

Expresión y significación clínica de la MMP-13 (colagenasa-3) en el cáncer gástrico

J.M. del Casar Lizcano^a, F. Vizoso Piñeiro^a, L.O. González Sánchez^b, A. Martín Suárez^c, R. Gava^c, E. Cuesta Fernández^a y M.C. Díez Santisteban^a

Servicios de ^aCirugía General y ^bAnatomía Patológica. ^cMédico Residente de Medicina Familiar y Comunitaria. Hospital de Jove. Gijón. España.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La MMP-13 (colagenasa-3) es una metaloproteína con una potente actividad degradativa contra variados elementos de la matriz extracelular. Se ha descrito su expresión en algunos carcinomas humanos, donde parece desempeñar un papel en la progresión tumoral y metástasis. El objetivo de este estudio fue investigar la expresión y significación clínica de la MMP-13 en carcinomas gástricos.

PACIENTES Y MÉTODO: La expresión de MMP-13 fue analizada por método inmunohistoquímico en los tumores de 44 pacientes tratados quirúrgicamente por adenocarcinoma gástrico, que fueron sometidos a un período medio (\pm error estándar) de seguimiento clínico de 21.4 ± 3.2 meses.

RESULTADOS: Un total de 14 carcinomas gástricos (31,8%) presentaron una tinción inmunohistoquímica positiva para la MMP-13. El porcentaje de tumores positivos para la enzima fue significativamente ($p = 0,009$) más elevado en los carcinomas en estadio IV (69,2%) en relación con los carcinomas con estadios inferiores (I, 22,2%; II, 12,5%, y III, 14,3%), así como también en los tumores no resecables (R1 y R2) (61,5%) en relación con los resecables (R0) (19,4%) ($p = 0,017$). Asimismo, la expresión tumoral de MMP-13 estuvo significativamente asociada con una menor supervivencia total en el conjunto de los pacientes ($p = 0,0006$) y en el subgrupo de enfermos con carcinomas resecables ($p = 0,018$).

CONCLUSIONES: Nuestros resultados sugieren que la expresión tumoral de MMP-13 está asociada con una mayor agresividad tumoral y un peor pronóstico de los pacientes en el cáncer gástrico.

EXPRESSION AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF COLLAGENASE-3 (MMP-13) IN GASTRIC CANCER

BACKGROUND: MMP-13 (collagenase-3) is a metalloproteinase with potent degradative activity against a variety of ele-

ments of the extracellular matrix. Its expression has been described in some human carcinomas, where it seems to play a role in tumor progression and metastasis.

The objective of this study was to investigate the expression and clinical significance of MMP-13 in gastric carcinomas.

PATIENTS AND METHOD: MMP-13 expression was analyzed by immunohistochemistry in resected specimens from 44 patients with gastric adenocarcinoma. The mean (\pm standard error) follow-up period was 21.4 ± 3.2 months.

RESULTS: A total of 14 gastric carcinomas (31.8%) showed positive immunostaining for MMP-13. The percentage of MMP-13-positive tumors was significantly ($p = 0.009$) higher in stage IV carcinomas (69.2%) than in lower stages (I: 22.2%; II: 12.5%; and III: 14.3%), as well as in nonresectable tumors (R1 and R2) (61.5%) than in resectable carcinomas (R0) (19.4%) ($p = 0.017$). Likewise, MMP-13 tumor expression was significantly associated with shortened overall survival in both the entire group of patients ($p = 0.0006$) and in the subgroup of patients with resectable tumors ($p = 0.018$).

CONCLUSIONS: Our results suggest that, in patients harboring gastric adenocarcinoma, MMP-13 tumor expression is associated with higher tumor aggressiveness and a poor prognosis.

El proceso de invasión tumoral y de metástasis requiere la degradación proteolítica de los diferentes componentes macromoleculares de la membrana basal y de la matriz extracelular. En general, estas estructuras pueden ser degradadas por cuatro clases de enzimas proteolíticas: cisteínpoteasas, aspartilproteasas, serinproteasas y metaloproteinasas (MMP)¹. Existen evidencias crecientes de que las MMP desempeñan un papel relevante a la hora de facilitar la progresión de las neoplasias malignas humanas debido a su capacidad de degradar el tejido conectivo del organismo a un pH neutro.

Las MMP de la matriz extracelular están ampliamente distribuidas en el organismo humano, donde desempeñan un papel esencial en diversos procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo tisular embrionario, la remodela-

Correspondencia: Dr. F. Vizoso.
 Servicio de Cirugía General. Hospital de Jove.
 Avda. Eduardo Castro, s/n. Apdo. 385. 33290 Gijón. España.
 Correo electrónico: fujvizo@wanadoo.es

Recibido el 30-4-2002; aceptado para su publicación el 25-7-2002.

ción tisular², la menstruación³ y la cicatrización de heridas⁴. Todas las MMP tienen características comunes, como la presencia de dos átomos de cinc en el sitio activo de la molécula y un residuo característico de cisteína, que resulta esencial para el mantenimiento de su latencia enzimática⁵. Asimismo, las MMP son inhibidas por una familia específica de proteínas denominadas inhibidores tisulares de MMP (TIMP)⁶. En la actualidad, se han descrito al menos 28 MMP humanas⁷ que, de acuerdo con su estructura y especificidad de sustrato, pueden ser divididas en los subgrupos de colagenasas, estromalisininas, gelatinasas, MMP de membrana (MT-MMP) y otras MMP⁷. De todas esas MMP, los miembros de la superfamilia de las colagenasas son las principales proteasas neutras con capacidad de degradar las fibrillas de colágeno. Hasta el momento se han identificado cuatro colagenasas: colagenasa fibroblástica (MMP-1), colagenasa neutrofílica (MMP-8), MT1-MMP (MMP-14)⁸ y la más recientemente descubierta MMP-13 (colagenasa-3)⁹.

La MMP-13 presenta una secuencia proteica idéntica en más de un 50% a las otras tres colagenasas⁹. Sin embargo, se observan diferencias en la especificidad de su sustrato. Así, la caracterización bioquímica de la MMP-13 ha revelado que degrada preferencialmente el colágeno tipo II^{10,11}. No obstante, también se ha demostrado que la enzima es capaz de degradar otras proteínas de la matriz extracelular, como los colágenos tipo IV, X y XIV, la fibronectina, la tenascina y la fibrilina^{12,13}. En la actualidad se sabe que la MMP-13 desempeña un papel determinante en procesos fisiológicos, como la osificación fetal¹⁴, la ovulación o la involución uterina tras el parto^{15,16}. Sin embargo, la MMP-13 fue inicialmente descubierta en el cáncer de mama⁹. Con posterioridad también fue hallada sobreexpresada en otros tumores malignos, como en condrosarcomas¹⁷, carcinomas de cabeza y cuello^{18,19}, carcinomas escamosos de la piel²⁰, melanomas malignos²¹, carcinomas de vulva²² y, más recientemente, en carcinomas de vejiga urinaria²³ y de esófago²⁴. También es reciente el hallazgo de la expresión de la MMP-13 en una variedad de procesos inflamatorios²⁵⁻²⁷, así como en la aterosclerosis y en los aneurismas aórticos^{28,29}, en la cicatrización de úlceras cutáneas³⁰, en la osteoartritis y en la artritis reumatoide^{10,11}.

El hallazgo de que la MMP-13 es sobreexpresada por diversos tumores malignos, así como su potente acción degradativa sobre numerosas proteínas de la matriz extracelular, sugiere que esta proteasa puede desempeñar un papel relevante en los procesos de remodelación tisular que acompañan a la progresión tumoral. Así, recientemente se ha descrito que la MMP-13 puede ser esencial durante la transición de lesiones de carcinoma ductal *in situ* de mama a lesiones de carcinomas ductales infiltrantes³¹. Además, se ha comunicado que la expresión de MMP-13 está relacionada con parámetros tumorales indicativos de una mayor agresividad tumoral en carcinomas de laringe^{18,19} y esofágicos²⁴.

Los objetivos del presente estudio fueron investigar, mediante análisis inmunohistoquímico, la expresión de MMP-13 en una serie de carcinomas gástricos, así como la relación de esta expresión con las características clíni-

copatológicas de los tumores y con el pronóstico de los pacientes.

PACIENTES Y MÉTODO

Pacientes

Este estudio fue realizado sobre una serie de 44 pacientes diagnosticados y tratados de adenocarcinoma gástrico en el Hospital de Jove de Gijón, entre enero de 1994 y diciembre de 1998. La edad media de los pacientes fue de 68,5 años (rango, 33-86 años).

Todos los pacientes fueron sometidos a tratamiento quirúrgico. De ellos, en 24 se llevó a cabo una gastrectomía subtotal y en 20 una gastrectomía total. En un total de 31 pacientes se hallaron tumores que pudieron ser completamente resecados (R0), mientras que en los 13 pacientes restantes los tumores no fueron quirúrgicamente resecados de forma completa (R1 o R2), de acuerdo con los criterios de la International Union Against Cancer (UICC)³². Ningún paciente recibió tratamiento postoperatorio con quimioterapia.

Tras la cirugía, los enfermos fueron sometidos a controles clínicos cada 3 meses durante el primer año, y más tarde cada 6 meses. En ese período de seguimiento, y con objeto de detectar la recurrencia de la enfermedad, los pacientes fueron sometidos a exámenes clínicos y biológicos, endoscopia gastrointestinal superior, y diagnóstico por imagen (radiografías de tórax, ultrasonografía, tomografía axial computarizada, o resonancia magnética nuclear). La base de datos sobre el seguimiento clínico se cerró en el año 2000. El período medio (\pm error estándar) de seguimiento clínico fue de $21,4 \pm 3,2$ meses. De los 31 pacientes del estudio con tumores resecables, 12 desarrollaron recurrencia tumoral, y un total de 18 del conjunto de los pacientes falleció como consecuencia de la progresión tumoral. Además, 3 enfermos fallecieron como consecuencia de causas no relacionadas con el cáncer gástrico.

Muestras tisulares

Todos los tejidos fueron fijados durante 16 h en formaldehído al 10% tamponado con tampón fosfato 0,1 mol/l, pH 7,4. Posteriormente, las muestras tisulares fueron deshidratadas mediante pasos sucesivos por etanol a concentraciones crecientes hasta el 99,5% y se incluyeron en parafina.

Purificación de la MMP-13 y obtención de anticuerpos

La MMP-13 se produjo a partir de bacterias recombinantes⁹. Posteriormente, el anticuerpo se obtuvo mediante la inmunización de conejos blancos de Nueva Zelanda³⁴. Para ello se inyectaron intradérmicamente y en múltiples zonas 10 µg de MMP-13 disuelta en 0,5 ml de PBS y emulsionada con igual volumen de adyuvante completo de Freund. Los conejos fueron sangrados a las 6 semanas tras las inyecciones, y el suero dializado a 4 °C durante 24 h contra tampón fosfato 20 mmol/l, pH 7,2. Finalmente, el material obtenido fue cromatografiado en una columna de DEAE-cellulosa equilibrada y diluida en el mismo tampón. Las fracciones de IgG se conservaron a -20 °C hasta su posterior utilización. En experimentos previos que examinaron la posible reacción cruzada de la IgG purificada contra la MMP-13 con otras MMP, incluyendo colagenasa-1, colagenasa-2, estromalisinina-1, estromalisinina-2, matrilisina, gelatinasa-A y gelatinasa-B, no se detectó ninguna reacción cruzada significativa¹¹.

Preparación de las muestras y tinción inmunohistoquímica

La tinción inmunohistoquímica se realizó sobre cortes de 5 µm de los bloques de parafina siguiendo el método biotina-streptavidina mediante el sistema Supersensitive (Biogenex, San Ramón, CA, EE.UU.). La incubación con el anticuerpo contra la MMP-13 (a dilución 1:200 en tampón fosfato pH 7,2 con un 1% de seroalbúmina bovina) se realizó durante 30 min a temperatura ambiente. Entonces, las preparaciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado (Biogenex) durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación se procedió a la incubación con el complejo streptavidina-fosfatasa alcalina Label (Biogenex) durante 20 min a temperatura ambiente, siendo la reacción revelada con Fast Red en Tris-buffer con naftol-fosfato. Las preparaciones se contrastaron con hematoxilina de Mayer y fueron montadas en Aquatex (Merck, Darmstadt, Alemania).

Una vez realizado el proceso de inmunotinción, las preparaciones histológicas fueron analizadas por dos patólogos independientes sin conocimiento de los datos clínicos del estudio. Las preparaciones fueron consideradas como positivas cuando al menos un 10% de las células tumorales presentaban una tinción immunohistoquímica positiva para la enzima. Las posibles discrepancias existentes entre los patólogos en relación con la interpretación de las tinciones immunohistoquímicas fueron resueltas mediante la evaluación consensuada de las mismas.

Análisis estadístico

La relación entre la tinción immunohistoquímica para la MMP-13 y los factores clinicopatológicos fue examinada mediante el test de la χ^2 con la corrección de Yates. Las curvas de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia global fueron calculadas mediante el método de Kaplan y Meier³⁵ y comparadas con el test de rangos logarítmicos³⁶. Se consideró como supervivencia global la relacionada directamente con el cáncer gástrico. El modelo de regresión logística de Cox³⁷ fue también utilizado para examinar las diferentes combinaciones e interacciones de los factores pronósticos en un análisis multivariante. En el análisis se incluyeron las siguientes variantes: edad, sexo, localización tumoral, tipo histológico, grado histológico y estadio de acuerdo a la clasificación de la UICC. La selección de las variables pronósticas se realizó con el modelo de Cox utilizando la opción de regresión *stepwise* del paquete estadístico BMDP (programa 2L)³⁸. El criterio elegido para introducir un factor en el modelo de Cox fue un nivel de significación del 5%. Se realizó análisis multivariante en el conjunto de los pacientes, y luego separadamente en el grupo de pacientes con tumores quirúrgicamente resecables (R0). El nivel de significación estadística fue establecido para un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Expresión tumoral de la MMP-13 por los carcinomas gástricos y su relación con las características de los pacientes y sus tumores

Las características de los pacientes y de sus tumores con respecto a la edad, sexo, localización tumoral, tipo histológico, grado histológico y estadio clínico de la enfermedad se exponen en la tabla I. Cada caso fue clasificado de acuerdo con la clasificación TNM recomendada por la UICC³². El tipo histológico de los tumores fue evaluado de acuerdo con los criterios de Lauren³³. También se determinó el grado de diferenciación de los tumores según los criterios clásicos.

Un total de 14 carcinomas gástricos (31,8%) presentaron una tinción immunohistoquímica para la MMP-13, que se localizó en el citoplasma de al menos el 80% de las células tumorales, si bien ocasionalmente también observamos una tinción positiva para la enzima en los fibroblastos peritumorales. Por otra parte, no observamos tinción positiva para la MMP-13 en el tejido gástrico normal adyacente a los tumores en las preparaciones tisulares. En la figura 1 se expone un ejemplo de tumor positivo.

En relación con las características de los pacientes y de sus tumores, los valores de tinción immunohistoquímica para la MMP-13 no revelaron diferencias significativas con la edad y el sexo de los pacientes, ni tampoco con la localización tumoral, el grado y el tipo histológico, ni con el estado de afección tumoral de los ganglios linfáticos regionales. Sin embargo, resultó llamativo comprobar que los valores de expresión tumoral de la enzima ponían de manifiesto marcadas diferencias en función del grado y del tipo histológico de los tumores, cercanos a la significación estadística ($p = 0,056$ y $p = 0,051$, respectiva-

TABLA I. Tinción inmunohistoquímica para la MMP-13 (colagenasa-3) en carcinomas gástricos clasificados de acuerdo con las diferentes características de los pacientes y sus tumores

Características de los pacientes y sus tumores	N. ^o	MMP-13				p	
		Negativa		Positiva			
		N. ^o	%	N. ^o	%		
Total tumores	44	30	68,2	14	31,8		
Edad (años)						0,975	
< 65	14	9	64,3	5	35,7		
≥ 65	30	21	70	9	30		
Sexo						0,226	
Varón	24	14	58,3	10	41,7		
Mujer	20	16	80	4	20		
Localización tumoral						0,698	
Cardias	5	4	80	1	20		
Fundus	2	2	100	0	0		
Cuerpo	12	7	58,3	5	41,7		
Antro-píloro	20	13	65	7	35		
Muñón gástrico	5	4	80	1	20		
Tipo histológico						0,051	
Intestinal	32	25	78,1	7	21,9		
Difuso	12	5	41,7	7	58,3		
Grado histológico						0,056	
Bien diferenciado	14	13	92,9	1	7,1		
Moderadamente diferenciado	14	8	57,1	6	42,9		
Pobremente diferenciado	16	9	56,3	7	43,7		
Estadio tumoral*						0,009	
I	9	7	77,8	2	22,2		
II	8	7	87,5	1	12,5		
III	14	12	85,7	2	14,3		
IV	13	4	30,8	9	69,2		
Ganglios						0,852	
Negativos	15	11	73,3	4	26,6		
Positivos	29	19	65,5	10	34,5		
Resecabilidad**						0,017	
R0	31	25	80,6	6	19,4		
R1-R2	13	5	38,5	8	61,5		

El estadio y la resecabilidad fueron establecidos de acuerdo con los criterios de la UICC³².

*Estadio IV frente a I, II y III.

**Resección R0 frente a R1 y R2.

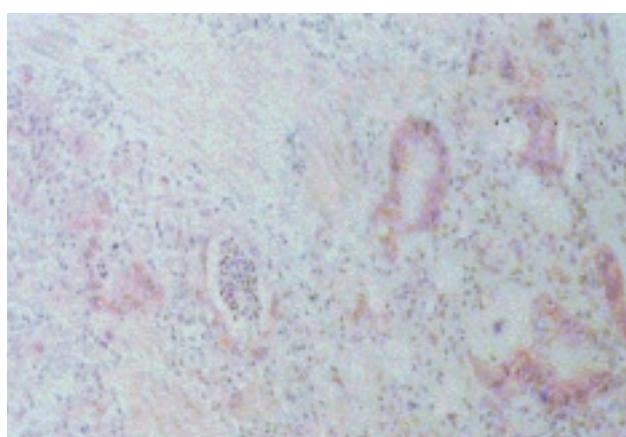


Fig. 1. Tinción inmunohistoquímica de la MMP-13 en un adenocarcinoma gástrico positivo ($\times 100$).

mente), siendo el porcentaje de tumores positivos para la MMP-13 más elevado en los tumores de tipo histológico difuso (58,3%) en relación con los de tipo intestinal (21,9%), así como en los tumores indiferenciados (43,7%) y en los moderadamente diferenciados (42,9%) en comparación con los bien diferenciados (7,1%) (tabla I). En cam-

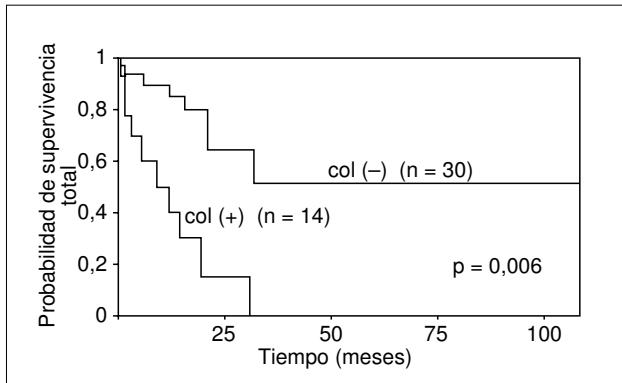


Fig. 2. Supervivencia total en función de los valores de MMP-13 en 44 pacientes con cáncer gástrico.

TABLA II. Análisis univariado de la asociación entre la tinción inmunohistoquímica para la MMP-13 (colagenasa-3) con la supervivencia de 44 pacientes con carcinoma gástrico

Factor	Supervivencia total			p	
	N. ^o	% ± EE			
		2 años	4 años		
Total	44	60 ± 8	32 ± 11	0,8646	
Localización tumoral					
Cardias	5	62 ± 21	—		
Fundus	2	50 ± 35	0		
Cuerpo	12	80 ± 12	30 ± 23		
Antro-píloro	20	53 ± 14	35 ± 17		
Muñón gástrico	5	60 ± 21	60 ± 21		
Tipo histológico ^a				0,024	
Intestinal	32	73 ± 8	56 ± 12		
Difuso	12	29 ± 15	0		
Grado histológico ^b				0,0049	
Bien diferenciado	14	91 ± 7	61 ± 25		
Moderadamente diferenciado	14	41 ± 17	47 ± 17		
Pobremente diferenciado	16	49 ± 14	14 ± 12		
Estadio tumoral ^c				0,0003	
I	9	64 ± 21	64 ± 21		
II	8	85 ± 13	85 ± 13		
III	14	73 ± 13	48 ± 21		
IV	13	14 ± 12	0		
MMP-13 ^d				0,0006	
Negativa	30	80 ± 8	64 ± 12		
Positiva	14	14 ± 12	0		
Grupo R0				0,0180	
MMP-13 ^e					
Negativa	25	90 ± 6	72 ± 12		
Positiva	6	30 ± 23	0		

^aTipo difuso frente a intestinal.

^bGrado histológico pobremente diferenciado versus bien y moderadamente diferenciado. ^cEstadio IV frente a I, II y III.

^dMMP-13 positiva frente a negativa.

^eMMP-13 positiva frente a negativa en tumores quirúrgicamente resecables (R0). EE: error estándar.

bio, los valores de tinción inmunohistoquímica para la MMP-13 sí pusieron de manifiesto diferencias significativas en función del estadio tumoral y resecabilidad quirúrgica del tumor. Así, el porcentaje de tumores positivos para la enzima fue significativamente ($p = 0,009$) más elevado en los tumores en estadio IV (69,2%) en relación con los tumores en otros estadios inferiores (I: 22,2%, II: 12,5% y III: 14,3%). Asimismo, el porcentaje de tumores positivos para la MMP-13 fue también significativamente ($p = 0,017$) más elevado en los tumores que fueron no

TABLA III. Análisis multivariante de la asociación entre la tinción inmunohistoquímica para la MMP-13 con la supervivencia de 44 pacientes con carcinoma gástrico

Factor	Supervivencia total		
	RR	CR ± EE	p
Estadio tumoral ^a		0,65 ± 0,29	0,0116
I	0,32		
II	0,62		
III	1,19		
IV	2,3		
MMP-13 ^b		1,23 ± 0,55	0,0268
Negativa	0,67		
Positiva	2,32		
Grupo R0 ^c		1,78 ± 0,71	0,018
MMP-13 ^d			
Negativa	0,78		
Positiva	4,22		

^aEstadio IV frente a I, II y III. ^bMMP-13 positiva frente a negativa. ^cMMP-13 positiva frente a negativa en tumores quirúrgicamente resecables (R0). RR: riesgo relativo; CR: coeficiente de regresión.

resecables quirúrgicamente (R1 y R2) (61,5%) en relación con los resecables (R0) (19,4%).

Expresión tumoral de la MMP-13 y pronóstico

Los valores de expresión de MMP-13 también estuvieron significativamente asociados con una menor supervivencia total de los pacientes (tabla II). Así, durante el período de seguimiento clínico se produjeron 10 fallecimientos (71,4%) a causa de la progresión tumoral en el grupo de 14 pacientes con tumores MMP-13 positivos, mientras que tan sólo hubo 8 muertes (26,6%) en el grupo de 30 pacientes con tumores MMP-13 negativos. Como se puede comprobar en la figura 2, existieron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia total determinadas para esos dos grupos de pacientes ($p = 0,0006$).

El análisis univariante de la supervivencia total de este conjunto de pacientes con carcinoma gástrico puso de manifiesto que el estadio tumoral ($p = 0,0003$), el tipo histológico ($p = 0,024$) y el grado histológico de los tumores ($p = 0,0049$) estuvieron todos ellos significativamente asociados con la supervivencia total (tabla II). Sin embargo, el análisis multivariante demostró que tan sólo el estadio tumoral y los valores de expresión de MMP-13 fueron factores pronósticos significativos e independientes para predecir la supervivencia total en el conjunto de los pacientes (tabla III).

En el subgrupo de pacientes con carcinomas gástricos quirúrgicamente resecables, la expresión tumoral de MMP-13 estuvo también significativamente asociada con una menor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia total. Así, durante el período de estudio se detectó recurrencia tumoral en cinco de los 6 pacientes (83,3%) con tumores MMP-13 positivos y tan sólo en siete de los 25 pacientes (28%) con tumores MMP-13 negativos ($p = 0,0144$) (fig. 3). Asimismo, durante el período de seguimiento se registraron 4 fallecimientos (66,6%) a causa de recurrencia tumoral en los 6 pacientes con tumores MMP-13-positivos, mientras que tan sólo hubo 5 fallecidos (20%) en el grupo de 25 pacientes con tumores

MMP-13-negativos. Como se observa en la figura 4, existieron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia total determinadas para estos dos grupos de pacientes ($p = 0,018$). Por otra parte, el análisis multivariante demostró que la expresión tumoral de MMP-13 alcanzó también significación estadística como factor pronóstico independiente para predecir la supervivencia total de los pacientes con carcinoma gástrico quirúrgicamente resecable (tabla III).

DISCUSIÓN

Este estudio demuestra la expresión tumoral de la MMP-13 en un porcentaje significativo (31,8%) de carcinomas gástricos, expresión enzimática que se observa en un elevado porcentaje de los tumores en estadio más avanzado. Además, nuestro estudio demuestra que la expresión de MMP-13 en los carcinomas gástricos está significativamente asociada de forma independiente con un pronóstico más desfavorable de los pacientes.

Nuestros resultados contribuyen a demostrar la evidencia de que los carcinomas gástricos tienen la capacidad de expresar MMP. Así, hasta el momento, otros estudios también han descrito la expresión elevada en estos tumores de otras MMP, como la gelatinasa A (MMP-2)³⁹⁻⁴², la gelatinasa B (MMP-9)⁴¹, la matrilisina (MMP-7)^{43,44} y la MT1-MMP⁴⁵. Además, en esos estudios se ha encontrado que la expresión de esas MMP está, en general, asociada con un pronóstico más adverso de los pacientes.

Los datos obtenidos en el presente estudio que indican que la expresión de MMP-13 se encuentra asociada con lesiones tumorales gástricas de evolución desfavorable están, de algún modo, de acuerdo con estudios previos sobre la expresión de esta proteasa en otros tumores. Así, se ha descrito que la sobreexpresión de la MMP-13 en carcinomas de cabeza y cuello está asociada con un incremento de la invasividad local de las células cancerosas^{18,19}. Más recientemente, también se ha descrito que la expresión de la MMP-13 está positiva y significativamente asociada con la invasión vascular, metástasis en nódulos linfáticos, con un estadio tumoral más avanzado y con una menor supervivencia de los pacientes con cáncer de esófago²⁴. Todo ello sugiere que la MMP-13 puede tener un papel relevante en la progresión tumoral. Esto parece ser debido, como ya hemos señalado con anterioridad, a la potente acción degradativa de la proteasa contra variados componentes moleculares de la matriz extracelular. Además, cabe resaltar que se ha demostrado que la expresión tumoral de la MMP-13 se relaciona con la de la gelatinasa A y la MT1-MMP⁴⁶, y que también puede ser activada por la plasmina en la superficie de las células tumorales⁴⁷. Por tanto, la MMP-13 puede formar parte, junto con estas otras, de una cascada de MMP capaz de generar una potente actividad colagenolítica. Pero, independientemente de ese efecto directo y sinérgico de la actividad degradativa de la MMP-13 y otras proteasas, que facilitan la invasividad tumoral a través del tejido conectivo y la pared de los vasos sanguíneos, existen datos a favor de que las MMP pueden tener un papel más amplio durante la pro-

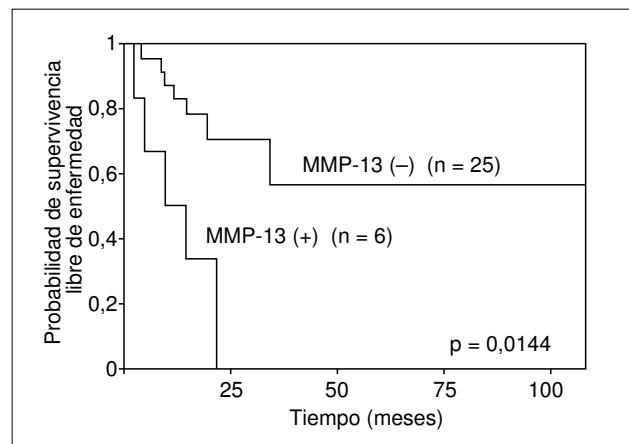


Fig. 3. Supervivencia libre de enfermedad en función de los valores de MMP-13 en 31 pacientes con cáncer gástrico resecable.

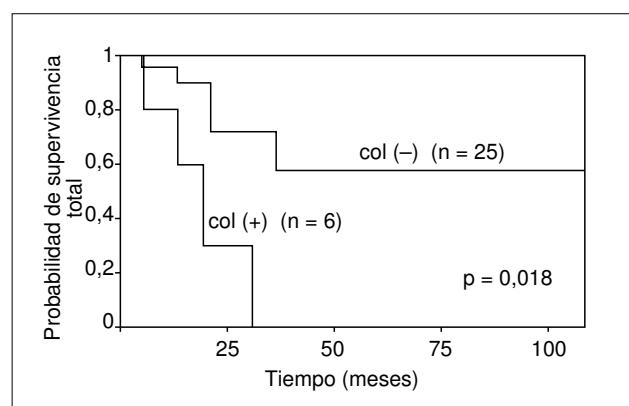


Fig. 4. Supervivencia total en función de los valores de MMP-13 en 31 pacientes con cáncer gástrico resecable.

gresión tumoral, afectando a procesos básicos como el crecimiento neoplásico, la apoptosis o la angiogénesis⁴⁸. Sin embargo, independientemente de todas estas evidencias que apoyan un papel relevante de la MMP-13 en la fisiopatología tumoral, existe en la actualidad controversia en cuanto a la naturaleza y las características funcionales de las células que producen la proteasa en las neoplasias humanas. En nuestro estudio, la localización morfológica de la expresión de la enzima fue predominantemente en las propias células cancerosas, y sólo en algunos fibroblastos de la estroma peritumoral. Este mismo patrón de expresión de la enzima ha sido descrito en los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello^{18,19} y de esófago²⁴. Otros estudios describen la expresión de la MMP-13 exclusivamente por las células tumorales de los melanomas²¹ o de la vejiga urinaria²³, mientras que en el cáncer de mama se ha demostrado la expresión de la enzima por los miofibroblastos de la estroma peritumoral^{31,49}. Es más, se ha demostrado que las células de la estroma tumoral pueden producir MMP-13 estimuladas por las propias células tumorales, habiéndose identificado como mediadores bioquímicos de esa señal a la interleucina-1α (IL-1α), IL-1β y el factor de crecimiento transformante β1 (TGF-β1)⁴⁹. Todo ello parece in-

dicar que, dentro del ámbito tisular de los tumores, el tipo celular responsable de la producción de la MMP-13 puede variar de acuerdo con los diferentes tipos de tumores. Otro aspecto relevante es que el efecto finalmente degradativo de las MMP sobre la matriz extracelular dependerá en gran medida del equilibrio con sus inhibidores naturales (TIMP)¹. Así pues, el análisis de la expresión o actividad de los TIMP, que pueden ser producidos por las propias células cancerosas para modular su acción degradativa, o bien por las células de la estroma peritumoral como mecanismo defensivo ante la acción devastadora de las MMP, puede aportar un mejor conocimiento del estatus molecular de la agresividad tumoral y, probablemente, una mayor precisión pronóstica. Además, cabe señalar que la posibilidad de controlar la acción de las MMP mediante sus inhibidores está generando un gran interés en la investigación oncológica. Si bien la utilización para este propósito de los TIMP parece tener poca utilidad farmacológica práctica debido a su baja vida media *in vivo*⁵⁰, se han sintetizado inhibidores de las MMP que, como el batimastato y marimastato, presentan actividad anticancerosa^{51,52}. Así, en el cáncer gástrico avanzado existen ya estudios preliminares que demuestran la actividad anticancerosa del marimastato^{53,54}.

En definitiva, los resultados de este estudio preliminar demuestran la expresión de la MMP-13 por un porcentaje significativo de carcinomas gástricos, y que esa expresión tumoral está asociada con una mayor agresividad tumoral. Por tanto, el análisis de la expresión de esta proteasa puede tener valor pronóstico en este tipo de tumores. Sin embargo, serán necesarios futuros estudios para confirmar los resultados preliminares aquí descritos, así como para investigar también el posible valor de la determinación de la MMP-13 en el cáncer gástrico de cara a seleccionar pacientes candidatos a tratamiento con inhibidores de las MMP.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Antonio M. Merino, por su colaboración en la interpretación de las tinciones inmunohistoquímicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Vizoso FJ, Martínez A, Vázquez J, Lamelas ML, Rodil A, García-Muñiz JL. Significación biológica y clínica de las enzimas proteolíticas y sus inhibidores en los carcinomas humanos. Cir Esp 2000;68:471-85.
- Werb Z, Alexander C, Adler R. Expression and function of matrix metalloproteinases in development. Matrix 1992 (Suppl 1): 337-43.
- Jeziorska M, Nagase H, Salamonsen LA, Woolley DE. Immunolocalization of the matrix metalloproteinases gelatinase B and stromalysin 1 in human endometrium through the menstrual cycle. J Reproduction Fertility 1996;107:43-51.
- Fini M, Girard M, Matsubara M. Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing. Acta Ophthalmol 1992; 70:26-33.
- Shima I, Sasaguri Y, Kusukawa J, Yamana H, Fujita H, Kakegawa T, et al. Production of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-3 related to malignant behaviour of esophageal carcinoma. Cancer 1992;70:2747-53.
- Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. Trends Gen 1990;6:121-5.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nature Rev Cancer 2002;2:161-74.
- Ouchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type I matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. J Biol Chem 1997;272:2446-51.
- Freije JM, Díez-Itza I, Balbín M, Sánchez LM, Blasco R, Tolivia J, et al. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. J Biol Chem 1994;269:16766-73.
- Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. J Clin Investig 1996;97:761-8.
- Lindy O, Kontinen YT, Sorsa T, Ding Y, Santavirta S, Ceponis A, et al. Matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) in human rheumatoid synovium. Arthritis Rheum 1997;40:1391-9.
- Knäuper V, Cowell S, Smith B, López-Otín C, O'Shea M, Morris H, et al. The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3. J Biol Chem 1997;40:7608-16.
- Ashworth JL, Murphy G, Rock MJ, Sherratt MJ, Shapiro SD, Shuttleworth CA, et al. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling. Biochem J 1999;340:171-81.
- Stahle-Bäckdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jiménez MG, Vega JA, et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and rheumatoid arthritis. Lab Invest 1997;76: 717-28.
- Balbín M, Fueyo A, López JM, Díez-Itza I, Velasco G, López-Otín C. Expression of collagenase-3 in the rat ovary during the ovulatory process. J Endocrinol 1996;149:405-15.
- Rudolph-Owen LA, Hulboy DL, Wilson CL, Mudhett J, Matrisian LM. Coordinate expression of matrix metalloproteinase family members in the uterus of normal, matrilysin-deficient, and stromelysin-1-deficient mice. Endocrinology 1997;138: 4902-11.
- Uriá JA, Balbín M, López JM, Álvarez J, Vizoso F, Takigawa M, et al. Collagenase-3 (MMP-13) expression in chondrosarcoma cells and its regulation by basic fibroblast growth factor. Am J Pathol 1998;153:91-101.
- Johansson N, Airola K, Grenman R, Kariniemi AL, Saarialho-Kere U, Kahari VM. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. Am J Pathol 1997;151:499-508.
- Cazorla M, Hernández L, Nadal A, Balbín M, López JM, Vizoso F, et al. Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. J Pathol 1998;186:144-50.
- Airola K, Johansson N, Kariniemi AL, Kahari VM, Saarialho-Kere UK. Human collagenase-3 is expressed in malignant squamous epithelium of the skin. J Investig Dermatol 1997;109: 225-31.
- Airola K, Karonen T, Vaalamo M, Lohi J, Kariniemi AL, Keski-Oja J, et al. Expression of collagenases-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. Br J Cancer 1999;80:733-43.
- Johansson N, Vaalamo M, Grenman S, Hietanen S, Klemi P, Saarialho-Kere U, et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by tumor cells in invasive vulvar squamous cell carcinomas. Am J Pathol 1999;154:469-80.
- Bostrom PJ, Ravanti L, Reunonen N, Aaltonen V, Soderstrom KO, Kahari VM, et al. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Int J Cancer 2000;88:417-23.
- Etoh T, Inoue H, Yoshikawa Y, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Increased expression of collagenase-3 (MMP-13) and MTI-MMP in oesophageal cancer is related to cancer aggressiveness. Gut 2000;47:50-6.
- Vaalamo M, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Kere J, Saarialho-Kere U. Distinct expression profiles of stromalysin-2 (MMP-10), collagenase-3 (MMP-13), macrophage metalloelastase (MMP-12), and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) in intestinal ulcerations. Am J Pathol 1998;152: 1005-14.

26. Utto VJ, Airola K, Vaalamo M, Johansson N, Puttnis EE, Firth JD, et al. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation. *Am J Pathol* 1998;152:1489-99.
27. Pérez-Ramos J, de Lourdes S, Vanda B, Selman M, Pardo A. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1274-82.
28. Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1999;99:2503-9.
29. Mao D, Lee JK, Van Vickle SJ, Thompson RW. Expression of collagenase-3 (MMP-13) in human abdominal aortic aneurysms and vascular smooth muscle cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:904-10.
30. Lund LR, Romer J, Bugge TH, Nielsen BS, Frandsen TL, Degen JL, et al. Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *EMBO J* 1999;18:4645-56.
31. Nielsen BS, Rank F, López JM, Balbín M, Vizoso F, Lund LR, et al. Collagenase-3 expression in breast myofibroblasts as a marker of transition of ductal carcinoma *in situ* lesions to invasive ductal. *Cancer Res* 2001;61:7091-100.
32. Hermanek P, Sobin LH, editors. UICC TNM classification of malignant tumors (4th ed.). Berlin: Springer, 1992.
33. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so called intestinal type carcinomas: an attempt at a histological classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31-49.
34. Vaitukaitis JL. Production of antisera with small doses of immunogen multiple intradermal injections. *Methods Enzymol* 1981; 73:46-52.
35. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-81.
36. Mantel N, Myers M. Problems of convergence of maximum likelihood iterative procedures in multiparameter situations. *J Am Stat Assoc* 1971;66:484-91.
37. Cox DR. Regression models and life tables. *J R Statist Soc B* 1972;34:187-220.
38. Dixon WJ, editor. BMDP statistical software. Release 1990. Berkeley: University of California Press, 1986.
39. Grigioni WF, D'Errico A, Fortunato C, Florentino M, Mancini AM, Stetler-Stevenson WG, et al. Prognosis of gastric carcinoma revealed by interactions between tumor cells and basement membrane. *Mod Pathol* 1994;7:220-5.
40. Nuovo GJ, McConell PB, Simsir A, Valea F, French DL. Correlation of the *in situ* detection of polymerase chain reaction-amplified metalloproteinase complementary DNAs and their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:267-75.
41. Sier CMF, Kubben FJ, Ganesh S, Heerding MM, Griffioen G, Hanemaaijer R, et al. Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996;74:413-7.
42. Allgayer H, Babic R, Beyer BCM, Grützner KU, Tarabichi A, Schildberg FW. Prognostic relevance of MMP-2 (72-kD collagenase IV) in gastric cancer. *Oncol* 1998;55:152-60.
43. Honda M, Mori M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. Matrix metalloproteinase-7 expression in gastric carcinoma. *GUT* 1996;39:444-8.
44. Senota A, Itoh F, Yamamoto H, Adachi Y, Hinoda Y, Imai K. Relation of matrilysin messenger RNA expression with invasive activity in human gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:313-21.
45. Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Okada Y. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 1995;55:3263-6.
46. Knäuper V, Will H, López-Otín C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, et al. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation: Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase A (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996;271:17124-31.
47. Cowell S, Knäuper V, Stewart ML, D'Ortho MP, Stanton H, Hembry RM, et al. Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem J* 1998;331:453-8.
48. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1260-70.
49. Uriá JA, Stahle-Bäckdahl M, Seiki M, Fueyo A, López-Otín C. Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer Res* 1997;57:4882-8.
50. Gómez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-22.
51. Davies B, Brown PD, East N, Crimmin MJ, Balkwill FK. A synthetic metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenografts. *Cancer Res* 1994;54:2087-91.
52. Drummond AH, Beckett P, Bone EA, Brown PD, Davis M, Galloway WA, et al. BB-2516: an orally bioavailable matrix metalloproteinase inhibitor with efficacy in animal cancer models. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1995;36:100.
53. Nemunaitis J, Poole C, Primrose J, Rosemurgy A, Malfetano J, Brown P, et al. Combined analysis of studies of the effects of the matrix metalloproteinase inhibitor marimastat on serum tumor markers in advanced cancer: selection of a biologically active and tolerable dose for long-term studies. *Clin Cancer Res* 1998;4:1101-11.
54. Tierney GM, Griffin NR, Stuart RC, Kasem H, Lynch KP, Lury JT, et al. A pilot study of the safety and effects of the matrix metalloproteinase inhibitor marimastat in gastric cancer. *Eur J Cancer* 1999;35:563-8.