

Metaloproteinasas de matriz en enfermedades del tracto gastrointestinal

C. Medina^a, A. Santana^a, E. Quintero^a, M.W. Radomski^b y F. Guarner^c

^aServicio de Aparato Digestivo y Unidad de Investigación. Hospital Universitario de Canarias. La Laguna. Tenerife. España.

^bDepartment of Integrative Biology and Pharmacology. Institute of Molecular Medicine. University of Texas-Houston. Houston. EE.UU.

^cServicio de Aparato Digestivo. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. España.

INTRODUCCIÓN

En el tracto gastrointestinal, el tejido conectivo está distribuido en las diferentes capas que constituyen la pared del tubo digestivo. Tiene 2 funciones básicas: por un lado, es un tejido de sostén que mantiene la estructura de la pared y, por otro, facilita el aporte de nutrientes a los diferentes elementos que constituyen las diversas capas. El tejido conectivo está constituido por 2 componentes: *a*) el componente celular, formado fundamentalmente por macrófagos, células mesenquimales, linfocitos y fibroblastos, y *b*) la matriz extracelular, constituida por fibras de colágeno, elastina, ácido hialurónico y proteoglicanos.

Concepto

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son un conjunto de enzimas dependientes del calcio y el cinc sintetizadas por diferentes células del tejido conectivo, que fisiológicamente participan en la remodelación de la matriz extracelular. Sin embargo, un aumento de su síntesis y de su función puede dar lugar a la degradación excesiva de sus componentes y, por tanto, provocar una lesión tisular. Las MMP se definen funcionalmente por las siguientes características: *a*) dependencia del cinc e inhibición por sus quelantes; *b*) secreción al espacio extracelular en forma latente, requiriendo su activación para su función; *c*) su actividad está regulada por inhibidores endógenos de las MMP, llamados inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP).

Correspondencia: Dr. C. Medina.
Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario de Canarias.
Cuesta-Taco, s/n. 38320 La Laguna. Tenerife. España.
Correo electrónico: cmedinamar@hotmail.com

Recibido el 17-11-2003; aceptado para su publicación el 17-11-2003.

Clasificación

Existen diferentes tipos de MMP según su peso molecular y especificidad de sustrato¹⁻⁷ y, aunque todas ellas tienen un nombre descriptivo y un número, se ha propuesto dividir las en 3 grandes grupos: colagenasas, gelatinasas y estromelinasas.

Las colagenasas, entre ellas la MMP-1 (colagenasa intersticial) y la MMP-8 (colagenasa neutrofílica), tienen capacidad de digerir colágeno intersticial tipos I, II y III; las gelatinasas, entre ellas una de 72 kDa (MMP-2 o gelatinasa A) y otra de 92 kDa (MMP-9 o gelatinasa B), pueden degradar colágeno tipo IV y gelatina; y las estromelinasas, entre ellas la MMP-3 (estromelina 1), tienen una especificidad de sustrato mayor que las anteriores y pueden degradar una gran variedad de componentes de la matriz extracelular, como proteoglicanos, colágeno tipo IV, fibronectina y laminina⁶. Más recientemente, se han identificado las denominadas metaloproteinasas de membrana, cuya función es la de activar las MMP liberadas al espacio extracelular, particularmente la MMP-2 y la colagenasa^{3,8,9}. En la tabla I se resumen las MMP mejor conocidas en función de su afinidad por el sustrato.

Estructura molecular de las metaloproteinasas

Todas las MMP tienen una estructura molecular similar: *a*) tienen el dominio propeptídico, cuya función es mantener la latencia de dichas enzimas hasta que se activan por medio de alguna señal bioquímica. De hecho, las MMP se liberan como zimógenos inactivos (proformas) que requieren de un proceso proteolítico para su activación y necesitan, en muchos casos, la participación de plasmina¹⁰, elastasa¹¹ o radicales de oxígeno¹²; *b*) la región catalítica de la enzima (zona por donde se fija el sustrato), que está compuesta por ácido hidroxámico y que requiere la presencia de cinc para su función, y *c*) la región C-terminal, íntimamente implicada en el reconocimiento específico del sustrato (fig. 1).

TABLA I. Clasificación de las metaloproteinasas de matriz (MMP) en función de su afinidad por el sustrato

Familia de MMP	Nombre	Número	Sustrato
Colagenasas	Colagenasa intersticial	MMP-1	Colágeno tipos I, II y III
	Colagenasa neutrofilica	MMP-8	
	Colagenasa 3	MMP-13	
Gelatinasas	Gelatinasa A	MMP-2	Colágeno tipos IV y V
	Gelatinasa B	MMP-9	
Estromelisinias	Estromelisinina 1	MMP-3	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, colágeno
	Estromelisinina 2	MMP-10	
	Matrilisinina	MMP 7	

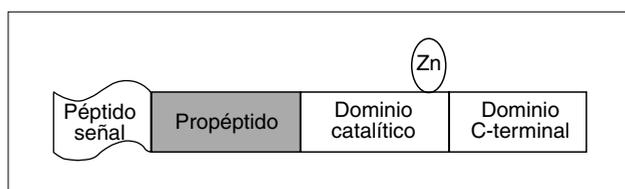


Fig. 1. Estructura molecular de las metaloproteinasas de matriz, donde se puede diferenciar la región C-terminal, el dominio propeptídico y la región catalítica de la enzima, que requiere el cinc para su función.

Inhibidores endógenos de las metaloproteinasas o TIMP

La actividad de las MMP puede regularse en diferentes niveles, pero el principal mecanismo de control es el bloqueo de su actividad enzimática. Éste puede llevarse a cabo por la interacción de las MMP con alguno de sus inhibidores fisiológicos, como la alfa-2-macroglobulina o sus inhibidores endógenos (TIMP). El complejo resultante de la unión de la MMP con su inhibidor es inactivo e incapaz de fijar un sustrato. Los TIMP tienen capacidad para inhibir la actividad de todas las MMP, pero cada uno de ellos muestra una afinidad diferente para cada proteasa. Actualmente se reconocen 4 tipos de TIMP que son capaces de unirse a la región catalítica de la enzima e inhibir su acción⁵. Sin embargo, la vida media de los inhibidores endógenos es muy corta, por lo que no se han utilizado en la práctica clínica.

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

Las MMP son enzimas sintetizadas en los tejidos, por lo que la obtención de muestras en el mismo lugar donde se produce la patología es fundamental para que sea un fiel reflejo de lo que sucede *in vivo*. Las MMP pueden estudiarse a diferentes niveles al tratarse de enzimas proteicas. A continuación se exponen brevemente los métodos diagnósticos utilizados con más frecuencia.

Cimografía

Es una técnica que permite valorar la actividad enzimática de las MMP. Para ello hay que homogeneizar el tejido estudiado, realizar la extracción proteica y poste-

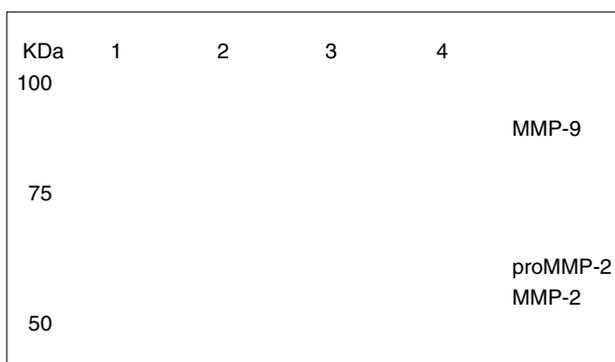


Fig. 2. Cimografía en homogeneizados de tejido colónico de ratones con colitis inducida por dextranosulfato sódico a día 5. La calle 1 corresponde al control positivo con medio de cultivo de células HT-1080 (fibrosarcoma humano); la calle 2, a ratones control sin colitis, y las calles 3 y 4 corresponden a ratones con colitis. Se puede apreciar un aumento de la actividad de las gelatinasas en los ratones con colitis inducida por dextranosulfato sódico. MMP: metaloproteinasa de matriz.

riormente llevar a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida suplementados con gelatina. Las enzimas migrarán en función de su peso molecular y, tras un proceso de revelado especial, su actividad gelatinolítica se visualiza mediante la aparición de una banda en el gel, cuya intensidad dependerá proporcionalmente de su actividad. Dicha banda puede cuantificarse mediante un sistema de lectura informático que permite la comparación entre las muestras¹³ (fig. 2). En muchas ocasiones, los estudios cimográficos van dirigidos a identificar las proformas de las MMP, puesto que con frecuencia las enzimas se degradan muy rápidamente y son difíciles de detectar en el gel.

Western blot

También denominada *immunoblot*, es un método muy fiable para detectar la expresión de un antígeno proteico. Para ello hay que homogeneizar el tejido estudiado, realizar la extracción proteica y posteriormente llevar a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta técnica permite identificar la proteína según su peso molecular basándose en su capacidad de interactuar con un anticuerpo específico. La banda resultante de dicha interacción puede cuantificarse mediante un sistema de lectura informática¹⁴ (fig. 3).

Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La retrotranscripción (RT) de ADN es la reacción enzimática mediante la cual se consigue la transformación de las moléculas de ARN mensajero (ARNm) en su correspondiente forma complementaria de ADN (cADN). El cADN obtenido puede amplificarse a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La RT-PCR es, por tanto, una técnica de amplificación del ARN que permite realizar un análisis cuantitativo eficaz de la expresión génica. Tras la homogeneización del tejido en estudio, se realiza la purificación del ARN mediante el uso de extracción fenólica basada en la mayor solubilidad de los ácidos nucleicos en soluciones acuosas. Así, mientras que los lípidos y las proteínas quedan atrapados en la fase fenólica, la fase acuosa contiene a los polisacáridos y ácidos nucleicos. El ARN purificado de esta fase mediante precipitación con etanol se somete posteriormente a la reacción de RT y luego se amplifica por PCR para ser detectado¹⁵.

Inmunohistoquímica

Es una técnica histológica que permite estudiar la expresión y la localización de una proteína en un determinado tejido. Para ello, es necesario fijarlo en parafina y realizar diferentes secciones en él. Posteriormente se emplearán anticuerpos específicos que se unirán al antígeno proteico, lo que puede observarse mediante microscopía óptica. Sin embargo, no es una técnica muy útil para la cuantificación de la expresión proteica¹⁶.

METALOPROTEINASAS DE MATRIZ Y ENFERMEDADES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

Las MMP y sus inhibidores endógenos se han relacionado con diversas enfermedades del tracto gastrointestinal, tales como el cáncer digestivo, la enfermedad inflamatoria intestinal o la enfermedad celíaca.

Metaloproteinasas de matriz y cáncer digestivo

Después de la transformación neoplásica, son necesarios varios mecanismos celulares y moleculares para que se produzca el rápido crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. Entre ellos destaca la neovascularización del tumor, la rotura de la membrana basal, con la subsecuente invasión de las células tumorales en la estroma, la intravasación en la circulación linfática o sanguínea y la extravasación y crecimiento tumoral a distancia. Se han realizado varios estudios para tratar de identificar los factores genéticos implicados, así como las proteínas responsables de los diferentes cambios fenotípicos. En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre las MMP y los TIMP que participan en diferentes procesos, como la migración celular, el crecimiento fetal y la angiogénesis¹⁷.

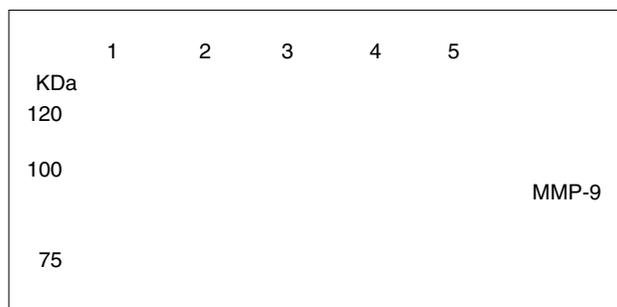


Fig. 3. Western blot con anticuerpos específicos para la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9) en homogeneizados de tejido colónico de ratones con colitis inducida por dextranosulfato sódico a día 5 (calles 3-5) y ratones sin colitis (calles 1 y 2). Se puede apreciar una banda a la altura de 92 kDa correspondiente a la expresión de la MMP-9 en los ratones con colitis.

Sin embargo, un aumento de la síntesis y actividad de las MMP puede dar lugar a la degradación excesiva de los diferentes componentes de la matriz extracelular. De hecho, se cree que las MMP, por rotura de las diferentes barreras fisiológicas tisulares, son enzimas muy importantes en el crecimiento tumoral y en el desarrollo de las metástasis¹⁷. En este sentido, se considera que la degradación de la matriz extracelular que rodea al tumor es un paso fundamental para la invasión de las células neoplásicas, y es la membrana basal, constituida fundamentalmente por colágeno tipo IV, la primera barrera que se opone a esta invasión. Aunque al principio se supuso que las células tumorales eran las únicas productoras de las MMP, posteriormente se ha observado que muchas células del tejido conectivo, incluidos fibroblastos y células inflamatorias, pueden sintetizar y secretar MMP en respuesta a señales enviadas por las propias células tumorales.

Uno de los primeros trabajos publicados en el que se estableció la participación de las MMP en el desarrollo del cáncer lo realizaron Liotta et al¹⁸ a principios de la década de 1980. A partir de la observación de que uno de los primeros pasos para la invasión tumoral era la proteólisis, identificaron una gelatinasa involucrada en la invasión y en el desarrollo de las metástasis del melanoma. Con respecto al tracto gastrointestinal, se han realizado diversos estudios para identificar diferentes MMP en distintos procesos tumorales. En este sentido, se cree que un aumento de la actividad y de la expresión de dichas enzimas puede asociarse con un peor pronóstico de la enfermedad. En un estudio realizado por Sier et al¹⁹, se demostró por cimografía un aumento de la actividad de la MMP-2 en el cáncer gástrico y que dicha actividad estaba relacionada con una disminución de la supervivencia de los pacientes. Más tarde, Murray et al²⁰ confirmaron estos resultados empleando técnicas de *western blot* e inmunohistoquímica. De hecho, la MMP-2 se considera una MMP muy importante para la invasión tumoral, especialmente en la degradación de la membrana basal²¹, tal como se ha puesto de manifiesto en estudios realizados en líneas de cultivos celulares²². Estudios posteriores han demostrado la presencia de otras MMP en el cáncer gástrico asociadas con

la aparición de nódulos linfáticos y la progresión de la enfermedad²³⁻²⁶.

En el cáncer colorrectal también se han realizado múltiples estudios que han demostrado la participación de las MMP en el grado de invasión tumoral y en la supervivencia de los pacientes. Así, Inoue et al²³ demostraron una asociación entre la expresión de la MMP-1 y un peor pronóstico de la enfermedad, mientras que otros autores han encontrado un aumento de la MMP-2, de la MMP-9 y de la MMP-7 en pacientes con cáncer de colon²⁷⁻³³. Además, también hay que tener en cuenta que en lesiones preneoplásicas, como los pólipos colónicos adenomatosos, se ha observado un aumento de las MMP, lo que indicaría que estas enzimas pueden participar en la capacidad de crecimiento, de invasión de la submucosa y de transformación neoplásica de los pólipos adenomatosos^{34,35}.

En el cáncer de esófago, se han realizado pocos estudios hasta el momento, por lo que no conocemos con exactitud el perfil de la expresión de las MMP en dicho tumor, aunque parece que la MMP-7 puede desempeñar un papel importante³⁶⁻³⁸. En el cáncer pancreático también se han identificado diversas MMP^{39,40}, y es uno de los primeros tumores digestivos donde se han ensayado inhibidores sintéticos de estas enzimas.

Por otro lado, polimorfismos genéticos en la región promotora de estas proteínas que producen un aumento de síntesis de las MMP parecen estar relacionados con una mayor agresividad tumoral. Así, el polimorfismo genético 1G/2G de la MMP-1 se ha relacionado con una mayor capacidad metastásica del cáncer colorrectal⁴¹, mientras que el polimorfismo genético C/T de la MMP-2 se ha relacionado con un aumento de la susceptibilidad de presentar un adenocarcinoma de cardias⁴².

Inhibidores sintéticos de las metaloproteinasas

Dado que las MMP pueden desempeñar un papel importante en diversos procesos tumorales, se han desarrollado rápidamente varios agentes terapéuticos específicos capaces de bloquear la actividad de estas enzimas de forma reversible y competitiva.

Datos preclínicos apoyan el empleo de inhibidores de las MMP en el cáncer gástrico y en el cáncer de colon diseminado. El empleo del R-94138, un inhibidor específico de las MMP, redujo de forma significativa el número de nódulos linfáticos metastásicos en un modelo de cáncer gástrico en ratón inducido por la implantación de una línea celular neoplásica⁴³. En otro modelo experimental animal de neoplasia gástrica con metástasis hepáticas, el empleo de un inhibidor selectivo de las MMP, el MMI-166, junto con otros agentes antineoplásicos, redujo de forma significativa el crecimiento y la diseminación tumoral, en comparación con los ratones tratados con monokuimioterapia⁴⁴. Por otro lado, el empleo del batimastato o del MMI-166 en modelos animales de cáncer de colon disminuyó el número de metástasis hepáticas y el grado de carcinomatosis peritoneal en los ratones tratados frente a los controles^{45,46}. Sin embargo, hasta el momento

no disponemos de estudios clínicos en humanos que verifiquen esta hipótesis.

El marimastato, otro inhibidor de las MMP, se ha probado en pacientes con neoplasia de páncreas avanzada, con buena tolerancia y pocos efectos adversos⁴⁷. Sin embargo, en un estudio publicado recientemente el marimastato, administrado oralmente juntamente con gencitabina a pacientes con cáncer pancreático irreseccable, no mostró mejoría en la supervivencia frente al empleo de gencitabina y placebo⁴⁸. Por tanto, hasta el momento actual no existen datos suficientes que apoyen el empleo de los inhibidores de las MMP en pacientes con cáncer de páncreas.

Metaloproteinasas de matriz y enfermedad inflamatoria intestinal

Varias citocinas proinflamatorias, tales como la interleucina 1 y el factor de necrosis tumoral alfa, pueden estimular la síntesis y liberación de las MMP por parte de células del tejido conectivo, como los macrófagos, fibroblastos o leucocitos polimorfonucleares, tal como se ha demostrado en diversas enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide⁴⁹ y la periodontitis⁵⁰. Una de las primeras evidencias en la bibliografía de la participación de las MMP en la enfermedad inflamatoria intestinal fue la aportada por Bailey et al⁵¹. Por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos frente a las MMP observaron que existía un aumento de la expresión de la MMP-9 en las células inflamatorias y de la MMP-1 en las zonas fibróticas en pacientes afectados de enfermedad de Crohn, además de un aumento de la MMP-1 en la lámina propia de los pacientes con colitis ulcerosa. Más tarde, Pender et al⁵² demostraron que la activación de los linfocitos T de la lámina propia de un modelo *in vitro* con tejido intestinal fetal humano mediante *pokeweed mitogen* (PWM) producía una gran lesión tisular, con pérdida de las vellosidades intestinales, así como un aumento de las MMP, fundamentalmente la MMP-3 detectada por cimografía y *western blot*. Asimismo, en este estudio se observó que el daño tisular inducido por el PWM se abolía al añadir un inhibidor de las MMP y que la adición directa de MMP sobre el tejido intestinal producía una lesión tisular dependiente de la dosis similar a la observada con el PWM. Además, en otro trabajo realizado por el mismo grupo⁵³ y en el mismo modelo, se demostró que la estimulación de los linfocitos T mediante PWM se seguía de un notable aumento de las concentraciones del factor de necrosis tumoral alfa, y que el empleo de un anticuerpo antifactor de necrosis tumoral alfa reducía de forma significativa los títulos de MMP y la lesión tisular intestinal.

Recientemente se han publicado diversos estudios que demuestran la presencia de concentraciones elevadas de MMP en zonas intestinales inflamadas, en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Así, Baugh et al⁵⁴ encontraron un aumento de la actividad y de la expresión de la MMP-9 y de la MMP-2 mediante cimografía y *western blot*, respectivamente, en pacientes con enfermedad de

Crohn y colitis ulcerosa, siendo la MMP-9 la enzima más sobreexpresada en el tejido inflamatorio. Von Lampe et al⁵⁵ también demostraron una importante sobreexpresión de MMP-1 y MMP-3 mediante PCR en tejido colónico inflamado en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal frente a sujetos sanos. Heuschkel et al⁵⁶ encontraron una sobreexpresión de la MMP-3 en niños con enfermedad inflamatoria intestinal mediante RT-PCR cuantitativa y *western blot*, mientras que el TIMP-1 permanecía inalterado. Además, en pacientes con pouchitis se ha observado un aumento de la concentración de la MMP-1 y MMP-2 mediante enzimoanálisis, *western* y *northern blot*, y que el tratamiento médico con metronidazol durante 6 semanas reduce de forma significativa los valores de ambas enzimas y produce una mejoría clínica e histológica⁵⁷.

Asimismo se ha demostrado un aumento de la actividad y de la expresión de las MMP en diversos modelos animales experimentales con colitis. Tarlton et al⁵⁸ encontraron un aumento de la actividad y de la expresión de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) mediante cimoografía e inmunohistoquímica en el tejido lesionado en un modelo de colitis transmural inducido en ratones inmunodeficientes. Posteriormente, en un modelo de colitis distal en ratas inducido por dextranosulfato sódico, también se observó un aumento de la actividad y de la expresión de la MMP-9 mediante cimoografía y *western blot*⁵⁹. En este último modelo, el empleo de un inhibidor de las MMP, el CGS 27023 A, redujo de forma significativa el grado de lesión histológica. Además, se han publicado otros estudios en modelos experimentales de colitis donde el empleo de inhibidores de las MMP ha tenido un efecto terapéutico beneficioso^{60,61}.

Otras enfermedades digestivas

La activación de los linfocitos T de la lámina propia de la mucosa intestinal produce una destrucción importante de las vellosidades mediada por la activación de las MMP⁵². Por este motivo, se han estudiado las MMP en otras enfermedades digestivas donde los linfocitos T pueden desempeñar un papel importante. Tal es el caso de la enfermedad celíaca. Así, Daum et al⁶² demostraron un aumento de la expresión de la MMP-1 y de la MMP-3 mediante hibridación *in situ* en fibroblastos y macrófagos subepiteliales de biopsias de pacientes con enfermedad celíaca, junto con una disminución del colágeno tipo I, lo que indicaría que la degradación de la matriz extracelular puede ser un mecanismo muy importante de lesión tisular en esta enfermedad.

Además, se han estudiado la actividad y la expresión de las MMP en otras enfermedades inflamatorias intestinales, ya que las citocinas proinflamatorias pueden ser potentes inductores de la síntesis de MMP. Tal es el caso de la proctitis actínica, donde se ha observado mediante cimoografía e inmunohistoquímica un aumento de la MMP-9 y de la MMP-2 a las 2 y 6 semanas posradioterapia como tratamiento del cáncer de próstata⁶³.

CONCLUSIÓN

Las MMP son enzimas capaces de degradar la matriz extracelular del tejido conectivo, por lo que un aumento de su actividad puede dar lugar a la destrucción tisular en diferentes procesos patológicos digestivos. Por tanto, sería razonable pensar en la utilización de inhibidores sintéticos de estas enzimas para tratar de reducir la lesión del tejido o, en el caso de procesos neoplásicos, para intentar disminuir la capacidad de invasión de las células tumorales. Datos preclínicos en modelos animales experimentales apuntan a un efecto beneficioso de los inhibidores sintéticos de las MMP; sin embargo, hasta el momento actual son pocos los estudios realizados en humanos y ofrecen datos poco prometedores. Por tanto, hacen falta más estudios para determinar el efecto terapéutico de los inhibidores de las MMP en las enfermedades gastrointestinales en las que su implicación se ha visto ampliamente demostrada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Woessner FJR. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145-54.
2. Woessner FJR. Literature on vertebrate matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Matrix* 1991;1(Suppl 1):425-501.
3. Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bio-Essays* 1992;14:455-63.
4. Nagase H, Barrett AJ, Woessner JR. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix* 1992;1(Suppl 1):421-4.
5. Woessner FJR. The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732:11-21.
6. Borkakoti N. Matrix metalloproteinases: variations on a theme. *Prog Biophys Mol Biol* 1998;70:73-94.
7. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Bio Med* 1993;4:197-250.
8. Kinoh H, Sato H, Tsunozuka Y, Takino T, Kawashima A, Okada Y, et al. MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis. *J Cell Sci* 1996;109:953-9.
9. Knauper V, Will H, López-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, et al. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation: evidence that MT1-MMP and gelatinase A are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996;271:17124-31.
10. Baramova EN, Bajou K, Remacle A, L'Hoir C, Krell HW, Weidle UH, et al. Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Lett* 1997;405:157-62.
11. Vissers MC, Winterbourn CC. Activation of human neutrophil gelatinase by endogenous serine proteases. *Biochem J* 1988;249:327-31.
12. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foams cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases *in vitro*: implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996;98:2572-9.
13. Heussen C, Dowle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecylsulfate and copolymerized substrate. *Anal Biochem* 1980;102:196-202.
14. Sawicki G, Salas E, Murat J, Mistza-Lane H, Radomski MW. Release of gelatinase B during platelet activation mediates aggregation. *Nature* 1997;386:616-9.
15. Jin CF, Mata M, Fink DJ. Rapid construction of deleted DNA fragments for use as internal standards in competitive PCR. *PCR Methods Appl* 1994;3:252-5.

16. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984;32:219-29.
17. Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of metalloproteinases and their inhibitors in tumor, metastasis, and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994;7:2062-72.
18. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980;284:67-8.
19. Sier CF, 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.
20. Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut* 1998;43:791-7.
21. Tryggvason K, Hoyhta M, Pyke M. Type IV collagenases in invasive tumors. *Breat Cancer Res Treat* 1993;24:209-18.
22. Schwartz G, Wang H, Lampen N, Altorki N, Kelsen D, Albino AP. Defining the invasive phenotype of proximal gastric cells. *Cancer* 1994;56:500-5.
23. Inoue T, Yashiro M, Nishimura S, Maeda K, Sawada T, Ogawa Y, et al. Matrix metalloproteinase-1 expression is a prognostic factor for patients with advanced gastric cancer. *Int J Mol Med* 1999;4:73-7.
24. Ajsaka H, Fushida S, Yonemura Y, Miwa K. Expression of insulin-like growth factor-2, c-MET, matrix metalloproteinase-7 and MUC-1 in primary lesions and lymph node metastatic lesions of gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1788-92.
25. Del Casar Lizcano JM, Vizoso Pineiro F, González-Sánchez LO, Martín Suárez A, Gava R, Cuesta Fernández E, et al. Expresión y significado clínico de la colagenasa-3 (MMP-13) en el cáncer gástrico. *Gastroenterol Hepatol* 2003;26:1-7.
26. Elnemr A, Yonemura Y, Bandou E, Kinoshita K, Kawamura T, Takahashi S, et al. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in human gastric cancer. *Gastric Cancer* 2003; 6:30-8.
27. Roeb E, Dietrich CG, Winograd R, Arnd M, Breuer B, Fass J, et al. Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinase-9. *Cancer* 2001;92:2680-91.
28. Waas ET, Lomme RM, DeGroot J, Wobbes T, Hendriks T. Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002;86:1876-83.
29. Behrens P, Mathiak M, Mangold E, Kirdorf S, Wellmann A, Fogt F, et al. Stromal expression of invasion-promoting, matrix-degrading proteases MMP-1 and -9 and the Ets 1 transcription factor in HNPCC carcinomas and sporadic colorectal cancers. *Int J Cancer* 2003;107:183-8.
30. Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift SI, Abulafi AM. Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2003;107:541-50.
31. Ougolkov AV, Yamashita K, Mai M, Minamoto T. Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer. *Gastroenterology* 2002;122:60-71.
32. Horiuchi S, Yamamoto H, Min Y, Adachi Y, Itoh F, Imai K. Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol* 2003; 200:568-76.
33. Rivat C, Le Floch N, Sabbah N. Synergistic cooperation between the AP-1 and LEF-1 transcription factors in activation of the matrilysin promoter by the src oncogene: implications in cellular invasion. *FASEB J* 2003;17:1721-3.
34. Tomita T, Iwata K. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in colonic adenomas-adenocarcinomas. *Dis Colon Rectum* 1996;39:1255-64.
35. Yantiss RK, Bosenberg MW, Antonioli DA, Ozde RD. Utility of MMP-1, p53, E-cadherin, and collagen IV immunohistochemical stains in the differential diagnosis of adenomas with misplaced epithelium versus adenomas with invasive adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2002;26:206-15.
36. Yamashita K, Mori M, Shiraishi T, Shibuta K, Sugimachi K. Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 expression in esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:1169-74.
37. Ohashi K, Nemoto T, Nakamura K, Nemori R. Increased expression of matrix metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* 2000;88:2201-9.
38. Salmela MT, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Saarialho-Kere U. Upregulation and differential expression of matrilysin (MMP-7) and metalloelastase (MMP-12) and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-3 in Barrett's oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2001;85:383-92.
39. Maatta M, Sioni Y, Liakka A, Autio-Harmanen H. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and membrane type 1-MMP in hepatocellular and pancreatic adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical prognosis. *Clin Cancer Res* 2000;6:2726-34.
40. Crawford HC, Scoggins CR, Washington MK, Matrisian LM, Leach SD. Matrix metalloproteinase-7 is expressed by pancreatic cancer precursors and regulates acinar-to-ductal metaplasia in exocrine pancreas. *J Clin Invest* 2002;109:1437-44.
41. Ghilardi G, Biondi ML, Mangoni J, Leviti S, DeMonti M, Guagnellini E, et al. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasiveness. *Clin Cancer Res* 2001;7:2344-6.
42. Miao X, Yu C, Tan W, Xiong P, Liang G, Lu W, et al. A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (-1306C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res* 2003;63:3987-90.
43. Matsuoka T, Yashiro M, Sawada T, Ishikawa T, Ohira M, Hirakawa K. Effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on a lymph node metastatic model of gastric cancer cells passaged by orthotopic implantation. *J Exp Clin Cancer Res* 2001;20:213-8.
44. Maki H, Hojo K, Tanaka H, Sawada TY, Maekawa R, Yoshioaka T. Augmented anti-metastatic efficacy of a selective matrix metalloproteinase inhibitor, MMI-166, in combination with CPT-11. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:519-26.
45. Aparicio T, Kermorgant S, Dessirier V, Lewin MJ, Lehy T. Matrix metalloproteinase inhibition prevents colon cancer peritoneal carcinomatosis development and prolongs survival in rats. *Carcinogenesis* 1999;20:1445-51.
46. Oba K, Konno H, Tanaka T, Baba M, Kamiya K, Ohta M, et al. Prevention of liver metastasis of human colon cancer by selective matrix metalloproteinase inhibitor MMI-166. *Cancer Lett* 2002;175:45-51.
47. Rosemurgy A, Harris J, Langleben A, Casper E, Goode S, Rasmussen H. Marimastat in patients with advanced pancreatic cancer: a dose-finding study. *Am J Clin Oncol* 1999;22:247-52.
48. Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, Brown PD, Baillet M, Buckels JA. A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2002;87:161-7.
49. Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV, Murphy G, Reynolds JJ. Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1: evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J Periodontol Res* 1989;24:207-13.
50. Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic disease: inversion of paradigm. *N Periodontol* 1998; 3:108-20.
51. Bailey CJ, Hembry RM, Alexander A, Irving MH, Grant ME, Shuttleworth CA. Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine. *J Clin Pathol* 1994;47:113-6.
52. Pender S, Tickle S, Docherty A, Howie D, Wathen NC, MacDonald TT. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* 1997;158:1582-90.
53. Pender S, Fell J, Chamow SM, Ashkenazi A, MacDonald TT. A p55 TNF receptor immunoadhesin prevents T cell-mediated intestinal injury by inhibiting matrix metalloproteinases production. *J Immunol* 1998;160:4098-103.
54. Baugh M, Pery M, Hollander A, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, et al. Matrix metalloproteinases levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999;117:814-22.

55. Von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;47:63-73.
56. Heuschkel RB, MacDonald TT, Monteleone G, Bajaj-Elliott M, Smith JA, Pender SL. Imbalance of stromelysin 1 and TIMP 1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;47:57-62.
57. Stallmach A, Chan CC, Ecker K-W, Feifel G, Herbst H, Schuppan D, et al. Comparable expression of matrix metalloproteinases 1 and 2 in pouchitis and ulcerative colitis. *Gut* 2000;47:415-22.
58. Tarlton JF, Whiting CV, Tunmore D, Bregenholt S, Reimann J, Claesson MH, et al. The role of up-regulated serine proteases and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of a murine model of colitis. *Am J Pathol* 2000;157:1927-35.
59. Medina C, Videla S, Radomski A, Radomski MW, Antolin M, Guarner F, et al. Increased activity and expression of matrix metalloproteinase-9 in a rat model of distal colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G116-G22.
60. Medina C, Videla S, Radomski A, Radomski MW, Antolin M, Guarner F, et al. Therapeutic effect of phenantrolin in two rat models of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1314-9.
61. Sykes AP, Bhogal R, Brampton C, Chander C, Whelan C, Parsons ME, et al. The effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on colonic inflammation in a trinitrobenzenesulphonic acid rat model of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1535-42.
62. Daum S, Bauer U, Foss HD, Wahnschaffe U, Schuppan D, Stein H, et al. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut* 1999;44:17-25.
63. Hovdenak N, Wang J, Sung CC, Kelly T, Fajardo LF, Hauer-Jensen M. Clinical significance of increased gelatinolytic activity in the rectal mucosa during external beam radiation therapy of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53:919-27.