

# O PAPEL DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO CARCINOMA DO COLO UTERINO MEDIADO PELA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS TIMP-2 E MMP-2

## 1. Introdução

O câncer de colo uterino é a segunda neoplasia mais comum em mulheres de todo o mundo, correspondendo anualmente a 16% dos casos de tumores femininos (International Agency for Research on Cancer-IARC)(1). No Brasil, estima-se que o câncer do colo do útero seja o terceiro mais comum na população feminina (Instituto Nacional do Câncer-INCA).(2)

Na última década, muitos estudos têm demonstrado que a associação entre o vírus do papiloma humano (HPV) e o câncer do colo uterino é inequívoca. Mais de 90 tipos de HPV já foram descritos e alguns deles podem causar apenas verrugas genitais, enquanto outros são responsáveis pelas lesões precursoras do carcinoma escamoso do colo uterino, conhecidas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Cerca de 20 tipos HPV têm sido identificados em 95% das NICs, sendo que o HPV 16 é o mais comum (3).

A prevalência da NIC varia com a idade da mulher. As lesões da NIC apresentam um gradiente de comprometimento histológico do epitélio cervical e são graduadas em NIC I, II e III, de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). A evolução das NIC é variada, sendo que a maioria das NIC I regride espontaneamente, porém, algumas podem persistir ou progredir para NIC II, NIC III ou para o carcinoma invasor (4).

O quadro histológico da NIC III, que inclui o carcinoma *in situ*, é composto por atipias celulares e desorganização estrutural restritas ao epitélio escamoso limitado pela membrana basal. Para que ocorra invasão e metástase tumoral, é necessária degradação da membrana basal e da matriz extracelular (MEC), que funcionam como uma barreira física para a migração celular (5). Este fato sugere que na evolução da NIC há fenômenos locais que resultariam no surgimento de novos clones celulares, com alterações genéticas, capazes de produzir substâncias que permitem a

degradação da membrana basal e originar um carcinoma invasor (6).

A degradação da MEC é mediada por algumas famílias de proteinases extracelulares, que incluem as serina-proteases, cisteína-proteases e metaloproteases (MMPs), as quais devem exercer papel chave na progressão das neoplasias malignas humanas através do aumento da proteólise mediada por estas proteínas (5,7,8).

A família das MMPs é composta por 20 enzimas proteolíticas dependentes de  $Zn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  que, de acordo com a especificidade do substrato e a homologia de domínios, são subdivididas em colagenases, gelatinases, elastases, estromelinas e MMPs (7,9). As MMPs podem ser produzidas pelo epitélio maligno e, também, pelo estroma adjacente, sugerindo um importante papel da interação célula-célula (10). A degradação da MEC por MMPs facilitaria a invasão tumoral e a progressão do câncer (5). A MMP-2, pertencente ao grupo das gelatinases, com seu potencial para a degradação do colágeno tipo IV da MEC tem-se mostrado como uma importante facilitadora da invasão estromal e vascular pelas células tumorais.(11)

Várias classes distintas de proteínas têm sido descritas como inibidoras da atividade das MMPs (TIMPs) e conseqüentemente, moduladoras do processo de angiogênese. As TIMPs são inibidores bem estudados das MMPs e consiste em uma família de 4 proteínas estruturalmente diferentes – TIMPs 1 a 4 (12). Um desbalanço entre as MMPs e as TIMPs pode conferir um potencial tumoral invasivo (13).

PARKS et al.,(14) foi o primeiro a sugerir que a TIMP-2 poderia mediar a ativação da MMP-2 na superfície celular. Em vários estudos posteriores relatou-se que a MMP-2 latente liga-se à proteína TIMP-2 (inibidores teciduais das metaloproteinase-2) em combinação com a MT1-MMP na superfície celular formando um complexo ternário. Então, a MMP-2 desse complexo é ativada pela MT1-MMP adjacente que está livre da TIMP-2, estando agora apta para seu papel de degradação da MEC. (15). Dessa forma, a TIMP-2 tem sido considerada como uma molécula com efeito pleiotrófico.

Estudos em carcinoma de colon, língua, bexiga, pâncreas, mama e boca associaram a expressão elevada da TIMP-2 e da MMP-2 com piores prognósticos. KIKUCHI et al., (2000) . YOSHIZAKI et al., (1997) KANAYAMA et al., (1998) KATAYAMA. (16,17,18,19,20,21,22,23,24).

Portanto, o objetivo desse estudo foi verificar a expressão da MMP-2 e da TIMP-2 na NIC III e no carcinoma escamoso invasor do colo uterino, na célula tumoral e nas células do estroma subjacente. Espera-se que os resultados possam contribuir para o melhor conhecimento do papel das proteínas MMP-2 e TIMP-2 durante o processo de invasão do carcinoma escamoso no colo uterino, bem como, o seu mecanismo de interação.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Amostra**

Neste estudo do tipo caso-controle foram revistos os prontuários de 65 mulheres com diagnóstico, por biópsia, de NIC III e 55 prontuários de mulheres com o diagnóstico, por biópsia, de carcinoma escamoso invasor do colo uterino. As mulheres com carcinoma invasor foram consideradas o grupo de casos e as com NIC III foram consideradas como grupo controle. A seleção foi seqüencial a partir de janeiro 2004 das mulheres atendidas na área de Oncologia. Como não se encontrou informações na literatura que poderiam servir de base para calcular o tamanho amostral, adotou-se uma amostra de pelo menos 45 casos que teria poder para demonstrar estatisticamente uma diferença de no mínimo 25% na frequência de positividade da expressão da proteína MMP-2 entre os grupos de estudo (alfa igual a 0,05; beta igual a 0,20).

As mulheres que apresentavam outro diagnóstico histológico associado foram excluídas do estudo. As lâminas das biópsias foram revisadas para confirmação do diagnóstico e os blocos correspondentes foram levantados do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica, para novos recortes visando a realização dos ensaios imunoistoquímicos. Foram excluídos os casos cujo material disponível nos blocos não era suficiente para análise. Por fim, foram selecionados os

blocos de 45 pacientes para cada grupo que atenderam os critérios de inclusão e exclusão, a partir da data de admissão no ambulatório do hospital.

## **2.2. Variáveis**

As seguintes variáveis foram observadas: data de nascimento, idade da mulher, paridade, partos vaginais, início da atividade sexual e número de parceiros, além do grau histológico e classificação do estágio da doença pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria (FIGO) para os carcinomas invasores.

## **2.3. Ensaio imunoistoquímico**

Um total de 90 blocos de material incluído parafina foram cortados em micrótomo em fatias com espessura de 5 µm para cada anticorpo. A seguir os cortes foram desparafinizados com xilol e recebem várias lavagens em álcool absoluto, 80% e 50%. Após hidratação gradual foram bloqueados os sítios inespecíficos do material em solução de 10% de peróxido de hidrogênio. Após o bloqueio, foi realizado a recuperação antigênica com tampão de pH 8,9 por 30 min na temperatura de 95°C. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal separadamente (matrix metalloproteinase 2, clone 17B11, código NCL-MMP2-507, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK/ tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2, clone 46E5, código NCL-TIMP2-487, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK) por 30 minutos em estufa a 37°C e, após, incubadas “*overnight*” No dia seguinte, o material foi lavado com PBS. Para a detecção da reação antígeno-anticorpo foi utilizado o método LSAB acoplado à peroxidase (LSAB+ system-HRP, código K0690-1, Dakocytomation, Carpinteria, CA, USA). Após lavagem, o imuno-complexo contendo peroxidase é detectado utilizando o cromógeno 3,3-diaminobenzidina-HCL seguido pela contra-coloração com Hematoxilina. Para cada reação foi colocado um controle positivo, recomendado pelo fabricante. Controle negativo foi sempre avaliado, sendo constituído pelo mesmo caso do controle positivo, com omissão do anticorpo primário na reação.

Para cada caso, foram escolhidas as áreas de “*hot-spot*” das reações e tiradas 5 fotografias para MMP-2 e 5 fotografias para TIMP-2 em campos de grande aumento (400x), que incluíssem a transição epitélio-estroma, com uma câmera digital NIKON, COOLPIX, modelo 995. As imagens transferidas para um computador, foram analisadas através de um software para análise de imagens (Imagelab 2000).

A pontuação final ou “score” foi calculado pela soma dos pontos recebidos para intensidade e porcentagem de marcação para cada anticorpo separadamente. Para avaliação da porcentagem de células positivas foram contadas mais de 1000 células tumorais e mais de 1000 células estromais em cada caso. Como células estromais foram computados os fibroblastos do estroma cervical, bem como as células inflamatórias. Os casos foram agrupados segundo a positividade determinada pela seguinte pontuação: 1- de 0 a 10% de células coradas, 2- 11 a 50% de células coradas e 3- 51 a 100% de células coradas. A avaliação semiquantitativa das lâminas observou a intensidade da marcação e a porcentagem de células positivas. A intensidade da marcação em células tumorais e em células do estroma foi avaliada usando a seguinte pontuação: 0 – ausência de marcação, 1 – leve, 2 – moderada, 3 – intensa.

### **2.3. Análise estatística**

A análise estatística para a MMP 2 foi realizada usando o programa EPI-INFO. Para dados com a distribuição amostral simétrica utilizamos o teste T-Student.

### **3. Resultados**

A reação imunoistoquímica para MMP-2 e TIMP-2 foi observada no citoplasma de células tumorais e células estromais em ambos os grupos estudados (Figuras 1 e 2). Também observamos a marcação, em alguns casos, em células endoteliais e em células glandulares, não valorizados na análise dos resultados.

A média da idade para NIC 3 foi de 48 anos, enquanto que para o carcinoma invasor foi de 59 anos. Nenhuma relação entre a expressão da MMP-2, tanto em células tumorais quanto em

células estromais, foi observada de acordo com a variação da idade de início da atividade sexual, a paridade, o número de parceiros e o número de partos vaginais .

A intensa positividade para MMP-2 no estroma (score>5) foi observada em 2% (1/45) das NIC III e em 40% (18/45) dos casos de carcinoma invasor. Para as células tumorais a marcação intensa da MMP2 foi de 18% (8/45) e 24% (11/45), respectivamente, para NIC 3 e o carcinoma invasor. Observamos maior expressão da MMP-2 nas células estromais no carcinoma invasor do que na NIC III, diferença estatisticamente significativa ( $<0,0001$ ). Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão da MMP-2 nas células tumorais entre NIC 3 e carcinoma invasor ( $P=0,9423$ ) (Tabela 1).

Na NIC III a expressão da MMP 2 e da TIMP-2 foi significativamente maior nas células epiteliais tumorais do que nas células estromais ( $p=0,05$  e  $p <0,0001$ , respectivamente). Entretanto, para o carcinoma invasor, não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão dessas proteínas entre as células epiteliais tumorais e estromais (Tabelas 3 e 4).

Para a TIMP-2 a intensa positividade no estroma (score>5) foi observada em 6,67% (3/45) das NIC III e em 26,67% (12/45) dos casos de carcinoma invasor. Para as células tumorais a marcação intensa da TIMP-2 foi de 35,55% (16/45) para a NIC III e para o carcinoma invasor. De forma semelhante a MMP-2 observamos para a TIMP-2 maior expressão nas células estromais no carcinoma invasor do que na NIC III ( $p=0,01$ ), não havendo também diferença estatisticamente significativa na expressão da TIMP-2 nas células tumorais entre NIC III e carcinoma invasor ( $P=0,67$ ) (Tabela 2).

De acordo com o grau histológico, os carcinomas escamosos foram classificados em: 5 bem diferenciados, 29 moderadamente diferenciados e 5 pouco diferenciados. Em 6 casos o carcinoma era micro-invasivo e o grau histológico não foi avaliado. Não observamos relação entre o grau histológico e a expressão da MMP2 e da TIMP-2 tanto nas células tumorais ( $p= 0,955$  e  $p=0,2$ ) quanto nas estromais ( $p=0,2744$  e  $p=0,2$ ) (dados não mostrados).

Pela a classificação de estádios da FIGO, 18 tumores foram detectados em estádios I-II , 26 em estádios III-IV e em 1 caso não foi estabelecido, devido à morte precoce da paciente. Observamos maior frequência de positividade com score >3 da MMP-2 nas células estromais nos estádios III-IV em relação ao estágio I-II, sendo esta diferença estatisticamente significante ( $p=0,04$ ). Nenhuma relação foi observada na expressão da MMP-2 em células tumorais para o estágio de FIGO. (Tabela 5). Referente a expressão da TIMP-2 não houve relação com a classificação de estádios da FIGO tanto para as células tumorais quanto para as células estromais. (tabela 6)

Quando comparamos a expressão da proteína MMP-2 com a proteína TIMP-2 no carcinoma escamoso observamos que na célula estromal ocorre aumento significativo da proteína MMP-2 ( $p=0,016$ ). Para a célula tumoral no carcinoma invasor e para a NIC III a comparação entre a expressão das proteínas estudadas não foram significativas (tabelas 7 e 8).

**Tabela 1. Expressão da proteína MMP-2 (score) nas células estromais e epiteliais tumorais entre os casos de NIC III e de carcinoma escamoso invasor.**

"Score" final	Células estromais			Células epiteliais tumorais		
	NIC 3	Ca invasor	$p^*$	NIC 3	Ca invasor	$p^*$
0-2	10	6	<0,0001	8	14	0,9423
3-4	34	21		29	20	
5-6	1	18		8	11	

\*. Teste do Qui-quadrado (score 0-2 ; score 3-4; score 5-6).

**Tabela 2. Expressão da proteína TIMP-2 (score) nas células estromais e epiteliais tumorais entre os casos de NIC III e de carcinoma escamoso invasor.**

"Score" final	Células estromais			Células epiteliais tumorais		
	NIC 3	Ca invasor	$p^*$	NIC 3	Ca invasor	$p^*$
0-2	28	19	0,01	8	12	0,67
3-4	14	14		21	17	
5-6	3	12		16	16	

\*. Teste do Qui-quadrado (score 0-2 ; score 3-4; score 5-6).

**Tabela 3. Expressão da proteína MMP-2 (score) nos casos de NIC III e de carcinoma escamoso invasor entre as células estromais e epiteliais tumorais.**

"Score" final	NIC 3			Ca invasor		
	Células estromais	Células epiteliais tumorais	<i>p</i> *	Células estromais	Células epiteliais tumorais	<i>p</i> *
0-2	10	8	0,05	6	14	0,09
3-4	34	29		21	20	
5-6	1	8		18	11	

\*. Teste do Qui-quadrado (score 0-2 ; score 3-4; score 5-6)

**Tabela 4. Expressão da proteína TIMP-2 (score) nos casos de NIC III e de carcinoma escamoso invasor entre as células estromais e epiteliais tumorais.**

"Score" final	NIC 3			Ca invasor		
	Células estromais	Células epiteliais tumorais	<i>p</i> *	Células estromais	Células epiteliais tumorais	<i>p</i> *
0-2	28	8	<0,0001	19	12	0,24
3-4	14	21		14	17	
5-6	3	16		12	16	

\*. Teste do Qui-quadrado (score 0-2 ; score 3-4; score 5-6).

**Tabela 5. Expressão da MMP-2 (score) nas células estromais e epiteliais tumorais de acordo com o estágio do carcinoma escamoso invasor.**

Score final	Células estromais			Células tumorais		
	Estadio		<i>p</i> *	Estadio		<i>p</i> *
	I-II	III-IV	0,0403	I-II	III-IV	0,1791
0-3	12	10		12	12	
4-6	6	18		6	14	

\*. Teste do Qui-quadrado (score 0-3; score 4-6).

**Tabela 6. Expressão da TIMP-2 (score) nas células estromais e epiteliais tumorais de acordo com o estágio do carcinoma escamoso invasor.**

Score final	Células estromais			Células tumorais		
	Estadio		$p^*$	Estadio		$p^*$
	I-II	III-IV	0,6	I-II	III-IV	0,41
1-3	11	13		10	10	
4-6	7	13		8	16	

\*. Teste do Qui-quadrado (score 0-3; score 4-6).

**Tabela 7. Expressão das proteínas MMP-2 e TIMP-2 (score) nos casos de NIC III entre as células estromais e epiteliais tumorais.**

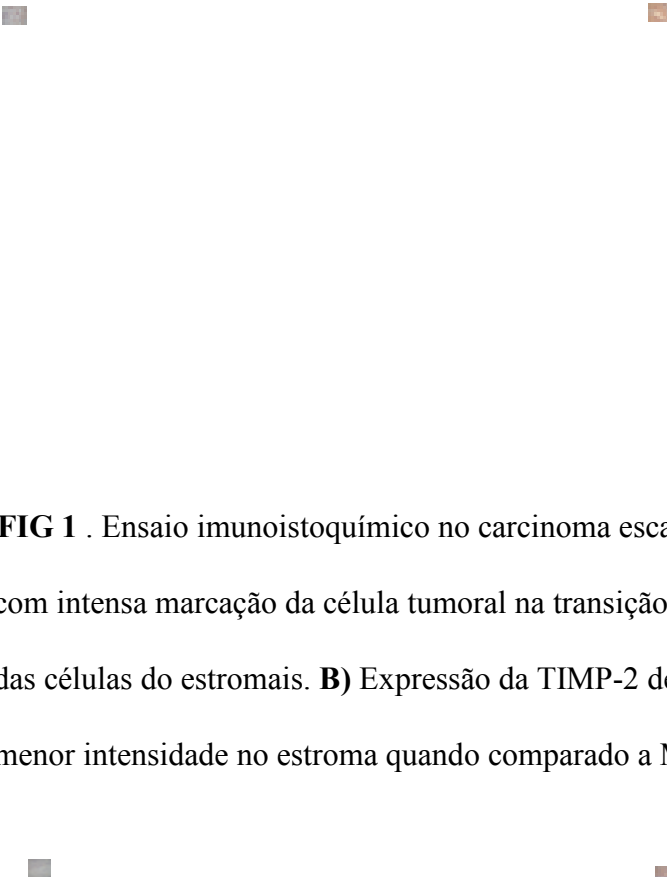
“Score” final	Células estromais			Células tumorais		
	MMP-2	TIMP-2	$p^*$	MMP-2	TIMP-2	$p^*$
0-2	10	28	0,72	8	8	0,468
3-4	34	14		29	21	
5-6	1	3		8	16	

\*. Teste do Qui-quadrado (score 0-2 ; score 3-4; score 5-6).

**Tabela 8. Expressão das proteínas MMP-2 e TIMP-2 (score) nos casos de carcinoma escamoso invasor entre as células estromais e epiteliais tumorais.**

“Score” final	Células estromais			Células tumorais		
	MMP-2	TIMP-2	$p^*$	MMP-2	TIMP-2	$p^*$
0-2	6	19	0,016	14	12	0,49
3-4	21	14		20	17	
5-6	18	12		11	16	

\*. Teste do Qui-quadrado (score 0-2 ; score 3-4; score 5-6).



**FIG 1** . Ensaio imunoistoquímico no carcinoma escamoso invasor (400x): **A)** Expressão da MMP-2 com intensa marcação da célula tumoral na transição epitélio tumoral-estroma e intensa marcação das células do estromais. **B)** Expressão da TIMP-2 de forte intensidade em todo o epitélio tumoral e menor intensidade no estroma quando comparado a MMP-2.

**FIG 2 .** Ensaio imunoistoquímico na NIC III (400x): **A)** Expressão da MMP-2 com leve marcação das células tumorais e raras células estromais positivas. **B)** Expressão da TIMP-2 de forte intensidade em todo o epitélio tumoral e raras células estromais marcadas discretamente.

#### **4. Discussão e Conclusão**

Até o momento, podemos analisar a expressão da MMP-2 e da TIMP-2 em 45 casos de NIC III e 45 casos de carcinoma escamoso invasor do colo uterino pela técnica de imunoistoquímica, comparando a localização da expressão nas células epiteliais neoplásicas com as células do estroma subjacente. De acordo com os resultados do nosso estudo, a expressão da MMP-2 e da TIMP-2 nas células estromais é maior no carcinoma invasor em relação NIC III, como também, para a MMP-2 é maior nos estádios avançados do carcinoma invasor. Por outro lado, análises semelhantes não mostraram diferenças na expressão dessas proteínas nas células tumorais.

Quando comparamos a co-expressão da MMP-2 com a TIMP-2 no carcinoma invasor observamos, nas células estromais, que ocorre um aumento ainda mais significativo da MMP-2.

Nossos resultados são semelhantes ao de Davidson et al (27) que em um estudo com menor número de casos, demonstrou no colo uterino, a maior positividade da MMP-2 nas células estromais adjacentes ao carcinoma invasivo quando comparada com as NICs. Esse estudo também relatou não haver diferenças na expressão da MMP-2 nas células tumorais para as NICs e o carcinoma escamoso invasor. Além disso, o autor analisou a quantidade de mRNA para MMP-2 nas células estromais e nas células tumorais e, observou que na célula tumoral havia uma quantidade maior de mRNA quanto comparada com a célula estromal. Na hipótese feita pela autor caberia à célula tumoral a síntese da proteína MMP-2, ficando a célula estromal responsável por sua ativação, o que justificaria a marcação estromal intensa para MMP-2. Nesse estudo, o autor também relata um

aumento da expressão da TIMP-2 a medida que o tumor se torna mais agressivo.

No nosso estudo, a alta expressão da proteína MMP-2 foi mais freqüente nas células epiteliais tumorais do NIC III do que nas células estromais. No carcinoma invasor, a expressão da proteína MMP-2 nas células estromais é mais intensa do que na NIC III, todavia é provável que a expressão nas células epiteliais tumorais ainda seja mais freqüente, porém nosso estudo não mostrou significância estatística porque o tamanho amostral não tinha poder suficiente para demonstrar esta possível diferença.

A importância das células estromais na determinação do papel da MMP-2 e da TIMP-2 também foi descrita em carcinoma do pulmão do tipo não pequenas células e em carcinomas de reto (28 e 29).

Outros estudos indicaram que é a célula tumoral que pode induzir a produção de enzimas proteolíticas nas células estromais vizinhas (25,30,31). O estudo de Sun et al sugere que a presença dos indutores de metaloproteinases de matriz celular (EMMPRIN-) nas células tumorais promovem a produção da MMP-2 latente pelos fibroblastos (30). O estudo de Cornellis complementa que depois de produzida pelos fibroblastos, a MMP-2 seria ativada na superfície das células tumorais na interface tumor-estroma (31)

Independente do local de expressão e ativação da MMP-2 e da TIMP-2, todos os estudos citados concordam que o aumento na expressão dessas proteínas correlacionam-se com um pior prognóstico da paciente devido à maior agressividade tumoral.

A mera presença da MMP-2 não implica na sua atividade proteolítica, já que ela pode estar em sua forma latente ou ativa e a técnica imunistoquímica utilizada não diferencia essas formas. Sabe-se que para ativação da MMP-2 necessita da MT1-MMP e da TIMP-2 (8) e em sua forma ativa pode não estar atuante pela presença de seus inibidores, já conhecidos como as TIMPS e o RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs)(32).

Na tentativa de entender como o organismo perde sua auto-regulação para essa proteína recentemente, Sigrun Smola-Hess et al (32) demonstraram que a proteína E7 dos HPV 16 e HPV 8 relacionava-se com o aumento da expressão da MT1-MMP em queratinócitos e, conseqüentemente, com o aumento da ativação da MMP-2. Em contraste, quando comparado com a proteína E7 derivado do HPV1 nenhum aumento na expressão da MT1-MMP foi observado. Esse resultado poderia justificar a participação do HPV de alto risco no desbalanço proteico da MMP-2 encontrado na invasão tumoral.

Em resumo, nosso estudo é convergente com a condição de que a MMP-2 e a TIMP-2 está relacionada com a progressão da neoplasia, o que se faria através do envolvimento progressivo das células estromais, apontando para a necessidade de contínua investigação das complexas relações da unidade funcional epitélio-estromal.

## 5. Referências Bibliográficas

1-IARC <http://www-depdb.iarc.fr/globocan/GLOBOframe.htm>

2-INCA <http://www.inca.gov.br/>

3-BURD EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* Jan;16(1):1-17, 2003.

4-SHERMAN ME, KURMAN RJ. Intraepithelial carcinoma of the cervix: reflections on half a century of progress. *Cancer Dec 1;83(11):* 2243-6, 1998.

5-ITOH Y. & NAGASE H. Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem., 38(21-36)*, 2002.

6-ZHOU CY, YAO JF, CHEN XD. Expression of matrix metalloproteinase-2, 9 and their inhibitor-timp 1,2 in human squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Ai Zheng.* 21(7):735-9, 2002.

7-BENAUD C, DICKSON RB, THOMPSON EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat., 50(2):* 97-116, 1998

- 8-BAKER AH, EDWARDS DR, MURPHY G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.*, **115**(PT 19): 3719-27, 2002
- 9-BRUMMER O, BOHMER G, HOLLWITZ B, FLEMMING P, PETRY KU, KUHNLE H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol.*, **84**(2):222-7, 2002
- 10-SINGER CF, KRONSTEINER N, MARTON E, KUBISTA M, CULLEN KJ, HIRTENLEHNER K, SEIFERT M, KUBISTA E. MMP-2 and MMP-9 Expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. *Breast Cancer Res Treat.*, **72**(1): 69-77, 2002.
- 11-AZNAVOORIAN S, MURPHY AN, STETLER-STEVENSON WG, LIOTTA LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* **71**: 1368-1383, 1993
- 12-VISSE R., NAGASE H. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase: structure, function and biochemistry. *Circ Res*, **92**: 827 – 839, 2003.
- 13-SATO H., KIDA Y., MAI M., ENDO Y., SASAKI T., TANAKA J. Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene* **7**: 77 – 83, 1992.
- 14-PARKS W & MECHAM R. Matrix Metalloproteinases 1ª edição: 92, 1998.
- 15-IMAI K, OKUCHI E, AOKI T, NOMURA H, FUJII Y, SATO H, SEIKI M, OKADA Y. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Cancer Res.* **56**: 2707-10, 1996
- 16-VAN DER JADT M.F.P., SWEEP F., WAAS E., HENDRIKS T., RUERS T., MERRY A., WOBES T., SPAN P. Correlation of reversion cysteine rich protein with kazal motifs (RECK) and extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), with MMP-2, MMP-9, and survival in colorectal cancer. *Cancer Letters*, **XX**: 1-9, 2005
- 17-MASUI T., DOI R., KOSHIBA T., FUJIMOTO K., TSUJI S., NAKAJIMA S., KOIZUMI M., TOYODA E., TULACHAN S., KAMI K., MORI T., WADA M., NODA M., IMAMURA M.

RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis.

*Clinical Cancer Research*, **9**: 1779 -1784, 2003.

**18**-BOAG A.H., YOUNG I.D. Increased expression MMP2 in prostatic adenocarcinoma. Demonstration by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Am. J. Pathol.* **144**: 585–591,1994.

**19**-DAVIES B., WAXMAN J., WASAN H., ABEL P., WILLIAMS G., KRAUSZ T., NEAL D., THOMAS D., HANBY A., BALKWILL F. Levels of matrix metalloproteinase in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res.* **53**: 5365 – 5369, 1993

**20**-PELLIKAINEN J.M., ROPPONEN K.M., KATAJA V.V., KELLOKOSKI J.K., ESKELINEN M.J., KOSMA V. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 e MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER-2, and prognosis. *Clinical Cancer Research* **10**: 5572 - 5579, 2004.

**21**-KANAYAMA H., YOKOTA K., KUROKAMA Y., MURAKAMI Y., NISHITANI M., KAGAWA S. Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. *Cancer (Phila)*, **82**: 1359 – 1366, 1998.

**22**-KATAYAMA A., BANDO N., KISHIBE K., TAKAHARA M., OGINO T., NONAKA S., HARABUCHI Y. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clinical Cancer Research* **10**: 634 – 640, 2004.

**23**-KIKUCHI R., NOGUCHI T., TAKENO S., KUBO N., UCHIDA Y. Immunohistochemical detection of membrane type-1-matrix metalloproteinase in colorectal carcinoma. *Br. J. Cancer*, **83**: 215 – 218, 2000.

**24**-YOSHIZAKI T., SATO H., MARUYAMA Y., FURUKAWA M. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 and predicts por prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, **95**: 44 – 50, 2001.

**25**-GAIOTTO M.A., FOCCHI J., RIBALTA J., STAV?LE J.N., BACARAT E.C., LIMA G., GUERREIRO I. Comparative study of MMP2 immune expression in normal uterine cervix, intraepithelial neoplasia, and squamous cells cervical carcinoma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*,**190**:1278-82, 2004.

- 26-BRANCA M., CIOTTO M., GEORGIA C., SANTINI D., DI BONITOL., COSTA S., BENEDECTTO A., DI BONITO P., PAPA P., ACCARDI L., SYJARNEN S., FAVALLI C. Matriz metalloproteinase-2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) are prognostic factors in cervical cancer, related to invasive disease but to high-risk human papillomavirus (HPV) or virus persistence after treatment of CIN. *Anticancer Research* 26 (2B): 1543-56, 2006
- 27- DAVIDSON B, GOLDBERG I, KOPOLOVIC J, LENER-GEVA L, GOTLIEB W, BEN-BARUCH G, REICH R. MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma- a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA *in situ* hybridization. *Gynecologic Oncology* 73: 372-382,1999
- 28-ISHIKAWA S, TAKENAKA K, YANAGIHARA K, MIYAHARA R, KAWANO Y, OTAKE Y, HASEGAWA S, WADA H, TANAKA F. Matrz metalloproteinase-2 status in stromal fibroblasts, not in tumor cell, is a significant prognostic factor in non-small-cell-lung cancer. *Clinical Cancer Research* 10: 6579-6585, 2004
- 29-MASAKI T, MATSUOKA H,SUGIYAMA M, ABE N, IZUMISATO Y, GOTO A, SAKAMOTO A, ATOMI Y. laminin-5 gamma 2 chain and matrix metalloproteinase-2 may trigger colorectal carcinoma invasiveness through formation of budding tumor cells. *Anticancer Res.* 23: 4113-9, 2003
- 30-SUN J, HEMLER ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD 147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res.* 61: 2276-81, 2001
- 31-CORNELLIS FM, ZUIDWIJK K, ZIJLMANS H, HANEMAAIJER R, MULDER-STAPEL A, PRINS F, DREEF E, KENTER GG, FLEUREN GJ, ARKO GORTER. EMMPRIN-induced MMP-2 activation cascade in human cervical squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 118: 2991-98, 2006.
- 32-SMOLA-HESS S, PAHNE J, MAUCH C, ZIGRINO P, SMOLA H, PFISTER H. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in papillomavirus-positive cell: role of the huma

papillomavirus (HPV) 16 and HPV8 E7 gene products. *J. General Virology* 86: 1291-96, 2006