



**RENORBIO-REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES 2 E 9 NO CÂNCER DE MAMA DE
MULHERES PRÉ-MENOPÁUSICAS**

LUANA MOTA MARTINS

**TERESINA
2019**

LUANA MOTA MARTINS

**EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES 2 E 9 NO CÂNCER DE MAMA DE
MULHERES PRÉ-MENOPÁUSICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Ponto Focal do Piauí como pré-requisito para obtenção do título de doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de agentes profiláticos, terapêuticos e testes diagnósticos

Orientador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Dilina do Nascimento Marreiro

**TERESINA
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCS
Serviço de Processamento Técnico

M386e Martins, Luana Mota.

Expressão das metaloproteinases 2 e 9 no câncer de mama de mulheres pré-menopáusicas / Luana Mota Martins. -- 2019.

103 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), 2019.

Orientação: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva.

1. Câncer de Mama. 2. Fibroadenoma. 3. Metaloproteinase de Matriz. 5. Biomarcadores. I. Título.

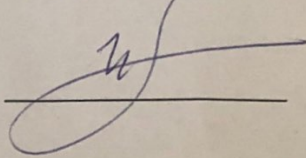
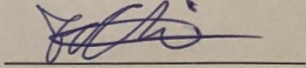
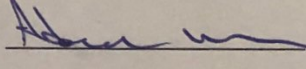
CDD 616.994 49

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: LUANA MOTA MARTINS

TÍTULO DO PROJETO: “EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES 2 E 9 NO CÂNCER DE MAMA DE MULHERES PRÉ-MENOPÁUSICAS”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Benedito Borges da Silva - UFPI (Presidente)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima - UESPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>Pedro Vitor Lopes Costa</u>
Prof. Dr. Vladimir Costa Silva – UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>Vladimir Costa Silva</u>
Prof. Dr. Francisco Adelson Alves Ribeiro - IFMA (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 15 de Julho de 2019.

HORÁRIO: 14:00h

LOCAL: Auditório do Curso de Farmácia - CCS/UFPI

Dedico esta vitória primeiramente a Deus. Aos meus pais, Manoel Martins e Ana Maria Mota, ao meu marido Edmilson Júnior e as minhas filhas Mariana e Alyssa Mota por compreenderem as muitas horas de ausência e principalmente por me levantarem nos momentos difíceis. Dedico também aos meus irmãos Anderson Mota e Lidiane Mota, aos cunhados Kelson Gomes e Veridiana Lustosa e sobrinhos pelo incentivo, pelo amor e pela segurança, que me fazem sentir mais forte na construção do melhor caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Benedito Borges da Silva, mestre na verdadeira acepção da palavra, muito obrigada por compartilhar seus conhecimentos com tanta dedicação, pela confiança que sempre depositou em mim e principalmente pelo acolhimento no momento em que aceitou me orientar no doutorado, mesmo sem antes me conhecer.

À minha Co-orientadora Prof^a. Dr^a. Dilina do Nascimento Marreiro, que me apresentou ao Prof. Benedito e que me ensinou o valor da pesquisa e seu benefício para sociedade desde a Iniciação Científica até o Doutorado.

Às pacientes do Setor de Mastologia do Hospital Getúlio Vargas, sem os quais não seria possível a realização deste estudo.

Ao Magnífico Reitor, Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes, pelo grande incentivo à pesquisa em nossa Instituição.

À Vice-Reitora, Prof^a. Dr^a. Nadir Nogueira do Nascimento pelos ensinamentos e apoio à pesquisa na UFPI.

À Prof^a. Dr^a. Carla Eiras, coordenadora do RENORBIO Ponto Focal do Piauí, pelo apoio e incentivo à pesquisa stricto sensu no Piauí.

Ao Dr Gilberto Albuquerque, Diretor do Hospital Getúlio Vargas, instituição que sedia a Clínica Ginecológica e alguns docentes da Disciplina de Ginecologia da Universidade Federal do Piauí, pelo apoio na realização deste estudo.

À Maria Acelina Martins de Carvalho por me incentivar a fazer o RENORBIO e por me recomendar ao professor Benedito Borges.

Aos Mastologistas: Dr. Ricardo Keyson, Dra Jaqueline, Dra. Patricia e Dr. Pedro Vítor Lopes Costa pela ajuda na coleta dos dados e seleção dos pacientes, imprescindíveis à realização deste trabalho.

Aos funcionários da Clínica de Mastologia e Ginecologia do Hospital Getúlio Vargas: D. Efigênia, D. Eugênia, Ulcimar, Toinha, D. Socorro Ramos, pelo carinho e ajuda a mim concedidos.

Aos colegas de Doutorado: Carla Solange Escórcio Dourado, Fabiane Araújo, Camila Revoredo, Gilmara Péres, Danylo Raphael e esposa Conceição Barros, Cléciton Tavares, Elmo Nery e Adelson Ribeiro.

Aos colegas do grupo de pesquisa, João Paulo, Larysse Campos Verdes, Victor Alves e demais colegas do grupo.

Às amigas da nutrição UFPI, Ana Raquel, Jennifer e Kyria Jayanne pela amizade e apoio nas horas mais difíceis.

À patologista Dra Lina e a Diana, funcionária do setor de patologia do Hospital São Marcos pela parceria na confecção dos blocos de parafina.

Às secretárias do Renorbio, Deusilene e Eliana. À Edilene, secretária do Mestrado Ciências e Saúde, pela ótima recepção.

A família que tão bem me acolheu e me apoiou em todos os momentos especiais da minha vida, Raimunda Inez, Luiz Henrique, Isadora, princesa Isis, Edmilson Abreu, Samira Bonfim, Maria José Nascimento, Luana Nascimento e Luan Nascimento.

Aos companheiros de trabalho da Uninassau – Redenção, Antônio, Conceição, Tereza, Emanuelle, Mayara Feitosa e Larissa pelo apoio e pelos momentos de descontração na sala dos professores.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

MARTINS, L.M. Expressão das Metaloproteinases 2 e 9 no Câncer de Mama de Mulheres Pré-Menopáusicas. 100 p. **Tese de Doutorado** (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia)- Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete mulheres em todo o mundo. No Brasil, a sua incidência vem aumentando significativamente, tendo sido estimado para o ano de 2018-2019 cerca de 59.700 novos casos e 14.206 mortes pela doença. O estudo de biomarcadores no carcinoma mamário vêm se destacando como uma ferramenta importante na avaliação de estratégias prognósticas e principalmente terapêuticas, pois os biomarcadores, tais como os relacionados à proliferação e metástases, apresentam a vantagem de sofrerem alterações em seus níveis antes de qualquer resposta clínica ao tratamento, e assim poderiam selecionar melhor as pacientes que se beneficiariam do tratamento adjuvante. A propósito, as metaloproteinase de matriz (MMP) têm sido sugeridas como potencial biomarcador no câncer de mama, em particular as metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) e metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), cujo papel é degradar o colágeno IV que reveste a matriz extracelular dos tecidos neoplásicos, favorecendo o crescimento e disseminação de células tumorais. A literatura sobre a matéria é escassa e controversa. Todavia, a maioria dos estudos sobre a expressão das MMP-2 e MMP-9 no carcinoma mamário e fibroadenoma são comumente em níveis séricos, com escassez de comparação imunoistoquímica entre os dois tumores, o que nos levou à concepção do presente estudo. Esta tese foi estruturada em dois capítulos. O capítulo I que teve como objetivo detalhar na literatura estudos disponíveis em várias bases de dados que investigam o impacto dos níveis de expressão de MMP-2 e MMP-9 em mulheres com câncer de mama. As evidências científicas reunidas nesta revisão sugerem que o aumento da expressão de metaloproteinases pode levar a uma maior agressividade do tumor e, conseqüentemente, a um pior prognóstico do câncer de mama. O capítulo II teve como objetivo comparar a expressão das MMP-2 e MMP-9 em mulheres com câncer de mama e com fibroadenoma, que mostrou uma expressão positiva de MMP-2 em 41,67% e 86,11% em fibroadenoma e carcinoma mamário, respectivamente ($p < 0,0009$), enquanto que a MMP-9 mostrou 66,67% e 93,33%, nos grupos controle e estudo, respectivamente ($p < 0,0138$). O presente estudo mostra que a expressão da MMP-2 e MMP-9 foi significativamente maior no câncer de mama do que no fibroadenoma.

Palavras-chave: Câncer de Mama. Fibroadenoma. Metaloproteinase de Matriz. Biomarcadores.

MARTINS, L.M. Expression of Metalloproteinases 2 and 9 in Breast Cancer of Premenopausal Women. 100 p. PhD Thesis (Post-Graduate Program in Biotechnology) - Federal University of Piauí, Teresina, 2019.

Breast cancer is the most common neoplasm of women in the world. In Brazil, its incidence has been increasing significantly, estimated for the year 2018-2019 about 59,700 new cases and 14,206 deaths from the disease. The study of biomarkers in mammary carcinoma has been highlighted as an important tool in the evaluation of prognostic and mainly therapeutic strategies, since the biomarkers, such as those related to proliferation and metastases, have the advantage of undergoing changes in their levels before any clinical response to treatment, and thus could better select patients who would benefit from adjuvant treatment. By the way, matrix metalloproteinase (MMP) has been suggested as a potential biomarker in breast cancer, in particular matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), whose role is to degrade collagen IV that covers the extracellular matrix of the neoplastic tissues, favoring the growth and dissemination of tumor cells. The literature on the subject is scarce and controversial. However, most studies on the expression of MMP-2 and MMP-9 in mammary carcinoma and fibroadenoma are commonly at serum levels, with a lack of immunohistochemical comparison between the two tumors, which led us to the design of the present study. This thesis was structured in two chapters. Chapter I aimed to detail in the literature studies available in several databases that investigate the impact of MMP-2 and MMP-9 expression levels in women with breast cancer. The scientific evidence gathered in this review suggests that increased expression of metalloproteinases may lead to increased tumor aggressiveness and, consequently, to a worse prognosis of breast cancer. Chapter II aimed to compare the expression of MMP-2 and MMP-9 in women with breast cancer and fibroadenoma, which showed positive MMP-2 expression in 41.67% and 86.11% in fibroadenoma and carcinoma ($p < 0.0009$), whereas MMP-9 showed 66.67% and 93.33%, respectively, in the control and study groups ($p < 0.0138$). The present study shows that the expression of MMP-2 and MMP-9 was significantly higher in breast cancer than in fibroadenoma.

Keywords: Breast Cancer. Fibroadenoma. Matrix Metalloproteinase. Biomarkers.

ANDI	Aberrações do Desenvolvimento e Involução Normal
CC	Circunferência da Cintura
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECM	Matriz Extracelular
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HER2	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
IDC	Carcinoma ductal infiltrado
ILC	carcinoma lobular infiltrativo
IL-10	Interleucina10
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corpórea
MMP-2	Metaloproteinases de Matriz de 2
MMP-9	Metaloproteinases de Matriz de 9
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
MT	Metalotioneína
MT1-MMP	Membrana Tipo 1 da Metaloproteinases de Matriz
RE	Receptor de Estrogênio
PR	Receptor de Progesterona
PUFA	Ácidos Graxos Poliinsaturados
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
TIMPs	Inibidores Teciduais das Metaloproteinases de Matriz
TGF-β	Transformação do fator de crescimento β
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TNBC	Câncer de mama triplo negativo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Zn	Zinco
ZIP	Irt-like proteins
ZNT	Transportadora de Zinco

Tese

Figura 1. Mecanismo e fases do desenvolvimento na carcinogênese.....	29
Figura 2. Mecanismo de ativação das MMP- 2 e 9.....	37
Figura 3. Mecanismo de ação das MMP- 2 e 9 com degradação da membrana extracelular e promoção da angiogênese.	38

Capítulo 1

Figura 1. Mecanismo de ativação das MMP- 2 e 9.....	60
---	----

Capítulo 2

Figura 1. Fotomicrografia do corte histológico de uma porção de fibroadenoma e câncer de mama, mostrando: (B, D) inúmeras células com forte citoplasma corado de marrom para MMP-2 e MMP-9 no grupo de câncer de mama comparado ao citoplasma marrom esparso no grupo fibroadenoma de mama (A, C).	80
---	----

Tese

Tabela 1. Especificidades do substrato das metaloproteinases da matriz.....	33
---	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Descrição dos estudos selecionados	63
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Características dos pacientes.	79
Tabela 2. Porcentagem de casos com células expressando MMP-2 e MMP-9 no fibroadenoma de mama (Grupo A, controle) e no câncer de mama (Grupo B, estudo).	79

DEDICATÓRIA	III
DEDICATÓRIA ESPECIAL	V
AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO	X
ABSTRACT	XII
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XVI
LISTA DE TABELAS	XVIII
SUMÁRIO	XX
1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. Câncer de Mama	26
2.1.1. Aspectos Epidemiológicos	26
2.1.2. Fatores de Risco	26
2.1.3. Carcinogênese	28
2.1.4. Classificação e Fatores Prognósticos	30
2.2. Fibroadenoma	31
2.3. Metaloproteinase de Matriz (MMPs): Estrutura, Classificação, Ativação e Inibição	33
2.4. Metaloproteinase 2 e 9 no Câncer de Mama e no Fibroadenoma	36
REFERÊNCIAS	42
CAPITULO 1	54
Papel das Metaloproteinases de Matrix 2 e 9 no Câncer de Mama: Uma Revisão de Literatura	57
CAPITULO 2	71
Expressão das metaloproteinases de matriz 2 e 9 no câncer de mama e fibroadenoma de mama: um estudo randomizado, duplo cego	74
3. CONCLUSÃO	87
ANEXO	89
APÊNDICE	98

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea de etiologia desconhecida que apresenta caráter multifatorial, envolvendo um desequilíbrio entre fatores genéticos, dietéticos, hormonais e reprodutivos, determinada principalmente pela ocorrência de mutações ou de alguma ativação anormal de genes que controlam a mitose e crescimento tumoral (SILVA et al., 2012). É a neoplasia maligna mais comum em mulheres no mundo (FERLAY et al., 2019), no entanto, a grande maioria das lesões mamárias é benigna (SANGMA; PANDA; DASIAH, 2013).

O fibroadenoma é a lesão mamária benigna mais frequente entre mulheres principalmente na idade reprodutiva (CIUREIA, et al., 2018), por sua vez, tem sido considerado por alguns autores não um verdadeiro tumor, preferindo rotulá-lo como aberrações do desenvolvimento normal e involução do lóbulo mamário (ANDI) (KAUR et al., 2012). Esta neoplasia apresenta baixo risco de associar-se ao câncer de mama, todavia alguns autores têm relatado o surgimento de lesões cancerosas no componente epitelial do fibroadenoma, fenômeno raro mas que demonstra a importância de se detectar essas neoplasias para evitar procedimentos muito invasivos ou falha no diagnóstico (MARUMOTO et al., 2019; TIWARI et al., 2018).

É importante destacar que o câncer de mama apresenta uma elevada taxa de mortalidade e morbidade, tendo sido estimado mais de 627.000 óbitos para o ano de 2018 (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2019). Estratégias diagnósticas precoces com métodos de imagens como mamografia e ressonância magnética tem reduzido a mortalidade (ANDERSON; SCHWAB; MARTINEZ, 2014).

Todavia, o estudo de biomarcadores no carcinoma de mama tem sido uma ferramenta importante na melhor avaliação da progressão tumoral assim como no desenvolvimento de estratégias prognósticas e terapêuticas, pois biomarcadores, como as metaloproteinases circulantes, apresentam evidências crescentes de um papel mais precoce no processo carcinogênico (DUFFY et al., 2000), e que seus níveis circulantes elevados poderiam portanto estar elevado entre as mulheres antes do desenvolvimento da neoplasia mamária clinicamente detectável (ARONER et al., 2015; SULLU et al., 2011).

A propósito, estudos têm sido realizados com as metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), endopeptidases dependente de zinco que possuem a capacidade de degradar a gelatina e o colágeno IV, principal componente da membrana basal, favorecendo a ruptura da membrana com disseminação de células cancerosas e metástases (SHUMAN MOSS; JENSEN-TAUBMAN; STETLER-STEVENSON, 2012). Níveis circulantes aumentados de metaloproteinases, parecem servir como marcadores biológicos para a carcinogênese, progressão e agressividade do câncer de mama (SOMIARI et al., 2006).

A associação da expressão imunohistoquímica de MMP-2 e MMP-9 com o carcinoma mamário tem sido relatada em diversos estudos (LI et al., 2017; SUN et al., 2017). Todavia, há uma escassez de estudos na literatura comparando a expressão imunohistoquímica das MMP-2 e MMP-9 entre carcinoma mamário e fibroadenoma, o que nos levou à concepção do presente estudo.

O conteúdo descrito neste estudo está estruturado sob a forma de capítulos, conforme segue: o capítulo I trata de uma revisão da literatura que objetivou detalhar estudos disponíveis em várias bases de dados que investigam o impacto dos níveis de expressão de MMP-2 e MMP-9 em mulheres com câncer de mama, o que gerou um artigo submetido ao jornal "*Cancer Investigation*", (Qualis Capes B1 em Biotecnologia) e que se encontra sob revisão. O capítulo II trata de um estudo que objetivou comparar a expressão de MMP-2 e MMP-9 entre mulheres com câncer de mama (estudo) e com fibroadenoma (controle), que resultou em um artigo submetido ao periódico "*Scientific Reports*" (A1 em Biotecnologia), sob revisão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Câncer de Mama

2.1.1. Aspectos Epidemiológicos

O câncer de mama é o tipo de malignidade que mais comumente acomete mulheres no mundo e a principal causa de morte por câncer, tendo sido estimado para o biênio 2018/2019 mais de 2.089.000 casos novos e uma taxa de mortalidade de 627.000 mulheres (BRAY et al., 2018). A incidência é mais elevada nas regiões mais desenvolvidas do mundo em comparação com as regiões em desenvolvimento e subdesenvolvidas, com uma variação de 27 casos por 100.000 mulheres na África Oriental para 96 casos por 100.000 mulheres na Europa Ocidental (FERLAY et al., 2015).

De um modo geral, o câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum em países ocidentais, após os cânceres de pele não melanomas (SMITH et al., 2013). Esta neoplasia tornou-se um evidente problema de saúde pública, no Brasil, o problema do câncer ganha relevância pelo perfil epidemiológico que essa doença vem apresentando. A incidência de câncer na população tem aumentado significativamente, tendo como principais fatores causais o estilo de vida e a longevidade. Para o ano de 2018 foram estimados, cerca de 59.700 casos novos de câncer de mama e 14.206 casos de morte pela doença, sendo que para o estado do Piauí foram estimados cerca de 580 casos novos (INCA, 2018).

2.1.2. Fatores de Risco

O câncer de mama é uma doença de etiologia não esclarecida e multifatorial, que envolve um desequilíbrio entre fatores genéticos, dietéticos, hormonais e reprodutivos, sendo determinada principalmente pela ocorrência de mutações ou de alguma ativação anormal de genes que controlam o crescimento e a mitose celular (SILVA et al., 2012). Os fatores genéticos/hereditários representam

uma pequena proporção de risco de câncer de mama, quando comparado a fatores ambientais, que favorecem desenvolvimento de obesidade, como mudanças de estilo de vida principalmente consumo de álcool, dieta com alta ingestão de carboidratos refinados e gorduras saturadas e baixa ingestão de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), fibras e vitaminas (como folato, vitamina D e carotenóides) e sedentarismo (ROMIEU; AMADOU; CHAJES, 2017).

A disfunção do tecido adiposo na obesidade também têm sido associada a um maior risco do desenvolvimento de diversos tipos de câncer (CABIA et al., 2016). A produção alterada de várias adipocinas, como aumento dos níveis de leptina, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6) e a diminuição de adiponectona e Interleucina-10 (IL-10), parece favorecer o desenvolvimento e progressão no câncer de mama (GILBERT; SLINGERLAND, 2013; VANSOUN, 2013). A propósito, os valores elevados do índice de massa corporal e circunferência da cintura em mulheres na pré-menopausa apresentam maior risco de câncer de mama do tipo triplo negativo, de caráter mais agressivo e pior prognóstico clínico, enquanto as obesas que estão na pós-menopausa têm risco aumentado de câncer com subtipo molecular de receptores positivos, que geralmente são menos agressivos (AGRESTE et al., 2016; WHITE et al., 2015).

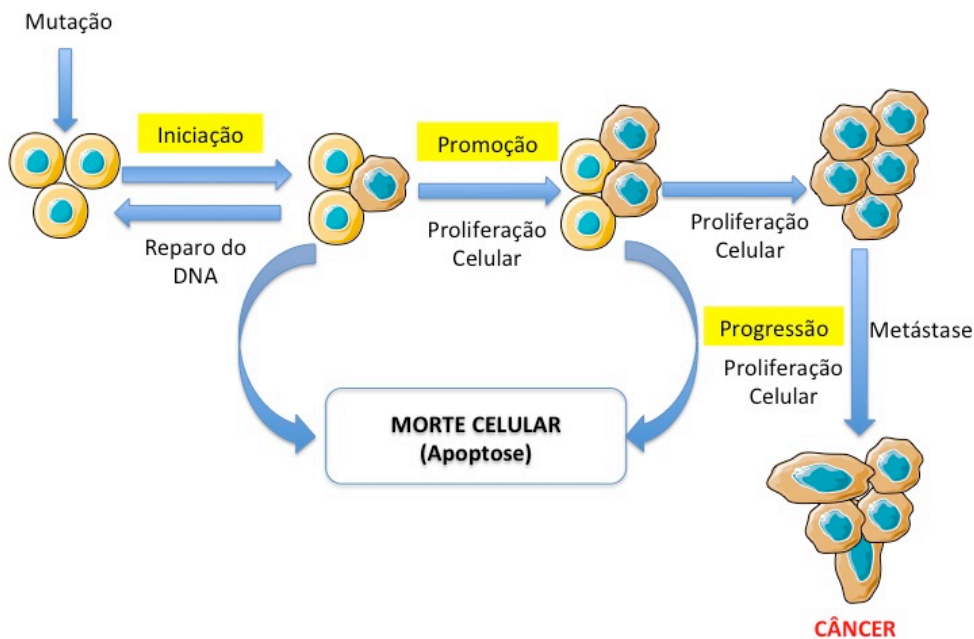
A exposição excessiva ao estrogênio também está associada ao aumento do risco de câncer de mama. Os mecanismos de carcinogênese na mama causados pelo metabolismo do estrogênio incluem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Excesso de EROS não só exerce genotoxicidade ao aumentar indiretamente a instabilidade genômica, mas também estimula a progressão da carcinogenicidade mamária induzindo uma via de sinalização associada ao redox (WEN et al., 2017).

A idade é um dos principais fatores que aumenta o risco para o desenvolvimento do câncer de mama, devido ao acúmulo de exposições ao longo da vida e as próprias alterações biológicas com o envelhecimento, sobretudo, a partir dos 50 anos. A história de menarca precoce com idade da primeira menstruação menor que 12 anos, menopausa tardia após os 55 anos, primeira gravidez após os

30 anos e nuliparidade, também são fatores que aumentam relativamente o risco para câncer de mama (INCA, 2016).

2.1.3. Carcinogênese

No processo carcinogênico ocorrem sucessivos ciclos de divisão celular, mutações e seleção natural das células que adquiriram maior capacidade de multiplicação em condições adversas, favorecendo o crescimento tumoral acelerado e desordenado (KADAM; ABHANG, 2016). A carcinogênese evolui em três estágios, iniciação, promoção e progressão. A iniciação é caracterizada pela interação dos agentes carcinogênicos com DNA que resulta em mutagênese (MINAMOTO; MAI; RONAI, 2000). Já o estágio de promoção tem como principal característica a proliferação das células de início tumoral, em particular, proliferação celular versus apoptose, portanto um estágio reversível por se tratar de células pré-cancerosas (DAYEM et al., 2016; NIU; CHEN, 2010). Por outro lado, o estágio de progressão tumoral caracteriza-se pela transformação gradual das células para o estado maligno com o surgimento de invasão e metástases via processo angiogênico (Figura 1) (RAJABI; MOUSA, 2017).

Figura 1. Mecanismo e fases do desenvolvimento na carcinogênese.

Fonte: Adaptado MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996

Existem três estratégias de quimioprevenção da carcinogênese, a primária bloqueia a ocorrência da carcinogênese em indivíduos saudáveis na fase de iniciação. A quimioprevenção secundária atua durante o estágio inicial ou por inibição da progressão tumoral. Por sua vez, a prevenção terciária é alcançada por inibição da invasão e metástases em pacientes com câncer após terapia (De FLORA et al., 2001). A prevenção do câncer de mama também envolve o bloqueio da invasão e das propriedades metastáticas de um tumor através da regulação das moléculas de adesão celular, proteção da matriz extracelular (ECM) contra a degradação do colágeno, em particular, por meio do equilíbrio entre metaloproteinases de matriz (MMP) e Inibidores Teciduais das MMPs (TIMPs) (De FLORA; FERGUSON, 2005; MOCANU; NAGY; SZÖLLÖSI, 2015).

A tentativa de esclarecer os mecanismos que regulam a proliferação e diferenciação celular tem contado com a biologia molecular e celular no intuito de identificar marcadores tumorais e suas vias de ação. A identificação de marcadores que possam prever o comportamento biológico dos tumores é especialmente

importante em câncer de mama devido a possibilidade de avaliar a agressividade e progressão da doença (DOWSETT et al., 1999; MAKLUF et al., 2006). A propósito, o envolvimento de biomarcadores como quimiocinas, proteínas de adesão e MMP têm sido associado ao processo de carcinogênese mamária (RAMOS et al., 2016).

Os biomarcadores utilizados para estabelecer um perfil molecular completo dos vários tipos de câncer de mama, além de controversos são escassos, sendo necessária uma maior investigação, com biomarcadores para caracterização molecular completa do tecido mamário humano tanto em amostras tumorais com câncer quanto em tecidos normais ou tumorais benignos, como o fibroadenoma (MARGAN et al., 2016).

2.1.4. Classificação e Fatores Prognósticos

Entre as pacientes é observada uma heterogeneidade tumoral, com subtipos específicos de câncer de mama associados a prognósticos diferentes. Diferenciar os subtipos de tumores de mama é um processo chave para manejo terapêutico adequado (LAU et al., 2017). De acordo com a WHO (2005), a morfologia tumoral foi agrupada em quatro categorias: carcinoma ductal infiltrado (IDC), carcinoma lobular infiltrativo (ILC), infiltração ductal mista e lobular, e doença de Paget da mama. Os tumores foram classificados como bem diferenciados, moderadamente diferenciados, mal diferenciados e desconhecidos.

Embora, a classificação molecular do câncer de mama seja baseada no padrão genômico nos países desenvolvidos, nos países em desenvolvimento os biomarcadores para esta classificação são identificados na prática clínica principalmente por imunistoquímica, tais como Receptor de Estrógeno (RE), Receptor de Progesterona (RP), Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2) e Ki-67 de acordo com a Declaração de Consenso de St. Gallen de 2011 (GOLDHIRSCH et al., 2011) da seguinte forma:

- Luminal A: ER- e / ou PR-positivo, HER2-negativo, Ki67 <14%;

- Luminal B (HER2-negativo): ER- e / ou PR-positivo, HER2-negativo, Ki67 >14%;
- Luminal B (HER2-positivo): ER- e / ou PR-positivo, HER2-positivo, qualquer Ki67;
- HER2-positivo (não luminal): ER- e PR-negativo, HER2-positivo, qualquer Ki67;
- Triplo negativo: ER e PR-negativo, HER2-negativo, qualquer Ki67.

De acordo com o perfil molecular, o subtipo que apresenta melhor prognóstico para a paciente é o Luminal A, pois possuem receptores hormonais positivos, que na maioria dos casos estão associados com melhores respostas terapêuticas. Por não apresentarem superexpressão de HER-2, estão associados com baixo grau histológico e menor agressividade tumoral. No subtipo Luminal B, as taxas de proliferação celular são maiores que ao subtipo Luminal A, tendo então um prognóstico pior quando comparado esses dois perfis (PEROU et al., 2000; SORLIE, 2004; WEIGEL; DOWSETT, 2010).

A superexpressão de HER-2 apresenta pior prognóstico em relação aos pacientes que não apresentam essa amplificação gênica. É relatado na literatura que a positividade para o HER-2 parece estar associada à resistência às terapias hormonais. Já o perfil Triplo-negativo é o que apresenta pior prognóstico, associado a menor sobrevida, e caracterizado por alto grau histológico, alto índice mitótico e resistência a terapias hormonais (SOTIRIOU et al., 2003; STIVAL et al., 2012; WOLFF et al., 2007).

2.2. Fibroadenoma

Fibroadenomas são tumores sólidos com proliferação intraparenquimal benigna dos ductos intra-lobulares e ácinos, compostos por células estromal e epitelial (CARTY et al., 1995). O fibroadenoma é o tumor de mama benigno que mais acometem mulheres principalmente na pré-menopausa, com idades

compreendidas entre 20 e 30 anos, mas também podem ser vistas em grupos etários pós-menopausa (EGWUONWU, et al. 2016). Esses tumores apresentam crescimento lento, com tamanho menor que 3 cm, com exceção de fibroadenomas gigantes raros (DUPONT et al., 1994).

O diagnóstico do fibroadenoma se inicia quando uma paciente apresenta um nódulo palpável ou realiza um exame de imagem da mama que mostra uma anormalidade, investigada com biópsia percutânea (NASSAR et al., 2015). No exame clínico, o fibroadenoma aparece bem circunscrito, com consistência firme e superfície homogênea, microscopicamente, apresentam crescimento bifásico com proliferação ductal e estromal (YANG et al., 2014). Observam-se nos esfregaços grupos celulares epiteliais em dedo de luva, formando agrupamentos arborescentes e numerosos núcleos desnudos (ROSEN, 2001).

O risco geral de desenvolver carcinoma de mama em pacientes com história de fibroadenoma é baixo, no entanto esse risco pode aumentar quando ocorrerem alterações fibrocísticas proliferativas envolvendo o tumor (NASSAR et al., 2015; WILLIAMS, 2018). Em raras ocasiões, o câncer invasivo pode se desenvolver em um fibroadenoma, assim como pode em qualquer outra parte da mama (AMIN et al., 2013; CIUREIA et al., 2018; MARUMOTO et al., 2019).

Segundo Sangma; Panda; Dasiah (2013) pacientes com lesões proliferativas apresentaram fatores de risco para o desenvolvimento de carcinoma invasivo e como não há consenso sobre os marcadores morfológicos de risco, no futuro, marcadores genéticos moleculares e biomarcadores podem auxiliar na estratificação do risco, o que ajudará no melhor manejo clínico.

Assim as MMPs, têm sido avaliadas tanto no carcinoma mamário, quanto em mulheres com tecido mamário normal e com tumores benignos, como fibroadenoma (MOLL et al., 1990), pois essa proteína é secretada por células normais e cancerosas, estando envolvida na progressão do tumor de vários tecidos (DAVIES et al., 1993). A propósito, vários estudos relataram níveis séricos mais elevados de MMP em mulheres com câncer de mama quando comparado a fibroadenoma

(SHEEN-CHEN et al, 2001; SOMIARI et al., 2006; PATEL et al., 2011; VASATURO et al., 2013).

2.3. Metaloproteinase de Matriz (MMPs): Estrutura, Classificação, Ativação e Inibição

As metaloproteinases de matriz são endopeptidase, pertencentes à classe metalo, da família das proteinases zinco-dependente, encontradas no meio extracelular de vários tecidos (PRZYBYLOWSKA et al., 2006). Até o momento, foram identificadas 28 MMPs, que compartilham uma grande quantidade de semelhanças estruturais e funcionais comuns, no entanto, diferem em suas especificidades de substrato (LINDSEY; ZAMILPA, 2012). Assim, essas proteínas foram classificadas em cinco grupos, tais como: colagenases intersticiais, gelatinases, estromelinas, MMPs tipo membrana e as matrilisinas (Tabela 01) (COWAN et al., 2009; DELABIO-FERRAZ et al., 2010).

Tabela 1. Especificidades do substrato das metaloproteinases da matriz.

GRUPO	MMP	PRINCIPAIS SUBSTRATOS DA MATRIZ EXTRACELULAR
Colagenase	MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18	Colágenos tipos I, II, III, VII, VIII and X e gelatinas
Gelatinases	MMP-2, MMP-9	Colágenos tipos IV, V, VII, X, gelatina, elastina e fibronectina
Estromelinas	MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-12	Colágenos tipos III, IV, IX e X, proteoglicanos, fibronectina, laminina, gelatinas e caseína
Matrilisinas	MMP-7, MMP-26	Colágeno tipo IV, proteoglicanos, fibronectina, laminina, proteoglicanos e V Ecadherina.
MMPs tipo membrana	MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-25	Tenascina-c, fibronectina e laminina.

Todos os grupos de metaloproteinases apresentam uma estrutura comum composta por uma sequência sinalizadora N-terminal (pré-domínio), um domínio pró-peptídico, responsável pela latência da enzima e um domínio catalítico com um sítio de ligação do íon zinco (Zn^{2+}). Além disso, a maioria das MMPs são constituídas por regiões de articulação ou ligação e um domínio de hemopexina que determina seu substrato (CATHCART; PULKOSKI-GROSS; CAO, 2015; ROY; YANG; MOSES, 2009). Essas proteínas podem ser encontradas em diferentes formas, como pró-enzimas inativas, enzimas ativas e enzimas ativas e pró-enzimas inativas complexadas com vários inibidores (BACK; KETELHUTH; AGEWALL, 2010; HANEMAAIJER et al., 2000).

As MMPs geralmente são secretadas na forma inativa como zimogênicos, denominados pró-MMPs e requerem ativação via proteólise. O domínio pró-peptídico é um regulador crítico da atividade de MMP, simplesmente bloqueando o acesso ao domínio catalítico. O domínio pró-peptídico é composto de três cadeias alfa com alças de conexão flexíveis que interagem umas com as outras para formar um núcleo hidrofóbico (NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006). O pró-domínio de todas as MMPs é caracterizado pela inclusão de uma sequência de aminoácidos comum que mantém o MMP inativo por um mecanismo de troca de cisteína. O grupo sulfidrilo da cisteína nesta sequência impede o acesso e interação da molécula de água com o íon zinco no domínio catalítico necessária para a proteólise (VAN; BIRKEDAL-HANSEN, 1990).

Sobre este aspecto, a atividade das MMPs são reguladas pela expressão gênica, ativadores deste precursor e inibidores da forma ativa. Sua ativação catalítica é realizada por outras MMPs ativas ou por serinoproteases, ocorrendo principalmente no meio extracelular, tendo suas atividades reguladas especificamente pelos TIMPs (Inibidores tissulares de metaloproteinases), constituído por um grupo de quatro tipos: TIMP1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 (EGEBLAD; WERB, 2002; KESSENBROCK et al., 2010; ROY; YANG; MOSES, 2009).

As MMPs estão envolvidas na remodelação protéica da matriz extracelular e têm papel importante nos processos fisiológicos, como embriogênese, remodelação de tecido normal e cicatrização de feridas, quando em equilíbrio com os TIMPs, contribuindo para a manutenção do equilíbrio metabólico e estrutural da membrana extracelular (NAGASE; WOESSNER, 1999; REN et al. 2015). Quando existe uma ruptura neste equilíbrio essas proteínas passam a ter envolvimento em condições patológicas, provocando doenças como artrites, retinopatia diabética, psoríase e câncer (CURRAN; MURRAY, 2000; RUNDHAUG, 2005).

Assim, a desregulação dessas enzimas desempenha papel importante em diversos estágios do desenvolvimento do câncer de mama e de atividades dependentes da ligação de zinco ao local catalítico (KLEIN; BISCHOFF, 2011). É provável que o zinco transportado para os compartimentos celulares seja utilizado para ligação ao domínio catalítico das metaloproteinases (metalação), para exercer sua função de proliferação celular e progressão tumoral (KAMBE, 2011).

Na patogênese do câncer de mama é observado aumento na expressão de proteínas transportadoras de zinco, sendo que a metalotioneína (MT), Zip 5, Zip 6, Zip 7, Zip 8 e Zip 10, principalmente MT e Zip 10, são expressas em células de tumores malignos e atuam na captação, efluxo e compartimentalização do zinco, transportando o zinco do meio extracelular ou de vesículas intracelulares para o citoplasma (DEVIRGILIIS et al., 2007; SEVE et al., 2004). Nesta perspectiva, o aumento das concentrações de zinco em compartimentos celulares e a redução desse oligoelemento no sangue dos pacientes com câncer de mama parece atrapalhar a sua função antioxidante, bem como alterar a atividade das MMPs, contribuindo para a proliferação do tumor maligno (MORCOS et al., 2013).

Durante a invasão neoplásica, as MMPs têm papel fundamental no rearranjo dos componentes da matriz extracelular, pois o colágeno que envolve e protege a matriz celular sofre ruptura com degradação da membrana basal favorecendo a migração celular e metástase. Devido à clivagem de proteínas extracelulares, as MMPs estimulam a liberação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e auxiliadas por moléculas de adesão aceleram o processo de angiogênese. O VEGF

é produzido e secretado por uma série de células normais, todavia tem sua expressão aumentada em células tumorais, agindo como um potente e seletivo fator mitogênico para o endotélio, com rápida e completa resposta angiogênica e aumento da permeabilidade capilar (BOUDREAU; MYERS, 2003; JOBIM et al., 2009).

2.4. Metaloproteinase 2 e 9 no Câncer de Mama e no Fibroadenoma

O grupo das gelatinosas é constituído por dois componentes: gelatinases A (MMP-2) e gelatinases B (MMP-9) que são distinguidos dos outros pela presença de um domínio semelhante a fibronectina, que contém três fibronectina tipo II de repetição, aos quais os substratos de colágeno de gelatina e tipo IV se ligam a um domínio protéico com papel semelhante ao da proteína de adesão celular (CATHCART; PULKOSKI-GROSS; CAO, 2015; KUBOTA et al., 2000; MURPHY et al., 1994).

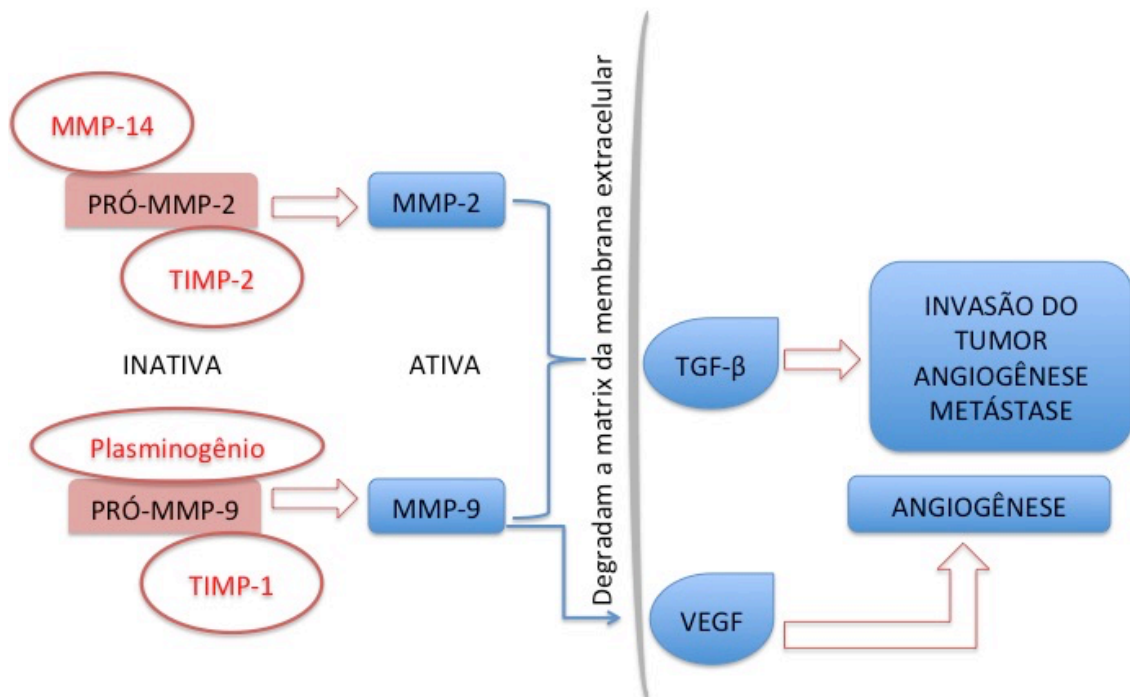
É importante destacar que as MMP-2 e MMP-9 são secretadas tanto por células tumorais como por células normais como fibroblastos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais (POLTAVETS et al., 2018). Estas enzimas são capazes de clivar o colágeno IV, que é o principal constituinte da membrana basal, primeira barreira contra a progressão de células epiteliais neoplásicas (ALA-AHO; KÄHÄRI, 2005; HANEMAAIJER et al., 2000). O processo proteolítico do colágeno é fundamental no desenvolvimento e na homeostase celular, mas também contribui para inúmeras patologias.

No câncer de mama a ativação do pró-MMP-2 ocorre pela MMP-14 (MT1-MMP) que ligada à superfície celular e auxiliada pelo TIMP-2 cliva o domínio peptídico ativando a MMP-2 (NAGASE; VISSIE; MURPHY, 2006). Por outro lado, a MMP-9, na forma inativa (pró-MMP-9), pode ser ativada pelo plasminogênio e TIMP-1 (KOHKA et al., 2013). TIMPs são capazes de efetuar fortes ligações com as MMPs ativas com a formação de complexos inibitórios, no entanto, também participam na ativação de algumas MMPs. Assim, os TIMPs atuam tanto na diminuição do

crescimento tumoral como também na progressão neoplásica (EGEBLAD & WERB, 2002; VISSE; NAGASE, 2003).

A MMP-9 desempenha um papel vital na angiogênese do tumor, pois controla a biodisponibilidade do VEGF, que é um indutor potente da angiogênese. Todavia, a MMP-9 juntamente com a MMP-2, ativam a sinalização de transformação do fator de crescimento β (TGF- β) para promover a invasão do tumor, angiogênese e metástases (Figura 2) (BENSON et al., 2013).

Figura 2. Mecanismo de ativação das MMP- 2 e 9.



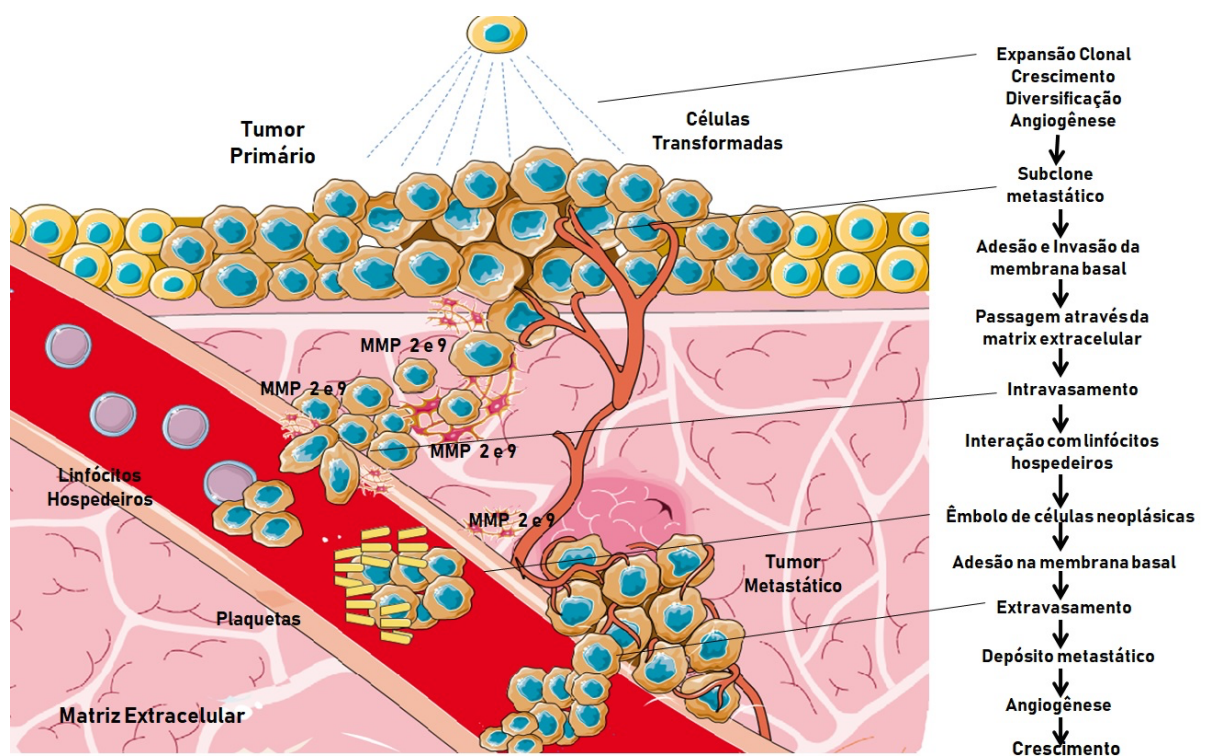
Fonte Própria

Lengenda: TIMP: Inibidores Teciduais das Metaloproteinases de Matriz; MMP: Metaloproteinases de Matriz; TGF- β : Transformação do fator de crescimento β ; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

A propósito, tem sido mostrado na literatura que as metaloproteinases 2 e 9 possuem atividade direta, promovendo a proliferação de células neoplásicas e a disseminação metastática por meio da degradação da matriz extracelular e da membrana basal. E atividade de forma indireta, promovendo a angiogênese,

formação de novos vasos, que proporcionam nutrição e disseminação do tumor (HADLER-OLSEN, 2011). Desta forma, as gelatinases têm sido estudadas no plasma e nos tecidos por imunohistoquímica e sugeridas como fator prognóstico por desempenharem papel importante nos processos de invasão tumoral e metástases (Figura 3) (LEV et al., 2002; SHUMAN MOSS; JENSEN-TAUBMAN; STETLER-STEVENSON, 2012; TSAI et al., 2003).

Figura 3. Mecanismo de ação das MMP- 2 e 9 com degradação da membrana extracelular e promoção da angiogênese.



Fonte: Adaptada de Robbins; Cotran, 2005

Estudos avaliando os níveis séricos dessas metaloproteinases em neoplasias mamárias e fibroadenoma têm sido relatados na literatura (SOMIARI et al., 2006;

ZHANG et al., 2014). No estudo de Zhang et al. (2014) os níveis séricos de VEGF e MMP-9 em pacientes carcinoma ductal invasivo foram significativamente maiores do que nos grupos de fibroadenoma e saudáveis, além disso, os níveis nos pacientes com fibroadenoma foram ligeiramente superiores aos dos adultos saudáveis, embora não houvesse diferença estatisticamente significativa.

Somiari et al. (2006) avaliaram as concentrações plasmáticas e atividade das metaloproteinase 2 e 9 em pacientes com doença benigna da mama, com câncer de mama e com risco elevado para desenvolver câncer de mama. Concluíram que as concentrações plasmáticas de MMP-2 foram significativamente menores no grupo com neoplasia benigna do que aqueles com risco de desenvolver câncer de mama e do que aqueles com câncer de mama. Contudo, as concentrações plasmáticas de MMP-9 não apresentaram diferença significativa entre os grupos. No entanto, Patel et al. (2011), Vassaturo et al. (2013), Huang et al. (2014) observaram que tanto os níveis séricos de MMP-2 como de MMP-9 em pacientes com câncer de mama foram significativamente maiores quando comparado aos controles e aos tumores benignos.

Diversos estudos sugerem que a MMP-9 está relacionada com o prognóstico em câncer de mama e que níveis plasmáticos elevados sugerem uma doença biologicamente mais agressiva (GASPARINI, 2000; JOBIM et al., 2008; MYLONA et al., 2007). Wu et al. (2014) mostraram níveis plasmáticos elevados da MMP-9 em câncer de mama quando comparado à tumores benignos da mama e gânglios linfáticos. Além disso, constataram uma associação positiva entre sua expressão imunohistoquímica nos gânglios linfáticos com metástases, mostrando o potencial da MMP-9 como marcador da progressão do câncer de mama.

Nesse sentido, é relatado na literatura, a expressão tecidual, por meio da técnica de imunohistoquímica, das MMP-2 e MMP-9 em tumores de mama. Xu et al. (2013) relataram que a expressão de MMP-2 foi significativamente maior em lesões malignas de mama do que em lesões benignas. Já Ramos et al. (2016) verificaram que a correlação entre MMP-2, PR e ER ajudam a prever o surgimento de metástases.

Em 2008, Jobim et al. verificaram que a expressão da MMP-9 e do VEGF estava presente difusamente no citoplasma das células neoplásicas e, ocasionalmente, parte da membrana estava corada. Cupić et al. (2011) relataram uma forte expressão de MMP-9 em tumores primários que se repetiram após 24 meses e uma menor expressão nos tumores que recorreram antes de 24 meses do diagnóstico inicial. Zhang et al. (2013) reforçaram os estudos e concluíram que, além da associação com lesões malignas, a superexpressão de MMP-9 estaria associada também a uma pior sobrevida global para as pacientes com câncer de mama. Com isso, Zhao et al. e Liu et al. ambos em 2013 relataram que pacientes triplo-negativo apresentava elevada expressão de MMP-9 resultando em pior prognóstico de câncer de mama.

Alguns estudos verificaram o aumento na expressão de MMP-2 e MMP-9 em tecidos de câncer mamário (HUANG et al., 2014; SULLU et al., 2011). Huang et al. (2014) avaliaram a expressão de MMP-2 e MMP-9 em tecido tumoral e mostraram que 72% e 76% dos casos de câncer de mama tinham citoplasma positivo para MMP-2 e MMP-9, respectivamente. Sullu et al. (2011) também analisaram a expressão imunohistoquímica da MMP-2 e 9 e a correlação entre as taxas de expressão e os parâmetros de prognóstico clinicopatológico em carcinoma ductal invasivo. Esses autores mostraram que 75% das pacientes tinham expressão positiva para MMP-2, no entanto não observaram relação da expressão da MMP-2 com o prognóstico no carcinoma ductal invasivo, enquanto 66% das pacientes tinham expressão positiva para MMP-9, que se correlacionava com um prognóstico desfavorável.

Daniele et al. (2010) avaliaram a expressão tecidual e os níveis séricos de gelatinases em pacientes com câncer de mama com metástases e sem metástase e verificaram uma diferença significativamente maior tanto na expressão imunohistoquímica tecidual quanto níveis séricos elevados de MMP-9 nos pacientes com câncer de mama metastático em comparação aos pacientes com tumor não metastático e controle sem tumor, sugerindo seu papel no crescimento, invasão e metástase em câncer de mama.

Diante do exposto, alguns estudos mostraram comparação entre mulheres com câncer e fibroadenoma mamário apenas quanto aos níveis séricos de MMP-2 e MMP-9 (SOMIARI et al., 2006; ZHANG et al., 2014). Assim, devido uma escassez de estudos comparando a expressão imunoistoquímica de MMP-2 e MMP-9 de mulheres com câncer de mama e fibroadenoma, nos levou ao desenho do presente estudo.

REFERÊNCIAS

- AGRESTI, R. et al. Association of adiposity, dysmetabolisms, and inflammation with aggressive breast cancer subtypes: a cross-sectional study. **Breast Cancer Res Treat**, v. 157, n.1: p.179-89, 2016.
- ALA-AHO, R., KÄHÄRI, V.M. Collagenases in cancer. **Biochimie**.v.87, n.3-4: p.273-286, 2005.
- AMIN, A.L. et al. Benign Breast Disease. **Surg. Clin N Am** v.93: p.299–308, 2013.
- ANDERSON KN, SCHWAB RB; MARTINEZ ME. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. **Breast Cancer Res Treat** v.144, n.1: p.1-10, 2014.
- ARONER, S.A. et al. Plasm matrix metalloproteinase 2 leves and breast cancer risk . **Cancer Epidemiology** v. 39, n.3: p.321-7, 2015.
- BACK, M.; KETELHUTH, D.F.; AGEWALL, S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. **Prog Cardiovasc Dis**. v. 52: p.410–428, 2010.
- BENSON, C.S.; BABU, S.D.; RADHAKRISHNA, S.; SELVAMURUGAN, N.; RAVI, S.B. Expression of matrix metalloproteinases in human breast cancer tissues. **Dis Markers**. v. 34,n.6: p.395-405, 2013.
- BOUDREAU, N; MYERS, C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. **Breast Cancer Res**, v. 5, n. 3: p.140-6, 2003.
- BRAY, F; FERLAY, J; SOERJOMATARAM, I; SIEGEL, RL; TORRE, LA. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **Ca Cancer J Clin**, 2018.
- CABIA, B. et al. A role for novel adipose tissue-secreted factors in obesity-related carcinogenesis. **Obesity reviews** v.17: p.361–376, 2016.
- CARTY, N.J. et al. Management of fibroadenoma of the breast. **Ann R CollSurgEngl**; v.77: p.127-30, 1995.
- CATHCART, J.; PULKOSKI-GROSS, A.; CAO, J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. **Genes& Diseases** v.2:

p.26-34, 2015.

CIUREA A; HERTA H; IACOBAN C; FETICA B; ROGOJAN L, CIORTEA C. Fibroadenomas and breast carcinoma: a possible answer to a frequently asked question. A pictorial essay. **Med Ultrason**, 2018. doi: 10.11152/mu-1408.

COTRAN, R.S. et al. Robbins e Cotran: Patologia - **Bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p.1592, 2005.

COWAN, R.W. et al. Collagenase expression and activity in the stromal cells from giant cell tumour of bone. **Bone**. v.44, n.5, p.865-871, 2009.

CUPIĆ D.F. et al. Expression of matrix metalloproteinase 9 in primary and recurrent breast carcinomas. **Coll Antropol**. v.35, n. 2: p.7-10, 2011.

CURRAN, S.; MURRAY, G.I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. **Eur J Cancer**.v.36, n.13: p.1621-30, 2000.

DANIELE, A. et al. Expression of Metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in Sentinel Lymph Node and Serum of Patients with Metastatic and Non-Metastatic Breast Cancer. **Anticancer Research**. v.30: p.3521-3528, 2010.

DAVIES, B. et al. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. **Br. J. Cancer** v.67: p.1126-1131, 1993.

DAYEM, A. A. et al. The Anti-Cancer Effect of Polyphenols against Breast Cancer and Cancer Stem Cells: Molecular Mechanisms. **Nutrients** v.8: p.581, 2016.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen*. v.591: p.8–15, 2005.

DE FLORA, S. et al. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation – related diseases. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen*. v.480: p. 9–22, 2001.

DELABIO-FERRAZ, E. et al. Rana Catesbeiana, Pólvora e Modulação Supramolecular Cicatrização Intestinal e Prognóstico no Câncer de Cólon: Uma Mesma Origem Biológica para o Insucesso? **Rev bras Coloproct.**, v.30, n.2: p.141-151, 2010.

DEVIRGILIIS, C. et al. Zinc fluxes and zinc transporter genes in chronic diseases. **Mutat Res, Amsterdam**, v. 622, n.1-2: p. 84-93, 2007.

DOWSETT, M. et al. Clinical studies of apoptosis and proliferation in breast cancer. **Endocr Relat Cancer**. v.6, n.1: p.25-8,1999.

DUFFY, M.J. et al. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. **Breast Cancer Res**; v.2, n.4: p.252–7, 2000.

DUPONT, W.D. et al. Long-term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. **N Engl J Med**. v. 331, n.1: p.10–15, 1994.

EGEBLAD, M; WERB, Z. New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. **Nature Reviews/Cancer**, v.2: p.161-74, 2002.

EGWUONWU, O.A. et al. Fibroadenoma: Accuracy of clinical diagnosis in females aged 25 years or less. **Niger J Clin.Pract**.v.19: p.336-8, 2016.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality world wide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**; v.136: p.359-386, 2015.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Int. J. Cancer**: v.144, p.1941–1953, 2019.

GASPARINI, G. et al. Behaviour of metastasis in relation to vascular index in patients with node-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen. **Clin Exp Metastasis**. v.18, n.1: p.15-20, 2000.

GILBERT, C.A.; SLINGERLAND, J.M. Cytokines, obesity, and cancer: new insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression. **Annu Rev Med**.v.64: p.45–57, 2013.

GOLDHIRSCH, A. et al. Panel members (2011) Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. **Ann Oncol**. v.22: p.1736–1747, 2011.

HADLER-OLSEN, E. et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. **FEBS J.**, v.278, n.1: p.28-45, 2011.

HANEMAAIJER R. et al. Increased gelatinase-A and gelatinase-B activities in malignant vs. benign breast tumors. **Int J Cancer**. v. 86, n.2: p.204-7, 2000.

HUANG J, et al. Serum and tissue expression of gelatinase and Twist in breast cancer. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**. v.18, n.18: p.2662-9, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, José Alencar Gomes da Silva. Ministério da saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva. Ministério da saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

JOBIM, F.C.et al. Expressão da MMP-9 e do VEGF no câncer de mama: correlação com outros indicadores de prognóstico. **Rev. Bras. Ginecol. Obstert.** v. 30, n.6: p.287-293, 2008.

JOBIM, F.C. et al. Prevalence of vascular-endothelial growth factor, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in primary breast cancer. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 10: p. 979-87, 2009.

KADAM, C.Y.; ABHANG, S.A. Apoptosis Markers in Breast Cancer Therapy **Adv Clin Chem**. v.74: p.143-93, 2016.

KAMBE,T. An overview of a wide range of functions of ZnT and Zip zinc transporters in the secretory pathway. **Biosci Biotechnol Biochem**. v.75, n.6: p.1036-43, 2011.

KAUR, N. et al. Clinicopathologic profile of benign breast conditions in Indian women: prospective study based on aberrations of normal development and involution classification. **World J Surg**. v.36, n.9: p.2252-8, 2012.

KESSENBROCK, K; PLAKS, V; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1: p. 52-67, 2010.

KHOKHA, R; MURTHY, A; WEISS, A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 9, p. 649-65, 2013.

KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases. **Amino Acids** v.41, n.2: p.271-290, 2011.

KUBOTA, S. et al. Effects of para-nonylphenol on 92 kDa gelatinase secretion by human peripheral lymphocytes and U937 cells in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 279, n.1: p.270-4, 2000.

LAU, C.E.; TREDWELL, G.D.; ELLIS, J.K.; LAM, E.W.; KEUN, H.C. Metabolomic characterisation of the effects of oncogenic PIK3CA transformation in a breast epithelial cell line. **Sci Rep**. v.7: p.46079, 2017.

LEV, S. et al. Prevention of tumor spread by matrix metalloproteinase-9 inhibition: old drugs, new concept. **Eur J Intern Med**. v.13, n. 2: p.101-103, 2002.

LI, H. et al. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. **Oncol Lett** v.14: p.5865-70, 2017.

LINDSEY, M. L.; ZAMILPA, R. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases following myocardial infarction. **Cardiovasc. Ther**. v.30,n.1: p.31-41, 2012.

LIU W.Q, et al. A study on the predictive and evaluational value of molecular subtypes and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi**. v.51, n.8: p.706-9, 2013.

MAKLUF, A.S.D.; DIAS, C.R.; BARRA, A.A. Avaliação da qualidade de vida em mulheres com câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 1, p. 49-58, 2006.

MARGAN, M. M. et al. Molecular Portrait of the Normal Human Breast Tissue and Its Influence on Breast Carcinogenesis. **Breast Cancer** v. 19 n. 2: p.99-111, 2016.

MARUMOTO A et al. An Uncommon Pairing of common Tumors: Case Report of Ductal Carcinoma *in situ* Within Fibroadenoma. **Hawaii J Med Public Health**. v.78, n.2: p.39-43, 2019.

MINAMOTO T, MAI M, RONAI Z. K-ras mutation: early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and lung cancers—a review. **Cancer Detect Prev**, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. COORDENAÇÃO NACIONAL DE CONTROLE DE TABAGISMO - CONTAPP. "Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco". Rio de Janeiro, 1996.

MOCANU, M.M.; NAGY, P.; SZÖLLŐSI, J. Chemoprevention of breast cancer by dietary polyphenols. **Molecules** v.20: p.22578–22620, 2015.

MOLL, U.M. et al. Tumor promoter-stimulated Mr 92,000 gelatinase secreted by normal and malignant human cells: isolation and characterization of the enzyme from HT1080 tumor cells. **Cancer Res**. v. 50: p.6162-6170, 1990.

MORCOS, N.Y. et al. Postoperative simple biochemical markers for prediction of bone metastases in Egyptian breast cancer patients. **Ecancermedical science**. v.7, p.305, 2013.

MURPHY, G. et al. Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. **JBiol Chem** v.269: p.6632-6636, 1994.

MYLONA, E. et al. The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma. **Histopathology**. v. 50: p. 338– 347, 2007.

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

NAGASE, H.; WOESSNER, J.F. JR. Matrix metalloproteinases. **JBiol Chem**. v. 274, n.31: p. 21491-4, 1999.

NASSAR, A. et al. Complex fibroadenoma and breast cancer risk: a Mayo Clinic Benign Breast Disease Cohort Study. **Breast Cancer Res Treat.** v.153, n.2: p.397-405, 2015.

NIU, G.; CHEN, X. Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy. **Curr. Drug Targets** v.11: p.1000–1017, 2010.

PATEL, S. et al. Role of serum matrix metalloproteinase-2 and -9 to predict breast cancer progression. **Clin Biochem** v.44: p.869-872, 2011.

PEROU, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature.** v. 406, n.6797: p.747-52, 2000.

POLTAVETS, V. et al. The Role of the Extracellular Matrix and Its Molecular and Cellular Regulators in Cancer Cell Plasticity. **Front Oncol.** v. 8: p.431, 2018.

PRZYBYLOWSKA, K. et al. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**v.95: p. 65–72, 2006.

RAJABI, M.; MOUSA, S.A. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. **Biomedicines.** v.5, n. 2, p: E34, 2017.

RAMOS, E.A.S.et al. Worse Prognosis in breast cancer patients can be predicted by immunohistochemical analysis of positive MMP-2 and negative estrogen and progesterone receptors. **Rev Assoc Med Bras** v. 62,n.8: p.774-781, 2016.

REN, F. et al. Overexpression of MMP Family Members Functions as Prognostic Biomarker for Breast Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE** v.10, n.8: e0135544, 2015.

ROMIEU, I.I.; AMADOU, A.; CHAJES, V. The Role of Diet, Physical Activity, Body Fatness, and Breastfeeding in Breast Cancer in Young Women: Epidemiological Evidence. **Rev Invest Clin.** v. 69, n.4: p.193-203, 2017.

ROSEN, P.P. **Rosen's breast pathology.** 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Raven; 2001. p. 143-55.

ROY, R; YANG, J; MOSES, M.A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 31: p. 5287-97, 2009.

RUNDHAUG, J.E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **J Cell Mol Med**. v.9, n.2: p.267-85, 2005.

SANGMA, M.B.M.; PANDA, K.; DASIAH, S. A clinico-pathological study on benign breast diseases. **J Clin Diagn Res**. v.7, n.3: p.503–6, 2013.

SEVE, M. et al. In silico identification and expression of SLC30 family genes: Na expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters tissue expression. **BMC Genomics**, London, v. 5, n.1, p.32, 2004.

SHEEN-CHEN SM, et al. Serum levels of matrix metalloproteinase 2 in patients with breast cancer. **Cancer Lett**. v.173, n.1: p.79-82, 2001.

SHUMAN MOSS, L.A.; JENSEN-TAUBMAN, S.; STETLER-STEVENSON, W.G. Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. **Am J Pathol**.v.181, n. 6: p.1895-1899, 2012.

SILVA, A.G. et al. Li- Fraumeni-like syndrome associated with a large BRCA 1 intrageneticdeletion. **BMC Cancer**, n.12, p.237, 2012.

SMITH, R.A. et al. Cancer screening in the United States, 2013: a review of current American Cancer Society guidelines, current issues in cancer screening, and new guidance on cervical cancer screening and lung cancer screening. **Cancer J Clin**. v.63, n.2: p.88-105, 2013.

SOMIARI, S.B. et al. Plasma concentration and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with breast disease, breast cancer and at risk of developing breast cancer. **Cancer Lett**. v. 233, n.1: p. 98–107, 2006.

SOMIARI, S.B. et al. Circulating MMP2 and MMP9 in breast cancer- Potential role in classification of patients into low risk, high risk, benign disease and breast cancer categories. **Int J Cancer**; v.119: p .1403–11, 2006.

SORLIE, T. et al. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **Eur J Cancer**. v.40, n.18: p.2667-75, 2004.

SOTIRIOU et al., Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.100, n.18: p.10393-8, 2003.

STIVAL, R.A. et al. Impacto do fenótipo triplo- negativo no prognóstico de pacientes com câncer de mama de uma unidade de referência no Brasil central. **Rev Bras Mastologia**, v. 22, n. 1, p. 6-12, 2012.

SULLU, Y. et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. **Pathology-Researchand practice** v. 207: p.747-753, 2011.

SUN, H. et al. Anti-angiogenic treatment promotes triple-negative breast cancer invasion via vasculogenic mimicry. **Cancer Biology & Therapy** , v.18, n. 4: p. 205–213, 2017.

TIWARI, A et al. Incidental Detection of Carcinoma In-situ in Fibroadenoma of the Breast in a Young Woman: A Rare Finding. **Cureus**. v.10, n.12: p.3797, 2018.

TSAI, C.H. et al. Matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 expression in human oral squamous cell carcinoma and the effect of protein kinase C inhibitors: preliminary observations. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod**.v.95, n.6: p.710-6, 2003.

VAN WART H.E, BIRKEDAL-HANSEN H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 87: p. 5578-5582, 1990.

VANSAUN, M.N. Molecular pathways: adiponectin and leptin signaling in cancer. **Clin Cancer Res**. v.19: p.1926–1932, 2013.

VASATURO, F. et al. Plasma levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 correlate with histological grade in breast cancer patients. **Oncol lett** v.5: p.316-320, 2013.

- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res.** v. 92: p. 827-839, 2003.
- WEIGEL, M.T., DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocr Relat Cancer.** v.17; n.4: p.245-62, 2010.
- WEN, C. et al. Unifying mechanism in the initiation of breast cancer by metabolism of estrogen (Review). **Mol Med Rep.** v.16, n.2: p.1001-1006, 2017.
- WHITE, A.J. et al. Overall and central adiposity and breast cancer risk in the sister study. **Cancer.** v.121, n.20: p.3700-8, 2015.
- WHO ICDO – 3ª: **Classificazione Internazionale delle Malattie per l'Oncologia**-Terza Edizione. Inferenze Scarl, Milano, 2005.
- WILLIAMS, H.J. Educational Case: Fibroadenoma of the Breast. **Acad Pathol.** v. 5: p. 2374289518790926, 2018. doi: 10.1177/2374289518790926.
- WOLFF, A.C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol.** v. 25, n.1: p.118-45, 2007.
- WU, Q-W. et al. Expression and Clinical Significance of matrix metalloproteinase-9 in lymphatic invasiveness and metastasis of breast cancer. **Plos One.** v. 9, n.5: p.97804, 2014.
- XU, N et al. Clinical Study of Tumor Angiogenesis and Perfusion Imaging Using Multi-slice Spiral Computed Tomography for Breast Cancer. **Asian Pacific J Cancer Prev** v. 14, n.1: p.429-433, 2013.
- YANG, X. et al. Fibroepithelial Tumors of the Breast: Pathologic and Immunohistochemical Features and Molecular Mechanisms **Arch Pathol Lab Med.** v.138: p. 25-36, 2014.
- ZHANG, J. et al. Detection of serum VEGF and MMP-9 levels by Luminex multiplexed assays in patients with breast infiltrative ductal carcinoma. **ExpTher Med.** v.8, n.1: p.175-180, 2014.

ZHANG, M. et al. Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. **Breast**. v. 22, n.3: p.330-4, 2013.

ZHAO H, et al. Matrix metalloproteinases contribute to kidney fibrosis in chronic kidney diseases. **World J Nephrol**. v. 2, n. 3: p.84–89, 2013.

Papel das Metaloproteinases de Matrix 2 e 9 no Câncer de Mama: Uma Revisão de Literatura



Artigo submetido a Cancer Investigation

Journal ISSN: 1699-048X (Print) 1699-3055 (Online)

QUALIS: B1 em Biotecnologia

JCR 2016/2017: 2.053

Role of Metalloproteinases-2 and -9 in Breast Cancer: an review the literature

Luana Mota Martins¹, Larysse Mayra Campos-Verde¹, Danylo Rafael Costa-Silva¹,
Camila Maria Simplício-Revoredo¹, Maria da Conceição Barros-Oliveira¹, Elmo de
Jesus Nery Júnior¹, Dilina do Nascimento Marreiro¹, Benedito Borges da Silva¹

*¹Postgraduate Program, Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal
University of Piauí, Teresina, Piauí 64049-550, Brazil.*

Corresponding author:

Benedito Borges da Silva

2280 Frei Serafim Avenue, UFPI

64001-020 Teresina, Piauí, Brazil

Telephone: +55 86 3232 5063

Email: beneditoborges@globo.com

Papel das Metaloproteinases de Matrix 2 e 9 no Câncer de Mama: Uma Revisão de Literatura

Resumo

Os biomarcadores, como os relacionados à proliferação e apoptose, têm a vantagem de sofrer alterações em seus níveis anteriores antes de qualquer resposta clínica do tumor ao tratamento. A metaloproteinase de matriz (MMP) tem sido sugerida como um potencial biomarcador no câncer de mama, particularmente como MMP-2 e MMP-9, cujo papel é degradar o colágeno IV que cobre uma matriz extracelular de tecidos neoplásicos, favorecendo o crescimento e disseminação do tumor. Os resultados encontrados nesta revisão sugerem que o aumento da expressão de metaloproteinases pode influenciar uma maior agressividade tumoral e um prognóstico mais avançado de câncer de mama. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo não são claros. Assim, estudos adicionais sobre esse assunto podem contribuir para o papel das metaloproteinases como um importante biomarcador preditivo no câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de Mama, Matriz metaloproteinase-2. Matriz metaloproteinase-9. Imunoistoquímica. Biomarcadores.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença multifatorial de etiologia desconhecida, envolvendo um desequilíbrio entre fatores genéticos, dietéticos, hormonais e reprodutivos, sendo determinada principalmente pela ocorrência de mutações ou alguma ativação anormal de genes que controlam o crescimento e a mitose celular [1]. É a neoplasia maligna mais comum em mulheres em todo o mundo. No Brasil, a incidência de câncer de mama aumentou significativamente, com uma estimativa de 59700 novos casos e 14206 óbitos relacionados a essa doença em 2018 [2,3].

Estratégias diagnósticas precoces com métodos de imagem, como mamografia e ressonância magnética, reduzem a mortalidade, pois a doença metastática é responsável por mais de 90% dos casos de mortalidade por câncer de mama [4]. A formação de metástases pelo tumor primário é devido à ruptura da membrana basal em um processo que envolve principalmente metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas que requerem zinco para desempenhar suas funções [5].

O papel das MMPs durante a invasão neoplásica consiste no rearranjo dos componentes da matriz extracelular para acomodar melhor a migração celular. Assim, a desregulação dessas enzimas desempenha um papel importante na progressão do câncer de mama [6,7]. Até o momento, 28 MMPs foram identificados, que compartilham um grande número de semelhanças estruturais e funcionais comuns [8]. Nesse sentido, MMP-2 e MMP-9 merecem destaque no câncer de mama, pois têm a capacidade de degradar o colágeno IV, que compõe a lâmina basal, favorecendo a migração de células neoplásicas malignas. Essas MMPs, também conhecidas como gelatinases ou colagenases, têm sido estudadas no plasma e nos tecidos e aparecem como potenciais biomarcadores prognósticos no carcinoma mamário [9].

Os níveis de expressão de MMP-2 e MMP-9 no câncer de mama têm sido relacionados a desfechos desfavoráveis e aumento da agressividade [10-12]. Além disso, essas metaloproteinases de matriz, bem como outros biomarcadores, têm a vantagem de sofrer alterações antes das alterações clínicas do tumor e permitir ajustes na terapia [13]. No entanto, poucos estudos relataram a expressão das metaloproteinases 2 e 9 no tecido mamário, o que nos levou a apresentar, em uma revisão narrativa, informações detalhadas disponíveis em diversas bases de dados

de estudos que investigaram o efeito dos níveis de expressão de MMP-2 e MMP-9 no câncer de mama.

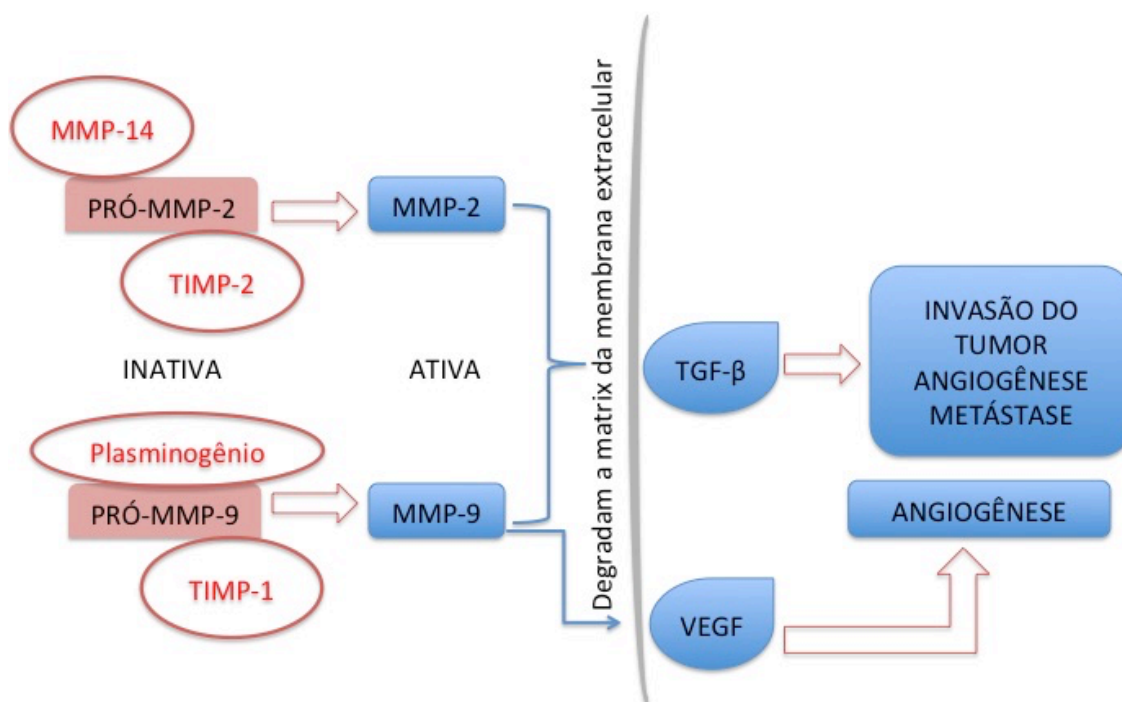
Metaloproteinase 2 e 9 no Câncer de Mama

O grupo de gelatinases consiste de dois componentes: gelatinase A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9) que se distinguem pela presença de um domínio semelhante à fibronectina, que contém três repetições de fibronectina tipo II, onde gelatina e tipo IV substratos de colágeno ligam-se de maneira semelhante às proteínas de adesão celular [14,15]. Estas enzimas são, portanto, capazes de clivar o colágeno IV, que é o principal constituinte da membrana basal, a primeira barreira à progressão das células epiteliais neoplásicas. Assim, as gelatinases desempenham um papel na invasão tumoral e na metástase [16-19].

É importante destacar que as MMP-2 e MMP-9 são secretadas por células tumorais e células normais, como fibroblastos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais, mas em sua forma inativa. A ativação de pró-MMP-2 ocorre por MMP-14 (MT1-MMP), que se liga à superfície celular e auxiliada pelo TIMP-2 cliva um domínio peptídico, conduzindo ativação da MMP-2. MMP-9 inativa (pró-MMP-9) pode ser ativada por plasminogênio e TIMP-1 [20,21].

TIMPs são capazes de efetuar fortes conexões com as MMPs ativas através da formação de complexos inibitórios. No entanto, eles também participam da ativação de algumas MMPs. Assim, os TIMPs atuam tanto na diminuição do crescimento do tumor quanto na progressão neoplásica [22,23].

A propósito, a literatura tem mostrado que as metaloproteinases 2 e 9 promovem diretamente a proliferação de células neoplásicas e a disseminação metastática através da degradação da matriz extracelular e da membrana basal e promovem indiretamente a angiogênese e a formação de novos vasos, que proporcionam nutrição e disseminação do tumor (Figura 1) [24].

Figura 1. Mecanismo de ativação das MMP- 2 e 9.

Fonte: Própria

A MMP-9 desempenha um papel importante na angiogênese do tumor pois controla a biodisponibilidade do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), que é um potente indutor da angiogênese. No entanto, a MMP-9 juntamente com a MMP-2 ativam a sinalização de transformação do fator de crescimento β (TGF- β), promovendo invasão tumoral, angiogênese e metástase [25].

As metaloproteínases têm sido estudadas no plasma e nos tecidos usando imunistoquímica e têm sido sugeridas como fator prognóstico principalmente para avaliar a invasividade do tumor [8,26]. Além disso, os níveis séricos dessas metaloproteínases em neoplasias mamárias e fibroadenoma têm sido relatados na literatura. Zhang et al. [27] compararam os níveis séricos de VEGF e MMP-9 entre adultos saudáveis e pacientes com carcinoma ductal infiltrante e fibroadenoma. Eles mostraram que os níveis de VEGF e MMP-9 em pacientes com carcinoma ductal invasivo foram significativamente maiores do que aqueles em fibroadenoma e pacientes saudáveis, e os níveis em pacientes com fibroadenoma foram ligeiramente maiores do que em adultos saudáveis, o que foi estatisticamente significativo [27].

Somiari et al. [28] avaliaram as concentrações plasmáticas e a atividade das metaloproteinases 2 e 9 em pacientes com alto risco de desenvolver câncer de mama, doença benigna da mama e câncer de mama. Esses autores concluíram que as concentrações plasmáticas de MMP-2 foram significativamente menores no grupo de neoplasias benignas do que aquelas em risco de desenvolver câncer de mama e aquelas com câncer de mama. No entanto, as concentrações plasmáticas de MMP-9 não mostraram diferença significativa entre os grupos. No entanto, Patel et al. [29], Vassaturo et al. [30] e Huang et al. [31] descobriram que os níveis séricos de MMP-2 e MMP-9 em pacientes com câncer de mama eram significativamente maiores quando comparados a controles e tumores benignos.

Estudos sugeriram que a MMP-9 está relacionada ao prognóstico no câncer de mama e que níveis plasmáticos elevados sugerem uma doença biologicamente mais agressiva [32-34]. Wu et al. [35] demonstraram níveis plasmáticos elevados de MMP-9 no câncer de mama, quando comparados a tumores benignos de mama e gânglios linfáticos. Além disso, esses autores encontraram uma associação positiva entre a expressão imunoistoquímica dessa proteína em linfonodos com metástases, mostrando o potencial da MMP-9 como marcador de progressão do câncer de mama.

A expressão imunoistoquímica tecidual de MMP-2 e MMP-9 discutida nesta revisão está resumida na Tabela 1. Jobim et al. [36] encontraram maior expressão de MMP-2 e MMP-9 em tecidos mamários, porém não houve correlação entre a expressão de proteína e o status de linfonodo sentinela. Um aspecto importante deste estudo foi a correlação positiva entre VEGF e MMP-9, ambos relacionados à angiogênese, bem como uma correlação entre MMP-2 e TIMP-2, o que corrobora com o resultado mencionado anteriormente de que o TIMP-2 se liga à forma inativa da MMP-2 e a ativa.

Daniele et al. [37] avaliaram a expressão tecidual e os níveis séricos de gelatinase em pacientes com câncer de mama metastático e não metastático e encontraram uma diferença significativamente maior em ambas as expressões imunoistoquímicas e níveis séricos elevados de MMP-2 e MMP-9 em pacientes com câncer de mama metastático em comparação aos pacientes com tumor não-metastático e os pacientes controle sem tumor, sugerindo que eles estão implicados no crescimento, invasão e metástase no câncer de mama.

Sullu et al. [11] também analisaram a expressão imunoistoquímica de MMP-2 e MMP-9 e a correlação entre as taxas de expressão e os parâmetros do prognóstico clínico-patológico no carcinoma ductal invasivo. Esses autores mostraram que 75% dos pacientes tinham expressão positiva para MMP-2. No entanto, eles não observaram uma relação da expressão de MMP-2 com o prognóstico no carcinoma ductal invasivo, enquanto 66% dos pacientes mostraram uma expressão positiva de MMP-9 correlacionada com um prognóstico desfavorável. Da mesma forma, Cupić et al. [38] relataram que a maioria das células tumorais foram coradas para MMP-9 e também observaram aumento da expressão de MMP-9 em tumores primários que recidivaram após 24 meses, sugerindo uma ligação entre a expressão proteica e a agressividade do tumor.

Em relação à expressão de metaloproteinases e sua associação com a agressividade do câncer, Zeng et al. [39] relataram que, além de sua associação com lesões malignas, a superexpressão de MMP-9 também estaria associada à pior sobrevida geral em pacientes com câncer de mama. Além disso, Zhao et al. [40] relataram que os casos triplo-negativos, um subtipo mais agressivo, tinham alta expressão de MMP-9, resultando em um pior prognóstico do câncer de mama.

Quanto às comparações entre tecidos mamários normais, lesões benignas no tecido mamário e tecidos mamários com lesões cancerígenas, Xu et al. [41] relataram que a expressão de MMP-2 foi significativamente maior em lesões mamárias malignas quando comparadas a lesões benignas. Youssef e Hakim [42] observaram que o tecido mamário normal adjacente ao tumor era negativo para a expressão de MMP-9 e que, no carcinoma ductal invasivo, havia uma alta expressão dessa proteína e estava correlacionada com metástases.

Huang et al. [31] avaliaram a expressão de MMP-2 e MMP-9 no tecido tumoral e mostraram que 72% e 76% dos casos de câncer de mama tinham expressão citoplasmática positiva para MMP-2 e MMP-9, respectivamente. As metaloproteinases também foram relacionadas aos subtipos moleculares; Min et al. [43] verificaram maior frequência de expressão de MMP-9 em mulheres mais jovens e em alto grau histológico de tumores. Eles também observaram que a expressão de MMP-2 estromal isolado, bem como a coexpressão de MMP-2, MMP-2 estromal ou tumor MMP-9, correlaciona-se significativamente com preditores prognósticos como

alto grau histológico, receptor de estrogênio negativo (ER) e receptor de progesterona (PR) e HER2 positivo, bem como com sobrevida global pobre. Ramos et al. [44] verificaram uma coloração positiva para MMP-2 em 68% das células e que a correlação entre MMP-2, PR e ER ajudou a prever o surgimento de metástases.

Recentemente, Li et al. [10] e Sun et al. [12], também avaliaram a expressão de metaloproteinases no carcinoma mamário: a expressão de MMP-2 e MMP-9 em tecidos de câncer de mama foi significativamente maior do que em tecidos tumorais adjacentes normais e altos níveis de expressão de MMP-2 e MMP-9 foram correlacionados com metástase linfonodal e tumor de estadiamento [10], enquanto uma expressão de células MMP-2 mais alta foi observada em pacientes triplo-negativos em comparação com pacientes não triplamente negativos [12].

Considerando a complexa ação das metaloproteinases nos mecanismos envolvidos na patogênese do câncer de mama e seu papel na proliferação celular, metástase e angiogênese, a inibição da atividade da metaloproteinase da matriz parece ser um alvo interessante para se obter um melhor prognóstico em pacientes oncológicos. No entanto, novos estudos que determinam o papel dessas proteínas no carcinoma de mama ainda são necessários.

Tabela 1. Descrição dos estudos selecionados.

Autores	Tipo de Estudo	MMP	Amostra	Conclusão
Jobim et al., (2009)	Transversal	MMP-2 e MMP-9	95 pacientes com câncer de mama, com idade entre 33 e 81 anos, linfonodos axilares negativos e sem metástases à distância.	Não houve correlação significativa entre a quantidade de VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e comprometimento linfático.
Daniele et al., (2010)	Caso Controle	MMP-2 e MMP-9	50 pacientes com e sem metástases e grupo controle de 34 mulheres saudáveis com idade entre 24 e 92 anos.	Expressão de MMP-2 e MMP-9 nos linfonodos foram significativamente mais elevados no câncer de mama metastático, tanto no tecido como soro.
Sullu et al., (2011)	Transversal	MMP-2 e MMP-9	41 pacientes câncer de mama triplo negativo e 99 pacientes não triplo-negativo com idade entre 22 e 85 anos.	Os resultados indicam aumento na expressão de MMP-2 e MMP-9 em carcinoma ductal infiltrante. O aumento da expressão de MMP-9 foi associado a um pior prognóstico.
Cupic et al., (2011)	Transversal	MMP-9	29 pacientes com câncer de mama, com idade entre 37 e 79 anos. Sendo 29 carcinomas primários e 48 carcinomas recorrentes.	Forte expressão de MMP-9 em tumores primários e aumento da expressão em carcinomas recorrentes após 24 meses.
Xu et al., (2013)	Caso Controle	MMP-2	45 amostras de tecido mamário com câncer de mama e 16 amostras de tecido mamário com tumor benigno com idade entre 39 e 71 anos.	Os níveis de VEGF e MMP-2 foi significativamente maior no grupo de câncer da mama do que o grupo de tumor benigno.
Zeng et al., (2013)	Caso Controle	MMP-9	55 pacientes com câncer de mama.	Expressão maior de MMP-9 em tecidos de câncer de mama em comparação com os não cancerosos.
Zhao et al., (2013)	Caso-Controle	MMP-9	127 pacientes com TNBC e 30 pacientes com fibroma de glândula mamária com idade entre 30 e 68 anos.	Pacientes com TNBC tem uma elevada expressão de CD147 e MMP-9, ambas correlacionadas com invasão, metástase e associadas a um mau prognóstico.

Tabela 1. Descrição dos estudos selecionados (Continuação)

Autores	Tipo de Estudo	MMP	Amostra	Conclusão
Youssef and Hakim, (2014)	Transversal	MMP-9	Foi realizado em 67 casos de carcinoma ductal invasivo de mama com idade entre 35 e 76 anos.	Houve uma correlação significativa entre a expressão de MMP-9 e metástases linfonodais
Min et al., (2014)	Transversal	MMP-2 e MMP-9	177 amostras de tecido diagnosticados com câncer de mama ductal invasivo com idade entre 25 e 79 anos	A expressão de MMP-2 estromal isolada, bem como sua coexpressão com MMP-2 ou -9 tumoral, correlaciona-se com pior prognóstico.
Huang et al., (2014)	Caso Controle	MMP-2 e MMP-9	A população estudada foi composta por 46 pacientes com câncer de mama com idade entre 32 e 83 anos.	Aumento na expressão de MMP-2 e MMP-9 em tecido com câncer de mama, sugere um papel essencial na invasão e metástase.
Ramos et al., (2016)	Transversal	MMP-2	44 amostras de tecido mamário com câncer de mama com idade entre 27 e 84 anos.	A MMP-2 em combinação com outros marcadores ajudam a prever o surgimento de metástases e morte em pacientes com câncer de mama.
Li et al., (2017)	Transversal	MMP-2 e MMP-9	80 pacientes com câncer de mama com idade entre 24 e 78 anos.	Expressão elevada de MMP-2 e MMP-9 no câncer de mama, forte associação à metástase linfonodal e estadiamento tumoral e prognóstico.
Sun et al., (2017)	Transversal	MMP-2	174 tecidos de câncer de mama humano	As amostras de câncer de mama indicaram nível mais elevado de MMP-2 positivo nos casos de TNBC comparados com o não-TNBC.

MMP: Metaloproteinase; TNBC: Câncer de Mama Triplo Negativo;

Conclusão

Este artigo fornece informações sobre o papel das metaloproteínas em vários tipos de câncer de mama associados a fatores prognósticos estabelecidos, a fim de ajudar a entender o efeito das metaloproteínas na progressão do câncer de mama. As evidências científicas reunidas nesta revisão sugerem que o aumento da expressão de metaloproteínas pode levar a uma maior agressividade do tumor e, conseqüentemente, a um pior prognóstico do câncer de mama. Vale ressaltar que as colagenases, MMP-2 e MMP-9, atuam na promoção da proliferação celular neoplásica e da disseminação metastática através da degradação da matriz extracelular e da membrana basal.

No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo não são totalmente compreendidos. Assim, novos estudos podem contribuir para esclarecer o papel das metaloproteínas como importantes biomarcadores e fatores prognósticos do câncer de mama.

Referências

1. Silva AG, Ewald I, Sapienza M, Pinheiro M, Peixoto A, de Nóbrega AF, Carraro DM, Teixeira MR, Ashton-Prolla P, Achatz MI, Rosenberg C, Krepschi AC. Li- Fraumeni-like syndrome associated with a large BRCA 1 intragenetic deletion. *BMC Cancer* 2012; n.12, p.237.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D and Bray F: Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136: p.359-386.
3. National Cancer Institute (INCA). Cancer estimates for 2018 in Brazil. 2018. <http://www.inca.gov.br/estimate/2018>. Accessed 20/03/2018.
4. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2000; 10(6): p.415-33.
5. Ramos EA, Silva CT, Manica GC, Pereira IT, Klassen LM, Ribeiro EM, Cavalli IJ, Braun-Prado K, Lima RS, Urban CA, Costa FF, Noronha L, Klassen G. Worse prognosis in breast cancer patients can be predicted by immunohistochemical

analysis of positive MMP-2 and negative estrogen and progesterone receptors. *Rev Assoc Med Bras* 2016; 62(8): p.774-781.

6. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases. *AminoAcids*. 2011; v.41, n.2, p.271-290.

7. Yue J, Zhang K, Chen J. Role of integrins in regulating proteases to mediate extracellular matrix remodeling. *Cancer microenvironment: official journal of the international cancer microenvironment society* 2012; v. 5, n.3, p.275-283.

8. Lindsey ML, Zamilpa R. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases following myocardial infarction. *Cardiovasc Ther* 2012; 30(1): 31-41. doi: 10.1111/j.1755-5922.2010.00207.x.

9. Shuman Moss LA, Jensen-Taubman S, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. *Am J. Pathol*. 2012; v.181, n. 6, p.1895-1899.

10. Li H, Qiu Z, Li F, Wang C. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncol Lett*. 2017;14, p.5865-70.

11. Sullu, Y, Demirag GG, Yildirim A, Karago Z, Kandemir B. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. *Pathol-Res and pract*. 2011; 207, p.747-753.

12. Sun H, Zhang D, Yao Z, Lin X, Liu J, Gu Q, Dong X, Liu F, Wang Y, Yao N, Cheng S, Li L, Sun S. Anti-angiogenic treatment promotes triple-negative breast cancer invasion via vasculogenic mimicry. *Cancer Bio Ther*. 2017; 18, 4, p.205–213.

13. Dowsett, M. et al. Clinical studies of apoptosis and proliferation in breast cancer. **Endocr Relat Cancer**. v.6, n.1: p.25-8,1999.

14. Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. *Genes Diseases* 2015; 2: p.26-34.

15. Murphy G, Nguyen Q, Cockett MI, Atkinson SJ, Allan JA, Knight CG, Willenbrock F, Docherty AJ. Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J Biol Chem*. 1994; 269: p.6632-6636.

16. Ala-Aho R, Kähäri, VM. Collagenases in cancer. *Biochim*. 2005; 87, 3-4, p.273-286.

17. Hanemaaijer R, Verheijen JH, Maguire TM, Visser H, Toet K, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. Increased gelatinase-A and gelatinase-B activities in malignant vs. benign breast tumors. *Int J Cancer*. 2000; 86, 2: p.204-7.
18. Lev S, Gilburd B, Lahat N, Shoenfeld Y. Prevention of tumor spread by matrix metalloproteinase-9 inhibition: old drugs, new concept. *Eur J Intern Med*. 2002; 13, 2:p.101-103.
19. Tsai CH, Hsieh YS, Yang SF, Chou MY, Chang YC. Matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 expression in human oral squamous cell carcinoma and the effect of protein kinase C inhibitors: preliminary observations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 95,6: p.710-6.
20. Khokha R, Murthy A, Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13, 9, p. 649-65.
21. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006; 69: p. 562-573.
22. Egeblad M, Werb Z. New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. *Nature Reviews/Cancer*, 2002; 2: p.161-74.
23. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92: p. 827-839.
24. Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg JO. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J*. 2011; 278 (1), p.28-45.
25. Benson CS, Babu SD, Radhakrishna S, Selvamurugan N, Ravi SB. Expression of matrix metalloproteinases in human breast cancer tissues. *Dis Markers*. 2013; 34 (6): p.395-405.
26. Pereira AC, Carmo ED, Silveira EAS, Amadeu SU, Rosa LAB. O papel das MMPs 2 e 9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. *Rev. Bras. Cancerol*. 2006; 52 (3), p.257-262.
27. Zhang J, Yin L, Wu J, Zhang Y, Xu T, Ma R, Cao H, Tang J. Detection of serum VEGF and MMP-9 levels by Luminex multiplexed assays in patients with breast infiltrative ductal carcinoma. *Exp Ther Med*. 2014; 8, 1, p.175-180.
28. Somiari SB, Shriver CD, Heckman C, Olsen C, Hu H, Jordan R, Arciero C, Russell S, Garguilo G, Hooke J, Somiari RI. Plasma concentration and activity of

matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with breast disease, breast cancer and at risk of developing breast cancer. *Cancer Lett.* 2006; 233(1): p.98–107.

29. Patel S, Sumitra G, Koner BC, Saxena A. Role of serum matrix metalloproteinase-2 and -9 to predict breast cancer progression. *Clin Biochem* 2011; 44, p.869–72.

30. Vasaturo F, Solai F, Malacrino C, Nardo T, Vincenzi B, Modesti M, Scarpa S. Plasma levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 correlate with histological grade in breast cancer patients. *Oncol Lett.* 2013; 5: p.316-320.

31. Huang J, Ang L, Liu MQ, Hu HG, Wang J, Zou Q, Zhao Y, Zheng L, Zhao M, Wu ZS. Serum and tissue expression of gelatinase and Twist in breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014; 18 (18): p.2662-9.

32. Gasparini G, Fanelli M, Boracchi P, Morabito A, Locopo N, Biganzoli E. Behaviour of metastasis in relation to vascular index in patients with node-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen. *Clin Exp Metastasis.* 2000; v.18, n.1: p.15-20.

33. Jobim FC, Schwartzmann G, Xavier NL, Uchoa DM, Saciloto M, Chemello N. Expressão da MMP-9 e do VEGF no câncer de mama: correlação com outros indicadores de prognóstico. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2008; 30 (6), p.287-293.

34. Mylona E, Nomikos A, Magkou C, Kamberou M, Papassideri I, Keramopoulos A, Nakopoulou L. The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma. *Histopathology.* 2007; 50: p. 338– 347.

35. Wu QW, Yang QM, Huang YF, She HQ, Liang J, Yang QL, Zhang ZM. Expression and Clinical Significance of matrix metalloproteinase-9 in lymphatic invasiveness and metastasis of breast cancer. *PlosOne.* 2014; 9 (5): p.97804.

36. Jobim FC, Xavier NL, Uchoa DM, Cruz DB, Saciloto M, Chemello N, Schwartzmann G. Prevalence of vascular-endothelial growth factor, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in primary breast cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42(10): p.979-87.

37. Daniele A, Zito AF, Giannelli G, Divella R, Asselti M, Mazzocca A, Paradiso A, Quaranta M. Expression of Metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in Sentinel Lymph Node and Serum of Patients with Metastatic and Non-Metastatic Breast Cancer. *Anticancer Research.* 2010; 30: p.3521-3528.

38. Cupić DF, Tesar EC, Ilijas KM, Nemrava J, Kovacević M. Expression of matrix metalloproteinase 9 in primary and recurrent breast carcinomas. *Coll Antropol.* 2011; 35 (2): p.7-10.
39. Zeng Y, Liu C, Dong B, Li Y, Jiang B, Xu Y, Meng L, Wu J, Qu L, Shou C. Inverse correlation between Naa10p and MMP-9 expression and the combined prognostic value in breast cancer patients. *Med Oncol.* 2013; 30(2): p.562.
40. Zhao H, Dong Y, Tian X, Tan TK, Liu Z, Zhao Y, Zhang Y, Harris DCh, Zheng G. Matrix metalloproteinases contribute to kidney fibrosis in chronic kidney diseases. *World J Nephrol.* 2013; 2(3): p.84–89.
41. Xu N, Lei Z, Li XL, Zhang J, Li C, Feng GQ, Li DN, Liu JY, Wei Q, Bian TT, Zou TY. Clinical Study of Tumor Angiogenesis and Perfusion Imaging Using Multi-slice Spiral Computed Tomography for Breast Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev,* 2013: 14 (1), p.429-433.
42. Youssef NS, Hakim SA. Association of Fascin and matrix metalloproteinase-9 expression with poor prognostic parameters in breast carcinoma of Egyptian women. *Diagnostic Pathology* 2014; 9: p.136.
43. Min KW, Kim DH, Do SI, Kim K, Lee HJ, Chae SW, Sohn JH, Pyo JS, Oh YH, Kim WS, Lee SY, Oh S, Choi SH, Park YL, Park CH. Expression patterns of stromal MMP-2 and tumoral MMP-2 and -9 are significant prognostic factors in invasive ductal carcinoma of the breast. *APMIS* 2014; 122, p.1196-1206.
44. Ramos EAS, Silva CT, Manica GC, Pereira IT, Klassen LM, Ribeiro EM, Cavalli IJ, Braun-Prado K, Lima RS, Urban CA, Costa FF, Noronha L, Klassen G. Worse Prognosis in breast cancer patients can be predicted by immunohistochemical analysis of positive MMP-2 and negative estrogen and progesterone receptors. *Rev Assoc Med Bras* 2016; 62(8): p.774-781.

**Expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 in
breast cancer and breast fibroadenoma: a
randomized, double-blind study**



Artigo submetido a Scientific Reports

ISSN: 0163-4984 (Print), 1559-0720 (Electronic)

QUALIS: A1 em Biotecnologia
JCR 2016/2017: 4.122

Expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer and breast fibroadenoma: a randomized, double-blind study

Luana Mota Martins¹, Larysse Maira Campos-Verdes¹, Fabiane Araújo Sampaio¹, Camila Maria Simplício Revoredo¹, Danylo Raphael Costa-Silva¹, Maria da Conceição Barros-Oliveira¹, Elmo de Jesus Nery Junior¹, Gilmara Péres Rodrigues¹, Diego Cipriano Chagas¹, Dilina do Nascimento Marreiro¹, Benedito Borges da Silva¹.

¹Postgraduate Program, Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64000-020, Brazil.

Corresponding author

Benedito Borges da Silva

Avenida Elias João Tajra, 1260

54.049-300, Teresina Piauí, Brazil

Phone: +55 86 3232 5063

Email: beneditoborges@globo.com

Expressão das metaloproteinases de matriz 2 e 9 no câncer de mama e fibroadenoma de mama: um estudo randomizado, duplo cego

Resumo

As metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9 podem desempenhar um papel importante na proliferação celular e na disseminação do câncer. No entanto, poucos estudos compararam a expressão dessas proteínas entre o câncer de mama e o fibroadenoma. Um estudo randomizado, duplo-cego foi realizado em 66 mulheres na pré-menopausa, com idades entre 20-49 anos, que tinham sido diagnosticadas com fibroadenoma ou câncer de mama. Os pacientes foram divididos em dois grupos: grupo A, controle (fibroadenoma, n = 36) e grupo B, estudo (câncer, n = 30). A análise imunoistoquímica foi realizada utilizando amostras de tecido de fibroadenoma e câncer de mama para avaliar a expressão do antígeno MMP-2 e MMP-9. As células foram consideradas positivas se apresentou coloração citoplasmática castanha. O teste exato de Fisher foi usado para comparar a porcentagem de casos com células expressando MMP-2 e MMP-9 nos grupos controle e estudo ($p < 0,05$). A microscopia de luz mostrou uma maior concentração de células com coloração citoplasmática positiva para a expressão de MMP-2 e MMP-9 no câncer de mama do que no fibroadenoma. A porcentagem de casos com células expressando MMP-2 nos grupos controle e estudo foi de 41,67% e 86,11%, respectivamente ($p < 0,0009$), enquanto a porcentagem de casos com células expressando MMP-9 nos grupos A e B foi 66,67% e 93,33%, respectivamente ($p < 0,0138$). O presente estudo mostra que a expressão da proteína MMP-2 e MMP-9 foi significativamente maior no câncer de mama do que no fibroadenoma.

Palavras-chave: Câncer de mama, Fibroadenoma, Metaloproteinase de matriz-2, Metaloproteinase de matriz -9, Imunoistoquímica.

Introdução

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum que acomete mulheres no mundo¹. Essa doença é o segundo câncer mais frequente na população feminina do Brasil, e 59.700 novos casos e 14.206 óbitos foram estimados no ano de 2018². Embora a detecção precoce e a terapia direcionada ao câncer de mama tenham melhorado o prognóstico da doença³, tem sido sugerido que estratégias terapêuticas e prognósticas mais adequadas para o câncer de mama podem ser formuladas com o uso de biomarcadores protéicos, como proliferação celular e apoptose, uma vez que apresentam a vantagem de sofrer modificações antes de qualquer resposta clínica do tumor ao tratamento e sugerir mudanças na terapia⁴⁻⁶. Biomarcadores como metaloproteinases de matriz, uma família de endopeptidases dependentes de zinco, cujos principais membros da família são MMP-2 e MMP-9, têm sido relacionados à patogênese do câncer de mama^{7,8}.

Estas proteinases têm despertado o interesse de pesquisadores devido a sua associação com a proliferação celular, capacidade de degradar o colágeno IV encontrado principalmente na lâmina basal, favorecendo a migração de células malignas. Além disso, as metaloproteinases estão correlacionadas com a angiogênese, que é essencial para o crescimento do tumor e formação de metástases⁹⁻¹¹. Estudos mostraram que as concentrações de MMP-2 e MMP-9 estão aumentadas em mulheres com câncer de mama e associadas a um prognóstico desfavorável¹²⁻¹⁴. Além disso, a literatura tem mostrado aumento da expressão de MMP-2 e -9 no câncer de mama em mulheres com metástase linfonodal em comparação com a expressão dessas gelatinases no câncer de mama sem metástases em linfonodos axilares¹⁵⁻¹⁸.

Segundo Ciurea et al.¹⁹, os fibroadenomas são as lesões benignas mais comuns em mulheres jovens em idade reprodutiva e alguns autores não consideram o fibroadenoma como tumor, preferindo rotulá-lo como uma aberração do desenvolvimento e involução normal (ANDI)²⁰. Da mesma forma, esta consideração do fibroadenoma como uma alteração do tecido mamário normal permite o uso de amostras deste tumor como grupo controle para avaliar a expressão de biomarcadores no câncer de mama, como metaloproteinases. Portanto, levando em

consideração a prevalência do fibroadenoma mamário e do câncer de mama em mulheres na idade reprodutiva, bem como a importância das metaloproteinases de matriz como potencial marcador de desenvolvimento e agressividade tumoral, além da escassez de estudos avaliando a expressão de MMP no fibroadenoma e câncer de mama, é o que nos levou ao desenho do presente estudo.

Pacientes e Métodos

Pacientes

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal do Piauí (CAAE: 43447015.8.0000.5214) e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes do início do estudo. Sessenta e seis mulheres com câncer de mama ou fibroadenoma foram incluídas no estudo entre outubro de 2014 e outubro de 2016. As pacientes foram recrutadas na clínica de mastologia do Hospital Getúlio Vargas, Universidade Federal do Piauí, Brasil. O estudo incluiu pacientes pré-menopáusicas com níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH) <30 mUI/ml, fibroadenoma ou carcinoma de mama, e nenhum tratamento oncológico prévio foi incluído no estudo. Os pacientes com fibroadenoma foram submetidos à avaliação histológica do tumor para confirmar seu estado benigno.

Desenho do estudo

Um estudo randomizado, duplo-cego foi realizado, envolvendo 75 mulheres na pré-menopausa com tumores de mama. Nove pacientes foram excluídos devido a problemas técnicos que impossibilitaram a análise. Os pacientes foram divididos em dois grupos, grupo controle (fibroadenoma, n = 36) e grupo de estudo (câncer de mama, n = 30). Todos os participantes do estudo foram submetidos a um procedimento cirúrgico especializado para confirmação histológica e imunoistoquímica do tumor.

Imunoistoquímica de MMP-2 e MMP-9

Para análise imunoistoquímica, fragmentos de tecido mamário foram fixados em formalina tamponada, cortados em secções de 3 µm de espessura, desparafinados em xilol por 5 minutos, desidratados em etanol absoluto, lavados em solução salina tamponada a pH 7,4 durante 5 minutos e depois tratados durante 5 minutos com 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em tampão para bloquear peróxido endógeno.

Para a recuperação do antígeno, as lâminas foram colocadas em racks contendo 0,21% de ácido cítrico (pH 6,0) e aquecidas em um forno de microondas durante 15 minutos com potência máxima. Foi adicionada solução salina tamponada com fosfato contendo Tween (PBS-Tween) às lâminas depois de terem deixado arrefecer durante 20 minutos.

As amostras de tecido foram incubadas durante a noite a 4-8 °C com anticorpo monoclonal primário de rato NCL-MMP2-507 e NCL-MMP9-439 (diluição de 1:50). As lâminas foram lavadas com PBS-Tween, instiladas com reagente secundário (anti-mouse BA 2000, Vector Laboratories, Burlingame, CA) e incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem novamente com o PBS-Tween, as lâminas foram instiladas com o sistema de detecção ABC Elite (PK 6100, Vector Laboratories) e incubadas durante 45 minutos à temperatura ambiente.

As amostras foram lavadas mais uma vez com PBS-Tween, instiladas com DAB (1,0 ml de EnVision FLEX DAB para uma gota de cromogênio) e incubadas durante 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas com água destilada, contrastadas com hematoxilina, coradas com uma solução amoniacal, desidratadas com etanol absoluto, passadas através de vasos de Coplin contendo xilol e montadas na resina Permount. As células que expressam a proteína MMP-2 e MMP-9 foram identificadas por coloração marrom escuro do citoplasma.

Método quantitativo

A quantificação foi realizada por dois observadores cegos à identidade do paciente, que também não tinham conhecimento dos casos anteriormente. O

procedimento foi realizado utilizando um microscópio de luz (microscópio óptico Eclipse E-400, Nikon, Tóquio, Japão) conectado a uma câmera de vídeo (câmera digital CHC-370N, Samsung, Seul, Coréia), que capturou e transmitiu a imagem para um computador equipado com o software Image Lab, versão 2.3, desenvolvido pela Softium Informatica (São Paulo, Brasil) para análise de imagens.

Uma análise semi-quantitativa da imunorreatividade de MMP-2 e MMP-9 foi realizada, de acordo com os critérios estabelecidos por Van Slooten et al.²¹. Os seguintes parâmetros foram levados em consideração: intensidade da coloração celular (I) e fração de células neoplásicas coradas (F). A intensidade da coloração foi classificada como: 0 (negativo), 1 (corado fracamente), 2 (moderadamente corado) ou 3 (fortemente corado). A fração de células coradas foi classificada da seguinte forma: I (0 - 25%), II (25 - 75%) ou III (75 - 100%). O resultado final foi alcançado por uma combinação de dois parâmetros (I e F) variando de 0 a 6. Os casos com escore final ≥ 3 foram classificados como positivos para MMP-2 e MMP-9. Em todos os casos, a coloração citoplasmática marrom foi adotada como um padrão de positividade.

Análise Estatística

Os dados foram analisados no programa estatístico SPSS para Windows 8.0. A comparação da idade entre os dois grupos foi analisada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney²², enquanto o teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar o Índice de Massa Corporal (IMC) e a Circunferência da Cintura (CC). A porcentagem de casos expressando MMP-2 e MMP-9 entre os dois grupos foi analisada pelo teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de $p < 0,0523$.

Resultados

À microscopia de luz mostrou maior concentração de citoplasma corado para MMP-2 e MMP-9 no câncer de mama em comparação ao fibroadenoma (Figura. 1). As características dos dois grupos foram semelhantes, exceto para idade e circunferência da cintura (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos pacientes.

	Grupo A (controle) (n = 36) Média ±DP	Grupo B (estudo) (n=30) Média ±DP	p
Idade (anos)	32.92 ± 9.46	40.37 ± 6.77*	0.0011
Idade Menarca (anos)	12.86 ± 1.16	13.67 ± 1.79	0.0820
IMC (kg/m ²)	24.23 ± 4.79	25.83 ± 3.65	0.1342
CC (cm)	79.40 ± 12.34	83.92 ± 8.92*	0.0480

*Houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e o estudo ($p < 0,05$). ($p < 0,05$).

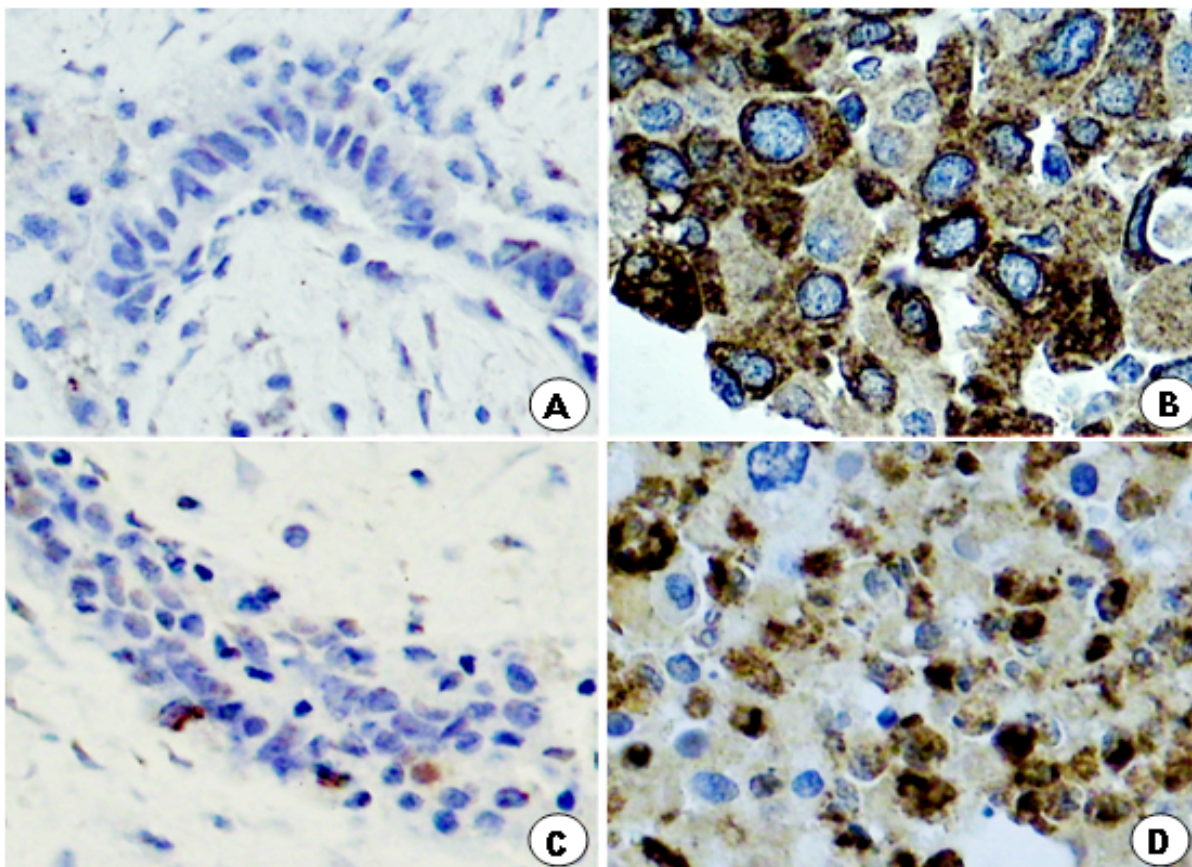
Quanto à quantificação da expressão do antígeno imunoistoquímico, a porcentagem de casos positivos para MMP-2 no grupo A (fibroadenoma) e B (câncer de mama) foi de 41,67% e 86,11%, respectivamente ($p < 0,0009$), enquanto a porcentagem de casos positivos para MMP -9 em tecidos de tumor de mama de mulheres dos grupos A e B foi de 66,67% e 93,33%, respectivamente ($p < 0,0138$) (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de casos com células expressando MMP-2 e MMP-9 no fibroadenoma de mama (Grupo A, controle) e no câncer de mama (Grupo B, estudo).

Variáveis	Grupos	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Total n (%)
MMP-2	Fibroadenoma	15 (41.67%)	21 (58,33%)	36 (100.00)
	Câncer de Mama	25(86.11%)*	5 (13.89%)	30 (100.00)
MMP-9	Fibroadenoma	24 (66.67%)	12 (33,33%)	36 (100.00)
	Câncer de Mama	28(93.33%)*	2 (6.67%)	30 (100.00)

* A diferença de expressão de MMP-2 e MMP-9 no grupo de câncer de mama foi estatisticamente maior em comparação com fibroadenoma, $p < 0,0009$ e $p < 0,0138$, respectivamente.

Figura 1. Fotomicrografia do corte histológico de uma porção de fibroadenoma e câncer de mama, mostrando: (B, D) inúmeras células com forte citoplasma corado de marrom para MMP-2 e MMP-9 no grupo de câncer de mama comparado ao citoplasma marrom esparsos no grupo fibroadenoma de mama (A, C). Ampliação 400x



Discussão

As metaloproteinases de matriz aumentam a atividade proteolítica contra a membrana basal, levando à propagação de células malignas²⁴. O presente estudo avaliou a expressão de MMP-2 e MMP-9 em células de câncer de mama em comparação ao fibroadenoma de mama, considerado por alguns autores como apenas uma aberração do desenvolvimento normal e da involução (ANDI)²⁰ e mostrou heterogeneidade entre a idade dos pacientes com câncer de mama e idade das mulheres com fibroadenoma. Entretanto, o fibroadenoma é mais comum em mulheres mais jovens, enquanto o carcinoma de mama é mais comum em mulheres mais velhas²⁵. A circunferência da cintura foi maior em pacientes com câncer de mama, o que concorda com os achados da literatura, onde alguns autores acreditam que mulheres pré-menopausadas com excesso de gordura visceral apresentam

maior risco de desenvolver câncer de mama triplo negativo, um tumor mais agressivo²⁶.

O presente estudo mostrou uma maior concentração de células com forte coloração citoplasmática marrom para MMP-2 e MMP-9 em células de câncer de mama do que no fibroadenoma. No entanto, há uma escassez de estudos na literatura comparando a expressão imunoistoquímica dessas gelatinases entre câncer de mama e fibroadenoma. Até onde sabemos, apenas um estudo na literatura avaliou a expressão imunoistoquímica de MMP-2 em câncer de mama e fibroadenoma e mostrou que uma alta expressão de MMP-2 no carcinoma ductal de mama *in situ* foi um incidente precoce no curso da genética do câncer de mama²⁷. Por outro lado, a maioria dos estudos na literatura investigou as concentrações séricas de MMP-2 e MMP-9 e mostrou maior concentração dessas proteínas séricas em pacientes com câncer de mama do que em mulheres com fibroadenoma, corroborando com dados de expressão imunoistoquímica^{15,16, 28}.

A MMP-2 e a MMP-9 participam dos processos iniciais e tardios de progressão do tumor²⁹. Vale ressaltar que a atividade da MMP pode ser direta através da proliferação tumoral e disseminação metastática pela degradação da matriz extracelular e membrana basal. A atividade da MMP também pode ser indireta, promovendo a angiogênese³⁰. A MMP-9 em particular, tem um papel significativo neste processo, ativando o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é um dos principais contribuintes para a formação de novos vasos e crescimento tumoral³¹.

Huang et al.¹⁵ avaliaram a expressão de MMP-2 e MMP-9 em tecido de câncer de mama e soro de mulheres com câncer e aquelas com tumores benignos de mama, mostrando que 72% e 76% das mulheres com câncer de mama tiveram expressão positiva para MMP-2 e MMP-9, respectivamente. Os autores também demonstraram níveis séricos mais elevados dessas metaloproteinases em pacientes com câncer de mama, quando comparados a mulheres com tumores benignos. Sullu et al.¹² e Min et al.¹⁷, também analisaram a expressão imunoistoquímica de MMP-2 e MMP-9 em carcinoma ductal invasivo e identificaram uma forte coloração citoplasmática para MMP-9 em 66% e 93,8% dos casos, respectivamente.

Portanto, nossos resultados estão de acordo com os achados de Li et al.⁷, que mostraram uma expressão significativamente maior de MMP-2 e MMP-9 no câncer de mama do que no tecido adjacente normal. Isso sugere que essas metaloproteinases estão potencialmente associadas à agressividade do tumor e podem ser um biomarcador prognóstico do câncer de mama. Até onde sabemos, há escassez de estudos avaliando a expressão imunohistoquímica de biomarcadores no câncer de mama e fibroadenoma de mama, no entanto Sampaio et al.³² demonstraram maior expressão de metalotioneína-1 no câncer de mama do que no fibroadenoma. Assim, devido à escassez de estudos na literatura, mais estudos com um tamanho de amostra maior são necessários para melhorar o conhecimento do papel da MMP-2 e MMP-9 na progressão e no prognóstico do câncer de mama.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos pacientes que participaram do presente estudo e ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Piauí, no Brasil.

Contribuições dos autores

L.M.M e B.B.S. concebido e projetado o estudo. L.M.M. conduziu o estudo. C.S.M.E.D; F.A.S; D.R.C.S; J.P.S.S; L.M.C.V. ajudou com experimentos e análises de dados e B.B.S e D.N.M. revisão do manuscrito. Todos os autores redigiram e/ou editaram o manuscrito e aprovaram a versão final do manuscrito.

Informação de Financiamento

Este estudo não teve financiamento.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não têm conflito de interesses.

Aprovação ética

O conselho de revisão interna da Universidade Federal do Piauí aprovou este protocolo e o consentimento esclarecido foi obtido de todos os participantes individuais e incluídos no estudo. Todos os procedimentos realizados neste estudo obedeceram as leis atuais do Brasil e estavam em conformidade com os padrões éticos dos comitês de pesquisa institucional e nacional e com a declaração de Helsinki de 1964 e suas alterações posteriores.

Referências

1. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**, 359-386; 10.1002/ijc.29210 (2015).
2. National Cancer Institute (INCA). Cancer estimates for 2018 in Brazil. 2018. <http://www.inca.gov.br/estimate/2018>. Accessed 20/03/2018.
3. Anderson, K. N., Schwab, R.B. & Martinez, M. E. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast Cancer Res Treat* **144**, 1-10; 10.1007/s10549-014-2852 (2014).
4. Dowset, M., Smith, I. E., Ebbs, S. R., Dixon, J. M. & Skene, A. Proliferation and apoptosis as markers of benefit in neoadjuvant endocrine therapy of breast cancer. *Clin. Cancer Res* **12**, 1024-1030; 10.1158/1078-0432.CCR-05-2127 (2006).
5. Borges, U. S *et al.* A comparative study of Ki-67 antigen expression between luminal A and triple-negative subtypes of breast cancer. *Med Oncol* **34**, 156; 10.1007/s12032-017-1019-x (2017).
6. Escorcio-Dourado, C. S. *et al.* Bcl-2 antigen expression in luminal A and triple-negative breast cancer. *Med Oncol* **34**, 161; 10.1007/s12032-017-1022-2 (2017).
7. Li, H., Qiu, Z., Li, F. & Wang, C. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncol Lett* **14**, 5865-70; 10.3892/ol.2017.6924 (2017).

8. Ren, F. *et al.* Overexpression of MMP Family Members Functions as Prognostic Biomarker for Breast Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **10**, 0135544; 10.1371/journal.pone.0135544 (2015).
9. Amar, S., Smith, L. & Fields, G. B. Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1864**, 1940-1951; 10.1016/j.bbamcr.2017.04.015 (2017).
10. Chen, Y., Whang, X., Chen, G., Dong, C. & Zhang, D. The impact of matrix metalloproteinase 2 on prognosis and clinicopathology of breast cancer patients: A systematic Meta-Analysis. *Plos One* **10**, e0121404; 10.1371/journal.pone.0121404 (2015).
11. Klein, T. & Bischoff, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids*. **41**, 271–290; 10.1007/s00726-010-0689-x (2011).
12. Sullu, Y., Demirag, G. G., Yildirim, A., Karagoz, F. & Kandemir, B. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. *Pathol-Res and pract* **207**, 747-753; 10.1016/j.prp.09.010 (2011).
13. Patel, S., Sumitra, G., Koner, B.C. & Saxena, A. Role of serum matrix metalloproteinase-2 and -9 to predict breast cancer progression. *Clin Biochem* **44**, 869–72; 10.1016/j.clinbiochem.2011.04.019 (2011).
14. Vasaturo, F. *et al.* Plasma levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 correlate with histological grade in breast cancer patients. *Oncol Lett* **5**, 316-320; 10.3892/ol.2012.977 (2013).
15. Huang, J. *et al.* Serum and tissue expression of gelatinases and twist in breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. **18**, 2662-2669; (2014).
16. Jinga, D. C. *et al.* MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med* **10**, 499-510; (2006).
17. Min, K. W. *et al.* Expression patterns of stromal MMP-2 and tumoral MMP-2 and -9 are significant prognostic factors in invasive ductal carcinoma of the breast. *APMIS* **122**, 1196-1206; 10.1111/apm.12285 (2014).

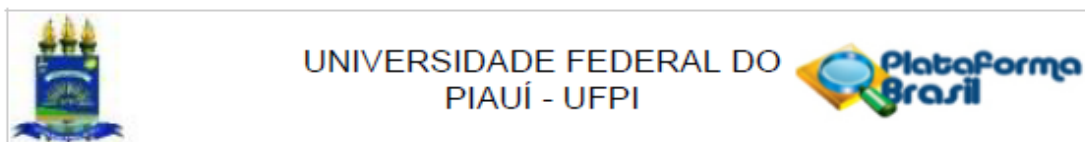
18. Zhao, M. *et al.* Expression and correlation of Twist and gelatinases in breast câncer. *Exp Therap Med.* **6**, 97-100; 10.3892/etm.2013.1099 (2013).
19. Ciurea, A. *et al.* Fibroadenomas and breast carcinoma: a possible answer to a frequently asked question. A pictorial essay. *Med Ultrason* **20**, 385-391; 10.11152/mu-1408 (2018).
20. Hughes, L. E., Mansel, R. E. & Webster, D. J. Aberrations of normal development and involution (ANDI): a new perspective on pathogenesis and nomenclature of benign breast disorders. *Lancet* **2**, 1316–1319; 10.1016/s0140-6736(87)91204-9 (1987).
21. Van Slooten, H. J. *et al.* Expression of Bcl-2 in node-negative breast cancer is associated with various prognostic factors, but does not predict response to one course of perioperative chemotherapy. *Br J Cancer* **74**, 78–85 (1996).
22. Conover, W. J. Nonparametrics statistics. 3rd edition. (Wiley, 1999).
23. Agresti, Alan. Categorical Data Analysis. (Wiley, 2013).
24. Hadler-Olsen, E., Fadnes, B., Sylte, I., Uhlin-Hansen, L. & Winberg, J. O. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J.*, **278**, 28-45; 10.1111/j.1742-4658.2010.07920 (2011).
25. Sönmez, K. *et al.* Surgical breast lesions in adolescent patients and a review of the literature. *Acta Chir Belg* **106**, 400-4; (2006).
26. Agresti, R. *et al.* Association of adiposity, dysmetabolisms, and inflammation with aggressive breast cancer subtypes: a cross-sectional study. *Breast Cancer Res Treat* **157**, 179–189; 10.1007/s10549-016-3802-3 (2016).
27. Peihong, S. & Perry, F. Expression of nm23, MMP-2, TIMP-2 in breast neoplasm in Zhengzhou Center Hospital. *Ethiop Med J* **45**, 79-83 (2007).
28. Somiari, S. B. *et al.* Circulating MMP2 and MMP9 in breast cancer – potential role in classification of patients into low risk, high risk, benign disease and breast cancer categories. *Int J Cancer* **119**, 1403–11; <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.21989> (2006).
29. Ala-Aho, R. & Kähäri, V. M. Collagenases in cancer. *Biochimie.* **87**, 273-286; 10.1016/j.biochi.2004.12.009 (2005).
30. Hanemaaijer, R. *et al.* Increased Gelatinase-A and Gelatinase-B activities in malignant vs. benign breast tumors. *Int. J. Cancer* **86**, 204–7; (2000).

31. Bergers, G. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat cell bio* **2**, 737-44; 10.1038/35036374 (2000).
32. Sampaio F.A. *et al.* A case-control study of Metallothionein-1 expression in breast cancer and breast fibroadenoma. *Sci Rep.* **9**, 7407; 10.1038/s41598-019-43565-0 (2019).

3. CONCLUSÃO

A expressão das MMP-2 e MMP-9 foi significativamente maior no câncer de mama em comparação com o fibroadenoma. Estes resultados sugerem que estas metaloproteinases estão associadas a um risco e agressividade tumoral aumentados, além de um potencial papel como biomarcador no câncer de mama.

□

ANEXO A - Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí.**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária.

Pesquisador: benedito borges da silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43447015.8.0000.5214

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.022.962

Data da Relatoria: 15/05/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto apresenta uma proposta de pesquisa de Mestrado intitulada: " Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária". Justifica a relevância da investigação devido a necessidade de identificação de substâncias relacionadas à carcinogênese como candidatos naturais para explorar novos fatores prognósticos ou alvos potenciais para terapias específicas, utilizados como fatores prognósticos das neoplasias mamárias como elemento facilitador do entendimento dos mecanismos fundamentais que regulam a proliferação, a diferenciação e o desenvolvimento de metástases tumorais. Inicialmente os marcadores tumorais eram identificados por meio de técnicas moleculares ou bioquímicas.

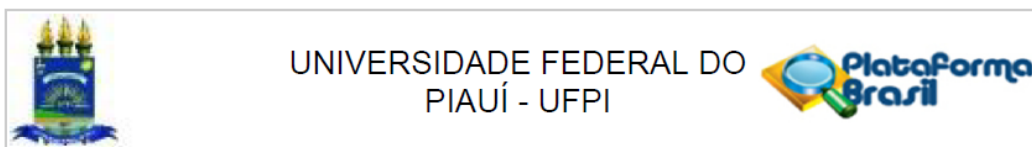
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar os biomarcadores moleculares em mulheres com neoplasias mamárias.

Objetivo Secundário: Expressão imunoistoquímica das metaloproteinases 2 e 9 na neoplasia mamária; Avaliar as concentrações plasmáticas de metaloproteinases 2 e 9; Determinar as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de zinco; Analisar o consumo alimentar e adequação da dieta em relação à macronutrientes e zinco; Avaliar a associação entre as metaloproteinases 2 e 9 com parâmetros de zinco; Correlacionar o polimorfismo do receptor

do fator de crescimento epidérmico e os subtipos moleculares de câncer de mama; Relacionar os dados antropométricos com subtipos moleculares de câncer de mama.

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



Continuação do Parecer: 1.022.962

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Quanto aos riscos o pesquisador diz no Protocolo que: "Não há nenhum risco aos participantes da pesquisa". No entanto no TCLE afirma que "Como durante a pesquisa será aplicado um questionário, este poderá ocasionar um risco de constrangimento, mas as pesquisadoras responsáveis, [...] adotarão procedimentos éticos no decorrer dessa aplicação conforme Resolução 466/2012 para evitar esse risco. Ao participar da pesquisa, a voluntária não sofrerá nenhum prejuízo; no entanto, poderá sentir leve desconforto em vista da coleta do material biológico, requerido para realização desta pesquisa. No entanto providências e cautelas serão empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições adversas que possam causar dano, após a coleta de sangue será oferecido um lanche patrocinado pelos pesquisadores. Ratificamos que nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade". Sendo o TCLE o documento de acesso aos participantes a descrição dos riscos foi considerada.

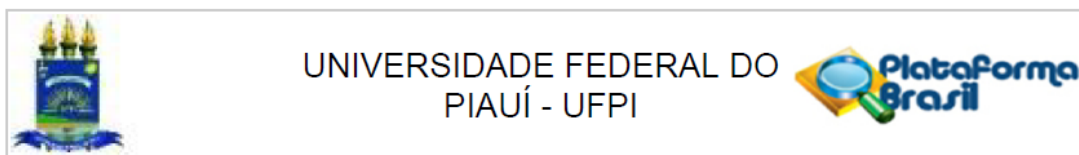
Benefícios:

Os participantes da pesquisa receberão uma orientação nutricional de acordo com as necessidades após todas as coletas de dados; Bem como receberão todos os resultados referente as análises realizadas durante a pesquisa. Acrescentando, ainda no TCLE que; "As participantes do estudo terão como benefícios os resultados dos exames referente aos biomarcadores moleculares, que serão fornecidos após a realização dos mesmos, bem como receberão uma orientação nutricional, proporcionando uma orientação da melhor alimentação".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Caracteriza-se como um estudo quantitativo do tipo grupo controle, para identificação de substâncias relacionadas à carcinogênese como candidatos naturais para explorar novos fatores prognósticos ou alvos potenciais para terapias específicas. A população será constituída de pacientes portadoras de câncer de mama, atendidas no Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas (lôcus da investigação), no período de julho de 2015 a julho de 2018 que serão submetidas a tratamento especializado. Do universo populacional será selecionado o grupo controle constituído por 40 pacientes portadoras de fibroadenoma. Define como critérios de inclusão serem pacientes portadoras de câncer de mama, comprovado histologicamente; Mulheres com idade maior que 20 anos sem qualquer tratamento prévio quimio, hormônio ou radioterápico. Como critério de Exclusão: ter sido submetida a tratamento prévio quimio, hormônio ou radioterápico; Mulheres com idade menor que 20 anos; Mulheres que não aceitaram participar do estudo; Mulheres com uso de suplementos alimentares. Para a coleta

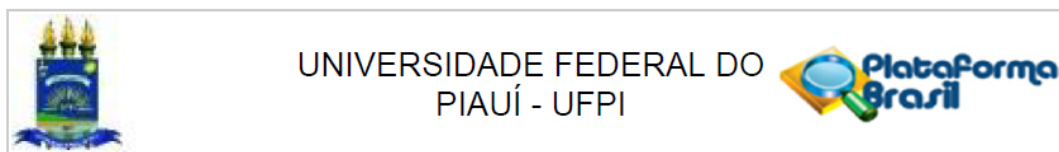
Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



Continuação do Parecer: 1.022.962

de dados serão realizados os seguintes procedimentos: Anteriormente a coleta de sangue, o peso corporal será determinado utilizando uma balança digital Filizola®, com capacidade máxima de 150 kg, graduada em 100 gramas. A estatura será medida com um antropômetro marca Secar, graduado em centímetros e com barra de madeira vertical e fixa. O peso e a estatura serão medidos três vezes para cada participante, sendo então obtida a média dessas medidas. O índice de massa corpórea será calculado a partir do peso da participante do estudo dividido pela sua estatura elevada ao quadrado (WHO, 2000). A medida da circunferência da cintura será realizada com as mulheres em pé, utilizando uma fita métrica não extensível, circundando a linha natural da cintura, na região mais estreita entre o tórax e o quadril, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. Para a avaliação do consumo alimentar será utilizado um inquérito alimentar realizado de acordo com a técnica de registro alimentar de três dias, compreendendo dois dias durante a semana e um dia no final de semana. O consumo alimentar de macronutrientes e zinco será calculado pelo software Nutwin, versão 1.5 do Departamento de Informática em Saúde da Universidade Federal de São Paulo (ANÇÃO et al., 2002). Para verificar a adequação da ingestão alimentar de zinco das participantes do estudo, será utilizado como referência a Estimated Average Requirement (EAR), contida nas DRI's (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001). Amostras de 20 mL de sangue venoso serão coletadas no período de 7:30 às 8:30 horas, estando as participantes da pesquisa em jejum de no mínimo 12 horas. O sangue colhido será distribuído em tubo contendo citrato de sódio a 30% como anticoagulante (10 L/mL de sangue) para a análise de zinco (10 mL), tubo contendo EDTA para análise das metaloproteinases 2 e 9 (5 mL) e para análise do receptor do fator de crescimento epidérmico (5 mL). O plasma será separado do sangue total por centrifugação a 1831xg durante 15 minutos a 4°C, sendo o mesmo extraído com pipeta automática, acondicionado em tubos eppendorfs de polipropileno desmineralizados e armazenado em freezer a -20°C. Para separação dos eritrócitos será utilizado o método proposto por Whithehouse et al. (1982). A massa eritrocitária será lavada com 5mL de solução salina isotônica 0,9%, sendo então homogeneizada lentamente por inversão e centrifugado a 2493xg por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. O procedimento descrito será realizado três vezes, para remover contaminantes dos eritrócitos. Após a última centrifugação, a solução salina será aspirada, descartada e a massa eritrocitária será cuidadosamente extraída com o auxílio de uma pipeta automática, transferida para tubos eppendorfs de polipropileno desmineralizados e mantidos à temperatura de -20°C para análise de zinco e hemoglobina. As pacientes serão submetidas a procedimento cirúrgico especializado para confirmação histológica do tumor, exérese dos tumores benignos

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



Continuação do Parecer: 1.022.962

(fibroadenoma) e biópsia (Core biopsy) das neoplasias malignas. A seguir, as amostras de tumor serão fixadas em formalina e emblocadas em parafina para confirmação diagnóstica. Para tal, as amostras serão então fixadas em formol tamponado, desidratadas em álcool etílico, diafanizadas pelo xilol e impregnadas pela parafina numa estufa a temperatura de 59 ° C (MASSON, 1956). Após este processo, parte da amostra será submetida a cortes seriados consecutivos e corados com hematoxilina-eosina. O bloco será então armazenado para posterior avaliação imunoistoquímica. A análise das metaloproteinases será realizada com base na plataforma Human MMP Panel 2 Magnetic Bead Kit (HMMP2MAG-55K).

Análise dos dados: Para a comparação dos grupos estudados quanto às variáveis envolvidas neste estudo, será realizado o teste t de Student, aplicada uma ANOVA – análise de variância, seguida do teste de Tukey para identificar as possíveis diferenças nas comparações entre os grupos. A diferença considerada significativa será quando $p < 0,05$ e intervalo de confiança adotado será de 95%. Na análise das variáveis possivelmente inter-relacionadas será utilizado o coeficiente de Pearson.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A proposta apresenta os componentes básicos exigidos por uma pesquisa acadêmica, referencial teórico que dará sustentação ao estudo, bem como os aspectos éticos do estudo, cronograma e orçamento afirmando ser financiada com recursos próprios. Os objetivos estão coerentes com a proposta de estudo. O coordenador é docente da UFPI com experiência na temática evidenciada e se compromete cumprir os termos da Resolução CNS nº 466/12 - e zelar pela privacidade e confidencialidade dos dados.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br

ANEXO B- Comprovante de Submissão do Artigo Científico originado da Tese

Papel das Metaloproteinases de Matrix 2 e 9 no Câncer de Mama: Uma Revisão de Literatura



Artigo submetido a Cancer Investigation

Journal ISSN: 1699-048X (Print) 1699-3055 (Online)

QUALIS: B1 em Biotecnologia

JCR 2016/2017: 2.053

02/07/2019

ScholarOne Manuscripts

 Cancer Investigation

 Home

 Author

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to Cancer Investigation

Manuscript ID LCNV-2019-RA-0230

Title Role of Matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer: a review of literature

Authors Martins, Luana
Campos-Verdes, Larysse
Costa-Silva, Danylo
Simplicio-Revoredo, Camila
Barros-Oliveira, Maria
Nery Junior, Elmo
Marreiro, Dilina
da Silva, Benedito

ANEXO C- Comprovante de Submissão do Artigo Científico originado da Tese

Expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer and breast fibroadenoma: a randomized, double-blind study



Artigo submetido a Scientific Reports

ISSN: 0163-4984 (Print), 1559-0720 (Electronic)

QUALIS: A1 em Biotecnologia
JCR 2016/2017: 4.122

01/07/2019

Scientific Reports

manuscripttrackingsystem

SCIENTIFIC REPORTS

[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [help](#) | [tips](#) | [logout](#) | [journal home](#)

Manuscript #	SREP-19-23886-T
Current Revision #	0
Submission Date	21st June 19
Current Stage	Manuscript Submitted
Title	Expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer and breast fibroadenoma: a randomized, double-blind study
Manuscript Type	Original Research
Collection	N/A
Corresponding Author	Prof. Benedito da Silva (beneditoborges@globo.com) (Federal University of Piauí and Facid / Wyden Faculty)
Contributing Authors	Prof. Luana Martins , Dr. Larysse Campos-Verdes , Prof. fabiane Sampaio , Dr. Camila Maria Revoredo , Dr. Danylo Costa-Silva , Dr. Maria Barros-Oliveira , Prof. Elmo Nery Junior , Dr. Gilmar Rodrigues , Prof. Diego Chagas , Prof. Dilina Marreiro
Authorship	Yes
Abstract	<p>Matrix metalloproteinases (MMPs) 2 and 9 may play an important role in cell proliferation and dissemination of cancer. However, few studies have compared the expression of these proteins between breast cancer and fibroadenoma. A randomized, double-blind study was carried out in 66 premenopausal women, aged 20-49 years, who had been diagnosed with fibroadenoma or breast cancer. The patients were divided into two groups: Group A, control (fibroadenoma, n = 36) and Group B, study (cancer, n = 30). Immunohistochemical analysis was performed using tissue samples of fibroadenoma and breast cancer to assess MMP-2 and MMP-9 antigen expression. Cells were considered positive if exhibiting brown cytoplasmic staining. Fisher's exact test was used to compare the percentage of cases with cells expressing MMP-2 and MMP-9 in control and study groups ($p < 0.05$). Light microscopy showed a higher concentration of cells with positive cytoplasmic staining for MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer than in fibroadenoma. The percentage of cases with cells expressing MMP-2 in the control and study groups was 41.67% and 86.11%, respectively ($p < 0.0009$), whereas the percentage of cases with cells expressing MMP-9 in groups A and B was 66.67% and 93.33%, respectively ($p < 0.0138$). The current study shows that MMP-2 and MMP-9 protein expression was significantly higher in the breast cancer than in the fibroadenoma.</p> <p>Keywords: Breast neoplasms, Fibroadenoma, Matrix metalloproteinase-2, Matrix metalloproteinase-9, Immunohistochemistry</p>

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Resolução CNS 466/12, item II.2 considera como pesquisa em seres humanos as realizadas em qualquer área do conhecimento e que, de modo direto ou indireto, envolva pessoas ou coletividades, em sua totalidade ou partes, incluindo o manejo de informações e materiais. Assim, também são consideradas pesquisas envolvendo seres humanos as entrevistas, aplicações de questionários, utilização de bancos de dados e revisões de prontuários. Portanto, em consonância com esta resolução este projeto será submetido ao parecer da Comissão de Ética da UFPI, como também serão respeitados todos os direitos dos pacientes ao anonimato e à autonomia. Será utilizado um termo de consentimento livre e esclarecido, no qual o responsável pelo paciente autorizará ou não a sua participação no projeto.

Assim, você está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa: Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária.

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS:

Justificativa: As neoplasias mamárias estão entre as maiores causas de morte de mulheres no Brasil. Portanto, um caminho para diminuição dessa mortalidade é a contínua busca por novos biomarcadores ou modelos de estágios que possam ajudar a prever a evolução clínica da doença, ou simplesmente melhorar a terapia. A este respeito, a identificação de substâncias relacionadas à carcinogênese são candidatos naturais para explorar novos fatores prognósticos ou alvos potenciais para terapias específicas. O **objetivo** desse projeto é Avaliar os biomarcadores moleculares em mulheres com neoplasias mamárias.

Procedimentos: A voluntária será submetida à coleta de sangue venoso para exames bioquímicos e análise de biomarcadores moleculares, será determinado o consumo alimentar por meio de registros alimentares. Não será realizada entrevista gravada ou filmada, aceitando participar da pesquisa você terá garantia de manutenção do sigilo e da privacidade dos resultados durante todas as fases da pesquisa.

DESCONFORTOS E RISCOS: Riscos: Como durante a pesquisa será aplicado um questionário, este poderá ocasionar um risco de constrangimento, mas as pesquisadoras responsáveis, Carla Solange de Melo E. Dourado e Luana Mota Martins adotarão procedimentos éticos no decorrer dessa aplicação conforme Resolução 466/2012 para evitar esse risco. Ao participar da pesquisa, a voluntária não sofrerá nenhum prejuízo; no entanto, poderá sentir leve desconforto em vista da coleta do material biológico, requerido para realização desta pesquisa. No entanto providências e cautelas serão empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições adversas que possam causar dano, após a coleta de sangue será oferecido um lanche patrocinado pelos pesquisadores. Ratificamos que nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade. Não há riscos diretos aos participantes. **Benefícios:** As participantes do estudo terão como benefícios os resultados dos exames referente aos biomarcadores moleculares, que serão fornecidos após a realização dos mesmos, bem como receberão uma orientação nutricional, proporcionando uma orientação da melhor alimentação. **GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:** Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada na Universidade Federal do Piauí e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE:

Eu, _____ fui informada dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O professor orientador certifica-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei localizar o professor orientador **Benedito Borges da Silvano** seguinte endereço: Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, CEP 64049-550 Teresina, PI. Telefone: (86) 3215-5160 ou o Comitê de Ética em Pesquisa se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato: Comitê de Ética em Pesquisa/UFPI, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, CEP 64049-550

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura da Testemunha	Data

FICHA DE CADASTRO DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA**GRUPO:****IDENTIFICAÇÃO:**

Nome: _____ Data: ____ / ____ / ____

DN: ____ / ____ / ____ Idade: ____ anos Sexo: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Tel: _____ Cel: _____ Esco-

laridade: _____ Ocupação: _____

Número de pessoas em casa: _____

HISTÓRIA CLÍNICA:

1. Fumantes: Sim () Não () b) Uso de medicamentos: Sim () Não ()

Quais? _____

2. Consumo de Bebidas alcoólicas: Sim () Não () Frequência? _____

3. Uso de Suplementos Nutricionais: Sim () Não () Quais? _____

4. Idade da Menarca: _____

5. Idade da Menopausa: _____

6. Antecedentes Familiares de Câncer: Sim () Não () Qual ?

7. Diagnóstico de câncer de mama positivo ou negativo: ____ Quanto tempo: ____

8. Qual o estágio da doença? _____

9. Tamanho do Tumor: _____

10. Classificação do Tumor: _____

11. Presença de doenças: Sim () Não () Qual ?

Diabetes () Hipertensão () Dislipidemias () Doenças Cardiovasculares ()

Alterações na Tireóide () Doenças Hepáticas ()

Outras: _____

PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS:Peso: _____ kg IMC: _____ kg/m² Altura: _____ m

Circunferência da Cintura: - _____ cm Estado Nutricional: _____

EXAME HISTOQUÍMICO: