

WILLIAM KHALIL EL CHAER

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA METALOPROTEINASE DE MATRIZ DO TIPO-1
PARA O DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA EM IDOSOS**

BRASÍLIA – DF, 2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

WILLIAM KHALIL EL CHAER

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA METALOPROTEINASE DE MATRIZ DO TIPO-1
PARA O DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA EM IDOSOS**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Área de concentração: Fisiopatologia Médica
Orientador: Dr. Otávio de Toledo Nóbrega

BRASÍLIA – DF

2020

WILLIAM KHALIL EL CHAER

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA METALOPROTEINASE DE MATRIZ DO TIPO-1
PARA O DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA EM IDOSOS**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Aprovado em (dia) (mês) (ano)

BANCA EXAMINADORA

Otávio de Toledo Nóbrega – Presidente
Universidade de Brasília

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes
Universidade de Brasília

Ciro José Brito
Universidade Federal de Juiz de Fora

Izabela M. Dourado Bastos
Universidade de Brasília

Izabel Cristina Rodrigues da Silva(Suplente)
Universidade de Brasília

*Ao meu pai Khalil (in memoriam) que me ensinou o
caminho do bem e a me apaixonar pelo simples.*

*À minha esposa Gilcilene, que me mostrou os desafios e
sabores da docência.*

Aos meus filhos, que deram sentido à minha vida

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente!

Ao meu amigo e orientador Otávio Toledo Nóbrega, um grande pesquisador que eu aprendi a admirar e a respeitar. Otávio é fera! É referência! Otávio foi o cérebro deste trabalho!

Ao meu amigo e parceiro de pesquisa, Dr. Clayton Franco, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho. Foram muitos momentos prazerosos e gratificantes ao longo de quatro anos no ambulatório de urologia do HUB. Sua simplicidade, alegria e sabedoria são contagiantes. Clayton foi o corpo deste trabalho!

Aos amigos que conquistei ao longo deste projeto, que muito contribuíram para sua concretização. Obrigado Adriane, Audrey, Gleiciane, Renata e Tiago.

Aos professores que passaram pela minha formação acadêmica e contribuíram para o meu aperfeiçoamento profissional e pessoal. Muito obrigada professora Leonora Gandolfi, seus ensinamentos são para a vida!

Aos meus pais, irmãos, minha esposa Gilcilene, meus filhos e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), pelo apoio financeiro sem o qual esta pesquisa seria inviável.

RESUMO

Introdução: o câncer de próstata (CaP) é universal, possui alta prevalência e mortalidade. Seu diagnóstico precoce é fundamental e carece de aprimoramento dos métodos utilizados. As metaloproteinases (MMPs) estão diretamente envolvidas no processo tumoral metastático e alterações de seus níveis têm sido detectados em diversos tipos de câncer. **Objetivo:** mensurar as concentrações séricas de MMP-1 de indivíduos com CaP e com hiperplasia prostática benigna (HPB), corrigindo os resultados para uma importante variabilidade alélica apontada como predisponente a níveis diferenciais de MMP-1 no soro. **Métodos:** amostra composta por 196 homens com mais de 50 anos, atendidos consecutivamente no ambulatório de urologia do Hospital Universitário de Brasília. Um único urologista realizou todos os exames clínicos, antropométricos e o toque retal. Foram coletadas amostras de sangue para dosagem de MMP-1, PSA, PSA livre, além de diversos marcadores bioquímicos, hormonais, hematológicos e inflamatórios. Em paralelo, o DNA genômico de todos participantes foi extraído e procedida genotipagem de MMP-1 em busca do polimorfismo SNP rs495366, conhecidamente relacionado ao aumento de MMP-1. Foram encaminhados para a realização de biópsia os participantes com indicação clínica e/ou laboratorial, e aqueles com resultado positivo para CaP compuseram o grupo teste CaP, enquanto os demais o grupo controle HPB. Para a análise estatística empregou-se os testes de *tStudent*, de Mann-Whitney, de Kolmogorov-Smirnov, o coeficiente de correlação, o teste de correlação de *Spearman's* e a análise multivariada de regressão linear. **Resultados:** procedido o ajustamento para os genótipos produzidos pelo SNP rs495366 e eliminada essa interferência, foram encontrados valores médios de MMP-1 exatamente duas vezes maior nos indivíduos com CaP (0.96 ng/mL) que nos com HPB (0.48 ng/mL). Como resultado esperado, uma diferença significativa foi observada entre os níveis de PSA total e livre ($p < 0,001$). Não houve diferença para todas demais variáveis clínicas e laboratoriais testadas, indicando uma homogeneidade entre os grupos. Também não foi encontrada nenhuma associação do polimorfismo ou da concentração sérica de MMP-1 com as variáveis clínicas testadas. **Conclusão:** Os resultados deste estudo revelaram que indivíduos com CaP apresentaram elevação dos níveis séricos médios

de MMP-1, e, portanto, há associação dos níveis circulantes totais deste marcador com malignidade prostática.

Palavras-chave: câncer de próstata; neoplasia; biomarcador; metaloproteinase.

ABSTRACT

Introduction: Prostate cancer (PCa) is a high-prevalence universal neoplasia. Early diagnosis is fundamental, and the methods currently used need improvement. Metalloproteinases (MMPs) are directly involved in the metastatic tumor process, and changes in their circulating levels have been detected in several types of cancer.

Objective: To compare total serum concentrations of the metalloproteinase-1 (MMP-1) across individuals clinically diagnosed with either PCa or benign prostatic hyperplasia (BPH), correcting the results for an important allelic variability identified as predisposing to differential serum MMP-1 levels.

Methods: The sample was composed of 196 men aged ≥ 50 years, consecutively followed at a university hospital urology outpatient clinic. The same urologist performed all clinical, anthropometric, and rectal examinations. Blood samples were collected prior to any clinical intervention to assess baseline MMP-1 and total/free PSA levels as well as of several metabolic, hormonal, and inflammatory markers. Genotyping was performed for the rs495366 single-base polymorphism (SNP), related to an increase in peripheral MMP-1. Participants with clinical and/or laboratory profile compatible with PCa composed the test group as long as confirmed for malignancy according to the Gleason scale and eligible for prostatectomy.

Results: In agreement with the literature, homozygotes for rs495366 SNP allele A showed reduced levels of MMP-1. Genotype-adjusted analyzes revealed mean MMP-1 level 2-fold higher in PCa carriers (0.96 ng/mL) compared to those with BPH (0.48 ng/mL). No other variation in clinical or laboratory parameters was found according to prostatic condition or genotypic distribution, exception for the expected difference in total and free PSA levels across PCa and BPH.

Conclusion: The results of this study showed increased serum levels of MMP-1 in PCa patients, and therefore an association of this marker with prostatic neoplasia.

Keywords: prostate cancer, neoplasm, biomarker, metalloproteinase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura básica de MMPs (Fonte: Visse e Nagase, 2003 (15)).	16
Figura 2 Comparação dos níveis circulantes brutos de MMP-1 entre indivíduos diagnosticados com hiperplasia benigna da próstata (BPH) ou câncer de próstata (PCa)	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação, características e funções das metaloproteinases	14
Tabela 2 Caracterização da expressão de MMPs e TIMPs no câncer de próstata ...	20
Tabela 3 Características clínicas e bioquímicas do soro dos indivíduos de acordo com o diagnóstico de câncer de próstata (PCa) ou hiperplasia prostática benigna (BPH)	36
Tabela 4 Análises de correlação dos níveis e dos grupos genotípicos da metaloproteinase-1 da matriz (MMP1) através das características clínicas e bioquímicas dos 196 idosos testados	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPS) E SEUS INIBIDORES	13
1.2 ENVOLVIMENTO FISIOPATOGÊNICO DAS MMPS E TIMPS	16
1.3 DOSAGENS DE MMPS E TIMPS CIRCULANTES.....	22
1.4 MMP-1 NO CaP.....	27
2. OBJETIVO	28
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3. MÉTODOS	29
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRA.....	29
3.2 AVALIAÇÃO UROLÓGICA	29
3.3 ANÁLISES LABORATORIAIS: TESTES CLÍNICOS E BIOQUÍMICOS	30
3.4 MMP1 GENOTIPAGEM	31
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
3.6 PRECEITOS ÉTICOS.....	33
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	53

1. INTRODUÇÃO

O Câncer de Próstata (CaP) é a neoplasia com maior prevalência entre homens no mundo ocidental (1–3). Quanto à letalidade, consiste na segunda principal causa de mortes relacionadas ao câncer nos Estados Unidos da América, depois do carcinoma de pulmão e brônquios. Registros da Sociedade Norte-Americana do Câncer apontam que 238.590 novos casos de CaP surgiram naquele país no ano de 2013, com a estimativa de que 29.720 homens morreram da doença (4).

No Brasil, estimativas para 2016 feitas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) dão conta de 61.200 novos casos, tendo o número de mortes em 2013 atingido 13.772, de modo que o CaP foi classificado como a segunda forma de neoplasia mais comum entre os homens no país (atrás apenas do câncer de pele não-melanoma) (5).

Já considerando o ano de 2018, o INCA estimou em 68.220 os novos casos e em 14.484 as mortes por CaP no Brasil, afirmando que o aumento recente observado nas taxas de incidência do país pode ser parcialmente justificado pela popularização dos métodos diagnósticos (exames), pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação e pelo aumento na expectativa de vida, e consiste tão somente no início de um processo de intensificação da frequência da doença em nosso país (6).

Ademais, o CaP é considerado um câncer da terceira idade, uma vez que cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos. No Brasil, aproximadamente 75% dos casos ocorrem após os 65 anos (6).

Não há causas definitivas estabelecidas para o câncer de próstata até o momento, mas a progressão da idade, a história familiar positiva, assim como a ascendência africana tem sido associadas ao seu desenvolvimento (2,7).

O diagnóstico precoce do CaP continua sendo fundamental, uma vez que os recursos terapêuticos e a possibilidade de cura são limitados em estágios avançados. As sociedades médicas de todo o mundo defendem que o rastreamento na população

gera benefícios para subsidiar uma decisão compartilhada entre médico e paciente, a despeito do diagnóstico (e consequente tratamento) e de políticas públicas de diversos países (incluindo o Brasil) não promoverem este rastreamento. A conduta clínica estabelece que a presença de hematúria visível, disfunção erétil e/ou alterações do padrão urinário ensejam investigação para o diagnóstico precoce (8,9).

Atualmente, o rastreamento do CaP costuma ser iniciado pela dosagem do antígeno prostático específico (PSA) conjuntamente ao exame pelo toque retal, compondo procedimento com sensibilidade aproximada de 80% (10). Apesar de ser uma estratégia pouco invasiva e de baixo custo, apresenta especificidade limitada para atestar CaP quando se considera o ponto de corte para PSA em 4,0 ng/dL (31% para brancos e 44% para negros) (11). Níveis séricos de PSA podem se exibir elevados na hiperplasia prostática benigna (HPB) ou em condições traumáticas e inflamatórias da próstata, e uma conduta baseada tão-somente em seus escores pode incorrer em resultado falso-positivo. Em verdade, apenas 25% das biópsias de próstata motivadas isoladamente por nível elevado de PSA confirmam câncer de próstata (12).

Assim, a dosagem dos níveis de antígeno prostático específico (PSA) ainda é considerada a mais importante ferramenta disponível para triagem do distúrbio, com vistas à sua detecção precoce, permitindo seu estadiamento e monitorização (7,13). Encontra-se bem estabelecidos que níveis de PSA se correlacionam com a extensão da doença no momento da recorrência, com níveis mais baixos associando-se com recidiva local enquanto níveis mais altos, com a recidiva sistêmica (14). Estudos demonstram que o PSA pré-operatório pode predizer a existência de doença extraprostática (15,16), mas o PSA não constitui marcador específico para o câncer prostático, e sim para alterações da glândula prostática, podendo seu nível se elevar em casos de prostatites ou hiperplasia benigna da próstata (HPB), por exemplo. Em linha, outras ferramentas clínicas de grande importância consistem nas características do toque retal, que auxilia no estadiamento do tumor, e os dados da biópsia, sendo o escore de Gleason o fator prognóstico isolado mais importante (17).

Novos marcadores têm sido propostos como um segundo teste (teste reflexo) quando títulos de PSA se mostram alterados, seja isoladamente ou compondo fórmulas, com o intuito de elevar a especificidade do rastreamento do CaP. Esses

testes devem possuir valor preditivo maior que o do uso do PSA isoladamente, sendo já utilizadas a relação PSA livre/ PSA total e a dosagem do antígeno PCA3, assim como os escores 4K, o índice de saúde da próstata (PHI), o RC3 e o modelo STOCKHOLM-3. Contudo, nenhum ainda demonstrou ganho significativo em acurácia clínica (18,19).

1.1 METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPS) E SEUS INIBIDORES

Evidências bioquímicas também demonstram que uma classe, em particular, de proteinases séricas denominadas metaloproteinases que degradam matriz extracelular (*matrixmetalloproteinases* - MMPs) encontram-se importantemente envolvidas na fisiopatologia da doença prostática maligna (20).

As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco e cálcio que degradam vários elementos da matriz extracelular (MEC), principalmente colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos. Também participam de vários processos fisiológicos como a embriogênese, ovulação e remodelação da matriz extracelular, mas por outro lado, estão também envolvidas em vários eventos patológicos para o advento da neoplasia, como a tumorigênese e a capacidade infiltrativa e de metástase, uma vez que promovem a degradação de componentes da MEC favorecendo a migração de células tumorais (14–16).

Já foram identificadas 24 MMPs, das quais 23 são encontradas em humanos, englobando collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelinas (MMP-3 e MMP-10), matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), MMPs de membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25), entre outras (Tabela 1).

Tabela 1 Classificação, características e funções das metaloproteínases

Classe	MMPs	Característica estrutural	Ação/substratos	Ref.
Matrilisinas	7 e 26	Domínio pró-peptídeo, peptídeo sinal e um domínio catalítico com o sítio ligante de zinco		Lynch, Matrisian, 2002
Colagenases	1, 8 e 13	Domínio simples de hemopexina conectado ao domínio catalítico através de uma região de dobradiça rica em prolina	Degradam a hélice nativa de colágeno tipo I, II e III entre outros	Curran, Murray, 1999
Estromelisinases	3, 10 e 12	Substrato específico	Degradam proteoglicans, fibronectina e laminina	Nagase, Woessner, 1999
Gelatinases	2 e 9	Contêm uma região adicional de três repetições de fibronectina tipo II	Preferência por colágeno desnaturado (gelatinases) e também degradam colágenos tipos IV, V, VII e X, além de fibronectinas e lamininas	Kleiner, Stetler-Stevenson, 1999
Tipo membrana (MT-MMPs)	14 (MT1-MMP), 15, 16, 17, 24 e 25	Limitadas à superfície das células através de um domínio transmembrana c-terminal	Degradam gelatina, fibronectina e agrecan e outros substratos da MEC	Seiki, 1999
Outras	12 (Metaloelastase), 19, 20 (Enamelisina), 23 e 28 (Epilisina)		Migração e proteólise de macrófagos (MMP-12) mediadores e formação do esmalte do dente (MMP-20)	McCawley, 2001; Caterina et al., 2002

Fonte: Elaborado pelo autor.

São encontradas em todos os tecidos e no plasma, e podem ser de membrana ou secretadas, sendo liberadas em sua maioria como pró-MMPs para, em seguida, serem ativadas pelo sistema uroquinase-plasminogênio/plasmina localizados em membranas celulares (15).

O pró-peptídeo de todas as metaloproteínases (Figura 1) contém um resíduo de cisteína conservado unido ao íon zinco no sítio catalítico das MMP (15-21). A ativação das MMPs inicia-se pelo rompimento desta ligação zinco-cisteína por fatores

físicos ou químicos. O domínio hemopexina (Pex) forma uma estrutura propulsora de quatro hélices feitas por beta-estruturas, que conferem a propriedade colagenolítica às MMPs (22).

Por sua vez, as gelatinases são distinguidas pela inserção de três repetições cabeça-cauda ricas em cisteína, em seus domínios catalíticos, os quais são importantes por se ligarem à gelatina (23).

Pelo domínio Pex as MMPs se ligam a outras proteínas como as integrinas, receptores de superfície celular e TIMPs (Tecidos Inibidores de MMP) (24). Todas as MT-MMPs (tipo membrana), MMP-11, MMP-23 e MMP-28 têm também uma sequência de reconhecimento furin entre o pró-peptídeo e o domínio catalítico, permitindo assim ativação e clivagem por enzimas convertases no aparelho de golgi (25).

Algumas citocinas, fatores de crescimento, agentes químicos, estresse físico, oncogenes e interações com a matriz extracelular, podem induzir a expressão das MMPs nos níveis transcricional e pós transcricional, já que a expressão da maioria das MMPs é baixa em tecido normal e acima do normal quando há remodelamento (26).

Em paralelo, e com ação regulatória e antagônica, foram descritos quatro inibidores teciduais das MMPs (TIMPs), a saber: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Suas expressões são induzidas durante a remodelação tecidual. Em situações fisiológicas, os níveis dos TIMPs são fundamentais para contrabalancear a ação das MMPs. Os TIMPs em geral atuam sobre todas MMPs, com poucas exceções e predileções, e se ligam às MMPs pelo domínio N-terminal. Em condições patológicas, uma hiperexpressão de TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 normalmente acompanham o curso do crescimento tumoral (15).

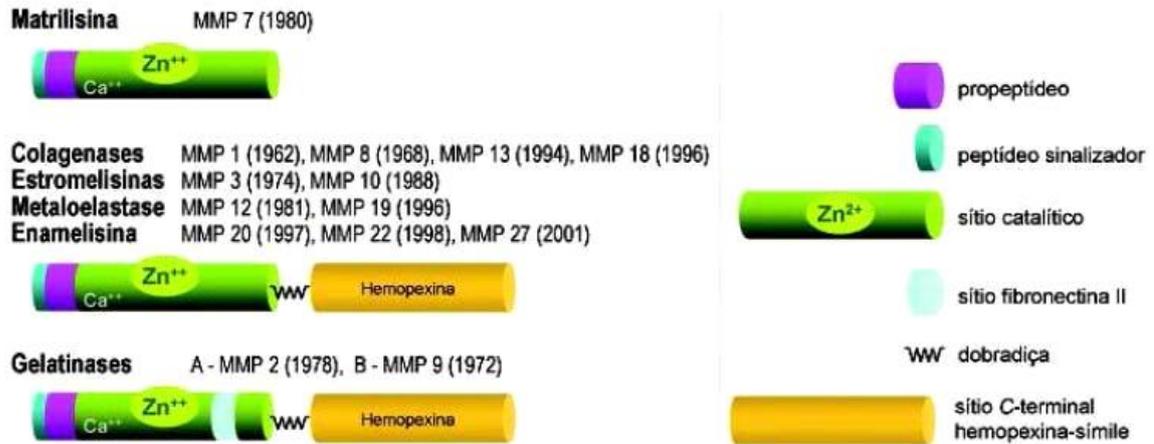


Figura 1 Estrutura básica de MMPs (Fonte: Visse e Nagase, 2003 (15)).

Adicionalmente, as TIMPs podem exercer funções biológicas que independem de sua capacidade de inibir MMPs. TIMP-1 e TIMP-2 estimulam a eritropoese e a proliferação celular fisiológica, enquanto TIMP-3 possui propriedades pró-apoptóticas. TIMP-2 é ainda inibidor da angiogênese (27-30).

1.2 ENVOLVIMENTO FISIOPATOGÊNICO DAS MMPs E TIMPs

Evidências científicas demonstram a participação das MMPs em diversos mecanismos fisiopatológicos. Além de degradarem componentes da MEC e ativar outras metaloproteinasas, as MMPs também participam da ativação de fatores de crescimento e citocinas (22). Assim, por exemplo, a MMP-9 cliva o sítio pró-inflamatório da interleucina 8 (IL-8), aumentando sua atividade em 10 vezes, o que acaba por degradar e inativar o fator plaquetário, um importante inibidor de angiogênese (31).

Revisões na literatura permitem constatar que as MMPs estão envolvidas na fisiopatogenia de diversas condições que podem ser agrupadas em: [1] destruição

tissular, invasão de células tumorais e metástases, artrite reumatóide, osteoartrite, diferentes tipos de úlceras, doença periodontal, injúria cerebral e doenças neuroinflamatórias; [2] fibrose pulmonar, cirrose hepática, enfisema pulmonar, endometriose, aterosclerose e esclerose múltipla; [3] cardiomiopatia, aneurisma da aorta e estenoses valvares e vasculares. Foi ainda caracterizado que as MMPs exercem funções na angiogênese e na apoptose (14).

A ampliação do processo de invasão tumoral pelas MMPs ocorre não somente através da degradação das proteínas da MEC, mas também pela ativação das cascatas de transdução de sinal que promovem motilidade e a solubilização de fatores de crescimento ligados à MEC (32). MMP-2 e MMP-9 são capazes de clivar proteoliticamente TGF-. MMP-9 induz ativação de TGF- na superfície de queratinócitos normais bem como de células malignas, o que sugere que a ativação de TGF- mediada por MMP-9 pode possuir um importante papel no remodelamento tecidual tanto em situações fisiológicas como no câncer, promovendo a invasão tumoral e angiogênese (33).

O aumento na expressão de MMPs ocorre nas próprias células tumorais ou em células estromais próximas, o que ajuda na remodelação da MEC propiciando um ambiente favorável para o estabelecimento do tumor primário. Também estão envolvidas na migração celular ajudando na remoção de sítios de adesão, e expondo novos sítios de migração, através da clivagem de receptores que promovem a ligação entre as células e destas com a MEC, além de degradar componentes da membrana basal permitindo que células tumorais invadam o estroma adjacente (32).

No que se refere à participação das MMPs na angiogênese, estas facilitam a ligação de fatores pró-angiogênicos aos receptores da membrana, além de suprimirem a ligação de inibidores da angiogênese. As MMP ajudam a quebrar a membrana basal associada com capilares e vasos linfáticos, permitindo que células tumorais ganhem a circulação para se disseminarem e se instalem em sítios metastáticos (34). Em sítios distantes, as MMPs são novamente requeridas para a migração e fixação celular, estabelecimento do microambiente necessário para crescimento metastático e angiogênese. Portanto, as MMP contribuem em múltiplos estágios para o processo carcinogênico (35).

Nesse contexto, Gong *et al.*, (2016) procederam meta-análise sobre a ação da MMP-9 no câncer pulmonar de pequenas células. Foram contabilizados 26 estudos que avaliaram a expressão e atividade sérica da MMP-9 no Ca de pulmão. Os autores concluíram que a atividade sérica da MMP-9 está positivamente associada a um pior estadiamento e à presença de metástase à distância, e que a hiperexpressão tecidual da MMP-9 constitui fator de risco para um pior estadiamento e prognóstico desfavorável (36).

No câncer de mama, mais estudos são necessários para elucidar a atuação das MMPs e de seus inibidores. Kim *et al.*, (2014) pesquisaram a expressão das MMPs e dos TIMPs nos diferentes tipos histológicos de Ca de mama, tendo sido identificado que a MMP-9 e a MMP-13 estão significativamente associadas ao subtipo HER-2 de Ca de mama (37). Por outro lado, outro estudo não indicou que MMP-9 e TIMP-1 séricos podem ser utilizados como biomarcadores do Ca de mama (38).

Em se tratando de câncer colorretal, estudo conduzido por Nada *et al.*, (2016) demonstraram hiperexpressão de MMP-2 e MMP-9 em análise histopatológica, e significativa associação com pior prognóstico e sobrevida livre de doença (39). Corroboraram Gimeno-Garcia *et al.* (2015), que evidenciaram níveis plasmáticos significativamente elevados de MMP-9 em pacientes com câncer colorretal em comparação a um grupo controle sem doença. Para MMP-2 não foi constatada essa diferença. Os autores concluíram que a MMP-9 pode ser um biomarcador alternativo para a detecção precoce de câncer colorretal avançado (40).

Particularmente no CaP, estudos sobre as MMPs e os TIMPs têm apresentado resultados inconclusivos e oscilam conforme método empregado para investigação. Cabe destacar que a grande maioria dos estudos realizados foi feito com amostras de biópsia pós prostatectomia, tendo sido utilizadas para identificação das MMPs e TIMPs técnicas de hibridização *in situ* e amplificação e detecção de seus genes codificadores.

Reis *et al.*, (2012) pesquisaram a associação da MMP-2 e do TIMP-2 com o CaP. Para tal, empregaram fragmentos de tecido prostático com câncer de 79 indivíduos obtidos após prostatectomia radical. Avaliaram por meio de PCR em tempo real a expressão dos genes da MMP-2 e da TIMP-2 e compararam com o

estadiamento Gleason e TNM, os níveis séricos pré-operatórios de PSA e a evolução da doença. Um grupo controle com hiperplasia prostática benigna (HPB) também foi investigado. Ficou demonstrada a subexpressão de MMP-2 e TIMP-2 no CaP e associação positiva dos níveis de MMP-2 e TIMP-2 com escores de Gleason mais elevados (41).

Ademais, em estudo anterior, Reis et al., (2011) constataram hiperexpressão de MMP-9 e subexpressão de TIMP-1 nas mesmas 79 amostras de biópsia de pacientes com CaP, e ainda associação significativa entre os níveis de MMP-9 e PSA maior que 10 ng/ml, fator por si só considerado indicador de pior prognóstico (42).

Carozzi et al., (2016) em um estudo de caso-controle retrospectivo com 126 pacientes com CaP, dos quais 38 evoluíram para óbito num prazo de 10 anos e 91 permaneceram vivos, identificaram que aqueles com maior expressão de MMP-2 nos fragmentos de biópsia possuíam chance 4,78 vezes maior de evoluir para óbito (*Odds ratio* (OR) =4,78 e $p=0,0066$), e que, portanto, níveis maiores de MMP-2 denunciaram um pior prognóstico (43).

Zhong et al., (2008) já haviam pesquisado o significado prognóstico de uma maior expressão de MMP-1, MMP-2 e MMP-9 em tecidos prostáticos de pacientes com CaP. Para todos os marcadores, comprovou-se significativa maior expressão nos casos de CaP quando comparados aos de HPB, e que MMP-2 estava correlacionada a maiores escores TNM e Gleason, e menor sobrevida (44).

Uma metanálise sobre a associação entre a expressão do gene da MMP-2 e o prognóstico do CaP, foi consolidada por Li et al., (2010). Os autores selecionaram somente estudos de caso-controle e os resultados indicaram que a expressão do gene da MMP-2 foi significativamente maior no grupo CaP que no grupo controle HPB. Além disso, constatou-se correlação significativa dos níveis de MMP-2 com maiores escores de Gleason e com estágios clínicos do CaP mais avançados, e ausência de correlação com os níveis séricos de PSA (45).

Estudo semelhante foi conduzido por Ma et al., (2016), no qual 1059 participantes advindos de 10 estudos foram alocados para uma metanálise sobre MMP-9 e CaP. Concluiu-se que MMP-9 está fortemente associada com o diagnóstico

de CaP na população geral (OR=7,91; IC=95%; $p<0,00001$), nos caucasianos quando analisados separadamente (OR=5,87; IC=95%; $p<0,00001$), assim como nos asiáticos (OR=11,80; IC=95%; $p<0,00001$), e que, portanto MMP-9 deve ser considerada como um importante marcador tumoral no CaP (46).

Os papéis da MMPs e TIMPs no CaP foram revisados por Gong et al., (2014). Os autores utilizaram diversos artigos para estudar as estruturas das MMPs e TIMPs, as suas funções, regulações e especialmente suas correlações com o diagnóstico e o prognóstico do CaP de acordo com o método (s) empregado (s) para detecção. A Tabela 2 reúne as principais constatações dos autores baseado nas evidências científicas reunidas (47).

Segundo os autores, destacaram-se MMP-2, MMP-7, MMP-9, MT1-MMP e TIMP-1. Inferiu-se que MMP-2 consiste em um biomarcador tecidual preditor de prognóstico ruim no CaP, uma vez que pode ser encontrada aumentada em 70% dos subtipos de CaP, e que está correlacionada com menor sobrevida em mais de 50% dos tumores epiteliais da próstata. Portanto, uma preditora independente de prognóstico desfavorável após prostatectomia. Ainda segundo a revisão, a possível utilização da MMP-9 como biomarcador tecidual de CaP é a mais controversa. Em alguns estudos foi demonstrada a correlação da maior expressão de MMP-9 com melhor desfecho clínico, enquanto em outros, com pior. Essa diferença pode ter se devido às diferenças metodológicas empregadas (47).

Tabela 2 Caracterização da expressão de MMPs e TIMPs no câncer de próstata

MMP e TIMP	Método	Conclusão	Referência
MMP-3 & TIMP-1	ELISA	↑TIMP-1 e MMP-3 no soro de pacientes com CaP metastático	Jung et al., 1997
MMP-1	IHC	↑ nos tumores de menor graduação e baixa incidência nos invasivos	Ozden et al., 2013
MMP-2	ISH e Northern	↑MMP-2/TIMP-1 nos tumores de alto estágio	Still et al., 2000
MMP-2, -9 & TIMP-1, -2	ISH	↑MMP-2, -9, ↓TIMPs nos tumores de alto estágio; MMP-2 e TIMP-1 são preditores independentes de prognóstico.	Wood et al., 1997
MMP-2	IHC	↑MMP-2 variando nos estágios de Gleason de CaP	Stearns & Wang, 1993
MMP-2	ELISA	↑sérico MMP-2 bem correlacionado com metástase óssea do CaP	Gohji et al., 1998
MMP-2	IHC	↑MMP-2 nos escores maiores de Gleason e nos pacientes com linfonodos comprometidos	Stearns & Stearns, 1996;

MMP e TIMP	Método	Conclusão	Referência
MMP-7 & TIMP-1	Northern	↑MMP-7 e MMP-7/TIMP-1 no CaP avançado	Hashimoto et al., 1998
MMP-9	Zimografia	↑atividade das MMP no tecido prostático maligno comparado com HPB	Hamdy et al., 1994
MMP-2, -9 & -13	ELISA	↑plasmático de MMP-2, MMP-9 e MMP-13 nos pacientes com CaP metastático	Morgia et al., 2005
MMP-2 & MT1-MMP	IHC, Western & Zimografia	↑MT1-MMP em células secretoras; MMP-2 heterogênea e MT1-MMP marcada dentro dos componentes epiteliais das glândulas cancerosas	Upadhyay et al., 1999
MMP-15 & -26	qRT-PCR	↑MMP-15 e MMP-26 correlacionados positivamente com escore de Gleason.	Riddick et al., 2005
MMP-2	IHC and ISH	↑MMP-2 na displasia epitelial e no adenocarcinoma prostático	Boag & Young, 1994
MMP-2 & -9	ISH	↑MMP-2&-9 associados com escores maiores de Gleason	Kuniyasu et al., 2000
MMP-2 & TIMP-2	IHC	↑MMP-2&TIMP-2 co-expressadas no adenocarcinoma e correlacionados com prognósticos variados	Ross et al., 2003
MMP-2, -9 & TIMP-1, -2	IHC	↑MMP-2, ↓MMP-9, ↓TIMP-1 nos tumores malignos; ↓TIMP-2 nas células do estroma adjacente ao tumor	Brehmer et al., 2003
MMP-1, MT1-MMP, MMP-7 & -9	IHC	↓MMP-1&↑ MT1-MMP, MMP-7 & MMP-9	Cardillo et al., 2006
MMP-2	IHC	↑MMP-2 associado com altos graus de tumor nos pacientes com doença metastática	Murray et al., 2012
MMP-2, -3, -9, -10 & -13	IHC	↑MMP-2, -3&-10 nas células neoplásicas; nenhuma imunorreatividade foi observada contra MMP-9 e -13	Bodey et al., 2001
MMP-9	IHC	↑MMP-9 nos tumores de alto grau e fortemente associado com altos escores de Gleason	Trudel et al., 2010
MMP-2, -7 & -9	IHC & ISH	↑MMP-2&-7 nos tumores e localização variada	Knox et al., 1996
MMP-7	ELISA	↑sérico de MMP-7 significativamente maior nos pacientes com metástases a distância	Szarvas et al., 2011
TIMP-1	ELISA	↑plasmático de TIMP-1 associado com menor sobrevida	Oh et al., 2011
MMP-2	IHC	MMP-2 expresso em mais de 50% das células malignas está associado com menor sobrevida	Trudel et al., 2003
MMP-2, -3, -7, -9, -13 & -19	IHC	↑ expressão de MMP-9 associado com maior recorrência e menor sobrevida de pacientes com CaP localizado	Boxler et al., 2010
MMP-9	qRT-PCR	↑MMP-9 relacionado com recorrência bioquímica	Reis et al., 2011
MMP-2 & -9	ELISA	↑sérico de MMP-9 nos pacientes com CaP, mas nenhuma associação com metástase óssea	Incorvaia et al., 2007
MMP-2, MMP-9 & MMP-9/NGAL	Cromatografia, zimografia & espectrometria	↑MMP-9 e dímero na urina de pacientes com CaP e câncer de bexiga	Roy et al., 2008
MMP-2 & -9	IHC	MMP-2&-9 significativamente associadas com pior prognóstico	Miyake et al., 2010

MMP e TIMP	Método	Conclusão	Referência
MMP-7	Northern, ISH	↑MMP-7 nas células epiteliais do adenocarcinoma prostático primário, assim como nas células metastáticas	Pajouh et al., 1991

Legenda: ISH: Hibridização in situ; IHC: Imunohistoquímica; qRT-PCR: PCR em tempo real.

Fonte: Gong et al., 2014 (47).

Quanto à TIMP-1, estudos bioquímicos, de hibridização in situ (ISH) e imunohistoquímica (IHC) revelaram menor expressão de TIMP-1 nas amostras de adenocarcinoma prostático e dos demais tumores sólidos da próstata (47). Paradoxalmente, outros estudos detectaram aumento dos níveis séricos de TIMP-1 e correlação com pior prognóstico e menor sobrevida, e maiores níveis séricos de TIMP-1 nos pacientes com metástases extra prostáticas que nos tumores confinados à próstata, o que permitiu deduzir que TIMP-1 é uma inibidora de metástase. Assim sendo, os autores não souberam precisar o que contribuiu para o aumento dos níveis séricos de TIMP-1 (47).

Em suma, estudos realizados com amostras histopatológicas têm objetivamente evidenciado a maior presença das MMPs e menor presença dos TIMPs no CaP, além de sua correlação com a pior evolução pós diagnóstico e tratamento.

1.3 DOSAGENS DE MMPS E TIMPS CIRCULANTES

Por se tratar de temática semelhante a desta pesquisa, se faz necessária uma maior ênfase nos estudos registrados na literatura realizados para quantificar MMPs e TIMPs no soro ou plasma de pacientes com CaP.

Morgia et al., (2005) investigaram a utilização de MMPs como biomarcadores circulantes para o diagnóstico e prognóstico do CaP. Foram testados 40 pacientes com CaP, dos quais 20 possuíam tumor localizado e 20 apresentavam metástases. Também foram analisadas amostras sanguíneas, a título de comparação, de 20

indivíduos com HPB e de 20 homens saudáveis. Dosou-se no soro MMP-2, MMP-9, MMP-13 e TIMP-1 por ELISA antes do início do tratamento e 90 dias após. Os níveis de MMP-2, MMP-9 e MMP-13 foram significativamente maiores no grupo CaP que nos grupos controles saudáveis e com HPB. Ainda significativamente maiores nos pacientes que apresentavam metástases à distância que naqueles com CaP localizado, e além disso, os níveis séricos de MMP-2 foram maiores nos pacientes com metástases ósseas. Ambas MMP-2 e MMP-9 decresceram no plasma após tratamento dos pacientes com metástases, e nos casos em que permaneceram elevadas, apontaram para um pior prognóstico. TIMP-1 estava em menor concentração no soro dos pacientes com CaP metastático do que nos demais grupos, embora sem significância estatística. Em suma, os autores concluíram que algumas MMPs séricas em conjunto com o PSA podem ser utilizadas como biomarcadores séricos auxiliares para o diagnóstico (MMP-13) e prognóstico (MMP-2 e MMP-9) do CaP (48).

Gohji et al., (1998) já haviam acumulado evidências da correlação entre os maiores níveis séricos de MMP-2 com a extensão tumoral. Os autores dosaram MMP-2 por ELISA no soro de 98 pacientes com CaP, 76 com HPB e 70 homens saudáveis. Verificou-se que os níveis séricos de MMP-2 foram significativamente maiores no grupo CaP que nos grupos HPB e saudáveis, e ainda bem mais altos nos pacientes com CaP metastático que naqueles sem metástase (49).

Zhang et al., (2004) pesquisaram entre outras, a atividade enzimática da MMPs-2 e -9 no soro de pacientes com e sem CaP. Foram analisados 20 soros de homens saudáveis, 26 com HPB, 10 com CaP localizado e 15 com CaP metastático, totalizando 71 amostras. A atividade enzimática foi aferida por zimografia. Os resultados indicaram haver diferenças significativas na atividade enzimática entre os grupos para MMP-9, mas não para MMP-2. Assim, concluiu-se que os níveis séricos de MMP-9 estariam correlacionados com a presença de malignidade e de metástases(50). E, diferentemente do estudo de Gohji et al., (1998), o mesmo se revelou inverídico para MMP-2 no soro, o que pode ser em parte explicado pelas diferentes metodologias adotadas nos dois estudos (49).

Já Bonaldi et al., (2015) correlacionaram os níveis séricos de E-caderina e MMP-13 no plasma de pacientes com CaP antes do início do tratamento, e três e seis

meses depois, com os níveis séricos de PSA, PSA livre, testosterona total e a evolução clínica. O mesmo foi feito em um grupo controle paralelo. A concentração de E-caderina foi menor no grupo CaP que no grupo controle. Para MMP-13, diferenças não foram verificadas. Durante o tratamento os autores identificaram apenas correlação positiva entre os níveis de PSA e E-caderina no terceiro mês de tratamento, e entre os níveis de testosterona e MMP-13 antes do início do tratamento (51).

TIMP-1 plasmático foi objeto de estudo de Oh et al., (2011), tendo sido dosado em 362 amostras de indivíduos com CaP metastáticos, resistentes à hormonioterapia e castrados. Trata-se de estudo de coorte com média de seguimento de 6,6 anos. Os pacientes que apresentaram os níveis mais elevados de TIMP-1 plasmático foram os que tiveram menor sobrevida, 19 meses, contra 43 meses daqueles que tinham os menores níveis de TIMP-1. Também foram computados no estudo os valores do PSA, fosfatase alcalina e escore Gleason. Segundo os autores, TIMP-1 plasmático demonstrou-se o melhor preditor de sobrevida em pacientes com CaP metastático resistentes e castrados, independentemente dos outros marcadores clássicos, e que, portanto, deve ser dosado como fator prognóstico (52).

A pesquisa acima foi corroborada pela de Gong et al., (2015), que, entre outros demais objetivos, compararam os níveis plasmáticos de TIMP-1 dos pacientes com CaP resistente ao tratamento hormonal (pacientes submetidos à orquiectomia) com os pacientes responsivos à hormonioterapia. No primeiro grupo, TIMP-1 plasmático foi significativamente maior (53).

Prior et al., (2013) dosaram no soro e urina de 113 homens, alguns portadores de CaP, MMP-2 e alguns outros biomarcadores, inclusive PSA. Os autores afirmam em seu estudo que MMP-2 dosada combinadamente com o PSA pode aumentar a sensibilidade para o diagnóstico de CaP (54).

Já a MMP-7 foi alvo de investigação de Szarvas et al., (2011), tendo sido quantificada por ELISA no soro de 93 pacientes com CaP localizado e 13 com metástases ósseas, todos pré-operatórios, além de 19 controles normais. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de MMP-7 dos pacientes e dos controles. Contudo, os níveis de MMP-7 foram

significativamente elevados nos pacientes com CaP metastático. Os autores sugerem que caso se utilize um ponto de corte de 3,7 ng/ml, a especificidade e sensibilidade da MMP-7 sérica para diagnóstico de CaP metastático é de 69 e 92% respectivamente. E ainda que MMP-7 sérica é um potente biomarcador para identificar pacientes com CaP metastático e um excelente preditor independente de prognóstico ainda na fase pré-operatória (55).

González et al., (2010) encontraram resultados insatisfatórios quando dosaram por ELISA MMP-9 no soro de 100 pacientes consecutivos que foram atendidos em um serviço de urologia de um hospital espanhol para se submeter à biópsia da próstata (estudo de corte prospectivo). Desses 100, 32 tiveram resultado de CaP com 52% classificados com Gleason maior ou igual a 7. Não foi encontrada diferença significativa dos níveis de MMP-9 entre os grupos com CaP e com resultado histológico benigno ou incerto. Nenhuma associação foi verificada entre os níveis de MMP-9 e os de PSA ou o escore Gleason (56).

Antes, porém, Castellano et al., (2008) evidenciaram em sua pesquisa que os níveis séricos de MMP-9 e de um ativador seu, o osteopontin, declinaram significativamente em pacientes 6 meses após a prostatectomia. Também identificaram correlação entre os valores de MMP-9 séricos e os do PSA e estadiamento Gleason (57).

De Cicco et al., (2008) quantificaram por ELISA MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2, entre outras moléculas, no plasma de 162 homens com diagnóstico de CaP. Contraditoriamente, encontraram apenas associação significativa entre baixos valores de MMP-2 (menor que 206 ng/ml) e uma pior evolução da doença (HR corrigido= 1,7 e IC=95%) (58).

Incorvaia et al., (2007) dosaram MMP-2 e MMP-9 no sangue de pacientes com câncer de mama e de próstata com e sem metástases ósseas. No que se refere ao CaP, ambas se encontravam significativamente mais elevadas nos pacientes com CaP em comparação à um grupo controle também testado, porém não havia diferença entre os com e sem metástases ósseas. Concluiu-se, portanto, que as MMPs, principalmente a 2, apresentou baixa acurácia no diagnóstico do CaP ósseo-metastático (59). Salminen et al., (2006) haviam obtido as mesmas conclusões que

Incorvaia et al., (2007) acerca da baixa acurácia de MMP-2 e MMP-9 no diagnóstico de CaP ósseo-metastático, em analogia à acurácia do PSA e fosfatase alcalina, tendo assim contraindicado suas dosagens para tal finalidade (60).

Dosagens séricas de MMPs também foram realizadas no Japão, tendo sido sinalizado pelos autores que MMP-2 pode ser utilizada em conjunto com o PSA para a avaliação prognóstica do CaP. Kanoh et al., (2002) aferiram por ELISA MMP-2 e PSA no soro de 51 pacientes com CaP e 39 com HPB. Os resultados foram os seguintes: os níveis séricos de ambos MMP-2 e PSA aumentavam com a progressão da doença e foram significativamente maiores nos indivíduos com CaP metastático que localizado. Nenhuma associação foi comprovada entre os níveis séricos de MMP-2 e PSA. Valores muito altos de MMP-2 (maior que 950 ng/ml) e PSA (maior que 300 ng/ml) foram observados apenas naqueles que possuíam metástases ósseas (61).

Por sua vez, Jung et al., (1997) analisaram as concentrações plasmáticas de MMP-1 e MMP-3, além de TIMP-1, por ELISA, de 19 portadores de CaP não metastático, 18 metastáticos, 29 com HPB e 35 homens saudáveis. Não foi encontrada diferença nas médias dos quatro grupos. A média da concentração de MMP-3 e TIMP-1 nos metastáticos foi significativamente maior que nos outros grupos, sendo que 10 dos 18 apresentaram níveis de TIMP-1 acima dos valores de referência. Concluíram que TIMP-1 pode ser correlacionado com o estágio do CaP (62).

MMP-9 foi alvo do estudo de Gil-Ugarteburu et al., (2012), os quais correlacionaram as concentrações plasmáticas de MMP-9 de 235 pacientes (dosada por ELISA) com o polimorfismo 1562C/T encontrado na região promotora do gene codificador desta metaloproteinase, aferido em fragmentos de biópsia, dos quais 90 pacientes foram positivos para CaP. Entre outras constatações, os autores não identificaram diferenças nas concentrações de MMP-9 nos subgrupos derivados, nem correlação alguma com o polimorfismo pesquisado (63).

Finalmente, no que se refere às MMPs com o biomarcadores circulantes para o diagnóstico e monitoramento do CaP, escassos estudos têm demonstrado, embora contraditória e inconclusivamente, um aumento de algumas MMPs no soro ou plasma de pacientes com CaP, especialmente MMP-2, MMP-7, MMP-9 e TIMP-1, além de as correlacionarem com pior prognóstico da doença.

1.4 MMP-1 NO CaP

Em particular, a forma ativa da MMP-1 atua degradando colágeno intersticial (incluindo os tipos I, II e III), com maior expressão em vesícula biliar e apêndice. Localizado em 11q22.2, onde se situa cluster codificador de diversas MMPs, seu gene apresenta formas alélicas que foram associadas a distúrbios como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (64).

Estudos prévios indicam possibilidade de associação de polimorfismos da região promotora do gene da MMP-1 com o CaP (65–68), apesar de uma metanálise recente concluir que apenas os polimorfismos 11715A/6A da MMP-3 e a variação rs17576 da MMP-9 foram correlacionados com risco aumentado de CaP (69).

Foram identificados raríssimos estudos na literatura que investigaram níveis séricos de MMP-1 no CaP, com destaque para o relato de Jung et al. (1997) que compararam diferentes estadiamentos de neoplasia (incluindo grupo HPB), sem produzir evidência de níveis diferenciais (62).

2. OBJETIVO

Tomando por base evidências experimentais de que a super-expressão de MMP-1 no CaP aumenta a migração e a invasão por células neoplásicas, a presente pesquisa objetivou mensurar concentrações de MMP-1 livre circulantes de indivíduos com CaP e com HPB, corrigindo os resultados para uma importante variabilidade alélica apontada como predisponente a níveis diferenciais da enzima no soro.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Versar, baseado em revisão da literatura científica, sobre as principais características das metaloproteinases de matriz
- Retratar o câncer de próstata conforme bibliografia e dados oficiais
- Quantificar, além da metaloproteinase-1, diversas covariáveis com intuito de identificar alguma associação com o câncer de próstata e minimizar uma possível heterogeneidade entre os grupos pesquisados
- Contribuir para o diagnóstico do câncer de próstata e de outras comorbidades possivelmente presentes nos indivíduos pesquisados

3. MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRA

Trata-se de ensaio clínico transversal desenvolvido em pacientes do sexo masculino com idade igual ou superior a 57 anos, atendidos consecutivamente no Serviço Ambulatorial de Urologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB). Durante o período de 36 meses (maio de 2016 a maio de 2019) foram atendidos 196 homens, os quais compuseram a amostra total deste estudo, portanto uma amostra de conveniência na qual todos os indivíduos atendidos foram incluídos. Cada indivíduo foi submetido a protocolo clínico focado na caracterização de alteração prostática, caso houvesse. Ademais, foram analisados aspectos clínicos, bioquímicos, metabólicos, antropométricos e inflamatórios de cada participante. Dos 196 indivíduos atendidos, 20 apresentaram diagnóstico de CaP confirmado por exame anatomopatológico, formando o grupo teste; os demais 176 tiveram diagnóstico de HPB, compondo o grupo controle.

3.2 AVALIAÇÃO UROLÓGICA

O presente estudo contou com uma avaliação urológica inicial dos participantes. Foram utilizados os critérios das Diretrizes da Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) para o diagnóstico do CaP, cujo procedimento clínico inicial consistiu

na obtenção da história clínica seguida pelo exame de toque retal, onde o volume e a simetria da glândula prostática foram detectados a partir do toque retal. Os níveis do antígeno prostático específico (PSA) foram obtidos para cada participante, bem como avaliados os sinais e sintomas classicamente associados ao quadro de CaP ativo, como disúria, intermitência ou esforço miccional, noctúria, sensação de repleção e hemospemia. Foram encaminhados para biópsia pacientes com presença de nódulos prostáticos detectados ao toque retal e/ou com níveis elevados de PSA (> 4,0 ng/mL), acompanhados ou não de outros sinais e sintomas (71).

Com base na conduta clínica descrita, foram considerados como portadores de CaP os pacientes elegíveis à cirurgia de prostatectomia radical, com biópsia positiva para neoplasia maligna conforme escore de *Gleason* (71). Caso excluída a suspeição de CaP após biópsia, os participantes eram considerados portadores de hiperplasia prostática benigna.

3.3 ANÁLISES LABORATORIAIS: TESTES CLÍNICOS E BIOQUÍMICOS

Foram coletadas amostras biológicas a partir de sangue periférico dos pacientes arrolados, mantendo-as preservadas (refrigeradas entre 4 e 8°C) para imediata análise de parâmetros de bioquímicos, ou estocadas (congeladas a -80°C) para análises complementares posteriores para o presente estudo. As amostras foram armazenadas no laboratório de Imunogerontologia da Universidade Católica de Brasília.

As amostras foram processadas para bioquímica clínica seguindo protocolos, controle de qualidade e instruções técnicas analíticas de rotina laboratorial. Foram analisados os perfis glicêmicos, lipídicos, enzimáticos, metabólicos e inflamatórios de cada participante. Níveis de glicose, creatinina, colesterol, triglicérides, HDL, AST

(TGO), ALT (GTP), Gama-GT, proteínas totais e albumina, foram mensurados por testes enzimáticos, cinéticos, ou colorimétricos, com reagentes compatíveis com o equipamento *HumanStar 600* (InVitro®, Brasil). A mesma automação foi utilizada para determinar níveis de proteína C-reativa ultrasensível, por turbidimetria. O ritmo de filtração glomerular foi estimado pela relação de Cockcroft-Gault (72), enquanto as frações LDL e VLDL foram estimadas pela fórmula de Friedewald (73).

As análises hematológicas foram realizadas por automação com o uso do em equipamento CellDyn3700 marca ABBOTT®, Brasil, operado conforme recomendações do fabricante. A hemoglobina glicada foi dosada pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), enquanto níveis de PSA total, PSA livre, insulina, vitamina D e TSH foram obtidos por eletroquimioluminescência através do sistema *Cobas E411* da marca Roche®, Brasil. Foram calculados os índices HOMA Beta e IR, além da relação PSA livre/PSA.

Os testes hematológicos, bioquímicos e hormonais referidos acima foram realizados no laboratório do Hospital São Francisco do Distrito Federal, onde o autor é o responsável técnico e administrativo.

Quanto aos valores de referência, foram considerados os fornecidos pelos fabricantes dos Kits ou aqueles preconizados pelas sociedades médicas conforme seus respectivos Guidelines, ou os valores universalmente aceitos e já tradicionais.

A dosagem de MMP-1 total circulante foi realizada por imunoenensaio enzimático (ELISA) (com kit comercializado pela empresa R&D Systems, USA – DuoSet, lote 339081, validade 07/2019), utilizando soro como amostra, e processado conforme orientações do fabricante. A análise foi procedida no laboratório de Imunogerontologia da Universidade Católica de Brasília.

3.4 MMP1 GENOTIPAGEM

O DNA genômico total foi obtido utilizando um kit de extração comercial (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Brazil). As reações de genotipagem foram realizadas utilizando a *real-time PCR* (qPCR) com o reagente TaqMan® Universal Master Mix e um ensaio específico para o polimorfismo SNP rs495366 da empresa Thermo Fisher (Massachusetts, USA), baseado no método de *stem-loop*. Os tempos de desnaturação, extensão e o número de ciclos utilizados seguiram o programa padrão no equipamento utilizado, o *QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher®, Massachusetts, USA)*. Assim como o ELISA, a genotipagem foi executada no laboratório de Imunogerontologia da Universidade Católica de Brasília.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados o teste t de Student (para dados paramétricos) ou o teste Mann-Whitney (para dados não paramétricos) para comparar variáveis antropométricas e bioquímicas médias (ou medianas) entre os portadores das condições da próstata investigadas.

A distribuição perto do normal de todas as variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, para avaliar a ocorrência e a força da associação de níveis circulantes e de grupos genotípicos da MMP1 com biomarcadores clássicos para condições relacionadas à idade, foram obtidos coeficientes de correlação para desvendar parâmetros de potencial efeito de confusão no modelo principal. A associação entre variáveis contínuas foi avaliada usando o

teste de correlação de Spearman devido ao envolvimento regular de pelo menos uma variável categórica ou não paramétrica em todas as análises. Portadores de diferentes genótipos foram representados por números árabes consecutivos (por exemplo, GG, AG e AA representados por 1, 2 e 3, respectivamente). Sempre que uma interação fosse observada, a associação dos biomarcadores com as condições da próstata era testada por meio de análises de correlação parcial realizadas usando o ajuste para as variáveis de confusão. Além disso, as concentrações brutas de cada biomarcador foram testadas em indivíduos que exibiam HPB ou CaP de acordo com o nosso protocolo, usando o teste de Mann-Whitney. Quando os resultados mostraram diferenças significativas, foram apresentados os tamanhos dos efeitos (d) e respectivos intervalos de confiança (IC 95%). A análise de regressão multivariada linear, método stepwise, foi realizada para avaliar em que medida as concentrações séricas dos biomarcadores explicam a variabilidade na ocorrência da condição da próstata.

Todas as análises foram realizadas com o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) para Windows (versão 17.0). Para este estudo, foi adotado o limiar bicaudal padrão de significância ($p \leq 0,05$).

3.6 PRECEITOS ÉTICOS

Por estar de acordo com a resolução 466/12, esta pesquisa encontra-se aprovada pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, conforme parecer consubstanciado número 1.708.470. Todos os participantes assinaram, antes da coleta de amostras e avaliação clínica, o termo de consentimento livre e esclarecido, e todos os resultados são e serão mantidos em sigilo (termo de consentimento em anexo).

4. RESULTADOS

Compuseram a amostra um total de 196 homens atendidos pelo mesmo médico no ambulatório de urologia do Hospital Universitário de Brasília durante um período de 36 meses. Todos concordaram em participar da pesquisa e se submeteram à coleta de amostras biológicas para os exames laboratoriais. As condições das próstatas observadas por meio do exame do toque retal demonstraram que a ampla maioria dos pacientes diagnosticados com CaP exibiram alteração de consistência (nódulos e/ou endurecimento), com apenas um paciente não demonstrando alteração perceptível. À biópsia, o escore de *Gleason* mais frequente ($n = 8$; 40%) correspondeu àquele de grau intermediário 3+4. Entretanto, escores de alto risco ($Gleason \geq 8$) representaram 30% ($n = 6$) do total analisado.

A tabela 3 apresenta escores médios e medianos de variáveis físicas e bioquímicas agrupadas conforme condição prostática. A despeito de uma diferença em número de integrantes, as medidas de bases se mostraram bastante próximas, indicando clara homogeneidade entre grupos quanto a condições clínicas gerais. Neste contexto, destacam-se os valores equivalentes em termos de proteína C reativa, o que afasta uma possível interferência por condições inflamatórias adversas (como prostatite, por exemplo) sobre os níveis circulantes de MMPs (15). Como resultado esperado, uma diferença significativa foi observada entre níveis de PSA total e livre assim como sua razão, fenótipo bem estabelecido na literatura, ainda que sejam questionáveis a sensibilidade e a especificidade do PSA para o diagnóstico do CaP.

Como esperado, a genotipagem rs495366 revelou que o homozigoto A constituía uma minoria (6,6%), enquanto o homozigoto G englobava quase metade (46,4%) dos pacientes, com média de idade e razão sexual semelhantes nos grupos genotípicos. Em toda a amostra, as proporções genotípicas não se desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 2,6$; $P = 0,106$) ou da condição prostática ($\chi^2 = 1,9$; $P = 0,394$).

Tabela 3 Características clínicas e bioquímicas do soro dos indivíduos de acordo com o diagnóstico de Câncer de Próstata (CaP) ou Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

	CaP (n = 20)	HPB (n = 176)	P*
Idade, anos	66.0 ± 11.5	67.1 ± 10.2	0.637
IMC, kg/m ²	26.2 ± 3.8	25.7 ± 4.2	0.624
Glicose, mg/dl	104.3 ± 24.2	102.2 ± 31.7	0.772
HbA1c, %	5.8 ± 1.1	5.8 ± 1.3	0.988
Insulina, mU/mL	7.8 [3.2; 9.2]	5.7 [2.9; 10.0]	0.471 [†]
índice HOMA	1.8 [0.8; 2.3]	1.4 [0.7; 2.5]	0.440 [†]
Triglicérides, mg/dL	141.9 ± 42.1	156.7 ± 113.2	0.249
Colesterol total, mg/dL	204.2 ± 37.2	197.4 ± 48.2	0.538
VLDL colesterol, mg/dL	28.4 ± 8.4	29.2 ± 16.4	0.727
LDL colesterol, mg/dL	126.5 ± 35.2	114.6 ± 43.7	0.242
HDL colesterol, mg/dL	49.4 ± 10.8	50.5 ± 13.0	0.710
AST/TGO, U/L	27.3 ± 11.7	27.6 ± 12.9	0.922
ALT/TGP, U/L	25.6 ± 17.1	26.4 ± 15.4	0.815
GGT, U/L	56.0 ± 42.6	49.0 ± 46.3	0.519
Creatinina, mg/dL	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.3	0.585
Proteínas totais, g/dL	7.2 ± 0.5	7.4 ± 0.4	0.192
Albumina, g/dL	4.2 ± 0.4	4.4 ± 0.4	0.216
Vitamina D, nmol/L	29.4 ± 10.2	31.5 ± 13.1	0.486
PCR, mg/L	1.12 ± 0.77	1.11 ± 0.68	0.995
TSH, mU/L	1.8 [1.0; 3.2]	1.9 [1.2; 3.0]	0.931 [†]
PSA total, ng/ml	21.8 [10.5; 34.6]	2.4 [1.1; 5.4]	<0.001 [†]
PSA livre, ng/ml	1.8 [0.5; 4.3]	0.4 [0.2; 0.9]	0.001 [†]
Relação PSAL livre/total	8.0 [5.4; 16.1]	19.7 [13.0; 26.1]	<0.001 [†]

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda - IMC: índice de massa corporal; HbA1c: hemoglobina glicada tipo A1c; HOMA: avaliação do modelo de homeostase; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa; AST/TGO: aspartato transaminase ou transaminase glutâmico-oxaloacética sérica; ALT/TGP: alanina transaminase ou transaminase glutâmico-pirúvica sérica; GGT: gama-glutamil transferase; TSH: hormônio estimulador da tireóide; PCR: proteína C reativa; PSA: antígeno específico da próstata. Dados expressos em cada grupo como média ± desvio padrão ou mediana com intervalos interquartis entre parênteses. * Valores de P para comparação de diferenças usando o teste t de Student, exceção para o uso do teste de Mann-Whitney[†] para dados não paramétricos.

Com base no conhecimento prévio de que este SNP influencia concentrações séricas de MMP-1 (74,75), a correlação entre diferentes arranjos genotípicos e níveis do mediador foram testados. Em tempo, testou-se a correlação dos referidos genótipos/níveis com variáveis clínicas usualmente desreguladas no envelhecimento (ou acentuadas no CaP), a exemplo da idade, TSH, PSA e parâmetros metabólicos associados. Estes testes objetivaram avaliar se níveis séricos de MMP-1 exibiam influência pelas variações alélicas do gene ou por outras condições clínicas incidentais, o que poderia suscitar possibilidade de associação espúria com CaP.

No entanto, não foi encontrada nenhuma associação do polimorfismo ou da concentração sérica de MMP-1 com as variáveis clínicas testadas (Tabela 4). Contudo, homozigotos para o alelo A exibiram níveis reduzidos de MMP-1 ($p= 0,045$ para rs495366 G vs AA), em marcante concordância com a melhor evidência disponível pela literatura (66).

O teste de correlação de Spearman foi utilizado. Os dados são expressos em índice de correlação e nível de significância (dois dígitos r ; três dígitos P). IMC: índice de massa corporal; HbA1c: hemoglobina glicada tipo A1c; TGL = triglicerídeos; CT = colesterol total; TSH: hormônio estimulador da tireóide; PSA: antígeno específico da próstata. Os indivíduos com os genótipos GG, AG e AA foram representados respectivamente por 1, 2 e 3 na análise com todos os grupos, enquanto os homozigotos G e portadores do alelo A (A_) foram representados por 1 e 2 nessa ordem na análise subsequente. Limiar de significância fixado em $P \leq 0,05$

Tabela 4 Análises de correlação dos níveis e dos grupos genotípicos da metaloproteinase-1 da matriz (MMP1) através das características clínicas e bioquímicas dos 196 idosos testados

	Idade (anos) p	IMC, (kg/m ²)	HbA1c, (%) p	Triglicérides (mg/dL) p	Colesterol (mg/dL) p
rs495366, GG vs AG vs AA	-0.03; 0.709	0.02; 0.813	-0.00; 0.945	-0.05; 0.474	0.00; 0.957
rs495366, GG vs A_	-0.01; 0.884	0.00; 0.960	-0.02; 0.768	-0.02; 0.745	0.02; 0.766
rs495366, G_ vs AA	-0.07; 0.332	0.06; 0.457	0.06; 0.436	-0.12; 0.094	0.06; 0.396
MMP1, pg/mL	0.05; 0.511	0.05; 0.499	0.10; 0.181	0.05; 0.537	-0.03; 0.727
	Creatinina, (mg/dL) p	PCR, (mg/L) p	TSH, (mU/L) p	PSA total, (ng/mL) p	MMP1, (ng/mL) p
rs495366, GG vs AG vs AA	-0.09; 0.237	-0.09; 0.249	0.03; 0.714	-0.06; 0.431	-0.14; 0.065
rs495366, GG vs A_	-0.06; 0.433	-0.06; 0.414	0.01; 0.935	-0.04; 0.605	-0.11; 0.134
rs495366, G_ vs AA	-0.14; 0.059	-0.13; 0.085	0.08; 0.252	-0.09; 0.208	-0.15; 0.045
MMP1, ng/mL	0.11; 0.154	0.10; 0.168	0.01; 0.883	0.02; 0.753	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base nas análises preliminares acima, testes inferenciais compararam níveis de MMP-1 entre pacientes diagnosticados com CaP e HPB, com ajustamento para os genótipos produzidos pelo SNP rs495366. Nota-se assim que, apesar da interferência dos genótipos, valores de MMP-1 foram encontrados em nível médio exatamente duas vezes maior entre indivíduos portadores de CaP (0.96 ng/mL) que aqueles dosados entre portadores de HPB (0.48 ng/mL) (Figura 2).

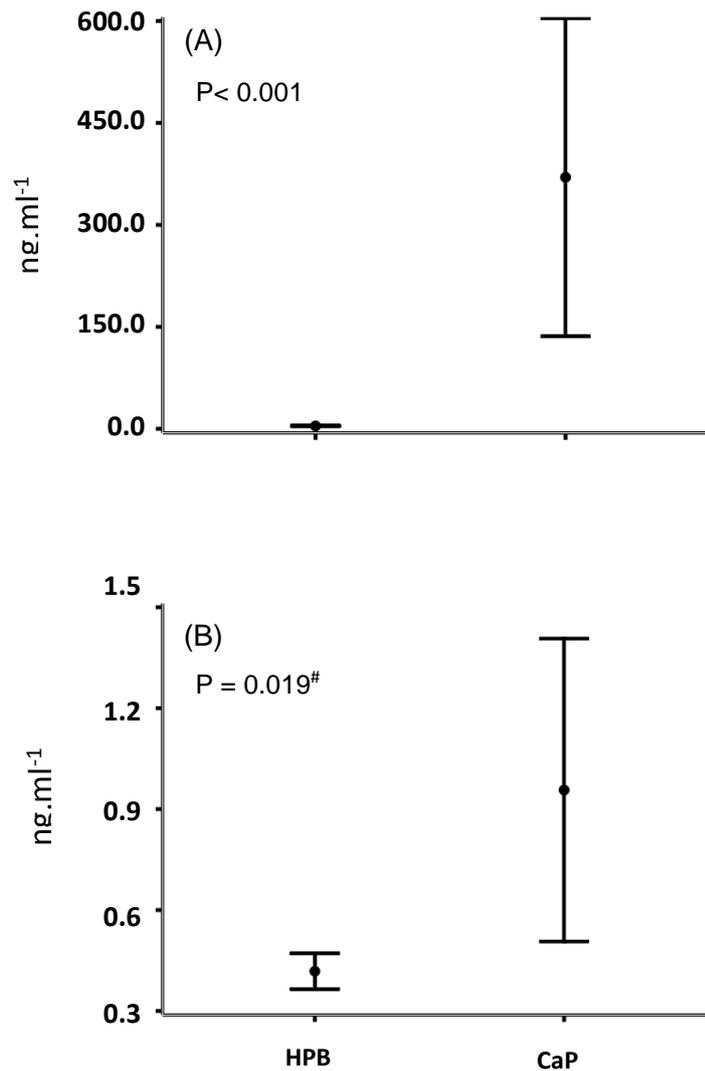


Figura 2 Comparação dos níveis circulantes brutos de PSA (A) e MMP-1 (B) entre indivíduos diagnosticados com hiperplasia benigna da próstata (HPB) ou câncer de próstata (CaP). A significância foi verificada pelo teste de correlação parcial controlado para os níveis de MMP-1 e todos os três genótipos rs495366. Barras verticais representam intervalos de um erro padrão. O número sobrescrito# representa o tamanho do efeito (d) de 1,57 e intervalo de confiança de 95% para HPB (0,3; 0,6) e CaP (0,5; 1,4).

As análises, após a convenção de Cohen (76), categorizaram essa diferença nos níveis de MMP-1 como de magnitude moderada do tamanho do efeito (d) entre indivíduos com e sem malignidade prostática ($d_{CaPvsHPB} = 0,5$). Por conseguinte, as análises de regressão logística binária revelam que os portadores de CaP tendem a exibir níveis de MMP-1 em circulação duas vezes mais altos em comparação aos não portadores da malignidade ($p = 0,038$).

5. DISCUSSÃO

MMPs compõem uma família de enzimas proteolíticas que participam de uma série de processos fisiológicos e patológicos. São capazes de degradar membranas celulares e MEC, além de participarem da expressão, produção e secreção de citocinas, de moléculas de adesão e de fatores de crescimento celular. Atuam, entre outros processos, na remodelação tecidual, inflamação, cicatrização, embriogênese, angiogênese, linfangiogênese e metástase (14, 15, 21,77).

Particularmente no câncer, há aumento de expressão e liberação de várias MMPs, com conseqüente elevação das concentrações teciduais e circulantes destes agentes e de seus moduladores (78). Embora continuem desconhecidos os mecanismos bioquímicos pelos quais MMPs participam da progressão tumoral, células tumorais podem produzir e secretar uma diversidade de MMPs, fato essencial para o processo metastático (77).

Grande parte das pesquisas apontam para uma elevação dos níveis circulantes da maioria das MMPs com a progressão do câncer, o que torna suas mensurações promissoras para a utilização no diagnóstico e no prognóstico de vários tipos de tumores. Embora estudos neste sentido tenham sido realizados, os resultados são conflitantes e não foi possível até o momento definir uma MMP com potencial para discriminar qualquer tipo de câncer (78).

No que se refere à MMP-1, há na literatura estudos correlacionando seus níveis circulantes com alguns tipos de câncer. Níveis séricos de MMP-1 foram mensurados em pacientes com câncer de pulmão, tendo sido significativamente aumentados nos portadores da malignidade, e positivamente associados com estágios mais avançados da doença e com menor sobrevida dos pacientes (45). Resultados semelhantes foram alcançados no câncer de estômago, com níveis circulantes elevados de MMP-1 e de TIMP-1 em portadores desta neoplasia em comparação a um grupo saudável, e ainda associados a aspectos de estadiamento avançado do tumor como tamanho, invasividade, acometimento de linfonodos, metástase hepática e invasão perineura

(79). Em ambos casos, os autores sugerem dosagem sérica de MMP-1 como ferramenta prognóstica e fator preditor de sobrevida, independente de outros fatores, para estes tipos de câncer (45,79).

Por outro lado, níveis séricos médios de MMP-1 foram encontrados diminuídos no grupo com câncer de mama, em uma associação inversa com o tamanho do tumor (80). Do mesmo modo, no câncer de bexiga foram quantificados níveis médios menores de MMP-1 sérica entre portadores da neoplasia comparados a grupo controle saudável (81). Considerando a provável atuação das MMPs na facilitação da proliferação tumoral e, sobretudo, do processo metastático, esta aparente contradição é inesperada, e constitui fato até então sem explicação na literatura.

No CaP, os raros estudos envolvendo MMP-1 foram realizados com amostras de tecido. Um destes, demonstrou evidências diretas de participação de MMP-1 neste câncer, com expressão nos tecidos malignos diretamente proporcional ao crescimento tumoral e à presença de metástase. Além disso, em paralelo, nesse mesmo estudo, a utilização de anticorpos anti-MMP-1 inibiu, em ratos, o crescimento do tumor prostático assim como a incidência de metástase pulmonar (68).

Paradoxalmente, outro estudo com portadores de CaP investigou por imunohistoquímica a expressão de MMP-1 nas células do tumor e a correlacionou com dados clínicos e laboratoriais dos pacientes. Verificou-se que maior expressão de MMP-1 nas células tumorais estava relacionada com escores de *Gleason* mais baixos, níveis reduzidos de PSA e menor invasividade local (82).

No que se refere à MMP-1 como biomarcador sanguíneo do CaP, objeto deste estudo, são ainda mais raras as pesquisas análogas, o que impossibilita discussão mais ampla. Em um desses estudos, onde níveis plasmáticos de MMP-1 foram comparados entre homens saudáveis, com HPB, com CaP *in situ* e com CaP metastático, títulos médios de MMP-1 não diferiram entre grupos (62).

Nossa pesquisa se propôs a comparar níveis séricos de MMP-1 entre pacientes diagnosticados com CaP e portadores de HPB, objetivando assim testar seu potencial enquanto biomarcador para o diagnóstico diferencial da neoplasia prostática. Nossos resultados revelaram que indivíduos com CaP apresentaram níveis médios de MMP-

1 duas vezes maiores, e independentemente de uma correlação com valores totais de PSA. Cabe ressaltar que nossas análises minimizaram a influência do SNP rs495366, cujo alelo A demonstrou associação com níveis de MMP-1 sérica, mantendo válido o achado de valores de MMP-1 significativamente elevados em portadores de CaP.

A escassez de relatos sobre uma interrelação entre MMP-1 e CaP impede propor que MMP-1 seja investigada como biomarcador no CaP. E os resultados conflitantes nestes poucos relatos dificultam advogar por um mecanismo de ação desta forma de metaloproteinase no câncer prostático. Talvez, ao menos em parte, o conflito decorra de falta de padronização da técnica utilizada para quantificação da MMP, de heterogeneidades na amostra ou mesmo do baixo poder amostral de cada estudo. Em linha, a ausência de fundamentação para assumir valores de MMP-1 como referência para indicar dada entidade clínica conhecida impossibilitou que cálculos de sensibilidade/especificidade ou de valores preditivos em nossas condições.

A despeito das limitações do estudo como um caráter preliminar e um recrutamento modesto e por conveniência, nossos resultados associam níveis circulantes totais de MMP-1 com malignidade prostática em um cenário ambulatorio real, com a condição prostática de cada paciente confirmada segundo a melhor prática clínica disponível.

6. CONCLUSÃO

Nosso estudo revelou concentrações séricas de MMP-1 significativamente maiores nos portadores de CaP. Fazem-se necessárias novas pesquisas que corroborem nossos achados para (se pertinente) permitir definição de valores de referência ou de corte informativos para neoplasia prostática, seja para triagem clínica ou enquanto ferramenta acessória de confirmação. Com base nos resultados aqui evidenciados, pode-se inferir que MMP-1 apresenta sensibilidade semelhante ao do PSA no diagnóstico inicial do CaP.

Ademais, serão benvindos estudos de seguimento clínico de sujeitos em risco para esta malignidade (p.ex.: história familiar) com a proposta de aferir MMPs circulantes e associar ao advento e prognóstico do câncer de próstata.

REFERÊNCIAS

1. Epidemiology: Epidemic rates of cancer incidence in Latin America. *Nature Reviews Clinical Oncology* [revista em Internet]. 7 de maio de 2013; acesso 17 de setembro de 2019; 10(6):304–304. Disponível em: <http://www.nature.com.ezproxy.puc.cl/nrclinonc/journal/v10/n6/full/nrclinonc.2013.77.html>
2. Grönberg H. Prostate cancer epidemiology. *The Lancet* [revista em Internet]. 8 de março de 2003; acesso 17 de setembro de 2019; 361(9360):859–64. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12642065>
3. Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. *Urology* [revista em Internet]. 22 de dezembro de 2003; acesso 17 de setembro de 2019; 62(6): 3–12. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14706503>
4. Prostate Cancer [revista em Internet]. American Cancer Society. 2013; acesso 21 de maio de 2019. p. on-line. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-key-statistics>
5. INCA. Estatísticas de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer [página na internet]. 2016; acesso 25 de fevereiro de 2016. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>
6. INCA. Instituto Nacional de Câncer [página na internet]. INCA - Instituto Nacional de Câncer [acesso 29 de janeiro de 2019]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/>
7. Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genetic*. 2004; 13 Spec (1):R103-R121.
8. World Health Organization. Guide to Cancer - Guide to cancer early diagnosis. Geneva: WHO; 2017. Acesso em 29 de janeiro de 2019. Disponível em: https://www.who.int/cancer/publications/cancer_early_diagnosis/en/
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Rastreamento. Série A: N. Brasília; 2010; acesso 29 de janeiro de 2019. p. 73–5. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caderno_atencao_primaria_29_rastreamento.pdf
10. Fay AP, Bastos DA, Moreira RB, Soares A, Monteiro FSM. Câncer de Próstata: Doença inicial e recorrência bioquímica [revista em Internet]. *Câncer de Próstata*. 2018; acesso 12 de fevereiro de 2019. p. 1–42. Disponível em: https://www.sboc.org.br/images/diretrizes/Câncer_de_próstata_2018.pdf
11. Nardi AC, Pompeo ACL, Faria EF, Guimarães GC, Calixto JR, Ponte JRT, et al. Câncer de Próstata: Diagnóstico [revista em Internet]. 2013; acesso 4 de junho de

2019. Disponível em:

http://www.sbu.org.br/pdf/diretrizes/novo/cancer_de_prostata_diagnostico.pdf

12. Fleshner K, Carlsson S V, Roobol MJ. The effect of the USPSTF PSA screening recommendation on prostate cancer incidence patterns in the USA. *Nature reviews Urology* [revista em Internet]. 14 de janeiro de 2017; acesso 4 de junho de 2019. 14(1): 26–37. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27995937>
13. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJJ, et al. Measurement of Prostate-Specific Antigen in Serum as a Screening Test for Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine* [revista em Internet]. 25 de abril de 1991; acesso 17 de setembro de 2019;324(17):1156–61. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1707140>
14. Amălinei C, Căruntu ID, Giușcă SE, Bălan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologieet embryologie* [revista em Internet]. 2010; acesso 17 de setembro de 2019; 51(2): 215–28. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495735>
15. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circulation Research* [revista em Internet]. 2003; 92(8): 827–39. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730128>
16. Deryugina EIE, Quigley JPJ. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* [revista em Internet]. Março de 2006; acesso 17 de setembro de 2019; 25(1): 9–34. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10555-006-7886-9>
17. Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Têtu B. Matrix metalloproteinase 9 is associated with Gleason score in prostate cancer but not with prognosis. *Hum Pathol* [revista em Internet]. 2010; acesso 17 de setembro de 2019. 41(12): 1694–1701. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004681771000167X>
18. Ström P, Nordström T, Aly M, Egevad L, Grönberg H, Eklund M. The Stockholm-3 Model for Prostate Cancer Detection: Algorithm Update, Biomarker Contribution, and Reflex Test Potential. *European Urology* [revista em Internet]. 2018; acesso 17 de setembro de 2019. 74(2): 204–10. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0302283817310965>
19. Cooperberg MR, Brooks JD, Faino A V, Newcomb LF, Kearns JT, Carroll PR, et al. Refined Analysis of Prostate-specific Antigen Kinetics to Predict Prostate Cancer Active Surveillance Outcomes. *European Urology* [revista em Internet]. 2018; acesso 17 de setembro de 2019. 74(2): 211–217. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302283818300678>
20. El-Chaer WK, Moraes CF, Nóbrega OT. Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer from Circulating Matrix Metalloproteinases and Inhibitors. *Journal of Aging Research* [revista em Internet]. 10 de julho de 2018; acesso 17 de setembro de 2019; p.1–7. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jar/2018/7681039/>

21. Nagase H, Woessner JFJ. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 30 de julho de 1999; acesso 17 de setembro de 2019. 274 (31): 21491–4. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/274/31/21491.long>
22. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: The role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*. 2003; acesso 17 de setembro de 2019. 200 (4):448–464. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.1400>
23. Lauer-Fields JL, Juska D, Fields GB. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules* [revista em Internet]. 2002; acesso 17 de setembro de 2019. 66 (1):19–32. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bip.10201>
24. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science* [revista em Internet]. 1 de outubro de 2002; acesso 17 de setembro de 2019; 115 (19): 3719–27. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235282>
25. Lee MH, Murphy G. No Matrix metalloproteinases at a glance. *J Cell Science* [revista em Internet]. 2004; acesso 17 de setembro de 2019. 117 (18):4015-4016. Disponível em: <https://jcs.biologists.org/content/117/18/4015.short>
26. Westermarck J, Kähäri M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB Journal* [revista em Internet]. 1 de maio de 1999; acesso 18 de setembro de 2019; 13 (8): 781–92. Disponível em: <http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fasebj.13.8.781>
27. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells A possible new growth factor in serum. *FEBS Letters* [revista em Internet]. 17 de fevereiro de 1992; acesso 17 de setembro de 2019. 298 (1): 29–32. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1544418>
28. Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Journal of Cell Science*. 1994; acesso 18 de setembro de 2019. 107(9): 2373-2379. Disponível em: <https://jcs.biologists.org/content/107/9/2373.short>
29. Bond M, Murphy G, Bennett MR, Newby AC, Baker AH. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway. *The Journal of biological chemistry* [revista em Internet]. 19 de abril de 2002; acesso 17 de setembro de 2019. 277 (16): 13787–95. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11827969>
30. Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol* [revista em internet]. 1993; acesso 17 de setembro de 2019. 157 (2): 351–358. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.1041570219>

31. Opdenakker G, Van Den Steen PE, Van Damme J, Gelatinase B. A tuner and amplifier of immune functions. *Trends immuno* [revista em Internet]. 2001; acesso 18 de setembro de 2019. 22 (10): 571–579. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1471490601020233>
32. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* [revista em Internet]. 2001; acesso 18 de setembro de 2019. 13 (5): 534–540. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955067400002489>
33. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & development* [revista em Internet]. 15 de janeiro de 2000; acesso 18 de setembro de 2019. 14 (2): 163–176. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10652271>
34. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* [revista em Internet]. 3 de setembro de 1997; acesso 18 de setembro de 2019. 89 (17): 1260–1270. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9293916>
35. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* [revista em Internet]. Março de 2002; acesso 18 de setembro de 2019. 2(3):161–74. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11990853>
36. Gong L, Wu D, Zou J, Chen J, Chen L, Chen Y, et al. Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* [revista em Internet]. 5 de abril de 2016; acesso 17 de setembro de 2019; 7(14):18458–18468. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26918342>
37. Kim GE, Lee JS, Choi YD, Lee KH, Lee JH, Nam JH, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in different immunohistochemical-based molecular subtypes of breast cancer. *BMC Cancer* [revista em Internet]. 16 de dezembro de 2014; acesso 17 de setembro de 2019; 14 (1): 959. Disponível em: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-959>
38. Ławicki S, Głazewska EK, Sobolewska M, Będkowska GE, Szmitkowski M. Plasma Levels and Diagnostic Utility of Macrophage Colony-Stimulating Factor, Matrix Metalloproteinase-9, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 as New Biomarkers of Breast Cancer. *Annals of Laboratory Medicine* [revista em Internet]. Maio de 2016; acesso 18 de setembro de 2019. 36(3): 223. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26915610>
39. Salem N, Kamal I, Al-Maghrabi J, Abuzenadah A, Peer-Zada AA, Qari Y, et al. High expression of matrix metalloproteinases: MMP-2 and MMP-9 predicts poor survival outcome in colorectal carcinoma. *Future Oncology* [revista em Internet]. 2016; acesso 18 de setembro de 2019. 12 (3): 323–331. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fon.15.325>

40. Gimeno-García AZ, Triñanes J, Quintero E, Salido E, Nicolás-Pérez D, Adrián-de-Ganzo Z, et al. Metaloproteinase 9 como biomarcador plasmático de neoplasia colorrectal avanzada. *Gastroenterologia y Hepatologia* [revista em Internet]. Agosto de 2016; acesso 17 de setembro de 2019. 39 (7): 433–441. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26601990>
41. Reis ST, Antunes AA, Pontes-Junior J, Sousa-Canavez JMD, Dall'Oglio MF, Piantino CB, et al. Underexpression of MMP-2 and its regulators, TIMP2, MT1-MMP and IL-8, is associated with prostate cancer. *International Braz J Urol* [revista em Internet]. 2012; acesso 17 de setembro de 2019. 38 (2): 167–174. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1677-55382012000200004&script=sci_arttext
42. Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, de Sousa-Canavez JM, Dall'Oglio M, Passerotti CC, et al. MMP-9 overexpression due to TIMP-1 and RECK underexpression is associated with prognosis in prostate cancer. *Int J Biol Markers* [revista em Internet]. 2011; acesso 17 de setembro de 2019. 26 (4): 255–261. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.5301/JBM.2011.8831>
43. Carozzi F, Tamburrino L, Bisanzi S, Marchiani S, Paglierani M, Di Lollo S, et al. Are biomarkers evaluated in biopsy specimens predictive of prostate cancer aggressiveness? *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* [revista em Internet]. 26 de janeiro de 2016; acesso 17 de setembro de 2019; 142 (1): 201–212. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26210155>
44. Zhong W, Han ZD, He HC, Bi XC, Dai QS, Zhu G, et al. CD147, MMP-1, MMP-2 and MMP-9 protein expression as significant prognostic factors in human prostate cancer. *Oncology* [revista em Internet]. 2008; acesso 17 de setembro de 2019. 75 (3–4): 230–236. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/Abstract/163852>
45. Li M, Xiao T, Zhang Y, Feng L, Lin D, Liu Y, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-1 levels in peripheral plasma and tumour tissues of lung cancer patients. *Lung Cancer* [revista em Internet]. 2010; acesso 17 de setembro de 2019. 69 (3): 341–7. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060194>
46. Ma F, Wang Z, Abdularab A, Dai L, Niu Y, Jiang N. Matrix metalloproteinase 9 and prostate cancer risk: a meta-analysis of 1059 participants. *Minerva Urol Nefrol* [revista em Internet]. 2017; acesso 17 de setembro de 2019.69:324-9. Disponível em: https://www.minervamedica.it/en/journals/minerva-urologica-nefrologica/article.php?cod=R19Y2017N04A0324#modal_3
47. Gong Y, Chippada-Venkata U, Oh W. Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Natural Inhibitors in Prostate Cancer Progression. *Cancers* [revista em Internet]. 27 de junho de 2014; acesso 17 de setembro de 2019;6(3):1298–327. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24978435>
48. Morgia G, Falsaperla M, Malaponte G, Madonia M, Indelicato M, Travali S, et al. Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res* [revista em Internet]. 2005; acesso 17 de setembro de 2019.33 (1): 44–50. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00240-004-0440-8>

49. Gohji K, Fujimoto N, Hara I, Fujii A, Gotoh A, Okada H, et al. Serum matrix metalloproteinase-2 and its density in men with prostate cancer as a new predictor of disease extension. *International journal of cancer* [revista em Internet]. 20 de fevereiro de 1998; acesso 17 de setembro de 2019; 79 (1): 96–101. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9495366>
50. Zhang L, Shi J, Feng J, Klocker H, Lee C, Zhang J. Type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2 and -9) in prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic diseases* [revista em Internet]. 2004; acesso 17 de setembro de 2019. 7 (4): 327–332. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/4500750>
51. Bonaldi CM, Azzalis LA, Junqueira VBC, Oliveira CGB, Boas VAV, Gáscon TM, et al. Plasma Levels of E-cadherin and MMP-13 in Prostate Cancer Patients: Correlation with PSA, Testosterone and Pathological Parameters. *Tumori Journal* [revista em Internet]. 13 de março de 2015; acesso 17 de setembro de 2019; 101 (2): 185–188. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/full/10.5301/tj.5000237>
52. Oh WK, Vargas R, Jacobus S, Leitzel K, Regan MM, Hamer P, et al. Elevated plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels predict decreased survival in castration-resistant prostate cancer patients. *Cancer* [revista em Internet]. 2011; acesso 17 de setembro de 2019. 117 (3): 517–525. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.25394>
53. Gong Y, Chippada-Venkata UD, Galsky MD, Huang J, Oh WK. Elevated circulating tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) levels are associated with neuroendocrine differentiation in castration resistant prostate cancer. *The Prostate* [revista em Internet]. 2015; acesso 17 de setembro de 2019. 75 (6): 616–627. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pros.22945>
54. Prior C, Guillen-Grima F, Robles JE, Rosell D, Fernandez-Montero JM, Agirre X, et al. Use of a combination of biomarkers in serum and urine to improve detection of prostate cancer. *World Journal of Urology* [revista em Internet]. 2010; acesso 17 de setembro de 2019. 28 (6): 681–686. Disponível em: https://www.researchgate.net/journal/1433-8726_World_Journal_of_Urology
55. Szarvas T, Becker M, VomDorp F, Meschede J, Scherag A, Bankfalvi A, et al. Elevated serum matrix metalloproteinase 7 levels predict poor prognosis after radical prostatectomy. *Int J Cancer* [revista em Internet]. 2011; acesso 17 de setembro de 2019. 128 (6): 1486–1492. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.25454>
56. González Rodríguez I, Rivas del Fresno M, Gil Ugarteburu R, González Arriaga P, López Cima F, Fernández Samoano A, et al. Expresión de metaloproteasa de matriz 9 en el cáncer de próstata: experiencia preliminar. *Archivos Españoles de Urología* [revista em Internet]. 2010; acesso 17 de setembro de 2019. 63 (2): 119–124. Disponível em: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0004-06142010000200007&script=sci_arttext&tIng=en
57. Castellano G, Malaponte G, Mazzarino MC, Figini M, Marchese F, Gangemi P, et al. Activation of osteopontin/matrix metalloproteinases-9 pathway correlates with

prostate cancer progression. *Clinical Cancer Research* [revista em Internet]. 2008; acesso 17 de setembro de 2019. 14 (22): 7470–7480. Disponível em: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/14/22/7470.short>

58. Cicco C, Ravasi L, Zorzino L, Sandri MT, Botteri E, Verweij F, et al. Circulating levels of VCAM and MMP-2 may help identify patients with more aggressive prostate cancer. *Current Cancer DrugTargets* [revista em Internet]. 2008; acesso 17 de setembro de 2019. 8 (3): 199–206. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/ccdt/2008/00000008/00000003/art00004>

59. Incorvaia L, Badalamenti G, Rini G, Arcara C, Fricano S, Sferrazza C, et al. MMP-2, MMP-9 and activin a blood levels in patients with breast cancer or prostate cancer metastatic to the bone. *Anticancer Research* [revista em Internet]. 2007; acesso 17 de setembro de 2019; 27 (3B): 1519–1525. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17595770>

60. Salminen EK, Kallioinen MJ, Ala-Houala MA, Vihinen PP, Tiitinen SL, Varpula M, Vahlberg TJ. Survival markers related to bone metastases in prostate cancer. *Anticancer Research* [revista em Internet]. 2006; acesso 17 de setembro de 2019. 26 (6C): 4879–4884. Disponível em: <http://ar.iijournals.org/content/26/6C/4879.short>

61. Kanoh Y, Akahoshi T, Ohara T, Ohtani N, Mashiko T, Ohtani S, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and prostate-specific antigen in localized and metastatic prostate cancer. *Anticancer Research* [revista em Internet]. 2002; acesso 17 de setembro de 2019. 22 (3): 1813-1817. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/12168874>

62. Jung K, Nowak L, Lein M, Priem F, Schnorr D, Loening SA. Matrix metalloproteinases 1 and 3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and the complex of metalloproteinase-1/tissue inhibitor in plasma of patients with prostate cancer. *International journal of cancer* [revista em Internet]. 22 de abril de 1997; acesso 17 de setembro de 2019; 74 (2): 220–223. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9133459>

63. Gil-Ugarteburu R, Gonzalez Rodriguez I, Rivas del Fresno M, Benito García P, Fernández Somoano A, Tardón García A. Plasmatic variations of metalloproteinase 9 (MMP-9) due to functional polymorphism in prostate cancer. *Urology*. Setembro de 2012; 80(3): S276. 360 PARK AVE SOUTH, NEW YORK, NY 10010-1710 USA: ELSEVIER SCIENCE INC.

64. MMP1 matrix metalloproteinase 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [página na Internet]. [acesso 29 de janeiro de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=4312>

65. Liao CH, Wu HC, Hu PS, Hsu SW, Shen TC, Hsia TC, et al. The Association of Matrix Metalloproteinase-1 Promoter Polymorphisms with Prostate Cancer in Taiwanese Patients. *Anticancer Research* [revista em Internet]. 2018; acesso 19 de setembro de 2019. 38: 3907–3911. Disponível em: <http://ar.iijournals.org/content/38/7/3907.short>

66. Albayrak S, Cangüven Ö, Göktaş C, Aydemir H, Köksal V. Role of MMP-1 1G/2G Promoter Gene Polymorphism on the Development of Prostate Cancer in the Turkish Population. *Urologia Internationalis* [revista em Internet]. 2007; acesso 19 de setembro de 2019. 79 (4): 312–315. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025848>
67. Tsuchiya N, Narita S, Kumazawa T, Inoue T, Ma Z, Tsuruta H, et al. Clinical significance of a single nucleotide polymorphism and allelic imbalance of matrix metalloproteinase-1 promoter region in prostate cancer. *Oncology Reports* [revista em Internet]. Julho de 2009; acesso 19 de setembro de 2019. 22 (03): 493–499. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19639194>
68. Pulukuri SMK, Rao JS. Matrix metalloproteinase-1 promotes prostate tumor growth and metastasis. *International journal of oncology* [revista em Internet]. 2008; acesso 19 de setembro de 2019. 32 (4): 757–765. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18360703>
69. Zhou H, Zhu X. Association between matrix-metalloproteinase polymorphisms and prostate cancer risk: a meta-analysis and systematic review. *Cancer Management and Research* [revista em Internet]. Novembro de 2018; acesso 19 de setembro de 2019. 10:5247–59. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30464622>
71. SBOC SB de OC, SBU SB de U. Primeiro consenso sobre câncer de próstata SBOC e SBU [revista em Internet]. 2018; acesso 12 de fevereiro de 2019. p. 42. Disponível em: https://www.s boc.org.br/images/diretrizes/Câncer_de_próstata_2018.pdf
72. Cockcroft DW, Gault H. Prediction of Creatinine Clearance from Serum Creatinine. *Nephron* [revista em Internet]. 1976; acesso 19 de setembro de 2019. 16 (1): 31–41. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1244564>
73. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry* [revista em Internet]. 18 de junho de 1972; acesso 19 de setembro de 2019. 18 (6): 499–502. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4337382>
74. Morais Junior GS, Rodrigues NO, Henriques AD, Tonet-Furioso AC, Brito CJ, Gomes LO, et al. Matrix Metalloproteinase-1 Gene Polymorphism Associated with Ultrasound-Assessed Carotid Thickness among Older Adults. *Journal of aging research* [revista em Internet]. Junho de 2018; acesso 18 de setembro de 2019. 2018:1475890. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jar/2018/1475890/>
75. Cheng Y-C, Kao W-HL, Mitchell BD, O'Connell JR, Shen H, McArdle PF, et al. Genome-Wide Association Scan Identifies Variants near Matrix Metalloproteinase (MMP) Genes on Chromosome 11q21–22 Strongly Associated With Serum MMP-1 Levels. *Circulation: Cardiovascular Genetics* [revista em Internet]. 2009; acesso 19 de setembro de 2019. 2 (4): 329–337. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20031604>

76. Cohen J. A power primer. *Psychological bulletin* [revista em Internet]. Julho de 1992; acesso 19 de setembro de 2019. 112 (1): 155-159. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19565683>
77. Gonzalez-Avila G, Sommer B, Mendoza-Posada DA, Ramos C, Garcia-Hernandez AA, Falfan-Valencia R. Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology* [revista em Internet]. 2019; acesso 19 de setembro de 2019. 137: 57–83. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1040842818304876>
78. Hadler-Olsen E, Winberg J-O, Uhlin-Hansen L. Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Tumor Biology* [revista em Internet]. 2013; acesso 19 de setembro de 2019. 34 (4): 2041–2051. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23681802>
79. Kemik O, Kemik AS, Sümer A, Dulger AC, Adas M, Begenik H, et al. Levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in gastric cancer. *World journal of gastroenterology* [revista em Internet]. 2011; acesso 19 de setembro de 2019. 17 (16): 2109–2112. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21547130>
80. Decock J, Hendrickx W, Vanleeuw U, Van Belle V, Van Huffel S, Christiaens M-R, et al. Plasma MMP1 and MMP8 expression in breast cancer: Protective role of MMP8 against lymph node metastasis. *BMC Cancer* [revista em Internet]. 2008; acesso 19 de setembro de 2019. 8 (1): 77. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-8-77>
81. Nikfarjam D, Tafvizi F, SalehiPoure M. Low level of matrix metalloproteinase-1 in patients with bladder cancer and the effect of MMP-1 polymorphism (-1607) on serum MMP-1 levels and the risk of bladder cancer. *World Cancer Research Journal* [revista em Internet]. 2018; acesso 19 de setembro de 2019. 5 (3): e1132. Disponível em: <https://www.wcrj.net/wp-content/uploads/sites/5/2018/09/e1132-Effect-of-serum-MMP-1-levels-on-MMP-1-polymorphism-and-bladder-cancer.pdf>
82. Ozden F, Saygin C, Uzunaslán D, Onal B, Durak H, Aki H. Expression of MMP-1, MMP-9 and TIMP-2 in prostate carcinoma and their influence on prognosis and survival. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* [revista em Internet]. 2013; acesso 19 de setembro de 2019. 139 (8): 1373–82. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23708302>

ANEXOS



Termo de Consentimento

O Senhor está sendo convidado a participar de um projeto em que nós, do Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB), buscamos por sinais clínicos e de laboratório que permitam identificar o desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento, sobretudo aquelas doenças relacionadas a problemas importantes para saúde do homem como os distúrbios da próstata.

O objetivo desta pesquisa consiste em quantificar moléculas presentes no sangue, denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs), com vistas a avaliar se poderão ajudar no diagnóstico precoce do câncer de próstata. O senhor receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que poderiam identificá-lo.

A sua participação será através de uma avaliação médica (com exame físico e entrevista para obtenção de informações) assim como por testes laboratoriais que não oferecerão riscos à sua saúde pois consistirão em uma única coleta de um pequeno volume (30 mililitros) de sangue, onde será a assegurada utilização de agulhas descartáveis. Também será solicitado que o senhor forneça pequena amostra de urina (cerca de 10 ml), colhida por ocasião da própria consulta médica. É assegurado que o (a) senhor (a) não realizará movimentos anormais, não terá mudança de rotina, não entrará em contato com quaisquer substâncias nocivas, nem terá qualquer instrumento introduzido em meu corpo, salvo pela agulha para coleta do sangue. As visitas clínicas ocorrerão em datas a se combinar, conforme sua disponibilidade, com um tempo total estimado para os procedimentos de não mais que 1 (uma) hora para sua realização: consulta médica e coleta de sangue. Informamos que o Senhor pode se recusar a responder qualquer questão que lhe traga constrangimento ou a participar de qualquer procedimento, podendo inclusive desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, sem nenhum prejuízo para o senhor. Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Os resultados da pesquisa serão divulgados pela Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a

guarda do pesquisador por um período de no mínimo cinco anos, após isso serão destruídos ou mantidos na instituição. Se o Senhor tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor, telefone para: Dr Clayton Franco Moraes, que atua no Hospital da Universidade de Brasília (telefone: 61 981673146), a qualquer momento que necessitar.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1918 ou do e-mail cepfm@unb.br.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Assinatura: _____

Nome do Paciente:

Assinatura:

Nome do Pesquisador Responsável:

Brasília, ____ de _____ de _____