Expressão das metaloproteinases 2 e 9 em adenocarcinoma colorretal

Metaloproteinases 2 and 9 expression in colorectal adenocarcinoma

CARLOS ROBERTO FELIN – Especialista. Médico do Hospital da Brigada Militar de Santa Maria e do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS.
ADRIANA BRONDANI DA ROCHA – Doutorado. Professora Orientadora do Programa de Pós Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil e do Programa de Pós Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular, Universidade Luterana do Brasil – Canoas – RS – Brasil.
IZABELLA PAZ DANEZI FELIN – Especialista. Professora do Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria – RS.
IVANA GRIVICICH – Doutorado. Professora Orientadora do Programa de Pós Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil e do Programa de Pós Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular, Universidade Luterana do Brasil – Canoas – RS – Brasil.

Laboratório de Marcadores de Estresse Celular, Centro de Pesquisas em Ciências Médicas, Universidade Luterana do Brasil.

✉ Endereço para correspondência:
Ivana Grivicich
Av. Farroupilha, 8001 – Prédio 22 – 5º andar
92245-900 – Canoas, RS – Brasil
☎ (51) 3477-9219
grivicich@terra.com.br

RESUMO

Introdução: Os carcinomas da região colorretal representam o terceiro tipo mais comum de neoplasia maligna e a terceira causa de mortalidade relacionada ao câncer no mundo. **Objetivos:** Este estudo teve como objetivo verificar se existe associação entre estadiamento, invasão vascular, tamanho do tumor, classificações Duke's, Astler-Coller, grau de diferenciação tumoral e expressão das metaloproteinases 2 e 9 em células de adenocarcinoma intestinal. **Métodos:** Foi realizado um estudo retrospectivo de 40 blocos de parafina contendo amostras obtidas de ressecção cirúrgica de tecido intestinal anteriormente diagnosticado como adenocarcinoma de intestino humano. O material foi coletado no período entre 1998 e 2003 no Hospital Universitário de Santa Maria, RS, Brasil. Como controle, foram utilizadas amostras fígado humano para MMP-9 e células deciduais normais para MMP2. Foi realizada a técnica de imunohistoquímica e sistema de amplificação por polímero não biotinilado Novolink (Novocastra, New Castle Upon Tyne, Inglaterra) para avaliar as metaloproteinases 2 e 9, por percentual de células neoplásicas coradas, semi-quantitativamente, considerando-se expressão citoplasmática. **Resultados:** Realizada análise estatística através do teste exato de Fisher, com nível de significância de 0,05, os testes não evidenciaram associação significativa para nenhuma das aplicações feitas. **Conclusões:** Os achados sugerem que não existe associação entre a expressão das metaloproteinases 2 e 9 com as variáveis deste estudo, sendo necessário estudos futuros.

UNITERMOS: Carcinoma colorretal; invasão; metaloproteinases 2 e 9; MMP-2; MMP-9; imunohistoquímica.

ABSTRACT

Introduction: *Colorectal carcinomas are the third most common type of malignant neoplasia and the third leading cancer-related cause of death worldwide.* ***Aims:*** *This study aimed at determining if there is an association between staging, vascular invasion, tumor size, Duke and Astler-Coller classifications, tumor differentiation grade, and metalloproteinase 2 and 9 in intestinal adenocarcinoma.* ***Methods:*** *A retrospective study was carried out of 40 paraffin blocks containing samples from surgical resections of intestinal tissue previously diagnosed as colon adenocarcinoma. The material was collected from 1998 to 2003 in the School Hospital of Santa Maria, RS, Brazil. Human liver extracts for MMP9 and normal decidual cells for MMP2 were used as controls. Immunohistochemistry and non-tinylated polymer amplification system Novolink (Novocastra, New Castle Upon Tyne, England) were performed to evaluate metalloproteinases 2 and 9 by percentage of stained cytoplasmic neoplastic cells, semi-quantitatively, and considering the cytoplasmic expression.* ***Results:*** *In the statistical analysis, the Fisher's exact test was used with a level of significance of 0.05, which did not show any significant association for any of the applications done.* ***Conclusions:*** *The findings show that there is no association of metalloproteinases 2 and 9 expression with the variables studied here.*

KEYWORDS: *Colorectal Adenocarcinoma, Invasion, Metalloproteinases 2 and 9, MMP2, MMP9, Immunohistochemistry.*

INTRODUÇÃO

O carcinoma colorretal (CCR) é uma das neoplasias malignas de maior importância, tanto por sua prevalência como por sua incidência, correspondendo à terceira causa de morte por câncer tanto em homens, quanto em mulheres (1). A taxa de sobrevivência de pacientes com CCR aumentou consideravelmente com os avanços na prevenção, detecção precoce e novas terapias do câncer ao contrário da taxa de incidência que não sofreu mudanças significativas nos últimos anos (2, 3).

O diagnóstico do CCR é confirmado pela endoscopia, seguida de biópsia e exame histopatológico, no qual são avaliados critérios considerados prognósticos, dentre eles o estadiamento, a invasão local, invasão vascular, a graduação específica, segundo Duke's e Astler-Coller e o grau de diferenciação tumoral (4, 5, 6, 7).

O CCR pode ser dividido em dois grandes grupos: o esporádico (80% dos casos) e o familiar (20% dos casos), onde é possível identificar duas vias de carcinogênese, a via de instabilida-

Recebido: 1/9/2008 – Aprovado: 2/10/2008

11-251-f.pmd 291 18/12/2008, 15:40

de cromossômica e a via de hipermutabilidade do DNA (8,9,10). Tumores com instabilidade cromossômica ocorrem na polipose adenomatosa familiar (PAF), caracterizada pela herança de uma mutação do gene supressor tumoral *APC* (polipose adenomatosa colônica). A via de hipermutabilidade do DNA, ocorre no câncer colorretal hereditário não poliposo (HNPCC) em que a alteração genética herdada é a inativação de um dos alelos dos genes envolvidos no reparo do DNA (*hMSH2* e *hMLH1*). Entretanto, outros genes também estão envolvidos na carcinogênese colorretal, como o *k-ras*, o *DCC* e o *Tp53* (11,12,13). Mais recentemente, alterações nas metaloproteinases (MMPs) foram associadas com o desenvolvimento de pólipos no intestino (característica associada a PAF) (14). Porém, a associação entre as alterações nas MMPs, desenvolvimento de pólipos e progressão do câncer de intestino ainda não é bem compreendida.

A invasão tumoral, que envolve a degradação da membrana basal é outro fator importantíssimo no prognóstico das neoplasias colorretais, já que está relacionada ao crescimento e a progressão do câncer, angiogênese e aparecimento de metástases (15). Neste sentido, a detecção da expressão das MMPs, moléculas efetoras da degradação de elementos da membrana basal, torna-se de grande importância. Alterações nas MMPs têm sido relacionadas com alto grau de malignidade, agressividade tumoral, maior capacidade de invasão, progressão da doença, metástase e prognóstico desfavorável em vários sítios tumorais (16,17).

Até o momento duas MMPs foram associadas ao CCR. A MMP-2 (gelatinase A), relacionada com a degradação do colágeno tipo IV, é superexpressa no câncer colorretal (18). Zeng *et al*. demonstraram um maior nível de RNAm da MMP-9 (gelatinase B) no carcinoma colorretal quando comparado com a mucosa intestinal normal (19). A expressão das MMPs no câncer de intestino está diretamente associada com a carcinogênese, progressão, invasão e metástases (20,21).

O prognóstico, acompanhamento e controle do CCR pode ser traçado com a detecção de alguns marcadores moleculares que, graças aos avanços da biologia molecular, têm permitido melhor compreensão dos mecanismos da carcinogênese colorretal (22). Atualmente, a elucidação da patogênese molecular do CCR vem merecendo atenção especial, já que diversas mutações nas células tumorais foram identificadas como responsáveis pela perda do controle na proliferação, diferenciação, apoptose e reparo do DNA, resultando em acúmulo de instabilidades genéticas e no câncer, como também em alterações moleculares detectáveis por imunohistoquímica (23, 24, 25).

Neste estudo, avaliamos a associação entre a expressão da MMP-2 e MMP-9 e estadiamento, invasão vascular, classificações Duke's e Astler-Coller e com grau de diferenciação tumoral no carcinoma colorretal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção de casos

Foram escolhidos blocos de parafina (n=40) contendo produtos de ressecção cirúrgica por hemicolectomia, anteriormente diagnosticados, como adenocarcinoma de Intestino. Os blocos foram provenientes do arquivo do Serviço de Patologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), RS, Brasil, referentes aos exames histopatológicos rotineiros realizados no período entre 1998 e 2003.

Como critério de inclusão, foi considerado a existência e a conservação de todos os blocos de parafina referentes a cada caso no período destinado ao estudo. Os critérios de exclusão foram a má conservação dos blocos de parafina, arquivo incompleto, dúvidas diagnósticas, outros diagnósticos, produtos de biópsias e casos fora do período do estudo.

O protocolo experimental desenvolvido neste estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e Animais da ULBRA (protocolo CEP-ULBRA 2006-256H).

Processamento histológico

Foram obtidos de todos os blocos cortes histológicos com 4µm de espessura, montados em lâminas histológicas tratadas com silano (4%) e coradas com hematoxilina e eosina para reavaliação histopatológica. A revisão histopatológica, em todos os casos, foi realizada por dois patologistas experientes, de forma independente, sem identificação dos casos. Eventuais resultados conflitantes foram discutidos pelos mesmos para definição consensual da análise.

Foram realizados graduação, estadiamento pTNM e caracterização de itens relativos ao preenchimento de um instrumento recomendado para adenocarcinoma colorretal (26) adotado pelo Serviço de Patologia do HUSM.

Imunohistoquímica

A partir dos blocos de parafina, foram obtidos cortes de 3µm, que foram montados sobre lâminas revestidas e submetidos à desparafinação e hidratação através de banhos seqüenciais de xilol e álcool etílico. Atividade de peroxidase endógena foi bloqueada através de banho com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em PBS por 10 minutos. Recuperação antigênica foi realizada através de calor úmido em vaporizador por 60 minutos, utilizando tampão de ácido cítrico a 0,21% em pH de 6.

Os cortes histológicos foram posteriormente incubados com os anticorpos primários pelo período de 8-12 h em temperatura ambiente. Foram utilizados os anticorpos Anti-MMP-2 (clone 17B11) e Anti-MMP-9 (clone 15W2), ambos da Novocastra (*New Castle Upon Tyne*, Inglaterra) ambos com diluição de 1:400. Após a incubação com esses anticorpos, foi aplicado o sistema de amplificação por polímero não biotinilado Novolink (Novocastra, *New Castle Upon Tyne*, Inglaterra) por 60 minutos à temperatura ambiente. A visualização da reação foi possível utilizando-se como cromógeno a diaminobenzidina (DAB) e con-

11-251-f.pmd 292 18/12/2008, 15:40

tra coloração com Hematoxilina de Harris por 5 minutos em cada uma dessas etapas. Foram usados como controle para MMP2 células deciduais normais e para MMP-9 fígado humano normal.

Análise imunohistoquímica

As imunorreações foram visualizadas sob microscópio óptico Olympus CX31, estimando-se o percentual de células positivas de forma semi-quantitativa em menor aumento (40x). Foi analisado o percentual de células neoplásicas coradas, considerando-se apenas expressão citoplasmática. Os casos foram tabulados utilizando-se os critérios abaixo (27):

0 – Negativa: <5% de células

1 – Positividade fraca: 5-20% das células

2 – Positividade moderada: 21-50% das células

3 – Positividade forte: >50%

Análise estatística

Para verificar a existência de associação entre a MMP-9 e as variáveis invasão local, invasão vascular, estadiamento tumoral, grau de diferenciação e classificações Duke's e Astler-Coller foi usado o Teste Exato de Fisher. Para aplicar o teste, os níveis 0 e + 1 foram analisados em conjunto enquanto que o nível 2 da MMP-9 foi analisado isoladamente, já que não houve nenhum caso nível 3. Também foi considerado os valores extremos de cada variável. Para a variável diferenciação tumoral foi usado moderadamente diferenciado e bem diferenciado; para invasão local foi usado pT2 e pT4; para estadiamento foram usados graus l e lll C; para invasão vascular foram considerados os critérios positivo e negativo; para a classificação de Duke's foi usado A e C e para a classificação Astler-Coller B1 e C2. Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 0,05 e os cálculos foram executados com o programa SPSS versão 14.0.

A análise estatística para a associação entre MMP-2 e as variáveis selecionadas para o estudo, foram impossibilitados de ser realizados pela baixa freqüência da expressão da MMP-2.

RESULTADOS

Caracterização da amostra

Foram estudados 40 casos de adenocarcinoma de intestino, 28 (70%) em mulheres e 12 (30%) em homens, com idade média de 61 anos. Com relação à localização do tumor houve predomínio do cólon descendente (n=38; 95%). A maioria dos tumores foi classificada como adenocarcinoma moderadamente (n=26; 65%) ou bem diferenciados (n=23; 32,50%). Em 75% da amostra a avaliação da invasão vascular foi negativa; e 92,50% dos casos não apresentaram invasão perineural (Tabela 1).

Em relação ao estadiamento tumoral os resultados apontam predomínio dos estágios III C em 11 casos (27,50%) e IIA em 8 casos (20%) (Tabela 1). A classificação de Duke's evidenciou predominância da amostra nos estádios Duke's C e B; sendo 18 casos (45%) Duke's C e 12 casos (30%) Duke's B (Tabela 1). A classificação de Astler-Coller mostrou predominância nos estádios Astler-CollerC2 em 15 casos (37,50%) e Astler-CollerB2 em 12 casos (30%) (Tabela 1).

Associação da expressão imunohistoquímica das MMPs com invasão vascular, diferenciação tumoral, invasão local, estadiamento e classificações Duke's e Astler-Coller

A realização da análise estatística dos resultados obtidos só foi possível em relação à MMP-9, já que foi obtida baixa freqüência em relação à MMP-2, impossibilitando os testes estatísticos. A tabela 2 mostra os níveis de significância obtidos neste estudo, o qual através do teste exato de Fisher não demonstrou associação para nenhuma das aplicações realizadas.

Quanto à invasão vascular, foram estudados 40 casos. Destes, 30 (75%) foram invasão vascular negativa e 10 (25%) invasão vascular positiva. Dos casos de invasão vascular negativa, 26 (65%) tiveram expressão de MMP-9 nível 0 ou 1 e 4 (10%) MMP-9 grau 2 (nenhum caso 3). Em relação aos casos de invasão vascular positiva, todos os casos demonstraram imunorreatividade para a MMP-9 moderada (grau 2) (Tabela 3).

Para os outros critérios, foram utilizados os dois extremos de cada variável, assim de um total de 40 casos estudados (n=40), foram considerados o número de casos de cada extremo em relação à cada critério. Desta forma, em relação a diferenciação tumoral, 39 casos foram avaliados, correspondendo 26 (66,6%) ao extremo moderadamente diferenciado e 13 (33,4%) ao extremo bem diferenciado, já que os pobremente diferenciados tiveram baixa freqüência (Tabela 4). Foram utilizados 15 casos em relação a invasão local, correspondendo à 10 (66,7%) casos pT2 e 5 (33,3%) casos pT4, já que os pT1 tiveram baixa freqüência (Tabela 5). Quanto ao estadiamento, foram utilizados 18 casos, sendo 7 (38,9%) estádio l e 11 (61,1%) estádio lll C (Tabela 6). Em relação a classificação Duke's foram utilizados 25 casos referentes aos extremos Duke's A e C, onde respectivamente foram encontrados 7 (28,0%) casos e 18 (72,0%) casos (Tabela 7); enquanto que em relação a classificação Astler-Coller foram utilizados 22 casos referentes aos extremos Astler-Coller B1 (7; 31,8%) e C1 (14; 63,7%) (Tabela 8).

Dos 26 (66,6%) casos moderadamente diferenciados, 23 (58,9%) demonstraram MMP-9 (0 ou 1) e 3 (7,7%) MMP-9 (2 ou 3). Enquanto que entre os 13 (33,4%) casos bem diferenciados, 12 (30,8%) foram MMP-9 0 ou 1 e 1 caso (2,6%) MMP-9 2 ou 3. No cruzamento entre MMP-9 versus diferenciação tumoral, 35 casos (89,7%) foram MMP-9 níveis (0 ou 1), enquanto que 4 (10,3%) foram MMP-9 nível 2 e nenhum caso nível 3 (Tabela 4).

11-251-f.pmd 293 18/12/2008, 15:40

Tabela 1 – Características gerais das amostras de carcinoma colorretal

Característica		Nº casos
Sexo	Masculino	12
	Feminino	28
Idade	< 50	7
	51-60	8
	61-70	11
	71-80	11
	>80	3
Localização do Tumor		
	Ângulo Hepático	1
	Cólon Descendente	38
	Cólon Ascendente	1
Grau de Diferenciação		
	Bem Diferenciado	13
	Moderadamente Diferenciado	26
	Pouco Diferenciado	1
Invasão Vascular		
	Presente	10
	Ausente	30
Invasão Perineural		
	Presente	3
	Ausente	37
Estadiamento		
	I	7
	IIA	8
	IIB	4
	IIIA	2
	IIIB	5
	III C	11
	IV	3
Classificação de Duke's		
	A	7
	B	12
	C	18
	D	3
Classificação de Astler-Coller		
	B1	7
	B2	12
	C1	3
	C2	15
	D	3

Tabela 2 – Reatividade imunohistoquímica da MMP-9 nas amostras de carcinoma colorretal

Comparação	Nº de casos	Nível de significância
MMP-9 versus Invasão Vascular	40	0,556
MMP-9 versus diferenciação	39	1,000
MMP-9 versus pT	15	0,505
MMP-9 versus estadiamento	18	0,245
MMP-9 versus Duke's	25	0,053
MMP-9 versus Astler-Coller	22	0,077
Não existe associação significativa (p<0,05)		

Dos 10 (66,7%) casos de invasão local pT2, 7 (46,7%) foram MMP-9 (0 ou 1) e 3 (20,0%) MMP-9 2, nenhum caso 3. Dos 5 (33,3%) casos pT4, todos MMP-9 (0 ou 1). Observando a relação entre MMP-9 e invasão local (pT), vê-se que 12 (80,0%) foram MMP-9 níveis (0 ou 1), enquanto que, 3 (20,0%) foram MMP-9 níveis 2 e nenhum caso 3 (Tabela 5).

Entre os 7 (38,9%) casos estádio l, 4 (22,2%) foram MMP-9 (0 ou 1) e 3 (16,7%) MMP-9 (2 ou 3). Já, entre os 11 (61,1%) casos estádio lll C, 10 (55,5%) foram MMP-9 (0 ou 1) e 1 (5,6%) MMP-9 2. Confrontando MMP-9 versus estadiamento, 14 (77,7%) foram níveis (0 ou 1), enquanto que 4 (22,3%) foram nível 2 (Tabela 6).

Entre os 7 (28,0%) casos classificados com Duke's A, 4 (16,0%) foram MMP-9 (0 ou 1) e 3 (12,0%) MMP-9 2. Em relação aos 18 (72,0%) casos Duke's C, 17 (68,0%) foram MMP-9 (0 ou 1) e 1 (4,0%) foi MMP-9 2. Na relação entre MMP-9 e classificação Duke's, observou-se que 21 (84,0%) dos casos foram MMP-9 níveis (0 ou 1), enquanto que, 3 (16,0%) casos foram nível 2 nenhum caso nível 3 (Tabela 7).

A avaliação dos casos referente a classificação de Astler-Coller, 7 (31,8%) foram referentes ao estádio B1. Entre estes, 4 (18,2%) foram MMP-9 (0 ou 1) e 3 (13,6%) MMP-9 2. Já nos casos classificados como estádio C2, 14 (63,7%) foram MMP-9 (0 ou 1) e 1 (4,5%) foi MMP-9 2. Na associação MMP-9 e Astler-Coller, 18 (81,9%) foram nível 0 ou 1, enquanto que 4 casos (18,1%) foram nível 2, nenhum caso nível 3 (Tabela 8).

DISCUSSÃO

O câncer de intestino tem alta prevalência e incidência e é responsável por um grande número de mortes por câncer (1). O conhecimento da carcinogênese intestinal possibilitou a detecção de marcadores moleculares associados ao prognóstico das neoplasias intestinais (15, 22). Sabemos hoje que, para que uma célula evolua de seu estado normal até assumir as características de uma célula neoplásica, é necessária a ocorrência de uma série de mutações, envolvendo genes que expressem proteínas cuja ação esteja re-

11-251-f.pmd 294 18/12/2008, 15:40

Tabela 3 – Associação entre MMP-9 e invasão vascular

	Invasão vascular negativa	Invasão vascular positiva	Total
MMP-9 (0 ou 1)	26 (65,0%)	10 (25,0%)	36 (90,04%)
MMP-9 (2 – nenhum caso 3)	4 (10,0%)	0 (0,0%)	4 (10,0%)
Total	30 75,0%)	10 (25,0%)	4 (0,0%)

Tabela 4 – Associação entre MMP-9 e diferenciação tumoral

	Moderadamente diferenciado	Bem diferenciado	Total
MMP-9 (0 ou 1)	23 (58,9%)	12 (30,8%)	35 (89,7%)
MMP-9 (2-nenhum caso 3)	3 (7,7%)	1 (2,6%)	4 (10,3%)
Total	26 (66,6%)	13 (33,4%)	39 (97,5%)

Tabela 5 – Associação entre MMP-9 e invasão local

	Invasão local pT2	Invasão local pT4	Total
MMP-9 (0 ou 1)	7 (46,7%)	5 (33,3%)	12 (80,0%)
MMP-9 (2-nenhum caso 3)	3 (20,0%)	0 (0,0%)	3 (20,0%)
Total	10 (66,7%)	5 (33,3%)	15

Tabela 6 – Associação entre MMP-9 e estadiamento

	Estadiamento I	Estadiamento III C	Total
MMP-9 (0 ou 1)	4 (22,2%)	10 (55,5%)	14 (77,7%)
MMP-9 (2 –nenhum caso 3)	3 (16,7%)	1 (5,6%)	4 (22,3%)
Total	7 (38,9%)	11 (61,1%)	18

Tabela 7 – Associação entre MMP-9 e Classificação de Duke's

	Duke's A	Duke's C	Total
MMP-9 (0 ou 1)	4 (16,0%)	17 (68,0%)	21 (84,0%)
MMP-9 (2 –nenhum caso 3)	3 (12,%)	1 (4,0%)	3 (16,0%)
Total	7 (28,0%)	18 (72,0%)	25

lacionada ao controle do ciclo celular e que podem ter papel importante como marcadores prognósticos (8, 9).

No presente trabalho, avaliamos o potencial uso destes marcadores como ferramenta diagnóstica. A população estudada tinha entre 61 a 80 anos, com idade média 61,8 anos, que está de acordo com o encontrado na literatura (28).

Recentemente, vários estudos tem associado à hiperexpressão das MMPs 2 e 9 com múltiplos critérios prognósticos, como angiogênese, progressão do tumor; estadiamento, diferenciação, presença de linfonodos, invasão tumoral e agressividade tumoral em diferentes tipos de tumores (19, 21, 29, 30, 31, 32, 33). Entretanto, todos estes estudos avaliaram a expressão das MMPs em células neoplásicas e na porção estromal das células do tecido conjuntivo e células inflamatórias (16, 17, 34, 35, 36). No presente estudo analisamos a expressão das MMPs somente em células neoplásicas.

Atualmente, alguns estudos têm relatado que a MMP-9 deve ter um papel mais importante que a MMP-2 durante a invasão (37). Neste sentido, nosso estudo demonstrou uma maior variabilidade de expressão da MMP-9 em relação aos diferentes casos avaliados; enquanto que a expressão da MMP-2 foi negativa. Diferente dos achados deste estudo, outros trabalhas mostraram associação entre a hiperexpressão de MMP-2 com avanço do estadiamento e grau tumoral no CCR (8).

Concordante com os resultados do nosso estudo, há relatos de não correlação significativa da expressão das MMP-2 e MMP-9 com critérios prognósticos como estadiamento, grau de diferenciação tumoral e invasão vascular no câncer colorretal (38,39). Por outro lado, em contraste com os achados do nosso estudo, foi demonstrada associação significativa entre o aumento da MMP-9 com o estádio avançado de acordo com a classificação de Duke's e presença de metástase à distância em no câncer de cólon (19,40). Além disso, foi demonstrada associação entre MMP-9 e invasão perineural em pacientes com CCR (41), o que não foi observado no nosso estudo.

Entretanto, foi observado que o aumento da expressão das MMP-2 e MMP-9 em território invasivo se dá possivelmente pelo aumento de secreção de MMPs pelas células estromais

11-251-f.pmd 295 18/12/2008, 15:40

Tabela 8 – Associação entre MMP- e Classificação Astler-Coller

	Aster-Coller B1	Aster-Coller C2	Total
MMP-9 (0 ou 1)	4	14	18
	(18,2%)	(63,7%)	(81,9%)
MMP-9	3	1	4
(2-nenhum caso 3)	(13,6%)	(4,5%)	(18,1%)
Total	7	15	22
	(31,8%)	(68,2%)	

do carcinoma de cólon (36). Desta forma, há evidências de que a maior expressão e ativação dos MMPs é dependente da densidade das células tumorais e dos locais onde foi avaliada a expressão destas colagenases (42). Assim, há possibilidade de interferência dos resultados da expressão das MMPs quando avaliadas somente no citoplasma das células neoplásicas, como foi feito no nosso estudo, ou se forem avaliadas também nas células estromais da resposta adjacente inflamatória e no tecido conectivo (37). Além disso, também pode haver oscilação de resultados na dependência da localização centro ou periferia tumoral (42).

Claramente as MMPs 2 e 9, em especial MMP-9, apresentam intensa expressão estromal, tanto nas células do tecido conjuntivo quanto nas células inflamatórias. Os estudos que quantificam este fator levam em conta apenas a expressão na borda do tumor (36,38). No nosso estudo foi verificada a expressão citoplasmática intratumoral, nas células neoplásicas, o que pode ter determinado a ausência de significado estatístico. O aumento da expressão das MMPs 2 e 9 parece estar mais associado com lesões iniciais do que em carcinoma de cólon já estabelecidos, como parte de um evento inicial na tumorigênese e associado com a degradação da membrana basal assim como, a transformação maligna, mas não necessariamente ao potencial de malignidade (26,42).

Embora nossos achados não possam suportar a hipótese de associação entre a expressão das MMPs 2 e 9 com invasão vascular, invasão local, estadiamento, diferenciação tumoral e classificações Duke's e Astler-Coller no CCR, sua contribuição é relevante para estudos futuros por apontar limitações desta análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2008;58:71-96.
2. Guimarães JR. Manual de oncologia. 2nd ed. São Paulo: Libbs Farmacêutica, 2006.
3. Brentani MM, Coelho FRG, Kowalsi L. Bases da Oncologia. 2nded. São Paulo: Lemor, 2003
4. Sobin LH, Wittekind CH. Classification of Malignant Tumours. International Union Against Cancer. 6thed. New York: Whiley-Liss, 2004.
5. Riddell RH. ADASP Recommendations for the reporting of resected large intestinal carcinomas. With commentary. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Pathol Case Rev. 1998;3:217-222.
6. Sather HN. The use of prognostic factors in clinical trials. Cancer. 1986;58:461-467.
7. Ponz de Leon M, Marino M, Benatti P, Rossi G, Menigatti M, Pedroni M, Di Gregorio C, Losi L, Borghi F, Scarselli A, Ponti G, Roncari B, Zangardi G, Abbati G, Ascari E, Roncucci L. Trend of incidence, subsite distribution and staging of colorectal neoplasms in the 15-year experience of a specialised cancer registry. *Ann Oncol*. 2004;15:940-946.
8. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins. Patologia estrutural e funcional. 7th. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
9. Sternberg S, Antonioli D, Carter D, Mills S, Oberman H. Diagnostic surgical pathology. 3rd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
10. Wijnen JT, Vasen HF, Khan PM, Zwinderman AH, van der Klift H, Mulder A, Tops C, Møller P, Fodde R. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. N Engl J Med. 1998;20:511-518.
11. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger, AC, Nakamura Y, White R. Allelotype of colorectal carcinomas. Science. 1989;244:207-211.
12. Ferreira CG, Rocha JC. Oncologia Molecular. 1st. São Paulo: Atheneu, 2004. p.171-81.
13. Louro ID, Llerena JC, Mello MS, Prolla P, Froes N. Genética Molecular do Câncer. 2ed. São Paulo: MSG, 2002.
14. Newell KJ, Witty JP, Rodgers WH, Matrisian LM. Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. Mol Carcinog. 1994; 10:199-206.
15. Pinho MSL. Biologia molecular do câncer: fundamentos para a prática médica. 1sted. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.
16. Mccawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. Mol Med Today 2000;6:149-156.
17. Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T.. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. Pathol Int. 2002; 52:255-264.
18. Poulsom R, Pignatelli M, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Wright PA, Jeffery RE, Longcroft JM, Rogers L, Stamp GW. Stromal expression of 72 kda type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. Am J Pathol. 1992;141:389-296.
19. Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG. Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. J Clin Oncol. 1996;14:3133-3140.
20. Mook ORF, Frederiks WM, Van Noorden CJF. The role of gelatinases in colorectal câncer progression and metastasis. Biochim Biophys Acta. 2004;1705:69-89.
21. Heslin MJ, Yan J, Johnson MR, Weiss H, Diasio RB, Urist MM. Role of Matrix Metalloproteinase in Colorectal Carcinogenesis. Ann Surg. 2001;233:786-792.
22. Simon SD. A biologia molecular aplicada ao diagnóstico e tratamento do câncer. Diál Cient. 2004;1:18-22.
23. Cotti GCC, Santos FPS, Sebastianes FM, Habr-Gama A, Seid VE, Martino RB. Genética do câncer colorretal. Rev Med. 2000;79:45-64.
24. Yamaguschi MD, Sugano K, Fukayama N, Nakashima Y, Saotome K, Yokoayama T, Yokota T, Ohkura H. Polymerase chain reaction-based approaches for detection of allelic loss in the p53 tumor suppressor gene in colon neoplasms. Am J Gastroenterol.1997;92:307-31.
25. Lynch H, Lynch J. Genetics of colonic cancer. Digestion. 1998;59:481-492.
26. Alves VFA, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. 1sted. São

11-251-f.pmd 296 18/12/2008, 15:40

Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.
27. Morales DS, Penido Nde O, da Silva ID, Stávale JN, Guilherme A, Fukuda Y. Matrix metalloproteinase 2: an important genetic marker for cholesteatomas. Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed). 2007;73:51-57.
28. Ponz de Leon M, Marino M, Benatti P, Rossi G, Menigatti M, Pedroni M, Di Gregorio C, Losi L, Borghi F, Scarselli A, Ponti G, Roncari B, Zangardi G, Abbati G, Ascari E, Roncucci L. Trend of incidence, subsite distribution and staging of colorectal neoplasms in the 15-year experience of a specialised cancer registry. *Ann Oncol*. 2004;15:940-946.
29. Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Niwa H, Tsuneyama K, Takano Y. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. Anticancer Res. 2006;26:3579-3583.
30. Soares FA, da Cunha IW, Guimarães GC, Nonogaki S, Campos RS, Lopes A. The expression of metalloproteinases-2 and –9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis. Virchows Arch. 2006;449:637-646.
31. Liu W, Matsumoto Y, okada M, Miyake K, Kunishio K, Kawai N, Tamiya T, Nagao S. Matrix metalloproteinase 2 and 9 expression correlated with cavernous sinus invasion of pituitary adenomas. J Med Invest. 2005;52:151-158.
32. Wang M, Wang T, Liu S, Yoshida D, Teramoto A. The expression of matrix metalloproteinase-2 and –9 in human gliomas of different pathological grades. Brain Tumor Pathol. 2003;20:65-72.
33. Herszényi L, Sipos F, Galamb O, Solymosi N, Hritz I, Miheller P, Berczi L, Molnár B, Tulassay Z. Matrix metalloproteinase-9 expression in the normal mucosa-adenoma-dysplasia-adenocarcinoma sequence of the colon. Pathol Oncol Res. 2008;14(1):31-7.
34. Ripley D, Tunuguntla R, Susi L, Cheginі N. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinase-3 and –4 in normal ovary and ovarian carcinoma. Int J Gynecol Cancer**.** 2006;16:1794-1800.
35. Aponte, D. M.; Gutierrez, O.; Lozano, J. M.; Valero, V.; Patarroyo, M. E. Deteccion de metaloproteinasas en cancer gastrico y tejido normal mediante cimografia / Metalloproteinases were investigated in biopses from normal and tumoral tissues in patientes with gastric câncer. Rev Colomb Gastroenterol. 2000;15:170-175.
36. Pyke C, Ralfkiaer E, Tryggvason K, Dano K. Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. Am J Pathol. 1993;142:359-365.
37. Erdem NF, Carlson ER, Gerard DA, Ichiki AT. Characterization of 3 oral squamous cell carcinoma cell lines with different invasion and/or metastatic potentials. J Oral Maxillofac Surg. 2007; 65:1725-1733.
38. Papadopoulou S, Scorilas A, Arnogianaki N, Papapanayiotou B, Tzimogiani A, Agnantis N, Talieri M. Expression of gelatinase-A (MMP-2) in human colon cancer and normal colon mucosa. Tumour Biol. 2001;22:383-389.
39. Kim TD, Song KS, Li G, Choi H, Park HD, Lim K, Hwang BD, Yoon WH. Activity and expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinases in human colorectal cancer. BMC Cancer. 2006;6:211-221.
40. Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift RI, 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;107:541-550.
41. Iþlekel H, Oktay G, Terzi C, Canda AE, Füzün M, Küpelioðlu A. Matrix metalloproteinase-9,-3 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables. Cell Biochem Funct. 2007;25:433-441.
42. Illemann M, Bird N, Majeed A, Sehested M, Laerum OD, Lund LR, Danø K, Nielsen BS. MMP-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases. Mol Cancer Res. 2006;4:293-302.

11-251-f.pmd 297 18/12/2008, 15:40