



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Expresión de las colagenasas MMP 1, 8 y 13  
en tumores mucinosos y serosos de ovario**

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

**Biol. Jade Rodríguez Cabrales**

**Tutor: Dr. Mauricio Salcedo Vargas**

**UNAM**  
**POSGRADO**  
Ciencias Biológicas



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue realizada en el Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el laboratorio de Oncología Genómica en la UIMEO del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. El proyecto fue apoyado con beca CONACyT, bajo la dirección del Dr. Mauricio Salcedo Vargas y miembros del comité tutor, Dra. Elizabeth Langley McCarron, Dr. José Moreno Rodríguez, Dra. Annie Pardo Semo, Dr. Fabian Arechavaleta Velasco y Dr. Rafael Camacho Carranza.

And those who were seen dancing were  
thought to be insane by those who could  
not hear the music.

Friedrich Nietzsche

## Agradecimientos

Al Dr. Mauricio Salcedo Vargas por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo y por la dirección en la realización de este trabajo.

A los sinodales que corrigieron y enriquecieron esta tesis: Dra. Elizabeth Langley McCarron, Dr. José Moreno Rodríguez, Dra. Annie Pardo Semo, Dr. Fabian Arechavaleta Velasco y Dr. Rafael Camacho Carranza.

A mis compañeros del lab: Ale, Manuel, Perlita, Mony, Lucerix, Miry, Nayetzi, Sarita, Dali, Pablo y Julius, gracias por todos los buenos consejos, apoyo y esos momentos de cábula.

A mi familia y amigos, porque siempre me han alentado y animado a ser mejor cada día, en especial a mi Mom por enseñarme a ser lo que soy, no dejarme caer ante las adversidades y luchar por mis ideales.

A Alberto por haber estado conmigo durante esta etapa, haberme apoyado, acompañado, ayudado, aconsejado y haberme dado la fuerza para seguir adelante : )=

## ÍNDICE

Resumen .....	1
<i>Abstract</i> .....	2
Introducción .....	3
 Epidemiología del Cáncer de Ovario .....	3
Factores de riesgo .....	4
 Cáncer de Ovario .....	6
Tumores Mucinosos .....	7
Tumores Serosos .....	8
 Metaloproteasas de la Matriz .....	11
Familia de las Metaloproteasas de la matriz .....	13
 Antecedentes .....	15
Justificación .....	19
Planteamiento del problema .....	20
Hipótesis .....	21
Objetivos .....	22
Diseño experimental .....	23
Materiales y métodos .....	24
Resultados .....	30
Discusión .....	44
Conclusiones .....	48
Referencias .....	49

## RESUMEN

El Cáncer de Ovario (CaO) es el tercer tipo de cáncer mas frecuente en ginecología oncológica en nuestro país, ocupando el noveno lugar en mortalidad, esto probablemente debido a que no existen métodos diagnósticos tempranos. Los tumores mas frecuentes en CaO son de tipo epitelial, siendo de mayor incidencia los tumores serosos y mucinosos. Se ha documentado que la invasión y metástasis son las principales causas de la progresión del cáncer. La degradación de la matriz extracelular, permite que las células tumorales invadan al tejido local. Las metaloproteasas de matriz (MMP) juegan un papel importante en la tumorigénesis sin embargo existen pocos reportes de su expresión en tumores mucinosos y serosos de ovario. En el presente estudio se evaluó la expresión de las colagenasas MMP-1, -8 y -13 en estos tipos de tumores. Se realizaron microarreglos de tejido que incluyeron 60 mucinosos (30 cistadenomas, 15 limítrofes, 15 carcinomas) y 90 tumores serosos (30 cistadenomas, 30 limítrofes, 30 carcinomas) y 15 tejidos de ovario sano. Como muestras control se utilizaron diferentes tipos de tejido (carcinoma gástrico, vejiga, cérvix, mama). Con los cortes de los microarreglos se realizaron reacciones de inmunohistoquímica para cada MMP, utilizando anticuerpos específicos. Los resultados se evaluaron obteniendo el HSCORE y posteriormente un ANOVA con la prueba de Tukey. Se encontró expresión diferencial de las MMP en tumores mucinosos y serosos de ovario. La expresión epitelial de la MMP-1 y -13 no fue significativa en tumores mucinosos (cistadenomas, limítrofes y carcinomas), sin embargo la MMP-8 tuvo una disminución significativa en los cistadenomas mucinosos. La MMP-1 y -13 mostraron una mayor expresión en cistadenomas serosos con respecto al tejido sano, sin cambios significativos en lesiones limítrofes y carcinomas. La expresión de la MMP-8 en lesiones limítrofes y carcinomas estuvo disminuida considerablemente. En conclusión, la MMP-1, -8 y -13 se expresan diferencialmente en tejido sano de ovario, tumores mucinosos y serosos. La expresión epitelial de estas colagenasas es mayor en tumores serosos que mucinosos. El incremento de la expresión de la MMP-1 y -13 se asocia a lesiones benignas serosas, mientras que existe pérdida de la expresión de la MMP-8 en lesiones invasoras.

**Palabras clave:** Cáncer de Ovario, metaloproteasas de la matriz, inmunohistoquímica.

## ABSTRACT

Ovarian Cancer (OC) is the third most common cancer in gynecologic oncology in Mexico, with a poor ratio of survival, this is because of the high percentage of cases diagnosed at advanced stage. The most common tumors in OC are the epithelial type, serous and mucinous tumors having the the highest incidence. It has been reported that invasion and metastasis are major causes of cancer progression. The degradation of the extracellular matrix, allows tumor cells to invade local tissue. The matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in tumorigenesis, but there are few reports of its expression in serous and mucinous tumors in ovary. In the present study we evaluated the expression of collagenases MMP-1, -8 and -13 in these types of tumors. Tissue microarrays were set up including 60 mucinous (30 cystadenomas, 15 borderline, 15 carcinomas) and 90 serous tumors (30 cystadenomas, 30 borderline, 30 carcinomas) and 15 healthy ovarian tissue. Control samples were used as different types of tissue (gastric carcinoma, bladder, cervix, breast). With microarrays cuts, immunohistochemical reactions were performed for each MMP, using specific antibodies. The results were scored by using HSCORE and assessed by ANOVA with Tukey test. The results show differential epithelial expression of MMPs in mucinous tumors and serous ovarian cancer. The epithelial expression of MMP-1 and -13 was not significant in mucinous tumors (cystadenomas, borderline and carcinomas), but MMP-8 had a significant decrease in it's expression, in mucinous cystadenomas. The MMP-1 and -13 showed increased expression in serous cystadenomas with respect to healthy tissue, no significant changes in borderline lesions and carcinomas. The expression of MMP-8 in borderline lesions and carcinomas was significantly decreased. In conclusion, MMP-1, -8 and -13 are differentially expressed in healthy ovarian tissue, mucinous and serous tumors. The epithelial expression of these collagenases is higher in serous than mucinous tumors. The MMP-1 and -13 increased expression is associated with serous benign lesions, whereas in invasive lesions there is a decrease of expression of MMP-8.

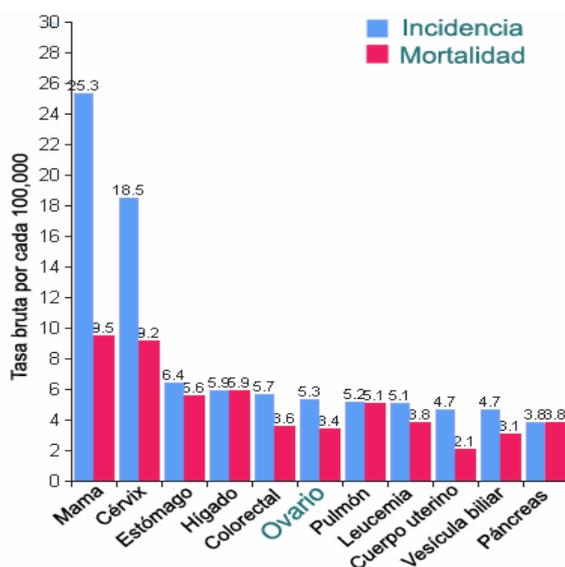
**Key words:** Ovarian Cancer, Matrix Metalloproteinases, Immunohistochemistry



## Epidemiología del cáncer de ovario

El cáncer de ovario (CaO) se encuentra en octavo lugar de incidencia y séptimo en mortalidad dentro de las neoplasias en la población femenina a nivel mundial, siendo los países desarrollados en donde se presenta con mayor frecuencia. En México el CaO es el tercer cáncer más frecuente en ginecología oncológica (tras mama y cérvix), y tiene el noveno lugar de mortalidad en neoplasias femeninas (Gráfica 1); esto se debe a la gran dificultad para el diagnóstico, ya que el 65% de las pacientes se diagnostican en estadios avanzados cuando la enfermedad se ha extendido o diseminado más allá de los ovarios (1, 2). La alta mortalidad, en relación a la incidencia, se atribuye a que el CaO es asintomático en los estadios tempranos y en estadios tardíos o más avanzados presentan síntomas no específicos, como: molestia abdominal, pérdida de peso, sangrado vaginal, incontinencia y constipación. En muchos casos los síntomas no se presentan hasta que el tumor llega a un estadio muy avanzado (3).

La demora en el diagnóstico, con el consecuente aumento de la mortalidad, es debida a una falta de técnicas de detección temprana aplicables a la población general, dotadas de una sensibilidad y especificidad adecuadas, así como la ausencia de síntomas específicos (3, 4).



**Gráfica 1.** Incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cáncer de mujeres en México (2).

## **Factores de riesgo**

La etiología del cáncer de ovario (CaO) no se conoce, sin embargo, existen factores de riesgo que predisponen su desarrollo. El CaO aumenta con la edad y es más frecuente en mujeres con historia familiar de esta enfermedad, cáncer de mama o cáncer de colon, aumentando el riesgo un 5% si es un familiar y 7% con dos familiares. Por el contrario, se ha propuesto que el riesgo de padecer cáncer de ovario disminuye con multiparidad, consumo de contraceptivos orales, menarca tardía, menopausia temprana, histerectomía simple, ooforectomía así como la salpingoclasia (3, 5, 6).

Existen varias hipótesis planteadas sobre los procesos biológicos que aumentan el riesgo de transformación maligna del epitelio del ovario, a continuación se describen brevemente.

### Hipótesis de la evolución incesante

Durante la ovulación, la ruptura folicular y liberación del óvulo causan un trauma físico sobre la superficie del ovario, creando una brecha en el epitelio que tiene que ser reparada. Durante el curso de la vida reproductiva de la mujer este proceso de daño y reparación se repite múltiples veces. Aunque el epitelio ovárico tiene un alto grado de plasticidad que facilita la remodelación de tejido, la acumulación de daño a DNA por las células del epitelio, puede incrementar la susceptibilidad a transformación. Asimismo, cuando la mujer envejece, la superficie del ovario desarrolla numerosas invaginaciones dentro del estroma cortical, las cuales se pueden liberar atrapándose dentro del estroma, formando quistes. Ya dentro del ovario, los quistes están expuestos a hormonas que pueden inducir diferenciación y metaplasias (7).

### Estimulación por gonadotropinas

Varias hormonas que actúan sobre el ovario (ej. hormona folículo estimulante, hormona luteinizante) tienen propiedades que promueven el crecimiento celular y mutaciones, que puede inducir proliferación de las células epiteliales y así colocarlas en un mayor riesgo de desarrollar cáncer de ovario (7, 8).

### Estimulación hormonal

Las altas concentraciones de andrógenos en el microambiente del tumor, se asocian con un mayor riesgo de CaO, mientras que las progestinas tienen un efecto contrario. Los andrógenos son las hormonas de mayor concentración dentro del folículo en desarrollo, lo que prolonga la exposición de las células epiteliales. Los receptores de andrógenos están presentes en las células del epitelio ovárico y estos estimulan la proliferación. Por lo tanto, la exposición a los andrógenos puede inducir una transformación maligna (7, 8).

### Inflamación

La ovulación produce un daño en las células del epitelio del ovario, lo cual puede promover susceptibilidad a reconstruirse y generar mutaciones. Existe un interés creciente en el papel etiológico de la inflamación que acompaña a cada ovulación, con liberación de citocinas asociadas, afluencia de células inflamatorias y reconstrucción de tejidos. Se ha postulado que este mecanismo estresa a las células epiteliales de ovario, las cuales ya están predispuestas a daños genéticos y transformaciones malignas (7, 8).

Aunque ninguna de estas teorías se ha confirmado, pueden desempeñar un papel en la carcinogénesis del ovario, por lo que se sugiere que existen otros procesos involucrados, no predecibles por medios clínicos, como la nuliparidad, la infertilidad o la exposición hormonal. Para detectar tempranamente el CaO o para identificar pacientes en riesgo, se necesita una búsqueda de las condiciones genéticas o epigenéticas que predisponen a las pacientes para el desarrollo de esta neoplasia así como el estudio de proteínas que puedan permitir la detección temprana.

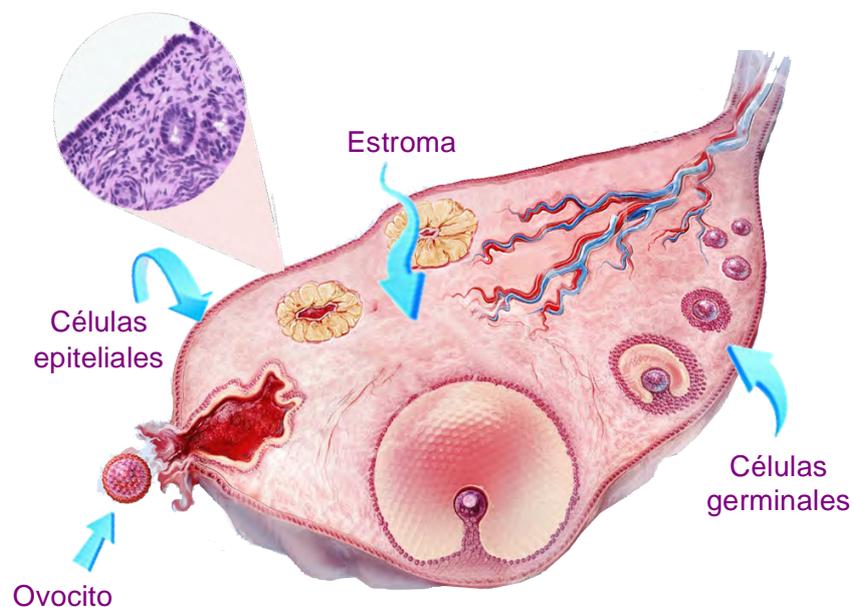


## Cáncer de ovario

El CaO es una enfermedad compleja, se caracteriza por la acumulación de múltiples alteraciones moleculares, tanto en las células en proceso de transformación neoplásica como las células huésped. Estas anomalías alteran la expresión de genes que controlan los procesos celulares, que conducen la iniciación de la tumorigénesis y desarrollo (9).

El ovario se conforma de tres tipos celulares, en general, los tumores de ovario se pueden desarrollar a partir de cada uno de estos tipos, que son: células epiteliales, células del estroma (incluyendo las de la granulosa, teca, y las células hilio) y células germinales (óvulos) (Fig. 1) (10).

El epitelio que recubre al ovario, también conocido como el mesotelio o epitelio ovárico normal, contiene una capa simple de células tipo planas a cuboidales, con pocas características distintivas (Fig. 1) (3). A pesar de su apariencia discreta y aparente falta de funciones es de gran importancia en el desarrollo del CaO, ya que el 90% de los tumores de ovario surgen de este epitelio (5, 6, 7). Este trabajo se centró exclusivamente en los tumores epiteliales de ovario, por ser predominantes y letales de esta neoplasia.



**Figura 1.** Morfología del ovario. Mostrando los tres tipos celulares que conforman el ovario, células del estroma, células germinales y células epiteliales. La fotografía representa una sección del epitelio de ovario sano, teñida con hematoxilina y eosina.

## Clasificación de los tumores de ovario

Los tumores de ovario tienen heterogeneidad histológica y la clasificación histológica de estos tumores, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, se basa en la histogénesis del ovario sano, por lo que los tumores de ovario se clasifican dependiendo de su origen: del epitelio, de células germinales y del mesénquima (estroma de la médula) (11).

Los tumores epiteliales pueden ser clasificados por su tipo histológico como: mucinosos, serosos, endometrioides, de células claras, tumores de Brenner, carcinosarcoma e indiferenciados. Asimismo, los tumores ováricos se dividen en: benignos si carecen de una gran proliferación y comportamiento invasor; limítrofes (*borderline*) o tumores de bajo potencial maligno si tiene gran proliferación celular pero no tienen carácter invasor; y malignos si tienen un carácter invasor (11).

Los tumores limítrofes son biológicamente diferentes de los carcinomas y no son precursores de estos últimos. En realidad, se desconocen los estadios precancerosos del cáncer ovárico. Estos tumores tienen características celulares de malignidad (atipias, mitosis) y mayor o menor grado de proliferación y estratificación, pero no invaden el estroma. Entre el 15 y el 40% de estos tumores muestran implantes peritoneales o incluso afectación de los ganglios retroperitoneales. Estos implantes pueden proceder del tumor ovárico o ser de origen peritoneal primitivo. El tipo histológico sigue siendo limítrofe y no se modifica la supervivencia (10, 11).

### **Tumores Mucinosos**

Los tumores mucinosos se originan de metaplasia del epitelio celómico del ovario. Estos se caracterizan por células epiteliales altas con mucina intracitoplasmática abundante, las células simulan el epitelio que reviste tanto el endocérvix como el intestino. Los tumores mucinosos benignos representan el 25% de todas las neoplasias benignas del ovario y el 75-85% de todos los tumores mucinosos (Fig. 2) (12).

El cistadenoma mucinoso es una de las neoplasias mas comunes en ovario, tienden a ser los mas grandes de todos tumores de ovario. Usualmente es un quiste unilocular con una pared delgada y lisa con fluido mucinoso.

El tumor limítrofe habitualmente tienen áreas papilares y sólidas, con células epiteliales de tipo intestinal y contienen abundante mucina. El estroma es infiltrado por neutrófilos.

Los carcinomas mucinosos son predominantemente sólidos, contienen puntos de hemorragia y necrosis. Están compuestos por quistes irregulares y glándulas cubiertas por células mucinosas atípicas, las cuales se encuentran estratificadas en cuatro o mas capas. El mayor criterio de estos tumores es la invasión al estroma (12, 13).

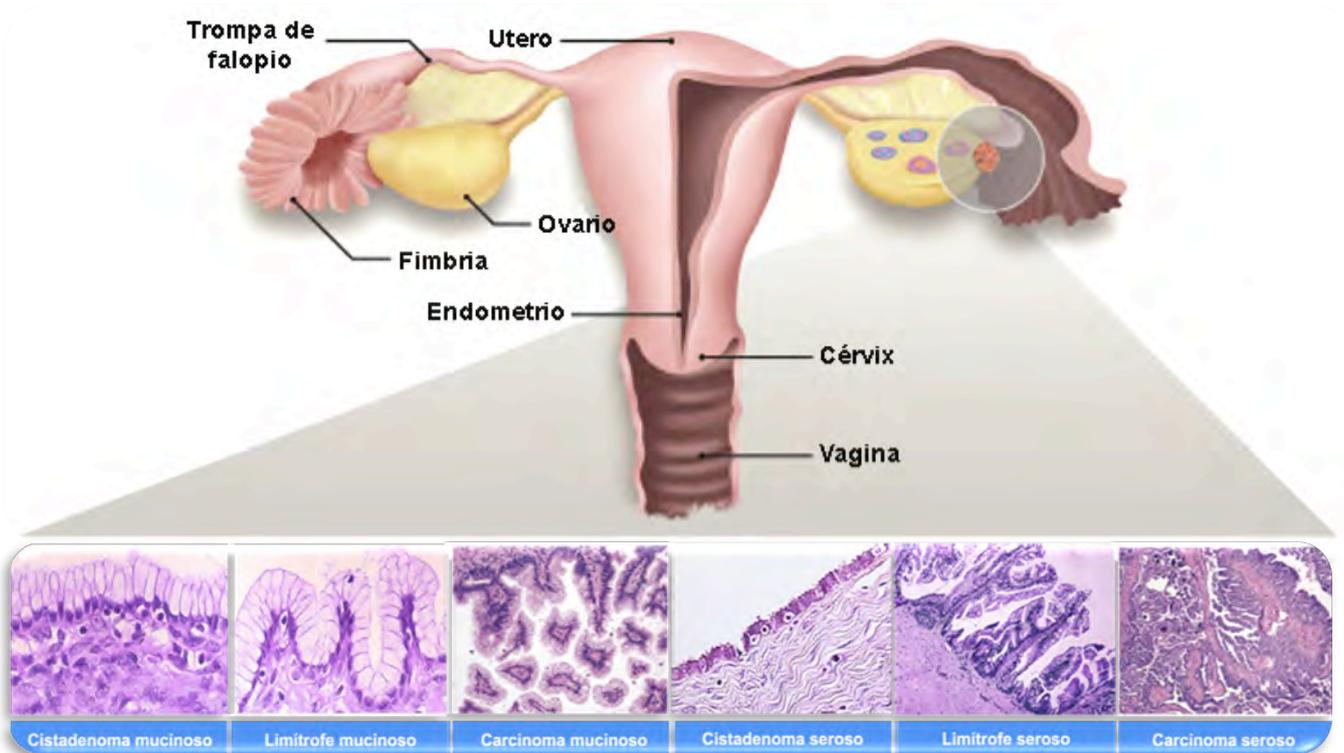
### **Tumores Serosos**

Los tumores serosos son las neoplasias mas comunes en CaO, representan el 70% de todos los tumores epiteliales de ovario. Se caracterizan por ser de tipo cilíndrico ciliado pseudoestratificado, simulando al de la trompa de Falopio (Fig. 2) (14).

Histológicamente, el cistadenoma es un quiste unilocular, con una superficie lisa y lleno de fluido seroso, aunque algunas veces consiste de quistes multiloculares. Se compone de células cuboidales alargadas ciliadas y no ciliadas, con núcleos elongados (15).

Los tumores limítrofes son frecuentemente grandes y bilaterales, con áreas quísticas y crecimiento papilar. Este tipo de tumor seroso, raramente presenta áreas sólidas o focos de hemorragia y necrosis. Las células que lo componen son parecidas a los cistadenomas pero con menos células ciliadas y poca actividad proliferativa. Las células se encuentran estratificadas en varias capas, formando mechones. Se caracterizan por presentar patrones de crecimiento tipo papilar y glandular. Muestran una atipia nuclear y figuras mitóticas, pero no tan marcadas como los carcinomas. No se observa invasión hacia el estroma.

El carcinoma seroso es generalmente grande y bilateral, muestra una mezcla de patrones quísticos, papilares y crecimiento sólido. El carcinoma invade a través de la cápsula ovárica y crece en la superficie del ovario. En este tipo de neoplasia, son comunes los focos de hemorragia y necrosis, se caracterizan por tener células mas extensas, un crecimiento celular mayor, una atipia nuclear mas marcada que los cistadenomas o limítrofes y se observa una invasión al estroma (14, 15).



**Figura 2.** Tumores epiteliales de ovario. Las fotografías muestran secciones representativas teñidas con hematoxilina y eosina de los tumores mucinosos (cistadenoma, limitrofe y carcinoma). Y los diferentes tipos de tumores serosos (cistadenoma, limitrofe, carcinoma).

### Invasión y metástasis

Durante la progresión del cáncer, algunas células tumorales adquieren la capacidad de invadir tejidos del huésped, llevando eventualmente a la diseminación metastásica. Este proceso de invasión requiere interacciones específicas de la matriz celular y actividades proteolíticas. La degradación de la matriz extracelular (MEC) durante la invasión tumoral y la angiogénesis se pueden liberar moléculas activas almacenados en la matriz y/o la generación de fragmentos activos de componentes de la matriz que promueven el crecimiento tumoral, la invasión y la angiogénesis (16, 17).

Como ya se mencionó, la invasión y metástasis se relaciona con la malignidad y son las principales causas de la progresión del cáncer. Las células tumorales se encuentran rodeadas por matriz extracelular, la cual contiene proteoglicanos y componentes no proteoglicanos (colágena, laminina, fibronectina y elastina). La degradación de la matriz extracelular permite que las células tumorales se desprendan de la masa tumoral primaria, invadan tejido local y construyan formaciones metastásicas. Se conocen cuatro clases de proteinasas capaces de romper casi todos los componentes de la matriz extracelular: serín proteasas, aspártico proteasas, cistein proteasas y las metaloproteasas de matriz (MMP) (18, 19, 20).

Trabajos previos han demostrado que las MMP facilitan la invasión y metástasis en general. Comparado con tejido sano, la expresión y activación de las MMP se incrementa en la mayoría de tipos de cáncer. Asimismo las MMP juegan un papel muy importante en múltiples procesos fisiológicos donde se requiere remodelado de tejido (ej. cicatrización de heridas, embriogénesis, angiogénesis y ovulación). Existe una regulación precisa entre la activación y la inhibición de la proteólisis, pero en cáncer este balance fisiológico parece ser interrumpido (21, 22, 23, 24).



## Metaloproteasas de la matriz

La matriz extracelular (MEC) proporciona un marco estructural para soportar células y mantener funciones celulares mediante interacciones célula-célula o célula-MEC. La degradación de los componentes de la matriz extracelular esta mediada por enzimas proteolíticas llamadas metaloproteasas de la matriz (MMP) (18). Existen muchas evidencias que apoyan la posibilidad que estas proteinasas median muchos de los cambios del microambiente durante la progresión tumoral. Estas enzimas regulan diversos procesos fisiológicos y eventos de señalización y representan piezas clave en la comunicación molecular entre el tumor y el estroma (22, 23).

Las MMP son una familia de endopeptidasas zinc-dependientes que participan en procesos como remodelación de tejidos y desarrollo de órganos, en procesos de regulación, de inflamación, en enfermedades como cáncer, artritis y enfermedades cardiovasculares. Esta familia se conforma por un mínimo de 24 enzimas que se catalogan por sus características estructurales y sus sustratos al que son afines (19).

Su estructura general contiene tres subdominios comunes en todas las MMP, el dominio mínimo común contiene tres regiones principales: una secuencia señal amino terminal (Pre) a ser escindida por la peptidasa señal durante la entrada en el retículo endoplásmico, un pro-dominio (Pro) que contiene un grupo tiol (-SH) y un punto de corte de furina y el dominio catalítico con un sitio de unión a zinc ( $Zn^{2+}$ ).

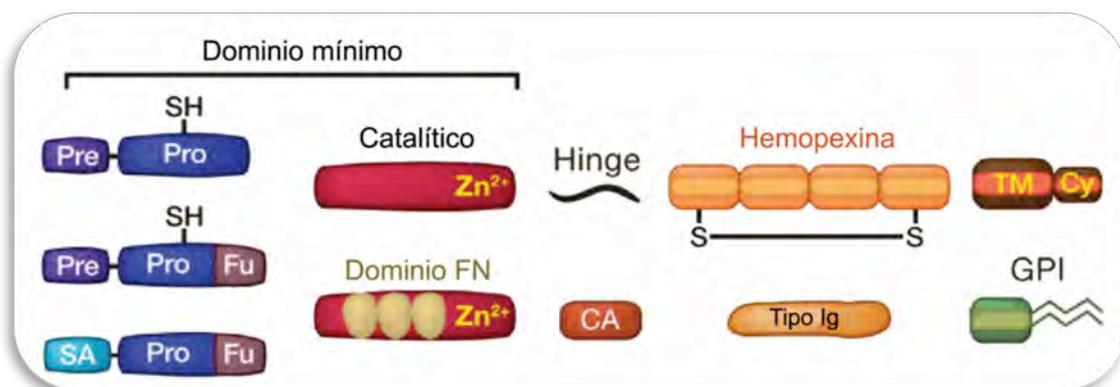


Figura 3. Estructura de las MMP. Dominio mínimo, región hemopexina y región *hinge* (bisagra).

Las MMP se mantienen como zimógeno inactivo debido a la interacción del grupo -SH del pro-dominio con el ion zinc del dominio catalítico, estas proteasas necesitan ser activados para unirse a su sustrato.

El mecanismo de activación del zimógeno involucra la ruptura de la interacción entre la cisteína conservada del pro-dominio y el zinc del sitio catalítico, la activación del zimógeno es mediada por proteasas intracelulares tipo furina, las cuales reconocen el motivo furina (Fu) entre el pro-dominio y el dominio catalítico. La mayoría de las MMP poseen una región tipo hemopexina, un dominio compuesto por cuatro repetidos que semejan hemopexina y contienen puentes disulfuro (S-S) entre el primer y ultimo subdominios, el cual esta vinculado al dominio catalítico vía la región bisagra (*hinge*). Las MMP pueden ser secretadas o ancladas a la membrana, si son ancladas a la membrana interviene un dominio transmembrana (TM) con un dominio citoplasmático (Cy) unidos a él, un glicosilfosfatidilinositol (GPI), o una señal amino-terminal de unión (SA) (19, 22).

La expresión de las MMP es regulada a tres niveles; nivel transcripcional, activación de la pro-enzima y por inhibición de la actividad proteolítica por inhibidores endógenos de las metaloproteasas de matriz (20).

- Regulación transcripcional: el control de la expresión génica y la secreción de las MMP es debido a una serie de citocinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6), factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), hormonas (esteroides) y promotores de tumor como el factor de necrosis tumoral (TNF) .

- Activación de la pro-enzima: las MMP se sintetizan como proenzimas latentes que requieren activación. La activación de las proenzimas esta mediada por la interrupción de la interacción cisteína-zinc y la eliminación del propéptido. Los principales mecanismos fisiológicos para esta activación son intracelulares por medio de furina, mecanismos extracelulares por medio de otras MMP y activación extracelular por agentes no proteolíticos como la plasmina, inhibidores de plasminógeno y especies reactivas de oxígeno.

- Inhibidores endógenos de las metaloproteasas de matriz: los inhibidores tisulares de las metaloproteasas de matriz (TIMP) son los inhibidores mas predominantes. Existen cuatro tipos de TIMP descritos, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Contienen dos dominios, el N-terminal y el C-terminal y de acuerdo a su dominio, se unen a las formas activas o latentes de las MMP en una proporción de 1:1 molecular, bloqueando el acceso de los sustratos al sitio activo o uniéndose al dominio hemopexina. El balance de las concentraciones relativas de las MMP y sus inhibidores activos determina la actividad proteolítica.

### **Familia de las Metaloproteasas de matriz (MMP)**

En base a su especificidad de sustrato, organización de dominio y su secuencia homóloga, las MMP se clasifican en seis grupos: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas, tipo-membrana (MT-MMP) y otros tipos no específicos (18, 19).

#### **Colagenasas**

Dentro de este grupo se incluyen la colagenasa-1 (MMP-1, colagenasa intersticial), colagenasa-2 (MMP-8, colagenasa neutrófila) y colagenasa-3 (MMP-13). Se caracterizan por su capacidad de degradar las fibras mayores de colágeno, las cuales son las mas abundantes en los componentes estructurales del tejido conectivo. Todas estas MMP degradan colágeno tipo I, II y III en sitios específicos, generando fragmentos N-terminal y C-terminal, que rápidamente se desnaturalizan a temperatura ambiente y se vuelven susceptibles a la degradación por otras MMP.

#### **Gelatinasas**

Las gelatinasas tienen un dominio extra de fibronectina localizado dentro del dominio catalítico y son muy eficientes en digerir colágeno desnaturalizado o gelatina. La MMP-2 degrada colágeno, elastina, fibronectina y varias quimiocina y activa a la proMMP-1 y proMMP-9. Es constitutivamente expresada en muchas células y tiene funciones muy importantes en migración celular, inflamación y metástasis. La MMP-9 contiene una secuencia tipo V tipo

colágeno entre el dominio catalítico y el de hemopexina. Esta gelatinasa degrada eficientemente colágeno desnaturalizado, colágeno tipo IV, V y XI, así como elastina (18).

### **Estromelisinias**

Las estromelisinias pueden digerir diferentes tipos de sustratos, incluyendo proteoglicanos, fibronectina, laminina, caseína, gelatina, colágeno (tipo IV, IX y X), tenascina, vitronectina y decorita. La MMP-3 se expresa en células del estroma durante el desarrollo de glándulas mamarias, también juega un papel importante en enfermedades de hueso y cartílagos. La MMP-10 se ha detectado en carcinomas, en tejido de cicatrización de heridas.

### **Matrilisinias**

En este grupo se encuentran la MMP-7 y la MMP-26, estas metaloproteasas carecen de la región *hinge* y del dominio hemopexina. La MMP-7 tiene una amplia gama de sustratos incluyendo colágeno tipo IV, laminina y entactina.

### **Tipo-membrana (MT-MMP)**

Estas MMP son mediadoras importantes de la proteólisis pericelular, que pueden modular diversas funciones, como la proliferación, apoptosis, diferenciación y migración. El grupo incluye cuatro enzimas transmembrana de tipo I (MMP-14, -15, -16 y -24) y dos proteasas de glicosilfosfatidilinositol ancladas (MMP-17 y -25). Todas las MT-MMP tienen un dominio de corte de furina en el final del pro-péptido y por tanto se expresan en la forma activa (20).

### **Otros tipos de MMP**

Por último, este grupo se compone de MMP clasificadas juntas, en secuencia y especificidad de sustrato en comparación con los cinco grupos anteriores. La enamelisina o MMP-20 esta dentro de este grupo y se ha sugerido que realiza cortes de proteína de la matriz de esmalte, que son esenciales para la eliminación de proteínas durante la fase de maduración del desarrollo del esmalte (19).



## Antecedentes

Como ya se menciona previamente, la invasión tumoral y metástasis son las principales causas para la progresión de diversos tipos de cáncer y existe evidencia que la expresión de las MMP está relacionada a estos eventos, (18, 34, 21, 24, 25).

Existen muchos estudios que muestran que la expresión y activación de las MMP, se ve incrementada en casi todos los tipos de cáncer humanos, en comparación con tejido sano, sugiriendo que estas proteínas se ven involucradas en estos eventos que son indispensables en la carcinogénesis (35, 36).

Dentro de diversos estudios de expresión de estas proteínas, las más estudiadas han sido la MMP-2, -7 y -9 (37). Por lo tanto, es de vital importancia conocer el papel de los otros tipos de MMP, por lo que este trabajo se enfocó en el grupo de las colagenasas, por ser el tipo de MMP que en su mayoría degradan colágeno, siendo uno de los componentes principales de la matriz extracelular (26, 27, 28, 29, 30).

En específico el grupo de las colagenasas (MMP-1, -8 y -13) han sido ampliamente estudiadas en diferentes tipos de tejidos y líneas celulares y se han visto involucradas en diferentes tipos de carcinomas. En un trabajo utilizando la sangre periférica y médula ósea de pacientes con cáncer gástrico, se analizaron los niveles del mRNA de la MMP-1, obteniendo diferencias de expresión comparando con individuos sanos, infiriendo que la expresión del mRNA en sangre periférica podría ser útil como marcador para metástasis distante en cáncer gástrico (26). Otro trabajo con resultados similares, analizaron suero de pacientes con la misma neoplasia, utilizando la técnica de ELISA, obteniendo un incremento en los niveles de la MMP-1 comparado con individuos sanos (38). Asimismo evaluando los niveles de mRNA, en líneas celulares de cáncer colo-rectal, se observó que existe una sobreexpresión de la MMP-13. Correlacionando estos resultados con los datos clinicopatológicos, se sugiere que los pacientes que poseen una sobreexpresión de esta proteína, tienen un mayor riesgo a una recaída post-operatoria, por lo que podría ser un

marcador pronóstico potencial para pacientes con cáncer colo-rectal (27). Otro grupo, compartiendo resultados al trabajo previo, analizaron de igual forma los niveles de expresión de la MMP-13 en pacientes con cáncer colo-rectal, donde se observó una mayor expresión en tejido tumoral que en tejido sano, asimismo observaron una correlación de esta expresión con metástasis hepática, concluyendo que la expresión génica de la MMP-13 es un predictor útil de las metástasis hepáticas en pacientes con cáncer colo-rectal (39).

La técnica de microarreglos de cDNA también ha sido utilizada para el estudio de las MMP, un grupo generó los perfiles de expresión génica de la MMP-1 en dos líneas celulares de osteosarcoma. Los resultados obtenidos sugieren que la MMP-1 juega un papel central en la invasión de osteosarcoma. En consecuencia, la MMP-1 podría ser un biomarcador y una estrategia terapéutica para los osteosarcomas invasivos (28). En otro trabajo, utilizando esta misma técnica, se seleccionaron 371 genes sobreexpresados en diferentes tipos de carcinoma de mama y se encontró que la MMP-13 se sobreexpresó en un 100% y se confirmó como una proteína secretada por análisis de *western blot*, sugiriendo que esta proteína puede ser un buen marcador para el diagnóstico de cáncer de mama (40).

Asimismo, existen otros trabajos donde se analizaron pacientes con cáncer de mama, utilizando la técnica de inmunohistoquímica. Obteniendo como resultado un incremento en la expresión de la MMP-1 con respecto a pacientes sin esta neoplasia (41). El grupo de Mannello (29), al analizar la expresión de la MMP-1, sugiere que dicho incremento tiene una correlación con un pobre resultado clínico en pacientes con cáncer de mama.

Por otro lado el papel que juega la MMP-8 en diferentes tipos de cáncer ya estudiados, es contrario al de las otras colagenasas. Se ha observado que esta proteína, inhibe la invasión o metástasis tumoral, por lo que actúa negativamente ante una neoplasia.

En un trabajo donde se estudiaron la MMP-1, -8 y -13, utilizando cultivos celulares de osteosarcomas, se realizaron análisis de *western blot*, inmunohistoquímica y PCR tiempo real. La expresión del mRNA fue mayor para la MMP-13 en todos los cultivos celulares. En la prueba de *western blot* se observó una gran expresión de la MMP-1 y -13 mientras que la MMP-8 no la

mostró. En el análisis de inmunohistoquímica se ve la localización de la MMP-1 y -13 en células del estroma mientras que la MMP-8 no se detecta en ninguna línea celular. Por lo tanto los resultados muestran que las células producen la MMP-1 y -13 pero no la MMP-8 (30).

En otro estudio que tuvo como objetivo evaluar los niveles plasmáticos de la MMP-1 y MMP-8 como marcadores diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama, utilizando la prueba de ELISA, los resultados sugieren que la MMP-8 puede afectar el comportamiento metastásico de las células de cáncer de mama a través de la protección contra la metástasis de ganglios linfáticos (42). Confirmando estos datos, un trabajo realizado en pacientes con cáncer de mama, reveló que la expresión de esta metaloproteasa se correlaciona con una menor incidencia de metástasis en ganglios linfáticos y le confiere un buen pronóstico a las pacientes. Sobre esta base, se propone que la MMP-8 es un factor de protección ante el tumor y que también tiene la capacidad de reducir el potencial metastásico de células malignas en humanos (43).

Con los datos antes mencionados, se puede tener un panorama general del rol de las colagenasas MMP-1, -8 y -13, en diferentes tipos de cáncer, utilizando múltiples técnicas para su estudio. Asimismo existe evidencia, que la expresión de las MMP está relacionada con la progresión de tipos de cáncer ginecológicos, como por ejemplo el caso del cáncer de endometrio (31, 44), el carcinoma cervical (45) y el carcinoma de ovario (46). Sin embargo, sólo pocos miembros de las MMP han sido investigadas, en estos tipos de tejido.

Para Cáncer de Ovario la MMP-2, -9 y -14 son las que se encuentran entre las más estudiadas como biomarcadores. La actividad de la MMP-9 en tejidos fue significativamente mayor en el cáncer de ovario avanzado, en comparación con los tumores benignos y se encontró que era un marcador de mal pronóstico (47). En otro estudio de cáncer de ovario epitelial invasivo, la alta expresión en el estroma de la MMP-9 y -14 fue significativamente correlacionado con la progresión de cáncer (48). También se ha reportado la correlación de la MMP-2 con la progresión del CaO (49).

Sin embargo son pocos los estudios de estas proteasas en los diferentes estadios del cáncer de ovario, ya que la mayoría de estos trabajos se enfocan solamente en los tumores malignos.

Con el fin de ampliar el conocimiento del rol de las MMP en Cáncer de Ovario, en este trabajo se analizó la expresión epitelial de las colagenasas MMP-1, MMP-8 y MMP-13 en dos diferentes tipos de tumores epiteliales (mucinosos y serosos), por ser los mas incidentes y agresivos y en sus diferentes grupos (cistadenomas, limítrofes y carcinomas). Y con esto poder establecer si se encuentran o no expresadas, o bien sobreexpresadas en tejido sano de ovario, en lesiones no invasoras y lesiones malignas, para determinar cual MMP es exclusiva de las lesiones analizadas y poder observar una asociación a la invasión y así establecer, si hubiera, un patrón característico para estos tipos de tumores de ovario. De igual manera, sugerir la agresividad que se puede presentar en cada tumor y poder efectuar en un futuro mejores terapias o métodos pronóstico y diagnósticos de esta neoplasia.

## JUSTIFICACIÓN

El cáncer de ovario es un problema de salud pública prioritario en México, ya que se encuentra en los primeros tipos de cáncer en mujeres, con una incidencia y mortalidad importantes. Asimismo la etiología de esta neoplasia no se conoce con certeza y no existen pruebas pronóstico temprano, por lo cual es de vital importancia su estudio.

Las metaloproteasas de matriz son una familia de endopeptidasas que se han visto relacionadas de manera importante en los procesos de invasión y metástasis. Existen varios trabajos donde señalan una alta expresión de algunas MMP en CaO, sin embargo no existen estudios del grupo de las colagenasas en tumores mucinosos y serosos de ovario y sus diferentes tipos (cistadenoma, limítrofe y carcinoma).

La correlación entre la expresión de las MMP-1, -8 y -13 y el estadio de los tumores de ovario podría tener un valor pronóstico y/o diagnóstico, asimismo establecer si existe progresión en el CaO por lo que este estudio brindará mas información sobre la biología de esta neoplasia.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. ¿Las colagenasas MMP-1, -8 y -13 se expresan en tejido sano y lesiones de ovario?
2. ¿Habrá diferencias de expresión de estas MMP entre tejido sano, lesiones benignas y malignas?
3. ¿Habrá diferencias en la expresión de las MMP-1, -8 y -13 en lesiones benignas y malignas?

## HIPÓTESIS

1. Se encontrará una expresión epitelial basal de la MMP-1, -8 y -13 en tejido sano de ovario y habrá un incremento de dicha expresión en las diferentes lesiones del ovario.
2. Existirán diferencias significativas en la expresión epitelial de las MMP estudiadas, comparando el tejido sano con lesiones benignas y malignas.
3. Se detectará una mayor expresión epitelial de la MMP-1, -8 y -13 en lesiones malignas que en benignas.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

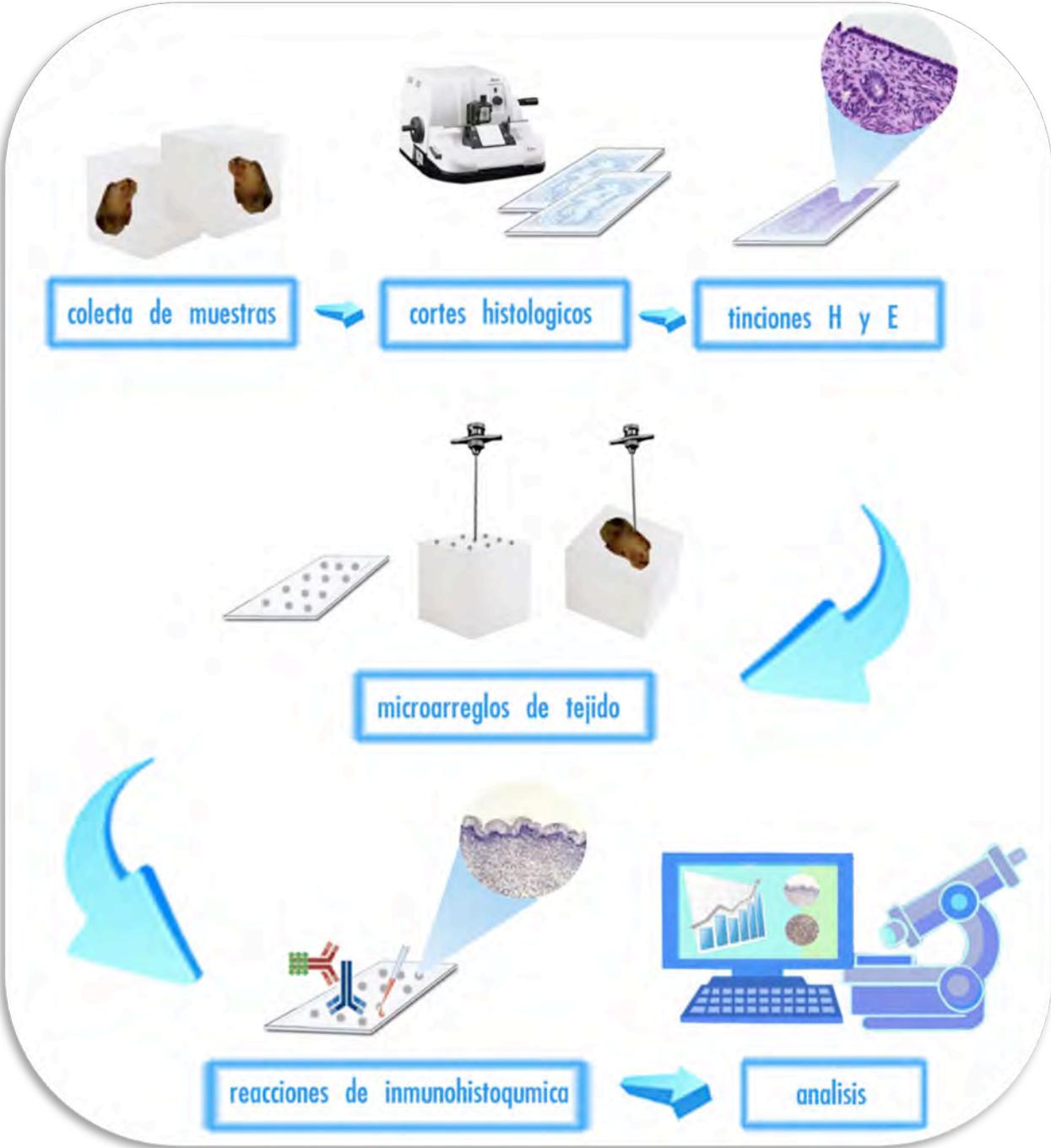
- ✚ Analizar la presencia de las colagenasas MMP-1, -8 y -13 en epitelio sano de ovario y en tumores mucinosos y serosos.

### Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de las colagenasas MMP-1, -8 y -13 en epitelio sano de ovario.
2. Determinar la presencia de las colagenasas MMP-1, -8 y -13 en las diferentes lesiones de ovario: cistadenomas, límitrofes y carcinomas, en tumores mucinosos y serosos.
3. Realizar el análisis de la expresión protéica de las colagenasas en tejidos de ovario.

# DISEÑO EXPERIMENTAL

A continuación se muestra un diagrama de los pasos realizados en este proyecto de investigación:



### Colecta de las muestras

Las muestras se obtuvieron de los archivos de los Servicios de Patología de los hospitales: Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 IMSS y Hospital General de México, siguiendo los lineamientos de ética de cada hospital y con el consentimiento informado de cada paciente.

Se colectaron 30 muestras de cistadenoma mucinoso, 15 muestras de tumor limítrofe mucinoso y 15 muestras de carcinoma mucinoso, para los tumores serosos se colectaron 30 muestras de cistadenoma, 30 muestras de tumores limítrofes serosos, 30 muestras de carcinoma serosos, de igual forma se colectaron 15 muestras de ovario sano, las cuales se obtuvieron de ooforectomías e hysterectomías. Los controles positivos utilizados fueron muestras de diferentes tejidos (tumoraes y tejido sano) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Cantidad y tipo de muestras colectadas.

<b>Muestra</b>	<b>Cantidad</b>	
Ovario sano		15
Tumores mucinosos	└ Cistadenomas Limítrofes Carcinomas	30 15 15
Tumores serosos	└ Cistadenomas Limítrofes Carcinomas	30 30 30
Tejidos control		35
<b>Total</b>		200

### **Criterios de Inclusión**

- Paciente con diagnóstico definitivo de los diferentes tipos de tumores de ovario (mucinosos, serosos).
- Pacientes con historial clínico accesible.
- Tener más de 1 laminilla extra, para ser almacenada en su archivo clínico.

### **Criterios de exclusión**

- Pacientes que no cumplan con los criterios de inclusión.
- Mujeres que hayan recibido tratamiento de quimioterapia y/o radioterapia.

### **Cortes histológicos**

Ya obtenidas las muestras se realizaron cortes histológicos de 5µm de espesor, utilizando un microtomo marca Leica. Se colocaron los cortes de parafina en agua a 60 °C con gelatina y se tomaron con un porta objetos (laminillas para cada una).

### **Tinción de hematoxilina-eosina (H y E)**

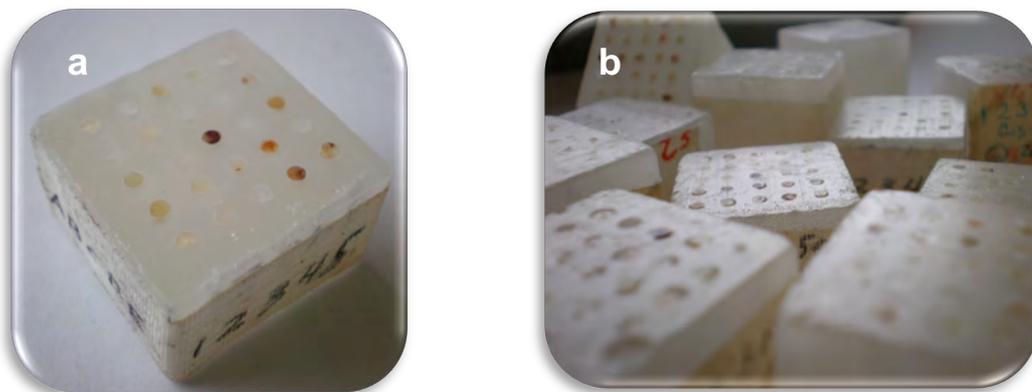
Los cortes obtenidos, se desparafinaron a 60 °C durante 20 min, se incubaron en xilol absoluto, se rehidrataron con alcoholes graduales (100, 90, 70, 30 %) durante 5 minutos cada uno y al finalizar en H<sub>2</sub>O destilada, posteriormente se tiñeron con Hematoxilina de Harris por 1 minuto, se enjuagaron con PBS 1X, se tiñeron en eosina por 30 segundos, se viró la reacción con agua amoniacal y se deshidrataron con alcoholes graduales (30, 70, 90 y 100 %). Por último, se viró resina para cubrirlos con el cubreobjetos. Se observaron las laminillas en un microscopio confocal (Leitz) y se localizó el área en donde se encontraba la lesión, con la ayuda de un patólogo; posteriormente se localizó la misma área en los bloques de parafina.

### Construcción de los microarreglos de tejido (MAT)

Con el área seleccionada por los patólogos como representativa de la muestra de los bloques de parafina, a partir de las tinciones H y E, se tomó un trozo de muestra utilizando un agujero para toma de muestra de médula ósea, con lo que se obtuvo un cilindro que fue insertado en un bloque de parafina en blanco, que previamente fue horadado con 25 perforaciones.

Una vez completado cada uno de los MAT, se adicionó un poco de parafina líquida para que las muestras se fijaran en el bloque receptor. Posteriormente, se realizaron los cortes histológicos de 5µm de espesor, de cada uno de los MAT construidos, siguiendo el mismo protocolo de corte ya mencionado.

Se realizaron 2 arreglos para cada tipo de tumor los cuales se hicieron por triplicado para evitar pérdida de tejido y optimizar la representación de los tumores (Fig. 4).



**Figura 4.** Microarreglos de tejido. a. MAT de ovario sano, b. Imagen de los MAT de todas las muestras obtenidas, para cada tipo de tumor.

## Reacciones de Inmunohistoquímica

Las laminillas obtenidas de los cortes se utilizaron para realizar las reacciones de inmunohistoquímica. Cada una de ellas contenía dos cortes (dos arreglos de tejido por laminilla), para utilizar un corte como control negativo de reacción. Para realizar estas reacciones se utilizó el *kit* de inmunodetección Ratón/Conejo con el sistema Biotina-Estreptavidina-Peroxidasa (Mouse/Rabbit HRP/DAB, Bio SB).

Se desparafinaron a 60 °C durante 20 min, se incubaron en xilol absoluto por 15 minutos, posteriormente se rehidrataron los tejidos con alcoholes graduales (100, 90, 70, 30 %) por 5 minutos en cada uno y por último se colocaron las laminillas en H<sub>2</sub>O destilada.

Ya hidratado el tejido, las laminillas se colocaron en una solución para la exposición de antígenos (Trilogy 1X, Cell Marque), previamente calentada a 90 °C y se mantuvieron a esa temperatura durante 20 minutos. Posteriormente se colocaron en PBS 1X y se colocaron en cámaras húmedas.

Se les colocó el bloqueador de peroxidasa endógena (ImmunoDetector Peroxidase Protein Peroxidase Blocker), durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Al término se lavaron 3 veces en PBS 1X.

Se colocaron las laminillas de nuevo en las cámaras húmedas para ser incubadas con el anticuerpo primario (MMP-1 ab52631, dilución 1:250; MMP-8 ab81286, dilución 1:200; MMP-13 ab3208, dilución 1:100). Se mantuvieron a TA durante 1 hora y media. Se colocó anticuerpo primario solamente a uno de los cortes de cada laminilla, para tener un control negativo de reacción y se pudiera corroborar la efectividad de la reacción, obteniendo una tinción azul sin que se observará el precipitado café como para los tejidos donde se colocó el anticuerpo primario.

Al finalizar el tiempo de incubación con el anticuerpo primario se lavaron los tejidos 3 veces en PBS 1X, para colocar el anticuerpo secundario conjugado a Biotina (ImmunoDetector Biotin Link) durante 15 minutos a TA. Se realizaron 2 lavados en PBS 1X al término del tiempo y se les colocó la Estreptavidina conjugada con peroxidasa para amplificar la señal de la reacción (ImmunoDetector HRP Label) también durante 15 minutos.

Al finalizar el tiempo de incubación se lavaron las laminillas en PBS 1X y se realizó el revelado de la reacción utilizando Diamino Bencidina (ImmunoDetector DAB Chromogen/ ImmunoDetector DAB Buffer), durante 10-20 segundos. Se contratiñó con Hematoxilina de Harris y se viró la reacción con agua amoniaca.

Se deshidrataron los tejidos con alcoholes graduales (30, 70, 90 y 100 %) un minuto por cada uno, posteriormente colocandolos en xilol absoluto. Por último, se vertió resina para cubrir las laminillas con el cubreobjetos.

### **Análisis semi-cuantitativo**

El análisis de los MAT se realizó por microscopía confocal (Olympus Microscope) a un objetivo de 40x. Los resultados de la inmunohistoquímica fueron calificados por cuatro observadores, la discordancia entre ellos no excedió el 5%.

### **Análisis estadístico**

Las reacciones de inmunohistoquímica fueron analizadas por el *HSCORE* (32). El cual se obtuvo mediante la multiplicación de la intensidad de la reacción por el porcentaje de células teñidas. La intensidad de la reacción se calificó en una escala de 4 puntos: 0, no hubo reacción; 1, reacción leve; 2, moderada; 3, intensa, esto se realizó para cada tipo de tumor. De igual forma se realizó la evaluación para determinar el porcentaje de células que presentaba cada reacción (0-100%). Con los datos obtenidos de cada evaluador se obtuvo la moda para obtener un solo valor para cada muestra. Es importante mencionar que el número mínimo de muestras a utilizar en el análisis fue de 5 muestras.

Ya obtenido el *HSCORE* se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de Tukey, para observar la diferencia significativa entre los grupos. Utilizando el programa estadístico *Prism 5 GraphPad*. Los valores de p fueron  $\leq 0.05$  para considerarlos significativamente diferentes.

## RESULTADOS

### Colecta de muestras

Como se mencionó previamente, se colectaron un total de 200 muestras, que incluyeron: tejido sano de ovario, tumores mucinosos y serosos (cistadenomas, limítrofes y carcinomas) y tejidos control. Sin embargo es importante mencionar que durante el proceso de análisis histopatológico llevado a cabo por los patólogos se descartaron muestras por no cumplir con los criterios de calidad.

Asimismo, durante el proceso de cortes histológicos y reacciones de inmunohistoquímica se fueron perdiendo muestras, ya que estos procesos son un tanto agresivos para los tejidos.

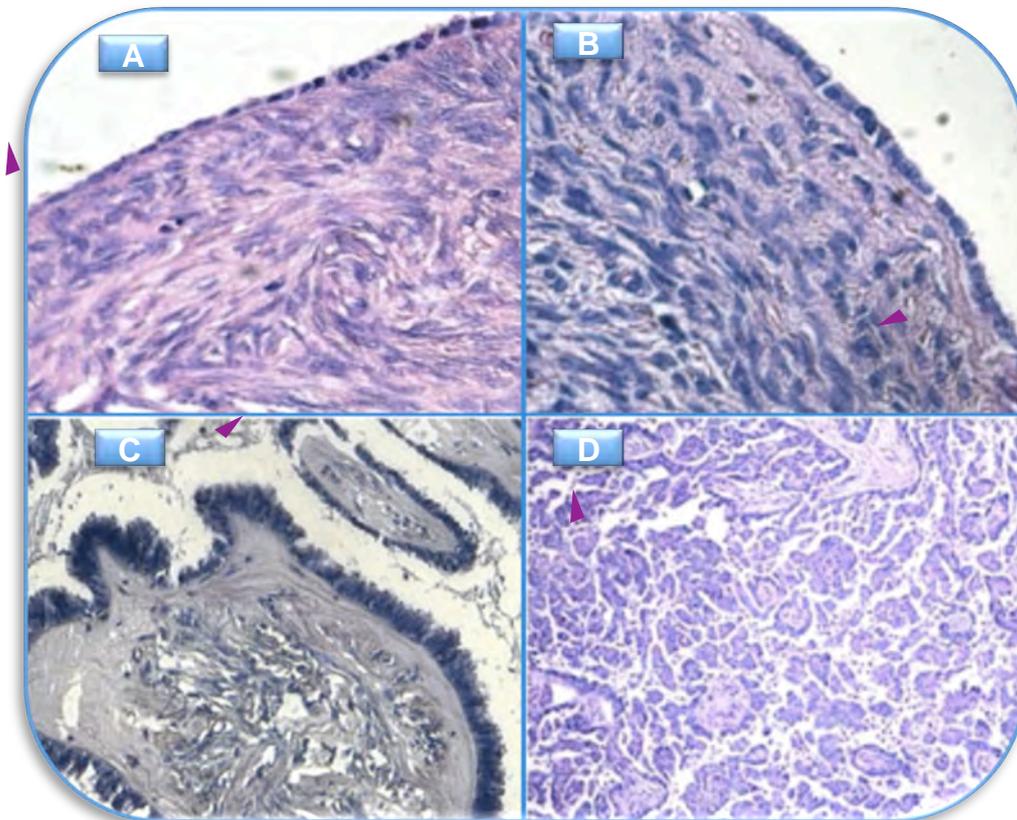
Por lo tanto se analizaron un número menor de muestras a las colectadas y el número de muestras analizadas por cada MMP varía (Tabla 2).

**Tabla 2.** Cantidad y tipo de muestras analizadas.

Muestra		Cantidad		
		MMP-1	MMP-8	MMP-13
Ovario sano		7	5	7
Tumores mucinosos	Cistadenomas	23	26	23
	Limítrofes	6	8	16
	Carcinomas	2	4	4
Tumores serosos	Cistadenomas	22	20	13
	Limítrofes	26	29	28
	Carcinomas	22	26	29

## Tejidos de ovario con tinciones hematoxilina y eosina (H y E)

Las lesiones de ovario se identificaron en los cortes histológicos teñidos con H y E en donde se clasificaron como: cistadenoma seroso, tumor limítrofe seroso y carcinoma seroso (Fig. 5), lo mismo se realizó para los tumores mucinosos. Para las muestras de ovario sano, se observó un epitelio simple que iba de aplanado a cilíndrico (Fig. 5A), para los cistadenomas, el epitelio se observó como cilíndrico, en algunas ocasiones ciliado y se encontraba como una inclusión dentro del tejido estromático (Fig. 5B), para los tumores serosos limítrofes se observó una mayor proliferación celular, mostrando un epitelio pseudoestratificado, pero sin invasión al estroma (Fig. 5C) y para los carcinomas, en general se observó que las células neoplásicas ya invadían al tejido estromático (Fig. 5D).



**Figura 5.** Cortes histológicos de tejidos de ovario. A. Sano, B. cistadenoma seroso, C. tumor limítrofe seroso y D. carcinoma seroso. La histomorfología celular así como la capacidad proliferativa es diferente entre los diferentes tipos de muestras (aumento de 200x). Se buscó la zona de interés (células encerradas en óvalos) para la construcción de los MAT.

## Reacciones de inmunohistoquímica

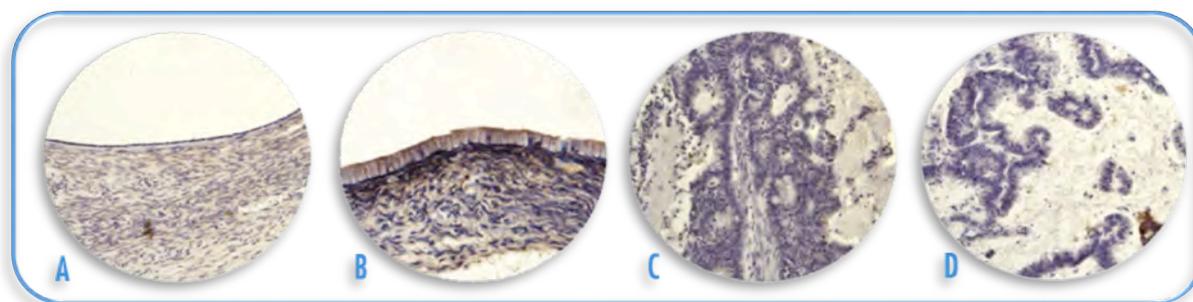
De acuerdo a los criterios de evaluación de la reacción de inmunorreactividad, las muestras fueron analizadas para cada una de las MMP:

### Expresión de la colagenasa MMP-1 en tumores mucinosos de ovario

Para los tumores mucinosos de ovario se analizaron un total de 38 muestras distribuidas en los diferentes grupos (Tabla 3). Cabe mencionar que para el grupo de carcinomas mucinosos, solo se obtuvieron 2 muestras por lo que se descartaron del análisis estadístico.

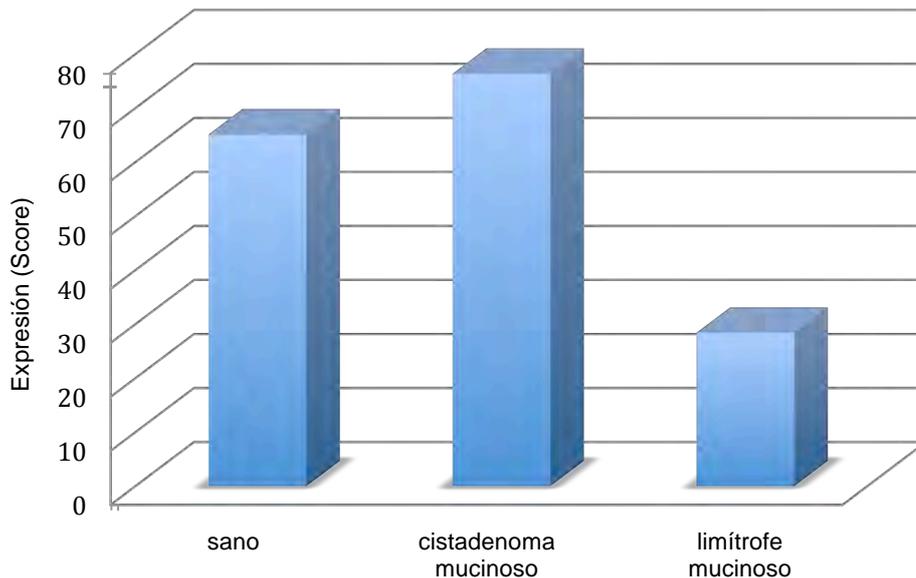
**Tabla 3.** Número de muestras con expresión de la colagenasa MMP-1, en tumores mucinosos de ovario así como tejido sano.

Reacción		Grupo			
		Sano	Cistadenoma mucinoso	Limítrofe mucinoso	Carcinoma mucinoso
Negativa	-	0	0	1	0
Positiva leve	+	3	8	4	2
Positiva media	++	4	8	1	0
Positiva intensa	+++	0	7	0	0
Total de muestras		7	23	6	2



**Figura 6.** Identificación de la expresión de la MMP-1 en ovario. Reacciones representativas de la MMP-1 en tejidos de ovario, (A) tejido sano, (B) cistadenoma mucinoso, (C) límite mucinoso y (D) carcinoma mucinoso.

En la figura 6 se muestran fotografías de los cortes de los microarreglos de tejido, tomadas posteriormente a la realización de las reacciones de inmunohistoquímica, utilizando un zoom de 40x. Para el tejido sano (Fig. 6A) se observa una tinción leve homogénea, mientras que para el cistadenoma mucinoso (Fig. 6B) la tinción es mas intensa, sin embargo en los tumores limítrofes y carcinomas (Fig. 6C y D) se observa un decremento en dicha coloración.



**Gráfica 2.** Expresión de la proteína MMP-1 en tumores mucinosos de ovario, \* $p \leq 0.05$ .

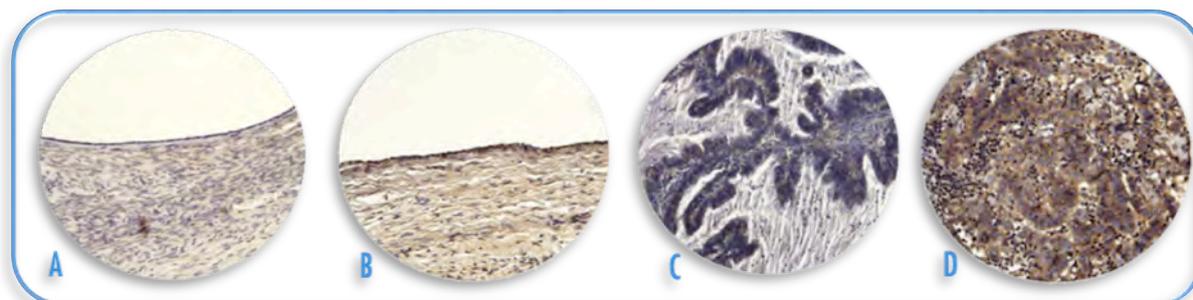
Para los tumores mucinosos podemos observar un comportamiento similar entre los cistadenomas y el tejido sano, por lo que no existen diferencias significativas si comparamos estos 2 grupos entre si (Gráfica 2). Asimismo, realizando el análisis de ANOVA con la prueba de Tukey obtenemos que no existen diferencias significativas entre el tejido sano con las lesiones limítrofes, de igual forma si se compara el grupo de los cistadenomas con los tumores limítrofes no hay cambios significativos en la expresión de la MMP-1, infiriendo que esta colagenasa no se ve modificada en el proceso de carcinogénesis en ovario para tumores mucinosos.

## Expresión de la colagenasa MMP-1 en tumores serosos de ovario

Se analizaron un total de 77 muestras distribuidas en los diferentes grupos (Tabla 4), para los tumores serosos de ovario.

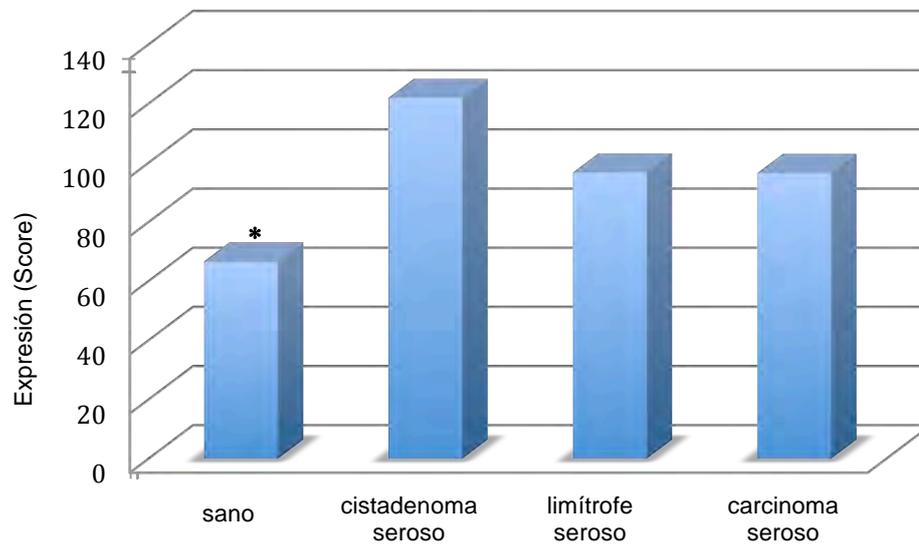
**Tabla 4.** Número de muestras con expresión de la colagenasa MMP-1, en tumores serosos de ovario así como tejido sano.

Reacción		Grupo			
		Sano	Cistadenoma seroso	Limítrofe seroso	Carcinoma seroso
Negativa	-	0	0	0	1
Positiva leve	+	3	1	7	2
Positiva media	++	4	7	8	8
Positiva intensa	+++	0	14	11	11
Total de muestras		7	22	26	22



**Figura 7.** Identificación de la expresión de la MMP-1 en ovario. Reacciones representativas de la MMP-1 en tejidos de ovario, (A) tejido sano, (B) cistadenoma seroso, (C) límite seroso y (D) carcinoma seroso. Zoom 40x.

En la figura 7 se muestran fotografías de los cortes de los microarreglos de tejido de tumores serosos. Para el tejido sano (Fig. 7A) se observa una tinción leve homogénea a lo largo del epitelio, mientras que para el cistadenoma seroso (Fig. 7B) la tinción es mas intensa comparado con el epitelio sano, sin embargo en el carcinoma la reacción se observa mucho mas intensa comparado con el tejido sano o los cistadenomas, mientras que las lesiones límites (Fig. 7C) la reacción es muy leve o casi nula.



**Gráfica 3.** Expresión de la proteína MMP-1 en tumores serosos de ovario, \* $p \leq 0.05$  vs. sano.

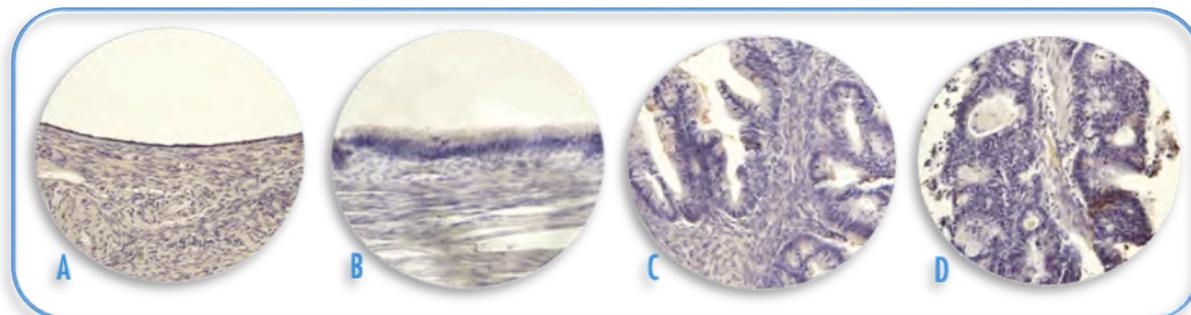
En la proteína MMP-1 se observó que existe una diferencia significativa para los tumores benignos (cistadenomas) comparados con el tejido sin lesión, asimismo hay un aumento en la expresión tanto para las lesiones límiteros como los carcinomas, contrastándolos con los tejidos sin neoplasia, pero estadísticamente no existen diferencias significativas. Sin embargo se observa una pequeña disminución para estos dos estadios (límitero y carcinoma) comparándolos con el cistadenoma seroso (Gráfica 3).

## Expresión de la colagenasa MMP-8 en tumores mucinosos de ovario

Para los tumores mucinosos de ovario se analizaron un total de 43 muestras distribuidas en los diferentes grupos (Tabla 5). Cabe mencionar que para el grupo de carcinomas mucinosos, solo se obtuvieron 3 muestras por lo que se descartaron del análisis estadístico.

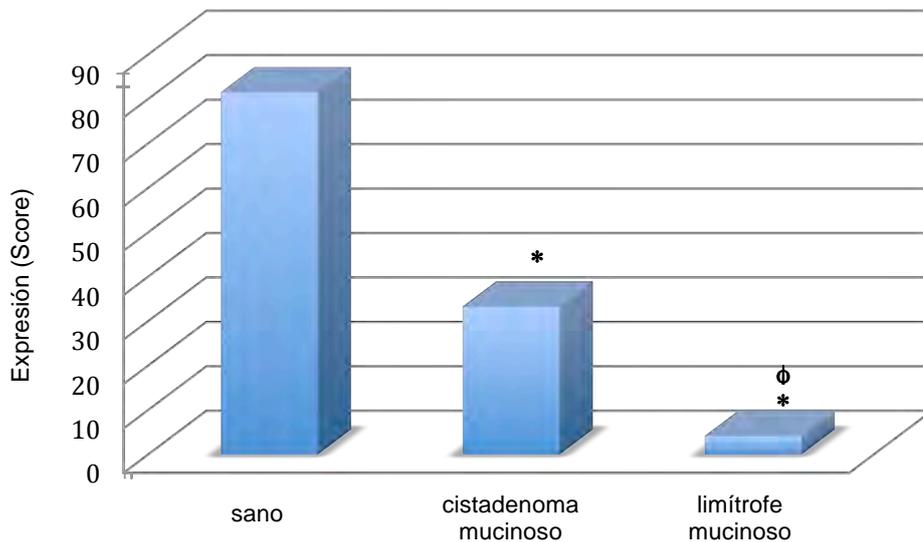
**Tabla 5.** Número de muestras con expresión de la colagenasa MMP-8, en tumores mucinosos de ovario así como tejido sano.

Reacción		Grupo			
		Sano	Cistadenoma mucinoso	Limítrofe mucinoso	Carcinoma mucinoso
Negativa	-	0	9	6	2
Positiva leve	+	2	15	2	2
Positiva media	++	3	2	0	0
Positiva intensa	+++	0	0	0	0
Total de muestras		5	26	8	4



**Figura 8.** Identificación de la expresión de la MMP-8 en ovario. Reacciones representativas de la MMP-8 en tejidos de ovario, (A) tejido sano, (B) cistadenoma mucinoso, (C) limítrofe mucinoso y (D) carcinoma mucinoso. Zoom 40x.

La expresión de la colagenasa MMP-8 en tejido sano de ovario (Fig. 8A) se observa como una reacción homogénea a nivel epitelial con una intensidad leve a media, comparando las imágenes con los tumores mucinosos de ovario se observa un decremento en la coloración de la reacción (Fig. 8 B, C y D).



**Gráfica 4.** Expresión de la proteína MMP-8 en tumores mucinosos de ovario, \* $p \leq 0.05$  vs. sano.  $\phi$   $p \leq 0.05$  vs. cistadenoma mucinoso.

Los tumores mucinosos de ovario muestran un decremento significativo en la expresión de la MMP-8 comparado con el tejido sano de ovario.

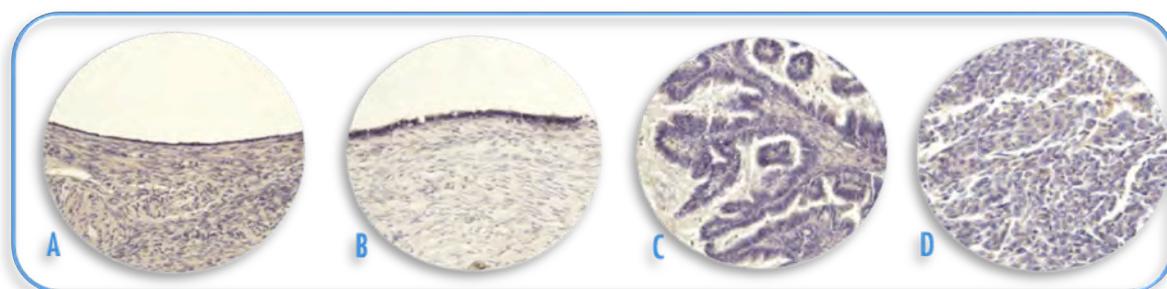
Asimismo, los cistadenomas mucinosos presentan poca expresión de la colagenasa comparándolo con el tejido sin lesión habiendo diferencias significativas. De igual forma se observa una disminución en la expresión de la MMP-8 en tumores limítrofes comparado con el tejido sano. Al comparar el grupo de los cistadenomas con el grupo limítrofe se observan cambios significativos (Gráfica 4).

## Expresión de la colagenasa MMP-8 en tumores serosos de ovario

Para los tumores serosos de ovario se analizaron un total de 80 muestras distribuidas en los diferentes grupos (Tabla 6).

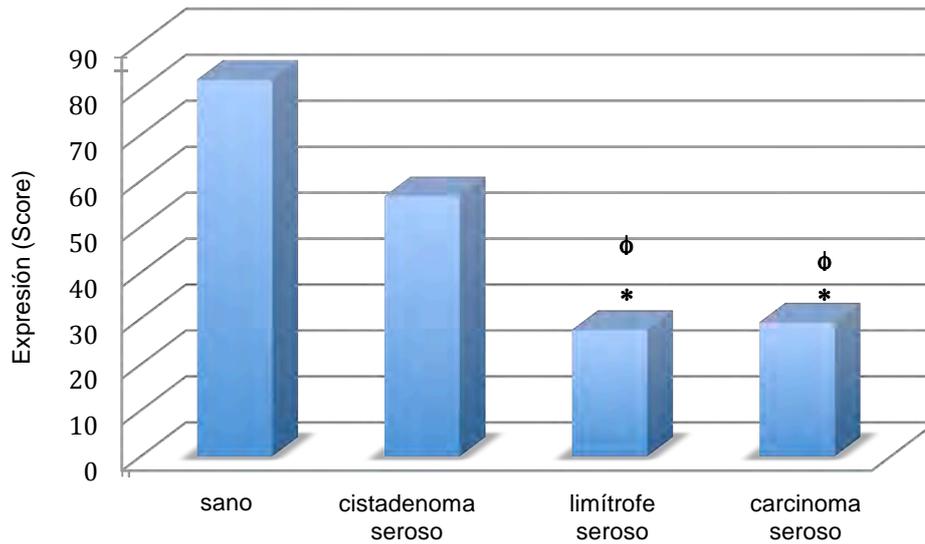
**Tabla 6.** Número de muestras con expresión de la colagenasa MMP-8, en tumores serosos de ovario así como tejido sano.

Reacción		Grupo			
		Sano	Cistadenoma seroso	Limítrofe seroso	Carcinoma seroso
Negativa	-	0	2	9	6
Positiva leve	+	2	6	20	17
Positiva media	++	3	9	0	3
Positiva intensa	+++	0	3	0	0
Total de muestras		5	20	29	26



**Figura 9.** Identificación de la expresión de la MMP-8 en ovario. Reacciones representativas de la MMP-8 en tejidos de ovario, (A) tejido sano, (B) cistadenoma seroso, (C) limítrofe seroso y (D) carcinoma seroso. Zoom 40x.

La expresión de la MMP-8 en cistadenomas serosos es similar al tejido sano (Fig. 9A y B), mostrando una reacción media. Mientras que las muestras de lesiones limítrofes como carcinomas (Fig. 9C y D) el color de la reacción es mas leve por lo que sugiere una menor expresión de dicha colagenasa en estos tipos de tumores.



**Gráfica 5.** Expresión de la proteína MMP-8 en tumores serosos de ovario, \* $p \leq 0.05$  vs. sano.  $\phi$   $p \leq 0.05$  vs. cistadenoma seroso.

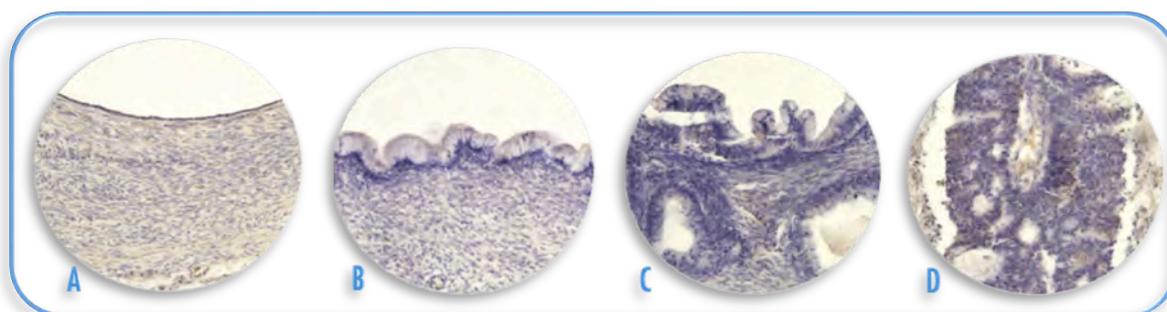
En la evaluación de la metaloproteasa MMP-8 en tumores serosos de ovario se observa un comportamiento similar en el tejido sin lesión como en el cistadenoma seroso, ya que no existen diferencias significativas en la expresión. Mientras que para las lesiones límiterofes hay un decremento en la expresión, comparado con el tejido sano y los cistadenomas, asimismo el carcinoma seroso se observa dicha disminución, comparándolos con dichos grupos (Gráfica 5).

## Expresión de la colagenasa MMP-13 en tumores mucinosos de ovario

Para los tumores mucinosos de ovario se analizaron un total de 50 muestras distribuidas en los diferentes grupos (Tabla 7). Cabe mencionar que para el grupo de carcinomas mucinosos, solo se obtuvieron 4 muestras por lo que se descartaron del análisis estadístico.

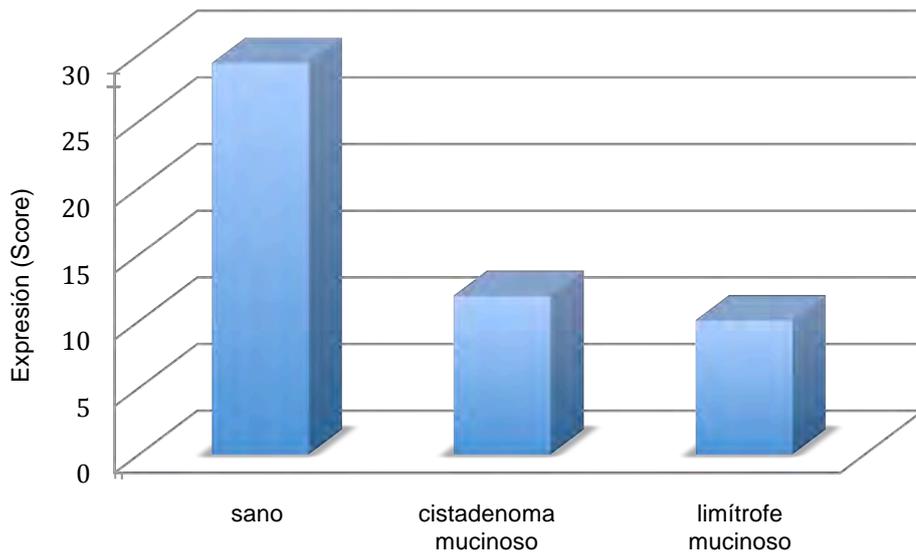
**Tabla 7.** Número de muestras con expresión de la colagenasa MMP-13, en tumores mucinosos de ovario así como tejido sano.

Reacción		Grupo			
		Sano	Cistadenoma mucinoso	Limítrofe mucinoso	Carcinoma mucinoso
Negativa	-	1	17	10	2
Positiva leve	+	5	5	6	2
Positiva media	++	1	1	0	0
Positiva intensa	+++	0	0	0	0
Total de muestras		7	23	16	4



**Figura 10.** Identificación de la expresión de la MMP-13 en ovario. Reacciones representativas de la MMP-13 en tejidos de ovario, (A) tejido sano, (B) cistadenoma mucinoso, (C) límite mucinoso y (D) carcinoma mucinoso. Zoom 40x.

Los tumores mucinosos de ovario muestran poca intensidad en la reacción, tanto para los cistadenomas, como límites y carcinomas (Fig. 10B, C y D), esto comparado con el tejido sano (Fig. 10A), en donde se observa una coloración mas oscura en las células del epitelio.



**Gráfica 6.** Expresión de la proteína MMP-13 en tumores mucinosos de ovario, \* $p \leq 0.05$  vs. sano.

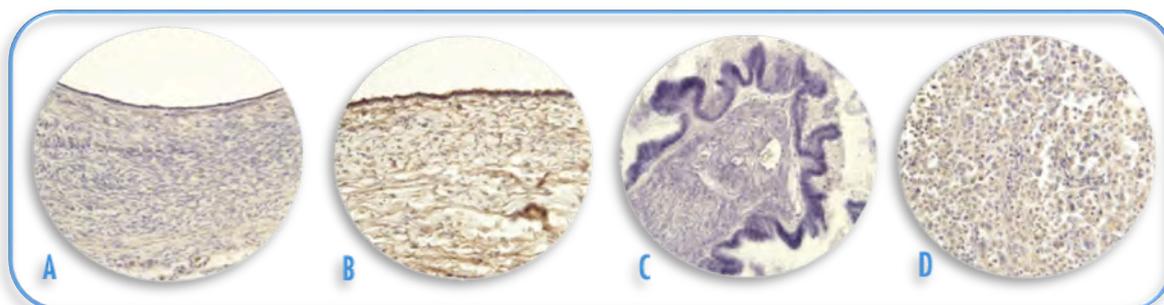
La expresión de la colagenasa MMP-13 en tumores mucinosos de ovario, se observa una disminución en la expresión para el grupo de cistadenoma mucinosos y límitrofe mucinosos, sin embargo, realizando el análisis estadístico no muestran cambios significativos comparados con el tejido sano (Gráfica 6).

## Expresión de la colagenasa MMP-13 en tumores serosos de ovario

Para los tumores serosos de ovario se analizaron un total de 77 muestras distribuidas en los diferentes grupos (Tabla 8).

**Tabla 8.** Número de muestras con expresión de la colagenasa MMP-13, en tumores serosos de ovario así como tejido sano.

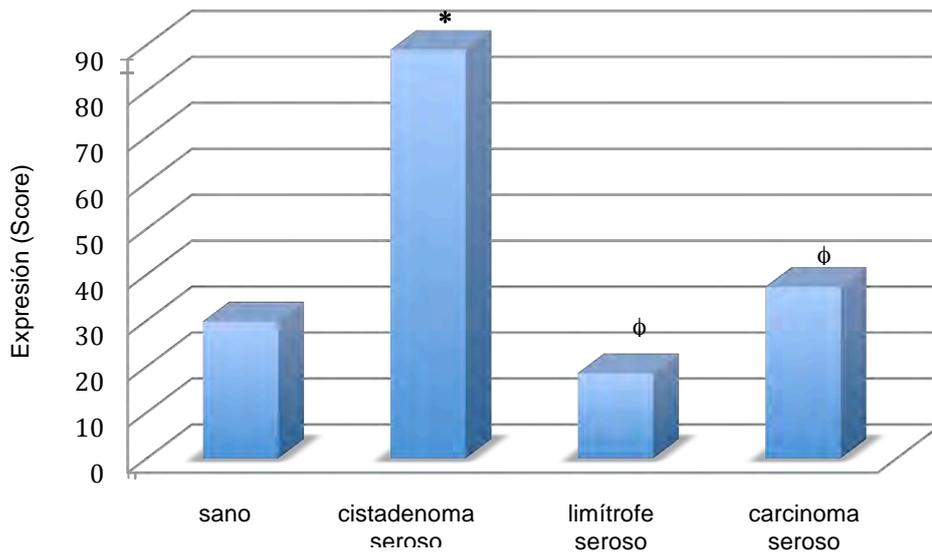
Reacción		Grupo			
		Sano	Cistadenoma seroso	Limítrofe seroso	Carcinoma seroso
Negativa	-	1	2	15	3
Positiva leve	+	5	1	12	21
Positiva media	++	1	4	1	5
Positiva intensa	+++	0	6	0	0
Total de muestras		7	13	28	29



**Figura 11.** Identificación de la expresión de la MMP-13 en ovario. Reacciones representativas de la MMP-13 en tejidos de ovario, (A) tejido sano, (B) cistadenoma seroso, (C) límite seroso y (D) carcinoma seroso. Zoom 40x.

La expresión de la MMP-13 en tejido sano es media (Fig. 11A), sin embargo al comparar la intensidad de la reacción con los cistadenomas se observa un incremento en la coloración (Fig. 11B).

Para el grupo de las lesiones límite (Fig. 11C), la reacción se ve disminuida en coloración con respecto al grupo de tejido sano y cistadenomas. Mientras que el grupo de los carcinomas (Fig. 11D) existe una tinción leve y homogénea.



**Gráfica 7.** Expresión de la proteína MMP-13 en tumores serosos de ovario, \* $p \leq 0.05$  vs. sano.  $\phi$   $p \leq 0.05$  vs. cistadenoma seroso.

La expresión de la MMP-13 para los cistadenomas serosos muestran cambios significativos comparados con el tejido de ovario sano. Los grupos limítrofes y carcinomas muestran un decremento significativo con respecto al grupo de los cistadenomas, sin embargo no hay cambios significativos con respecto al tejido sano (Gráfica 7).

La expresión de las tres MMP estudiadas en este trabajo, se encuentra dada en sus medias ( $\pm$ DS) de los tumores epiteliales de ovario (mucinosos y serosos) cada uno con sus grupos (Tabla 9).

**Tabla 9.** Expresión (media $\pm$ DS) de las MMP en tumores de ovario. \* $p \leq 0.05$  vs. sano.  $\phi$   $p \leq$  vs. cistadenoma

	Tumores mucinosos		Tumores serosos		
	Cistadenoma	Limítrofe	Cistadenoma	Limítrofe	Carcinoma
MMP-1	76.37 $\pm$ 52.25	28.42 $\pm$ 36.59	*121.9 $\pm$ 37.71	96.67 $\pm$ 50.90	96.50 $\pm$ 48.38
MMP-8	*33.29 $\pm$ 29.94	* $\phi$ 4.125 $\pm$ 5.786	56.63 $\pm$ 44.18	* $\phi$ 27.55 $\pm$ 21.26	* $\phi$ 29.19 $\pm$ 23.99
MMP-13	11.91 $\pm$ 25.81	10.06 $\pm$ 13.16	*88.96 $\pm$ 53.36	$\phi$ 18.59 $\pm$ 25.83	$\phi$ 37.36 $\pm$ 29.17

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se detectó la expresión de las colagenasas MMP-1, MMP-8 y MMP-13, en tumores epiteliales de ovario (mucinosos y serosos), mediante reacción de inmunohistoquímica.

Las principales observaciones de este trabajo, demostraron que las MMP estudiadas se expresan diferencialmente entre si en tejido de ovario con y sin lesión, por lo que existe una heterogeneidad en la expresión entre los dos tipos histológicos y los grupos analizados. Además, la expresión epitelial de las MMP estudiadas, fue mayor en tumores serosos que mucinosos, esto es similar a lo anteriormente descrito, donde se observa que la expresión de la MMP-2, -7 y -9, en lesiones de ovario, difiere entre tumores mucinosos y serosos (50). Se cree que los tumores mucinosos surgen del epitelio de los ductos de Müller mientras que los tumores serosos se originan del epitelio que recubre la superficie del ovario o por invaginaciones de la superficie del epitelio hacia el estroma ovárico, por lo que pudiera ser lo que genere esta diferencia en la expresión de dichos tumores.

La expresión de las colagenasas en tumores mucinosos no se ve alterada para la MMP-1 y -13 en ninguno de los grupos (cistadenomas, limítrofes y carcinomas). Estos datos son similares a un trabajo realizado en el 2008 en el cual se analizó la expresión de las MMP-2, MMP-7 y MMP-9 donde obtuvieron una expresión homogénea de estas MMP en tumores mucinosos de ovario (32). Sin embargo la expresión de la MMP-1 en otros tipos de cáncer, muestra una sobreexpresión comparándola con tejido sano, como por ejemplo en cáncer gástrico, osteosarcoma y cáncer de mama (26, 28, 29, 41). De igual forma la MMP-13 se sobreexpresa en cáncer de mama y cáncer colo-rectal (27, 40), por lo que su comportamiento en tumores mucinosos difiere a lo descrito para otros tejidos con neoplasia. El que exista una menor o no haya cambios en la expresión de la MMP-1 y -13 en lesiones de ovario podría sugerir que estas dos MMP, no se encuentran participando en el proceso carcinogénico en las lesiones mucinosas del ovario.

La expresión epitelial de la MMP-8 muestra una alteración significativa, ya que se observa un decremento en las lesiones benignas y en los tumores limítrofes de ovario. Como se mencionó en los antecedentes, se ha reportado que la MMP-8 juega un papel contrario a las otras dos colagenasas, su expresión en cultivos celulares de osteosarcoma es nula comparándola con la MMP-1 y MMP-13 (30), de igual forma en estudios de cáncer de mama han demostrado un papel de protección de la MMP para esta neoplasia (42). Por lo que nuestros datos son similares a los ya descritos para esta colagenasa.

Para los tumores mucinosos de ovario, no fue posible integrar el grupo de los carcinomas al análisis estadístico, ya que no se obtuvieron las muestras suficientes. Sin embargo, al observar el *HSCORE* de estas muestras se puede mencionar su tendencia. Para ninguna de las tres colagenasas estudiadas existió un incremento en la expresión en estas lesiones invasoras.

En cuanto a la expresión de las MMP en tumores serosos de ovario, se muestra un patrón diferente al de los tumores mucinosos. Mientras que en los tumores mucinosos se observa un decremento en las lesiones benignas, para los tumores serosos existe un claro incremento.

La expresión de la MMP-1 y -13, en cistadenomas serosos, muestran un incremento en los niveles de expresión. Nuestros datos son similares al trabajo de Qi Cai, *et al.*, (51), donde encontraron que la MMP-2 se expresa mas frecuentemente en tumores benignos que en carcinomas bien establecidos, además que la MMP-2 se expresaba con mayor frecuencia en líneas celulares de ovario sano y se veía muy reducida o nula la expresión en células tumorales. No es posible comparar nuestros datos con otros publicados, ya que no existen trabajos de estas colagenasas en lesiones benignas del ovario, por lo que estos resultados son de gran importancia para el estudio de esta neoplasia, sin embargo es importante realizar otras técnicas de detección, así como incrementar el número de casos estudiados, para poder validar completamente estos datos.

Por lo tanto, con nuestros resultados, se puede sugerir que el incremento en la expresión epitelial de la MMP-1 y -13, se ve asociada a lesiones benignas y posiblemente pudieran servir como apoyo en una potencial prueba

diagnóstica de cistadenomas serosos de ovario.

En el análisis de expresión de la MMP-13, se distingue una disminución para el grupo de los tumores limítrofes y los carcinomas, esto comparándolo con el grupo de cistadenomas. En un estudio, se observó un patrón similar a nuestros datos, ya que obtuvieron una menor expresión epitelial de la MMP-7 en lesiones invasoras que en cistadenomas y limítrofes (32), por lo tanto, se puede proponer que esta colagenasa no participa en procesos de invasión en ovario, sin embargo si se asocia a procesos proliferativos ya que se ve sobreexpresada en lesiones benignas serosas del ovario. Como ya se mencionó previamente, estas proteínas se ven reguladas a diferentes niveles, dentro de estos se encuentran los TIMP, por lo que sería primordial el estudio de estos inhibidores, para observar su participación en estas lesiones, ya que se sabe que los TIMP son inhibidores de las actividades de las MMP.

La MMP-8 muestra un patrón diferente a estas dos colagenasas ya mencionadas. La expresión de esta MMP se ve disminuida para los tumores limítrofes y los carcinomas, comparándolo con el tejido sano. Sin embargo, estos dos grupos también muestran una diferencia significativa con respecto al grupo de los cistadenomas, mostrando un abatimiento en su expresión.

Como ya se mencionó previamente, se ha reportado que miembros de la familia de las MMP pueden promover o inhibir el desarrollo del cáncer, por lo que una sola MMP puede actuar positivamente (promoviendo) o negativamente (inhibiendo) la progresión tumoral, dependiendo entre otros factores, la etapa del tumor, sitio tumoral (primario, metástasis), localización de la enzima (tumor vs. estroma) y el perfil del sustrato (54). Por lo que se podría inferir que el decremento de la expresión epitelial de la MMP-8 en los tumores limítrofes o carcinomas, tanto para tumores mucinosos como serosos de ovario, podría estar actuando “negativamente”. Estos datos se pueden comparar con los ya descritos, corroborando así, que esta colagenasa en particular actúa de manera contraria a la MMP-1 y MMP-13. Asimismo se puede sugerir que el decremento de la expresión de esta proteína se asocia con la aparición de la lesión invasora. Esta información estaría apoyando que la ausencia de esta

MMP puede ser un dato clave para la caracterización de las lesiones limítrofes y carcinomas, en los tumores serosos de ovario.

Finalmente, con estos datos se puede inferir que no existe alteración en la expresión de MMP-1 y -13 en tumores mucinosos en las lesiones benignas ni limítrofes. De igual forma para los tumores serosos, no existe una alteración en la expresión para la MMP-1 en dichos estadios. Mientras que en cistadenomas serosos, la MMP-1 y -13 podrían utilizarse como un posible marcador diagnóstico para determinar la existencia de estas lesiones en mujeres, que se encuentren en riesgo de esta enfermedad por diversos factores como la edad avanzada, molestias físicas, historia familiar o de la misma paciente con cáncer de mama o colon.

Es importante mencionar que las metaloproteasas de matriz no solo contribuyen en el crecimiento del tumor mediante la degradación de la matriz extracelular, si no que juegan muchos otros papeles en la progresión del cáncer, como la liberación de factores de crecimiento (ej. VEGF), promoviendo el escape inmune o induciendo señales de transducción, regulando la expresión génica de este modo, de igual forma interactuando y/o activando receptores y moléculas a nivel membrana, etc. Por lo que las MMP se han convertido en moléculas clave que participan tanto en el crecimiento local como en el desarrollo o metástasis en una variedad de tumores, con múltiples mecanismos (52, 53). Existe una gran cantidad de trabajos que demuestran, que las MMP se encuentran presentes en muchos procesos biológicos, tanto como en procesos patológicos. Sin embargo, aun es necesario el estudio de su participación en el desarrollo del cáncer.

Con los datos presentados en este trabajo, se reafirma que estas proteínas se encuentran en procesos carcinogénicos, sin embargo es necesario realizar otros estudios para poder establecer con certeza la participación de estas MMP en el proceso de carcinogénesis y así poder confirmar si la MMP-1 y MMP-13, podrían ser utilizadas como marcadores de lesiones benignas. Asimismo establecer y comprender el papel de la MMP-8 en los diferentes tipos de lesiones en el ovario (cistadenomas, limítrofes y carcinomas), tanto de los tumores mucinosos como serosos.

## CONCLUSIONES

- ✂ La MMP-1, MMP-8 y MMP-13 se expresan en epitelio sano de ovario, en tumores mucinosos y en tumores serosos.
- ✂ Los tumores serosos presentan mayor expresión epitelial, de las colagenasas, que los tumores mucinosos de ovario.
- ✂ La expresión epitelial de las colagenasas estudiadas, aparentemente, no se encuentran asociadas en la progresión del Cáncer de Ovario.
- ✂ La sobreexpresión de la MMP-1 y -13, se ve implicada en lesiones benignas serosas de ovario.
- ✂ Existe pérdida de la expresión de la MMP-8 en lesiones invasoras.

## REFERENCIAS

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 57, 43-66, 2007.
2. Globocan. Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008, última actualización agosto 2010. <http://globocan.iarc.fr>
3. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr. Rev.* 22, 255–288, 2001.
4. Dan G, Jan H, Mona P, Monique A, Joan M, Allan C, Pascale FM, Barry R. Microarray expression identification of differentially expressed genes in serous epithelial ovarian cancer compared with bulk normal ovarian tissue and ovarian surface scrapings. *Oncology Reports.* 18, 1347-1356, 2007.
5. Roett MA, Evans P. Ovarian cancer: an overview. *American Family Physician.* 15;80(6):609-16, 2009.
6. Cho KR y Shih IM. Ovarian Cancer. *Annu Rev Pathol.* 4: 287–313, 2009.
7. Karst AM y Drapkin R. Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model in Evolution. *J of Oncology.* Vol. 932371, 2010.
8. Landen CN Jr, Birrer MJ, Sood AK. Early Events in the Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer. *J Clin Oncology.* 26(6):995-1005, 2008.
9. Chang XH, Zhang L, Yang R, Feng J, Cheng YX, Cheng HY, Ye X, Fu TY, Cui H. Screening for genes associated with ovarian cancer prognosis. *Ch Med Journal.* 122(10):1167-1172, 2009.
10. Bell DA. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Patho.* 18, S19–S32, 2005.
11. Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, Ohishi Y, Kobayashi H, Hirakawa T, Nakano H. Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc.* 36:9–17, 2003.
12. Hart WR. Mucinous tumors of the ovary: a review. *Int J Gynecol Pathol.* 24(1),4-25, 2005.
13. Hess V, A'Hern R, Nasiri N, King DM, Blake PR, Barton DP, Shepherd JH, Ind T, Bridges J, Harrington K, Kaye SB, Gore ME. Mucinous Epithelial Ovarian Cancer: A Separate Entity Requiring Specific Treatment. *J Clin Oncol.* 22:1040-1044, 2004.
14. Bell DA, Longacre TA, Prat J, Kohn EC, Soslow RA, Ellenson LH, Malpica A, Stoler MH, Kurman RJ. Serous borderline (low malignant potential, atypical proliferative) ovarian tumors: workshop perspectives. *Hum Pathol.* 35(8), 934-48, 2004.
15. Levanon K, Crum C, Drapkin R. New Insights Into the Pathogenesis of Serous Ovarian Cancer and Its Clinical Impact. *J Clin Oncol.* 26:5284-5293, 2008.

16. Hanahan D y Weinberg R. The Hallmarks of Cancer Review. *Cell*. Vol. 100, 57–70, 2000.
17. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*. 284, 67–68, 1980.
18. Nagase H, Visse R, Murphy G: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 69(3):562-73, 2006.
19. Visse R y Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 92:827– 839, 2003.
20. Chakraborti S, Mandal M, Das S, *et al*. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem*. 253:269–285, 2003.
21. Sounni NE y Noel A. Biochimie Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. *Biochimie*. 87(3-4):329-42, 2005.
22. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*. 2;141(1):52-67. 2010.
23. Martin MD y Matrisian LM. The other side of MMPs: Protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 20(8), 934-48, 2007.
24. Lemaître V y D'Armiento J. Matrix Metalloproteinases in Development and Disease. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 78:1–10, 2006.
25. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *J Clin Oncol*. 27:5287-5297, 2009.
25. li M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. Role of Matrix Metalloproteinase-7 (Matrilysin) in Human Cancer Invasion, Apoptosis, Growth, and Angiogenesis. *Exp Biol Med*. 231, 20–27, 2006.
26. Kosaka Y, Mimori K, Fukagawa T, Ishikawa K, Etoh T, Katai H, Sano T, Watanabe M, Sasako M, Mori M. Clinical Significance of Molecular Detection of Matrix metalloproteinase-1 in Bone Marrow and Peripheral Blood in Patients with Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2011.
27. Huang MY, Chang HJ, Chung FY, Yang MJ, Yang YH, Wang JY, Lin SR. MMP13 is a potential prognostic marker for colorectal cancer. *Oncol Rep*. 24(5):1241-7. 2010.
28. Kimura R, Ishikawa C, Rokkaku T, Janknecht R, Mori N. Phosphorylated c-Jun and Fra-1 induce matrix metalloproteinase-1 and thereby regulate invasion activity of 143B osteosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 1813(8):1543-53, 2011.
29. Mannello F. What does matrix metalloproteinase-1 expression in patients with breast cancer really tell us? *BMC Medicine*. 9:95 doi:10.1186/1741-7015-9-95, 2011.
30. Cowan RW, Mak IW, Colterjohn N, Singh G, Ghert M. Collagenase expression and activity in the stromal cells from giant cell tumour of bone. *Bone*. 44(5):865-71, 2009.

31. Shiomi T y Okada Y: MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis Rev.* 22(2-3):145-52, 2003.
32. Brun JL, Cortez A, Commo F, Uzan S, Rouzier R, Daraï E. Serous and mucinous ovarian tumors express different profiles of MMP-2, -7, -9, MT1-MMP, and TIMP-1 and -2. *Int J Oncol.* 33(6):1239-46, 2008.
33. Egeblad M, Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2(3):161-174, 2002.
34. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z: Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(3):211-233, 2007.
35. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol.* 200(4):448-464, 2003.
36. Curran S, Dundas SR, Buxton J, Leeman MF, Ramsay R, Murray GI. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res.* 10(24):8229-8234, 2004.
37. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *J Clin Oncol.* 27:5287-5297, 2009.
38. Kemik O, Kemik AS, Sümer A, Dulger AC, Adas M, Begenik H, Hasirci I, Yilmaz O, Purisa S, Kisli E, Tuzun S, Kotan C. Levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 28; 17(16): 2109-2112, 2011.
39. Yamada T, Oshima T, Yoshihara K, Tamura S, Kanazawa A, Inagaki D, Yamamoto N, Sato T, Fujii S, Numata K, Kunisaki C, Shiozawa M, Morinaga S, Akaike M, Rino Y, Tanaka K, Masuda M, Imada T. Overexpression of MMP-13 gene in colorectal cancer with liver metastasis. *Anticancer Res.* 30(7):2693-9, 2010.
40. Chang HJ, Yang MJ, Yang YH, Hou MF, Hsueh EJ, Lin SR. MMP13 is potentially a new tumor marker for breast cancer diagnosis. *Oncol Rep.* 22(5):1119-27, 2009.
41. Boström P, Söderström M, Vahlberg T, Söderström KO, Roberts PJ, Carpén O, Hirsimäki P. MMP-1 expression has an independent prognostic value in breast cancer. *BMC Cancer.* 11;11:348, 2011.
42. Decock J, Hendrickx W, Vanleeuw U, Van Belle V, Van Huffel S, Christiaens MR, Ye S, Paridaens R. Plasma MMP1 and MMP8 expression in breast cancer: Protective role of MMP8 against lymph node metastasis. *BMC Cancer.* 8:77, 2008.
43. Gutiérrez-Fernández A, Fueyo A, Folgueras AR, Garabaya C, Pennington CJ, Pilgrim S, Edwards DR, Holliday DL, Jones JL, Span PN, Sweep FC, Puente XS, López-Otín C. Matrix Metalloproteinase-8 Functions as a Metastasis Suppressor through Modulation of Tumor Cell Adhesion and Invasion. *Cancer Res.* 68:2755-2763, 2008.
44. Tunuguntla R, Ripley D, Sang QX, Chegini N. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-3 and -4 in benign endometrium and endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 89(3):453-9, 2003.

45. Wang PH, Ko JL, Tsai HT, Yang SF, Han CP, Lin LY, Chen GD. Clinical significance of matrix metalloproteinase-2 in cancer of uterine cervix: a semiquantitative study of immunoreactivities using tissue array. *Gynecol Oncol.* 108(3):533-542, 2008.
46. Cai KQ, Yang WL, Capo-Chichi CD, Vanderveer L, Wu H, Godwin AK, Xu XX. Prominent expression of metalloproteinases in early stages of ovarian tumorigenesis. *Mol Carcinog.* 46(2):130-143, 2007.
47. Lengyel E, Schmalfeldt B, Konik E, *et al.* Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 82:291-298, 2001.
48. Kamat AA, Fletcher M, Gruman LM, Mueller P, Lopez A, Landen CN Jr, Han L, Gershenson DM, Sood AK. The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 15;12(6):1707-14, 2006.
49. Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K, *et al.* Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 7:2396-2404, 2001.
50. Feeley KM y Wells M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathol.* 38:87-95, 2001.
51. Qi Cai, Yang WL, Capo-Chichi CD, *et al.* Prominent expression of metalloproteinases in early stages of ovarian tumorigenesis. *Mol Carcinog.* 46:130-143, 2007.
52. N.E. Sounni, A. Noel. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. *Biochimie.* 329–342, 2007.
53. Murphy G y Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Asp of Med.* 29:290–308, 2008.
54. Fridman R. Metalloproteinases and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 25: 7–8, 2006.