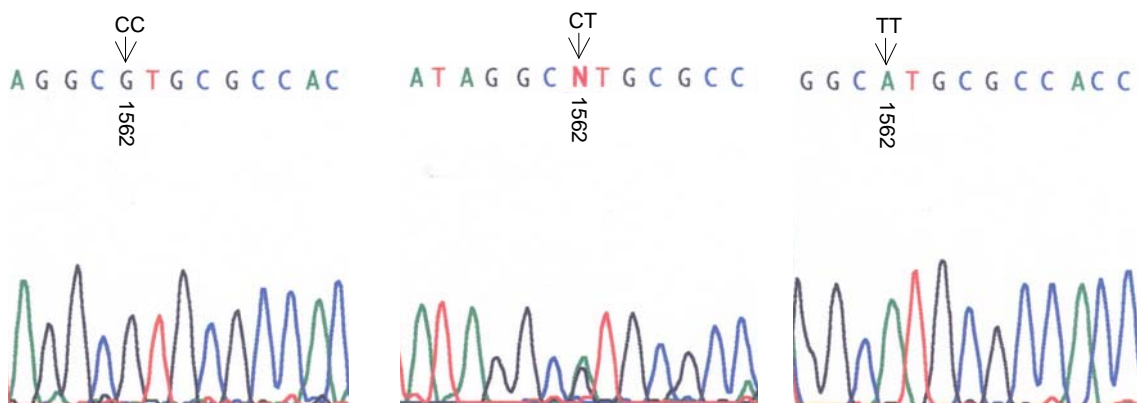


Figura 4. Seqüenciamento de DNA da Região Promotora da *MMP9* (Antisenso)

ANEXO D – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado cálculo do tamanho amostral, considerando $p\alpha \leq 0,05$ e $p\beta = 20\%$.

O teste Exato de Fisher foi aplicado para avaliar a variação das frequências dos genótipos entre casos e controles e para determinar a relação entre os genótipos e as características clinicopatológicas. O teste T Student foi utilizado para analisar as diferenças etárias entre os grupos. O ajuste etário foi realizado através de um modelo de regressão logística. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado e as frequências dos genótipos observadas e esperadas foram comparadas, aplicando-se o teste Qui-quadrado. Consideraram-se estatisticamente significativos valores de $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada através do SPSS 11.0 *software package* (Chicago, IL, US).

ANEXO E – TABELAS

Tabela 2. Características demográficas da amostra.

	Pacientes	Controles	Valor P
Média etária	55,21 (37-89) anos	34,06 (18-59) anos	p=0,000
Cor			
Branca	90	92	NS
Negra	6	8	NS
Total	96	100	

NS: não significativo ($p > 0,05$)

Tabela 3. Genótipos e freqüências alélicas.

Gene/ Polimorfismo	Genótipo/ Alelo	Casos n (freqüências)	Controles n (freqüências)	Valor P
<i>MMP2</i> - 1306C/T	CC	63 (0,70)	66 (0,66)	0,22
	CT	21 (0,24)	32 (0,32)	
	TT	5 (0,06)	2 (0,02)	
	Total	89	100	
	C	147 (0,83)	164 (0,82)	
	T	31 (0,17)	36 (0,18)	
<i>MMP9</i> - 1562C/T	CC	76 (0,80)	83 (0,83)	0,23
	CT	20 (0,20)	15 (0,15)	
	TT	0 (0,00)	2 (0,02)	
	Total	96	100	
	C	172 (0,89)	181 (0,905)	
	T	20 (0,10)	19 (0,095)	

Tabela 4. Genótipos e características fenotípicas das pacientes.

	Pacientes	<i>MMP9</i>		Pacientes	<i>MMP2</i>		P
	n (%)	CC	CT/TT	n (%)	CC	CT/TT	
Idade (anos)							NS
≤ 49	35 (33,5%)	28	7	32 (36%)	24	8	
≥50	61 (63,5%)	48	13	57 (64%)	39	18	
Tipo							NS
Histológico							
Ductal NS †	73 (76%)	56	17	69 (77,5%)	51	18	
Ductal ST ††	7 (7,3%)	6	1	7 (7,9%)	4	3	
Lobular	14 (14,6%)	12	2	11 (12,4%)	7	4	
Outro	2 (2,1%)	2	0	2 (2,2%)	1	1	
Grau							NS
Histológico							
I	9 (9,3%)	6	3	8 (8,9%)	6	2	
II	40 (41,6%)	32	8	37 (41,5%)	28	9	
III	25 (26%)	19	6	24 (26,9%)	18	6	
NA *	22 (22,9%)			20 (22,4%)			
TNM							NS
I	23 (24%)	19	4	20 (22,5%)	11	9	
IIa/b	52 (54,2%)	40	12	46 (51,7%)	35	11	
IIIa/b	17 (17,7%)	14	3	19 (21,3%)	13	6	
IV	4 (4,2%)	3	1	4 (4,5%)	4	0	
Status							NS
Linfonodal							
Negativo	55 (57,2%)	44	11	50 (56,1%)	34	16	
Positivo	40 (41,6%)	31	9	38 (42,7%)	28	10	
Sem	1(1%)			1 (1,1%)			
Informação							
Invasão							NS
Vascular							
Negativo	28 (29,1%)	22	6	27 (30,3%)	17	10	

Positivo	55 (57,2%)	45	10	52 (58,4%)	40	12	
Sem	13 (13,5%)			10 (11,2%)			
Informação							
RE † †							NS
Negativo	30 (31,2%)	24	6	30 (33,7%)	21	9	
Positivo	65 (67,7%)	52	13	57 (64%)	42	15	
Sem	1 (1,1%)			2 (2,2%)			
Informação							
RP † †							NS
Negativo	33 (34,3%)	26	7	29 (32,5%)	22	7	
Positivo	62 (64,5%)	50	12	58 (65,1%)	41	17	
Sem	1 (1,1%)			2 (2,2%)			
Informação							
P53 † †							NS
Negativo	74 (77,1%)	59	15	67 (75,2%)	48	19	
Positivo	18 (18,7%)	15	3	17 (19,1%)	14	3	
Sem	4 (4,1%)			5 (5,6%)			
Informação							
C-erbB-2 † †							NS
Negativo	68 (70,8%)	54	14	65 (73%)	48	17	
Positivo	26 (27,1%)	21	5	21 (23,5%)	15	6	
Sem	2 (2%)			3 (3,3%)			
Informação							
Total	96 (100%)			89 (100%)			

† Carcinoma ductal de tipo não especial

†† Carcinoma ductal de tipo especial

* NA: não se aplica. Casos de carcinoma ductal de tipo especial e lobular invasor

† Reação IMQ

† Positivo: reatividade \geq 1% no tumor

† Positivo: reatividade \geq 10% no tumor

† Positivo: reatividade forte (+++); negativo: reatividade moderada/fraca ou ausente (+++/zero)

ANEXO F – TERMO DE CONSENTIMENTO

Detecção de polimorfismos nos genes das metaloproteinases 2 e 9 em carcinoma de mama.

Termo de Consentimento Informado

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa sobre câncer de mama.

Você está sendo considerado como um possível participante deste estudo porque nós estamos comparando uma alteração nos pacientes com câncer de mama com pessoas saudáveis e sem antecedentes pessoais de câncer. Esta pesquisa tem por objetivo buscar informações que auxiliem o entendimento e o tratamento do câncer de mama. Todas as informações obtidas serão utilizadas para fins exclusivos desta pesquisa e serão confidenciais. A sua participação no estudo é totalmente voluntária e isenta de riscos para a sua saúde.

Nós lhe pedimos que leia este documento e esclareça qualquer dúvida antes de concordar em participar do estudo.

Este estudo está sendo conduzido pelo Programa de Pós-graduação em Anatomia Patológica da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre e Complexo Hospitalar Santa Casa.

A proposta desse estudo é comparar uma parte da estrutura genética de pessoas com carcinoma de mama com uma parte da estrutura genética da população em geral.

Se você concordar em participar do estudo nós vamos pedir a sua autorização para utilizar uma amostra do seu sangue para análise genética.

Este estudo não apresenta riscos para a sua saúde.

Os benefícios da sua participação no mesmo são: a ajuda no entendimento dos

fatores que contribuem para o desenvolvimento dessa doença e o auxílio no tratamento da mesma.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e confidenciais, sendo destinadas para utilização exclusiva neste estudo.

A sua decisão em participar ou não do estudo é totalmente voluntária e não afetará sua relação atual ou futura com esta instituição.

Os pesquisadores que estão conduzindo este estudo são:

Adriana Vial Roehe, Márcia Graudenz e Antônio Hartmann.

Em caso de dúvida, você poderá entrar em contato com os pesquisadores pelo telefone (51) 32264038, ramal 175, em horário comercial.

Caso você tenha alguma pergunta, você pode fazê-la agora.

Após ler, entender e esclarecer as dúvidas sobre as informações acima, concordo em participar do estudo.

Assinatura _____ Data _____

Assinatura do Investigador _____ Data _____

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)