



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**PAPEL DE LA MT4-MMP EN LA PROGRESION TUMORAL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. CERVANTES GARDUÑO ALEJANDRA BEATRIZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

**CD. MX., MAYO, 2019.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



OFICIO CPCB/391/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 12 de marzo de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **CERVANTES GARDUÑO ALEJANDRA BEATRIZ** con número de cuenta **98011636**, con la tesis titulada **"PAPEL DE LA MT4-MMP EN LA PROGRESIÓN TUMORAL"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO**:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Vocal: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE  
Secretario: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS  
Suplente: DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ  
Suplente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 29 de marzo de 2019

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM todo el apoyo brindado, las atenciones y sobre todo las herramientas para concluir exitosamente el Doctorado en Ciencias Biológicas.

A CONACYT agradezco la beca otorgada (número 225419) durante mis estudios de posgrado, indispensable para cumplir con esta etapa académica.

A los miembros de mi Comité Tutor: a la Dra. Gisela Ceballos, a la Dra. Isabel Soto y a la Dra. Vilma Maldonado Lagunas; gracias por las sugerencias, tutoría y por el tiempo dedicado a mi proyecto de investigación, elementos indispensables para mi desarrollo académico.



# Índice

<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	3
<b>Introducción</b>	5
Progresión tumoral	5
Metaloproteasas de matriz	7
Metaloproteasas de matriz tipo membrana	8
MT4-MMP	10
Funciones de la MT4-MMP	11
MT4-MMP en el cáncer	15
RNAs no codificantes	18
microRNAs	19
snoRNAs	20
<b>Hipótesis</b>	22
<b>Objetivos</b>	22
<b>Objetivo General</b>	22
<b>Objetivos específicos</b>	22
<b>Metodología</b>	23
Cultivo celular	23
Transfección celular	23
Plásmidos	23
Transcripción reversa y PCR cuantitativo	24
Xenotransplante / Zebrafish Husbandry y microinyección celular	25
Microarreglos y análisis	26
Análisis de la expresión de miRNAs por PCR cuantitativo	26

<b>Resultados</b>	<b>28</b>
La sobreexpresión de la MT4-MMP en células de cáncer de mama incrementan su capacidad de formar tumores en xenotransplantes en pez cebra.	28
Perfil de expresión de miRNAs en células de cáncer mama que sobreexpresan MT4-MMP.	31
La MT4-MMP modula la expresión de miRNAs asociados a cáncer.	37
Los miRNAs modulados por la MT4-MMP están relacionados con La progresión en cáncer de mama.	44
<b>Discusión</b>	<b>47</b>
<b>Conclusión</b>	<b>53</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>54</b>
<b>Literatura citada</b>	<b>55</b>
<b>Apéndice</b>	<b>62</b>
Artículo requisito para la obtención del grado	62

# Papel de la MT4-MMP en la progresión tumoral

## Resumen

La MT4-MMP es un miembro de la familia de metaloproteasas con un papel controversial en la remodelación de la matriz extracelular. Se ha observado una sobreexpresión de miembros de esta familia en el cáncer de mama con una posible capacidad para regular el crecimiento tumoral y la progresión del cáncer. Los mecanismos hasta ahora descritos por los cuales MT4-MMP participa en el cáncer de mama incluyen la desestabilización de los vasos sanguíneos del tumor, la activación de un interruptor angiogénico y la inducción de la vía del EGFR. Sin embargo, aún no se conocen completamente los mecanismos por los que la MT4-MMP participa en el cáncer de mama. Nosotros investigamos por primera vez, si la MT4-MMP puede modular la expresión de miRNAs relacionados con procesos biológicos asociados a la formación y progresión de tumores.

La MT4-MMP se sobreexpresó en células de cáncer de mama MDA-MB-231, se realizaron xenotransplantes en pez cebra con las línea celular que sobreexpresa a esta MT-MMP y se investigó el perfil de expresión de miRNAs inducido por la sobreexpresión por medio de microarreglos. Los datos de microarreglos se analizaron con diferentes herramientas bioinformáticas para encontrar las

funciones moleculares y celulares relacionadas con los miRNAs expresados diferencialmente. La relevancia clínica de algunos de estos miRNAs se analizó utilizando una base de datos pública.

Nuestros resultados muestran, que la sobreexpresión de la MT4-MMP en células de cáncer de mama indujo la formación de tumores y la modulación de 65 miRNAs. El análisis de las funciones asociadas a los miRNAs desregulados reveló la alteración de las vías dependientes de p53, TGF-  $\beta$ , MAPK, ErbB y Wnt, así como de procesos como el ciclo celular, las uniones adherentes, la adhesión focal y la apoptosis. Varios de los miRNAs regulados positivamente se asociaron con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama.

En conclusión, la sobreexpresión de la MT4-MMP en células MDA-MB-231, indujo formación de tumores en un *modelo in vivo* y a la desregulación de miRNAs relacionados con procesos biológicos asociados a la formación y progresión tumoral. Este estudio por primera vez muestra como la sobreexpresión de la MT4-MMP altera los perfiles de expresión de los miRNAs asociados a la progresión tumoral.

## **Abstract**

MT4-MMP is a member of the metalloproteinases family with a controversial role in extracellular matrix remodeling. Overexpression of this metalloproteinase has been observed in breast cancer with a possible ability to regulate tumor growth and cancer progression. MT4-MMP participates in breast cancer development, which includes tumor blood vessels destabilization, the activation of an angiogenic switch, and the increase of EGFR signaling. However, the fully mechanisms by which MT4-MMP participates in breast cancer are still unknown.

We investigated for the first time, if MT4-MMP can dysregulate the expression of miRNAs related to biological processes associated to tumor formation and progression. MT4-MMP was ectopically overexpressed in breast cancer MDA-MB-231 cells and this expression profile of miRNAs induced by this overexpression was investigated by miRNAs microarrays. Microarray data were analyzed with different tools to find the molecular and cellular functions related to the differentially expressed miRNAs. The clinical relevance of some miRNAs was analyzed using a public database.

Our results show that MT4-MMP overexpression in breast cancer cells induced the modulation of 65 miRNAs. The analysis of the functions associated to the

dysregulated miRNAs revealed the alteration of pathways dependent of p53, TGF- $\beta$ , MAPK, ErbB and Wnt, as well as processes such as cell cycle, adherens junctions, apoptosis and focal adhesion. Several of the upregulated miRNAs were associated to a worse prognosis in breast cancer patients.

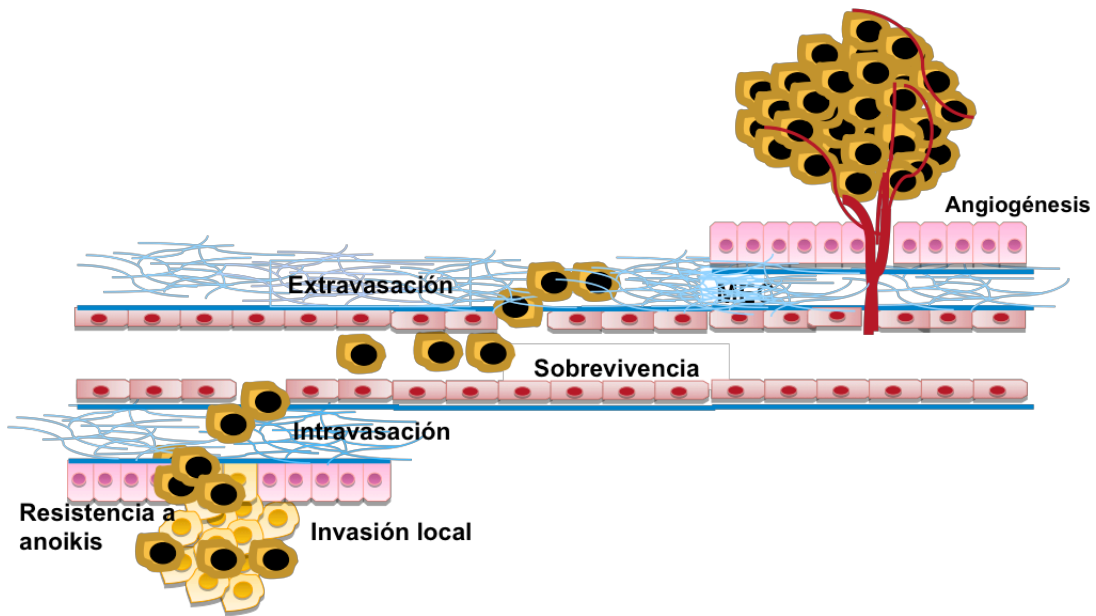
In conclusion, in breast cancer cells, MT4-MMP overexpression induces the formation of tumor in a model *in vivo* and dysregulation of miRNAs related to several biological processes associated to tumor formation and progression, being the first study in which shows a change in the expression profile of miRNAs associated with the expression of MT4-MMP..



# Introducción

## Progresión tumoral

La invasión tumoral y las metástasis definen la malignidad del cáncer y son las principales causas de muerte asociadas a esta enfermedad. La cascada metastásica es un proceso de múltiples pasos en el que algunas células de cáncer se diseminan del tumor primario a órganos o tejidos dístales [1]. Una vez que se forma y establece un tumor primario, un grupo de células adquiere la capacidad de invadir y generar metástasis. Los principales eventos que ocurren son: **1)** Invasión local a través de la membrana basal (BM) y la matriz extracelular (MEC, por sus siglas en inglés) para abrirse paso por el estroma y el epitelio [2]. **2)** Intravasación a los vasos sanguíneos o linfáticos locales, donde las células de cáncer atraviesan las paredes de los vasos y promuevan la neoangiogénesis. **3)** Sobrevivencia en la circulación. Una vez en torrente sanguíneo las células tumorales pueden diseminarse a órganos o tejidos lejanos. **4)** Extravasación en tejidos dístales, las células de cáncer salen de los vasos sanguíneos e invaden otros tejidos. **5)** Formación de micrometástasis, y el establecimiento en el microambiente nuevo. **6)** Colonización metastásica, en este paso las células de cáncer proliferan en los sitios metastásicos y la promoción de la angiogénesis [3].



**Figura 1.** Cascada metastásica. Una vez formado un tumor primario algunas células de cáncer se desprenden del tumor, estas células tienen la capacidad de resistir la anoikis adquiriendo la capacidad de migrar e invadir a través de la membrana basal y la MEC, posteriormente llegar a los vasos sanguíneos (intravasación) en donde tienen que sobrevivir hasta alcanzar un órgano o tejido distal donde salen de la circulación (extravasación) y finalmente formar un tumor secundario y promover la formación de vasos sanguíneos.

Un requisito para el establecimiento de las metástasis es la remodelación de la (MEC). Entre las principales proteínas que participan en la remodelación de la MEC se encuentran las metaloproteasas de matriz (MMPs) [4]. La familia de las MMPs está formada por 26 proteínas que están involucradas en la degradación de la MEC [2, 3].

## **Metaloproteasas de matriz**

Las MMPs son producidas por una gran variedad de tipos celulares, como las células epiteliales, los fibroblastos y las células inflamatorias [5, 6]. Las MMPs representan una familia de enzimas proteolíticas que tienen zinc en su sitio catalítico [7, 8]. Estructuralmente, las MMPs tienen diferentes dominios que son importantes para su clasificación, la especificidad a su sustrato y su localización celular. Todas las MMPs tienen un predominio, un pro-dominio, un dominio catalítico, un dominio *hinge* (tipo bisagra) y un dominio tipo hemopexina [9, 10]. Además de las semejanzas estructurales, las MMPs se sintetizan de manera similar, la pro-enzima inactiva requiere de la activación extracelular. Esta activación se realiza por las proteínas de los tejidos o del plasma, el proceso consta de dos pasos básicos: un corte inicial en la región del pro-dominio seguido de una reacción auto proteolítica que genera las enzimas activas muy estables [11, 12].

La mayoría de las MMPs se activan fuera de la célula, pero algunas otras MMPs pueden activarse antes de llegar a la superficie celular; y también las MMPs pueden activarse por otras MMPs o por proteínas con actividad proteasa de serina [11, 13]. La actividad de las MMPs puede ser regulada en tres niveles distintos: a nivel de expresión génica, durante la activación del zimógeno y durante la inhibición de la forma activa [11, 14]. Los principales inhibidores naturales de las MMPs son los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs, por sus siglas en

inglés), de los cuales se han identificado cuatro: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Los TIMPs son proteínas secretadas que tienen un papel central en la regulación de la inhibición de las MMPs de forma específica, también participan en la formación de complejos con las MMPs. En los complejos que forman es importante el balance entre la expresión de los TIMPs y las MMPs, en el caso del cáncer la regulación de los TIMPs es un paradigma ya que el balance del TIMP-2 y del TIMP-4 es importante durante la progresión tumoral, uno de los principales complejos es el que está formado por MT1-MMP/ TIMP-1 /Pro-MMP2 que está asociado a eventos durante la evolución de cáncer debido a que se promueve la elevada expresión de la metaloproteasa de matriz tipo membrana 1 (MT1-MMP, por sus siglas en inglés) [8]. Por otra parte los TIMP-2 y TIMP-3 inhiben a las MMPs de membrana principalmente [15].

### **Metaloproteasas de matriz tipo membrana**

Las metaloproteasas tipo membrana (MT-MMPs, por sus siglas en inglés), son un tipo particular de MMPs, que se encuentran ancladas a la membrana a través de un dominio único que las distingue del resto de las MMPs [16, 17]. Las MT-MMPs se subdividen por su tipo de anclaje en: transmembranales (TM-MT-MMP, por sus siglas en inglés) entre las que se encuentran la MT1-MMP, la MT2-MMP, la MT3-MMP y la MT5-MMP [18]; y las ancladas por una molécula de glicosil-fosfatidilinositol (GPI-MT-MMP), como la MT4-MMP y la MT6-MMP [19] (Figura 2).

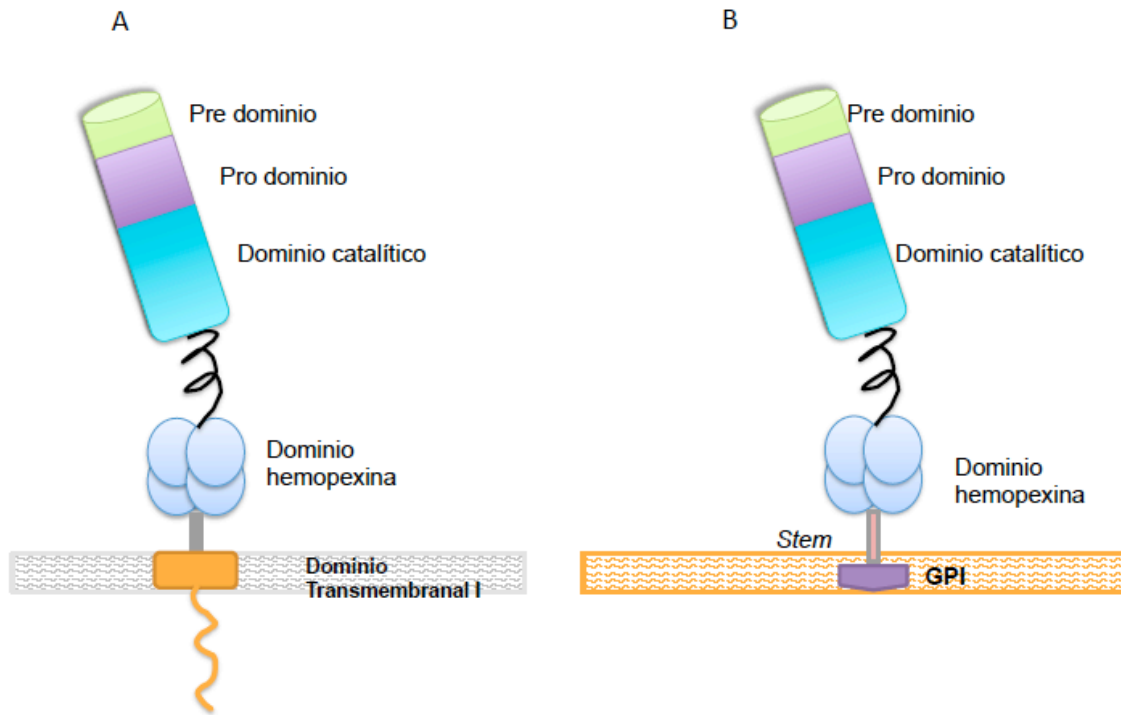


Figura 2. Estructura general de las MT-MMPs. Estas proteínas comparten los dominios de organización del resto de las MMPs como el pre-dominio, el pro-dominio, el dominio catalítico que contiene zinc, la región *hinge* y el dominio tipo hemopexina. A) Las TM-MT-MMP se unen a la membrana por un dominio transmembranal y tienen un tallo citoplásmico. B) Las GPI-MT-MMP se unen a la membrana por GPI y además contienen una región *stem* que une a la región de GPI y carecen de un tallo citoplásmico.

## MT4-MMP

La MT4-MMP fue clonada por primera vez de una librería de DNA complementario derivada de células de cáncer de mama [20]. La expresión del ARN mensajero se encontró en diferentes órganos: cerebro, sangre, colon, ovarios y testículos [20, 21]. Se describió que el cDNA reportado por Kajita y colaboradores, codifica para la proteína de la MT4-MMP con una secuencia de 605 aminoácidos y un peso de 67 kDa [21]. La MT4-MMP conserva los dominios característicos de las MMPs y además contiene una región *stem* formada por 50 residuos que une el dominio tipo hemopexina con el dominio de GPI [22, 23].

Las características estructurales de la MT4-MMP que la diferencian funcionalmente de las otras MT-MMPs se encuentran en: el dominio catalítico, la región *stem* y el GPI (Figura 2). La región *Stem* de las GPI-MT-MMPs tiene características únicas comparada con los otros miembros de las TM-MT-MMPs, debido a la presencia de los residuos de cisteína que son sitios donde se puede dar una gran variedad de modificaciones post-traduccionales, por ejemplo puentes disulfuro, prenilación y palmitoilación [24]. Los residuos de cisteína Cys<sup>564</sup> y Cys<sup>566</sup> de la región *stem* de la MT4-MMP, están asociados a su capacidad de formar dímeros e interacciones con las demás MMPs [23]. La formación de estas interacciones pueden ser de diferentes formas: monómeros, dímeros y oligómeros, Se ha caracterizado la formación homodímeros de la MT4-MMP, estos homodímeros se generan por la formación de puentes disulfuro, vía el residuos



Cys<sup>564</sup> que se localiza en la región Stem [23].

El dominio catalítico de la MT4-MMP a diferencia de las otras MT-MMPs no activa a la progelatinasa A y tampoco hidroliza los principales componentes de la MEC como la colágena tipo I, II, III y IV, la fibronectina, la laminina y la decorina [25]. Esta enzima solo es capaz de degradar algunos sustratos que forman parte de la MEC [21, 26]. Se ha mostrado mediante ensayos basados en zimogramas que la MT4-MMP únicamente es capaz de procesar fibrina, fibrinógeno y gelatina únicamente [22]. Adicionalmente se han descrito otros sustratos, que no son componentes de la MEC, como el pro-TNF $\alpha$ , la ADAMTs-4 (desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina) y la  $\alpha$ M-integrina [25, 27-30]. En cuanto a la inhibición de la MT4-MMP, el TIMP-1 suprime de manera efectiva la actividad de esta metaloproteasa, en contraste suprime limitadamente la actividad de la MT1-MM, la MT2-MMP y la MT3-MMP [25], mientras que el TIMP-2 es un potente inhibidor de la actividad de la MT4-MMP [25, 27].

### **Funciones de la MT4-MMP**

Las características peculiares de la MT4-MMP no solo están limitadas a su estructura y a sus funciones, ya sean éstas dependientes o independientes de su actividad catalítica. Se ha descrito la participación de la MT4-MMP en diversos procesos tanto fisiológicos como patológicos, a continuación se mencionan brevemente.

La MT4-MMP participa en la regulación de la osmolaridad del agua. En un modelo de ratones. Srichai y colaboradores., analizaron la expresión de la MT4-MMP en los receptores del hipotálamo, y observaron que esta MT-MMP se localizó específicamente en los osmo-receptores localizados en el interior del hipotálamo que es la zona donde el cerebro regula la homeostasis del agua. Adicionalmente en ratones mutantes MT4-MMP<sup>-/-</sup> encontraron que la ausencia de esta proteína genera alteraciones mínimas en el desarrollo de los riñones y no afecta sus funciones [31].

La formación de la memoria del miedo requiere de la participación de neuronas de la amígdala basolateral y de la activación del sistema dopaminérgico-BDNF. El grupo de Rainnie demostró que la activación del receptor TrKB requiere de la liberación de zinc y la consecuente activación de las MT3-MMP y MT4-MMP; estas proteínas, junto con los receptores D1 y D5, colocan en las neuronas principales de la amígdala basolateral. Además sugieren que estas MT-MMPs pueden activarse de manera preferencial solo en respuesta a una entrada sensorial fuerte, como la conversión de pro-BDNF. El funcionamiento anormal del sistema dopaminérgico-BDNF está implicado en psico-patologías de los desórdenes psiquiátricos como los desórdenes de estrés postraumático y depresión, y en el abuso de drogas [32].

El aumento en la degradación del agregano, que es uno de los principales componentes de la MEC del cartílago articular, pierde su estructura y función,

generando osteoartritis. Se ha reportado un incremento en la expresión de la proteína de MT4-MMP y de agregano, ambos colocalizaron en las zonas con lesiones de osteoartritis en los cartílagos de ratones, bovinos y humanos con osteoartritis. Una característica importante de los agreganos es que tienen motivos ADAMTS, por lo que la degradación se debe a la activación de estas agreganasas por la MT4-MMP [33]. También se ha reportado la importancia de la integridad de los condrocitos articulares en el cartílago, que está dada por la unión de los oligosacáridos y los receptores CD44. La degradación del cartílago se inicia cuando se inhibe la interacción del receptor CD44 con sus antagonistas, los oligosacáridos de ácido hialurónico HA (Small hyaluronan, por sus siglas en inglés) y promueve la transcripción de ADAMTS-4 y ADAMTS-5, que son activadas por la MT4-MMP generando la degradación del cartílago mediante la vía de los agreganos. Interesantemente se ha demostrado que en modelos de cáncer los HA inhiben vías de supervivencia e inducen la muerte por apoptosis [34].

Durante el ciclo menstrual la vascularización en el endotelio es un proceso importante en algunas de las fases de este ciclo. Se ha encontrado la expresión de las MT-MMPs en células endoteliales del endometrio, sin embargo durante la fase de proliferación y la fase secretoria del endotelio que se caracterizan por la elevada vascularización y numerosos vasos sanguíneos, se ha detectado la expresión de la MT2-MMP, la MT3-MMP y la MT4-MMP. La expresión de estas últimas correlaciona con los episodios de angiogénesis del ciclo *in vivo* e *in vitro*,

además encontraron que la MT2-MMP y la MT3-MMP participan en la formación de tubos capilares, mientras que la MT4-MMP no es capaz de inducir la formación de tubos capilares por lo que se desconoce cómo participa en la angiogénesis endometrial [35].

Se ha reportado la expresión de la proteína de la MT4-MMP en monocitos y macrófagos, en estas células se demostró que la MT4-MMP tiene la capacidad de procesar TNF- $\alpha$  y sugieren su posible participación en la inflamación [28]. También se ha demostrado la expresión constitutiva de la proteína MT4-MMP en eosinófilos, y al estimular con TNF- $\alpha$  incrementa la expresión de esta metaloproteasa. En consecuencia la MT4-MMP puede estar directamente implicada en la degradación de los componentes de la matriz extracelular o modular la actividad de otras proteínas implicadas en la migración de eosinófilos y la remodelación tisular [36].

Recientemente se ha descrito el procesamiento de un novedoso sustrato de la MT4-MMP en los monocitos y macrófagos, es la cadena de la  $\alpha$ M-integrina que está presente en los microdominios de lípidos de la membrana de las células antes mencionadas. El procesamiento de  $\alpha$ M-integrina depende de la actividad catalítica de la MT4-MMP y se lleva a cabo en la superficie de las células *in vitro*, además disminuye la adherencia de los monocitos a las zonas de inflamación. Este modelo es independiente al procesamiento de TNF- $\alpha$  previamente descrito para la MT4-MMP en este tipo de células [30]. Además de las diversas funciones

antes mencionadas en la que participa la MT4-MMP, tiene un papel importante en el desarrollo del cáncer.

### **MT4-MMP en cáncer**

Se ha documentado la participación de la MT4-MMP en diferentes procesos asociados a cáncer y a la progresión tumoral, en algunos de estos procesos su participación es controversial. Huang y colaboradores encontraron que la expresión de la MT4-MMP en carcinoma de células escamosas de la lengua (SAS) incrementa la invasión a través de Matrigel, pero no la migración celular [37]. En un modelo de cáncer de cabeza y cuello además demostraron que la expresión de la MT4-MMP también incrementaba las metástasis a pulmón, en este modelo encontraron que la expresión de la MT4-MMP es regulada por hipoxia, a través de los factores de transcripción HIF-1 $\alpha$  y Slug, los cuales incrementan la expresión de la MT4-MMP generando así las metástasis. Cabe mencionar que la MT4-MMP se utiliza como un marcador pronóstico en el cáncer de cabeza y cuello [37].

En cáncer gástrico se ha reportado un incremento en la expresión de la MT4-MMP comparado con muestras de tejido sano y muestras de gastritis atrófica. Este aumento en la expresión de la MT4-MMP se asoció con la profundidad de la invasión tumoral, la metástasis ganglionar y la afectación de los fenómenos serosos asociados con la progresión tumoral [38]. En contraste, en glioma se ha

reportado que los niveles de expresión son menores en los estadios más avanzados, contrario a lo que pasa con la expresión de la MT1-MMP, la MT2-MMP y la MT6-MMP [39].

En líneas celulares de melanoma se analizó la expresión de MT4-MMP y se encontró que estas tienen altos niveles de expresión de la metaloproteasa. También analizaron los niveles de expresión de la proteína de MT4-MMP en muestras de piel normal, células de nevus (melanocitos), melanoma primario y metástasis de melanoma, encontraron que todos eran positivos e identificaron tres formas diferentes de la MT4-MMP con los siguientes pesos moleculares: 45 kDa, 58 kDa y 69 kDa. Identificaron una forma con peso molecular 69 kDa como el precursor, el cual se localiza en el sistema membranoso de retículo endoplasmático / Golgi. La siguiente forma identificada pesa 58 kDa y corresponde a la ubicada en la membrana celular, la forma activa procesada por furina. Finalmente, también detectaron una forma de menor peso, 45kDa, que no es un producto de autocatálisis o procesamiento de furina. En los tejidos se encontró una baja cantidad de la forma de 69 kDa de la MT4-MMP, este hallazgo sugiere que esta variante se puede procesar rápidamente a las formas de 58 kDa o a la forma de 45 kDa [40].

El modelo en el que más se ha estudiado a la MT4-MMP es el cáncer de mama. Los grupos de Chabottaux y Hotary, demostraron que la sobreexpresión de la



MT4-MMP no promueve la invasión en células de cáncer de mama MDA-MB-231 [41]. En contraste, los grupos de Rizki y Hegedus demostraron que la inhibición de la MT4-MMP con siRNAs en células de cáncer de mama T4-2 y MDA-MB-231, respectivamente, inhibió la invasión [42, 43].

Adicionalmente, se ha descrito que la sobreexpresión de la MT4-MMP *in vivo* acelera el crecimiento tumoral, promueve la angiogénesis, la remodelación de vasos sanguíneos y las metástasis de cáncer de mama a pulmón [44]. Sin embargo, el mecanismo por el cual la MT4-MMP participa en cáncer aún no se ha establecido claramente. Se ha observado que la sobreexpresión de la MT4-MMP promueve el crecimiento tumoral y promueve las metástasis de células de cáncer de mama a través de la remodelación de los vasos sanguíneos, para lo cual requiere de su actividad catalítica [44-46]. Adicionalmente, en células de cáncer de mama MDA-MB-231, la MT4-MMP induce la activación y señalización del EGFR para promover la proliferación de células tumorales de manera dependiente de su actividad proteolítica [47]. Incluso la coexpresión de EFGR y MT4-MMP se correlaciona clínicamente con un fenotipo triple negativo que resultó ser sensible a una combinación de agentes quimioterapéuticos dirigidos al DNA y fármacos anti-EGFR [48]. Siendo estos los únicos mecanismos descritos a la fecha.

## **RNAs no codificantes**

Las regiones no codificantes del genoma representan aproximadamente entre el 1.5-2 % del **RNA** y tienen funciones importantes durante el desarrollo normal y la fisiología, y en las enfermedades [49, 50]. Los ncRNA son relevantes en el desarrollo del cáncer puesto que su desregulación está relacionada con la progresión y metástasis. Los ncRNAs pueden dividirse de acuerdo a su tamaño en: **ARNs** pequeños no codificantes (sncRNAs, por sus siglas en inglés) tienen un tamaño de 18-200 nucleótidos, y en **ARNs** largos no codificantes (lncRNAs, por sus siglas en inglés) que son moléculas de más de 200 nucleótidos [52]. Entre las categorías principales de ncRNAs encontramos a: miRNAs (microRNAs, por sus siglas en inglés), siRNAs (RNAs pequeños de interferencia, por sus siglas en inglés) piRNAs (piwi-interacción RNAs, por sus siglas en inglés), snRNAs (RNAs pequeños nucleares, por sus siglas en inglés), snoRNAs (RNAs pequeños nucleolares, por sus siglas en inglés), tRNAs (RNAs de transferencia, por sus siglas en inglés), y lncRNAs (RNAs largos no codificantes, por sus siglas en inglés) [50, 52]. A continuación se mencionan las principales características de los microRNAs y los snoRNAs, por ser de nuestro interés.

## microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs no codificantes que pueden regular negativamente la expresión de sus genes blancos degradando los RNA mensajeros o reprimiendo la traducción [53]. Más recientemente, se ha reconocido que la desregulación de miRNAs tiene un papel clave no solo en el inicio de la formación del tumor, sino también en la progresión del cáncer. Los miRNAs ejercen sus funciones oncogénicas al regular la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores, y también regulan la expresión de proteínas que participan en procesos tales como la migración celular, la proliferación y la neoangiogénesis [54].

Se ha descrito la existencia de un grupo de miRNAs (miR199-5p, miR-1993p y miR1908) que tienen como blancos genes asociados a las metástasis [55]. En el cáncer de mama se ha descrito la participación de moléculas, que funcionan como supresores durante la transcripción de varios miRNAs (miR-10b, miR-196) relevantes para metástasis [56]. Varios estudios han indicado que los miRNAs frecuentemente forman circuitos de retroalimentación, ya que podrían ser regulados por factores de transcripción, que los pueden dirigir directa o indirectamente mediante la desregulación en la expresión de los miRNAs [51, 57].

## snoRNAs

Los snoRNAs, están altamente conservados, y están formados por secuencias de 60-300 nucleótidos [58]. Como su nombre lo indica su ubicación celular es el nucleolo, en donde modifican y procesan al rRNA (RNA ribosomal , por sus siglas en inglés). Entre las principales modificaciones que dirigen los snoRNAs se encuentran la metilación y la pseudouridilación que son necesarias para el funcionamiento del esplaiceosoma. Estas modificaciones las lleva a cabo un subgrupo de snoRNA conocido como scaRNA (RNAs pequeños específicos del cuerpo de Cajal) [52]. La evidencia indica que los snoRNAs y los scaRNAs tienen importantes papeles en la regulación de la progresión del cáncer, aunque se desconoce si el mecanismo es independiente de su actividad canónica [59]. Algunos ejemplos de la participación de los snoRNAs en cáncer son: la expresión del SNORA42 se asocia al cáncer de pulmón [60], el snoRNAU50 se encuentra mutado en células de cáncer de próstata y en muestras de pacientes con cáncer de próstata, en contraste el snoRNAU50 tipo que está presente en los casos controles analizados [61].

Hasta la fecha se ha demostrado la participación de la MT4-MMP en el desarrollo del cáncer y durante la progresión. Aunque se han descrito algunos de los mecanismos tales como el incremento en la formación de tumores, la invasión y la formación de metástasis, también se ha reportado cómo la expresión de la MT4-

MMP en algunos tipos tumorales es asociada al mal pronóstico o estadios avanzados de la enfermedad. Sin embargo, se desconocen los mecanismos particulares que regulan sus distintas actividades en el desarrollo del cáncer. Por otra parte, la desregulación de los sncRNAs en cáncer y en la progresión ha sido demostrada en diversos estudios [62-64]. Por los motivos anteriormente mencionados y debido a la importancia de conocer más sobre la participación de la MT4-MMP en la progresión tumoral y poder establecer algún nuevo mecanismo de su participación en el cáncer, analizamos la expresión de los miRNAs desregulados por la sobreexpresión de la MT4-MMP.

## **Hipótesis**

La sobreexpresión de la MT4-MMP desregula la expresión de miRNAs asociados a la progresión tumoral en células de cáncer mama.

## **Objetivo**

Analizar los miRNAs desregulados por la sobreexpresión de la MT4-MMP en células de cáncer de mama.

## **Objetivos específicos**

1. Establecer una línea celular de cáncer de mama con niveles elevados de la MT4-MMP y analizar su potencial tumorigénico *in vivo*.
2. Analizar el perfil de expresión de miRNAs modulados por la MT4-MMP en células de cáncer de mama.
3. Analizar las vías de señalización asociadas al perfil de expresión de los miRNAs modulados por la MT4-MMP.
4. Analizar la relevancia clínica de los miRNAs regulados por la MT4-MMP en cáncer de mama.



## Metodología

### *Cultivo celular*

Las células MDA-MB-231 fueron compradas en American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Las células se cultivaron en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB). Las células fueron incubadas a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>.

### *Transfección celular*

Para sobreexpresar la MT4-MMP en las células MDA-MB-231, se sembraron 250,000 células en placas de seis pozos y se transfectaron con 2.8 microgramos de DNA y 8.3 microlitros de Fugene HD (Promega, Madison, WI, USA). Después de 48 horas las líneas celulares se seleccionaron con G418 (1.5mg/ml) por 30 días.

### Plásmidos

La construcción de la MT4-MMP en el vector pcDNA3.1 fue proporcionada por el Dr. Xose Puente, (Universidad de Oviedo, Departamento de Bioquímica y Biología molecular). El control que se usó fue el vector vacío pcDNA3.1 (Invitrogen, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA).

## Transcripción reversa y PCR cuantitativo

El ARN total fue purificado de las células MDA-MB-231 (MDA-MB-231 PCDNA3.1 and MDA-MB-231-MT4) con TRIzol (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se sintetizó a partir de 1 µg de RNA usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El PCR cuantitativo (qPCR, por sus siglas en inglés) se realizó con SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Como control endógeno se consideró la expresión de GAPDH. Las reacciones se realizaron en el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem).

Los primers usados fueron: GAPDH -F 5'- CCGGTTTCTATAAATTGAGCCCGCA-3', GAPDH-R 5'-GAGCGATGTGGCTCGGCTG-5'. MT4-F 3'-CACCAAGTGGAACAAGAGGAACCT-3', MT4-R 5'-TGGTAGTACGGCCGCATGATGGAGTGTGCA-3'. Las condiciones para las reacciones de PCR fueron: GAPDH 95°C 10m 1 ciclo; 95°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s 40 ciclos. MT4 95°C 10m 1 ciclo; 95°C 30s, 57.5°C 30s, 72°C 30s 40 ciclos. Los datos del PCR cuantitativo fueron analizados por medio de la técnica de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

## Xenotransplante Zebrafish Husbandry y microinyección celular

Los xenotransplantes fueron realizados por la Dra. Cecilia Zampedri. La cepa silvestre tipo AB de pez cebra se crió y se mantuvo normalmente (28,5 °C, pH 7,2-7,4, 12 horas y 12 horas fuera del ciclo de luz). Los embriones de peces se obtuvieron mediante cruces naturales. Las células que contenían solo el vector MDA-MB-231-PC y las células que contenían el plásmido MDA-MB-231-MT4 se inyectaron a una concentración de  $4 \times 10^7$  células/ml. Esta mezcla se cargó en una aguja de vidrio de borosilicato tirado por un extractor de micropipetas Flaming/Brown. Se implantaron 5-10 nanolitros de suspensión que contenían 125 ó 250 células en cada embrión de pez cebra a través del espacio de la yema en una sola inyección mediante el uso de un microinyector de presión de aire regulado electrónicamente. Después de la inyección, el pez cebra se lavó una vez y se mantuvo a 34°C. Los embriones se controlaron durante cinco días después de la inyección (DPI) para la formación del tumor y se documentaron fotográficamente. La proporción de individuos que formaron tumores en cada grupo se relacionó con la capacidad tumorigénica de las células inyectadas.

## Microarreglos y análisis

El RNA total derivado de tres réplicas de las líneas celulares estables se hibridó con GeneChip miRNA 4.0 (Affymetrix, USA). El análisis de la expresión de los miRNAs se realizó con Transcriptome Analysis Console [65] Software 4.0. (Affymetrix, USA).

La normalización de los datos de los miRNAs diferencialmente expresados se realizó con los siguientes parámetros: Fold Change < -1.5 or > 1.5, gene-Level P-Value < 0.05 and\_Anova Method: ebayes. El software IPA (Ingenuity Pathway Analysis) (Qiagen Silicon Valley, USA) fue usado para analizar las interacciones de los miRNAs diferencialmente expresados. Se empleó el Core Analysis para obtener las principales funciones y moléculas. Para el análisis de las principales funciones celulares y biológicas de los diez principales miRNAs regulados positiva y negativamente se usó la herramienta miRNet [66].

### *Análisis de la expresión de miRNAs por PCR cuantitativo*

Para la validación de la expresión de miRNAs, se transcribieron de forma inversa diez nanogramos de RNA total utilizando el kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cDNA se amplificó usando los siguientes ensayos de microRNA Taqman: hsa-miR-130a (000454), hsa-miR-224 (000599) y RNU6B (001093) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). La expresión de RNU6B

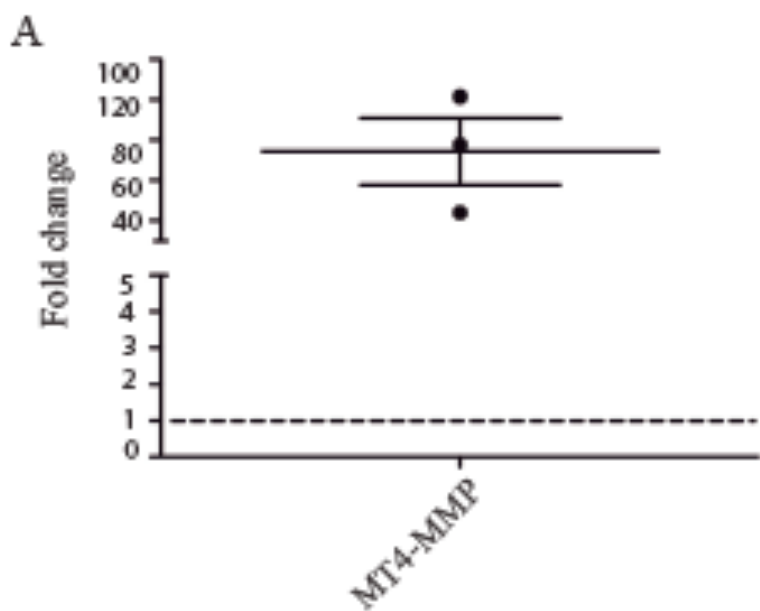
se usó como control para normalizar los datos. Para calcular la expresión relativa de miRNAs usamos el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## Resultados

**La sobreexpresión de la MT4-MMP en células de cáncer de mama incrementan su capacidad de formar tumores en xenotransplantes en pez cebra.**

Altos niveles de expresión de proteína de la MT4-MMP se han reportado en muestras de cáncer de mama comparadas con tejido normal de mama [44]. Además, la sobreexpresión de esta metaloproteasa en la línea celular MDA-MB-231 incrementa el crecimiento tumoral y las metástasis [44], mediante diversos mecanismos [45-47]. Para explorar la posible participación de los miRNAs en los efectos mediados por la MT4-MMP en cáncer de mama, primero se establecieron las líneas celulares transfectadas establemente con el vector vacío y con la construcción de la MT4-MMP (MDA-MB-231/pcDNA3.1 y MDA-MB-231/MT4, respectivamente). Después, en las líneas celulares MDA-MB-231/pcDNA3.1 y MDA-MB-231/MT4 se analizó la expresión de la MT4-MMP por qPCR, los valores se normalizaron con respecto a las células control (Figura 3A).

Al evaluar la tumorigenicidad de las células que sobreexpresan a la MT4-MMP en un modelo de xenotransplante en pez cebra encontramos, como se muestra en la figura 3B, que la sobreexpresión de la MT4-MMP incrementó el número de embriones con tumores, en comparación con los embriones que fueron inyectados con las células control. Este resultado muestra la capacidad tumorigénica de la MT4-MMP en un modelo *in vivo*.



**B**

Cell line	Number of injected cells/embryo	Embryos with tumor
pcDNA3.1	300	2/8 (25%)
	400	2/8 (25%)
	500	3/7 (43%)
MT4-MMP	300	2/8 (25%)
	400	5/8 (62.5%)
	500	6/8 (75%)

MDA-MB-231-pcDNA3.1



MDA-MB-231-MT4-MMP

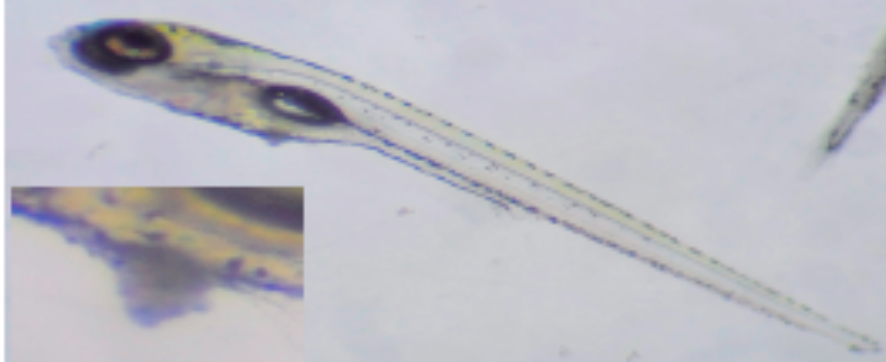


Figura 3 La sobreexpresión de la MT4-MMP en células MDA-MB-231 incrementa el número de tumores en xenotransplantes en pez cebra. A) Niveles de expresión de la MT4-MMP en las células MDA-MB-231 transfectadas establemente, validadas por qPCR. La gráfica muestra la media de las tres réplicas biológicas y las barras de error representan el error estándar de la media ( $\pm$ SEM). La línea punteada representa los niveles de expresión de las células control MDA-MB-231/pcDNA3.1. Los datos fueron normalizados con la expresión de GAPDH. B) Los embriones inyectados con las células MDA-MB-231/MT4-MMP formaron un mayor número de tumores versus los embriones que fueron inyectados con las células MDA-MB-231/pcDNA3.1 a diferentes densidades de células inyectadas. En la fotografía representativa de los embriones se muestra en el recuadro la zona en la que se formó el tumor por las células que sobreexpresan la MT4-MMP.



***Perfil de expresión de miRNAs en células de cáncer mama que sobreexpresan MT4-MMP.***

El perfil de miRNAs diferencialmente modulados en las células MDA-MB-231/pcDNA3.1 y MDA-MB-231/MT4 se analizó por microarreglos de expresión de miRNAs. Previamente ambas líneas celulares se cultivaron en monocapa y se realizó la extracción del RNA total de los triplicados biológicos de cada uno de las líneas y se hibridó con el GeneChip miRNA 4.0. La figura 4A muestra el número de miRNAs modulados por la MT4-MMP ( $FC \geq 1.5$ ,  $p < 0.05$ ). Los miRNAs desregulados en total fueron 65, de los cuales 24 fueron regulados positivamente y 41 fueron regulados negativamente en las células MDA-MB-231/MT4. Como se esperaba, el agrupamiento no supervisado de los perfiles de expresión se relacionó con la expresión de la MT4-MMP (Figura 4B).

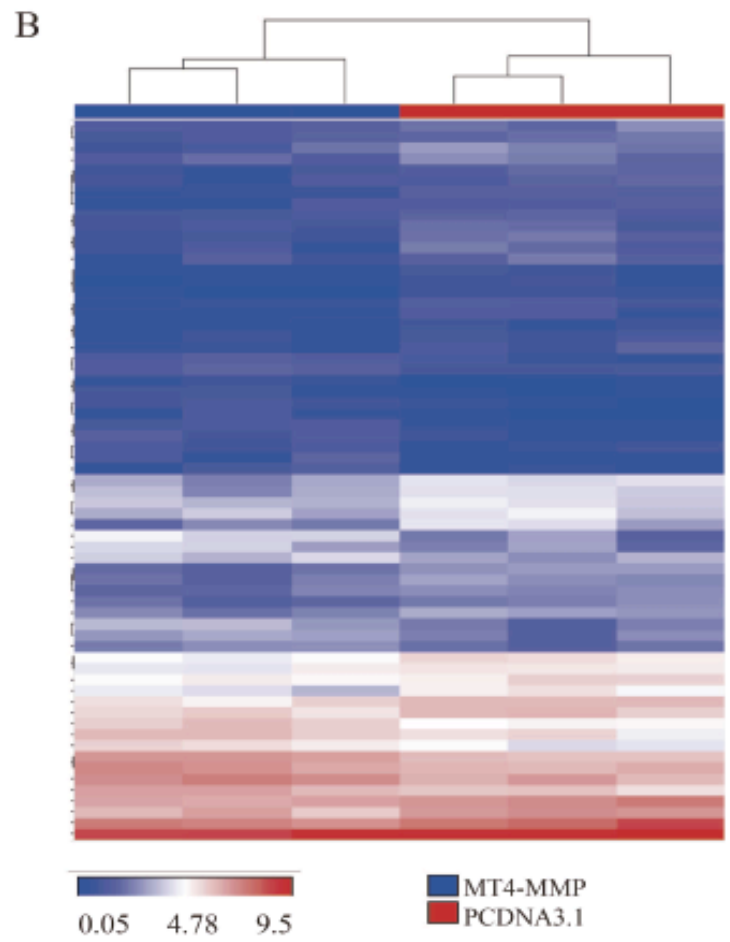
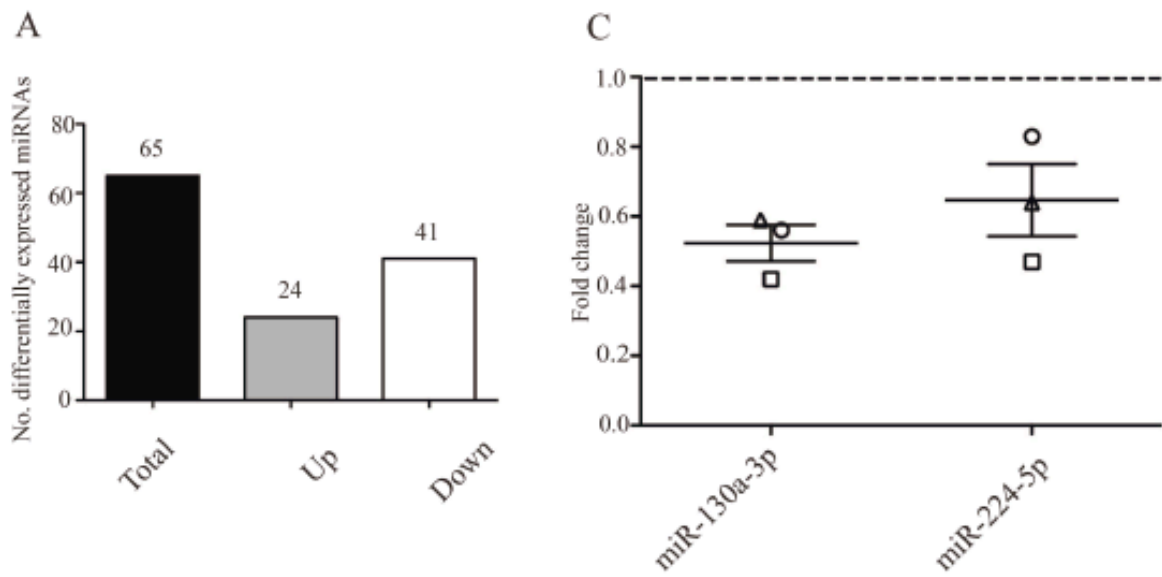


Figura 4. Expresión diferencial de miRNAs modulados por la MT4-MMP. El análisis de la expresión de los miRNAs se realizó con la TAC Software 4.0. A) La gráfica muestra el número de miRNAs desregulados. B) Mapa de calor de las miRNAs diferencialmente expresados en las células MDA-MB-231/MT4-MMP y MDA-MB-231/pcDNA3.1, este muestra cómo están diferenciados ambos grupos, en azul los miRNAs subexpresados y en rojo los miRNAs sobreexpresados. C) Niveles de expresión de miR-130a-3p y miR-224-5p, validados por PCR cuantitativo. La gráfica muestra el valor promedio y las barras de error representan el error estándar de la media ( $\pm$ SEM), la línea punteada representa los niveles de expresión de las células MDA-MB-231/pcDNA3.1, los datos fueron normalizados con la expresión de RNU6B.

En la tabla 1 se muestran las listas de los principales miRNAs desregulados. De esta lista seleccionamos aleatoriamente dos miRNAs regulados negativamente para la validación de los datos del microarreglo por PCR cuantitativo, el miR-130a-3p y el miR-224-5p. En la figura 4C se muestran los resultados del análisis por PCR, en donde se observa que los dos miRNAs analizados fueron regulados negativamente en las células que sobreexpresan la MT4-MMP, estos resultados concordaron con los datos del microarreglo.

Tabla 1. Los diez principales miRNAs regulados por la sobreexpresión de la MT4-MMP

<b>miRNA</b>	<b>Fold change</b>
<b>Regulados positivamente</b>	
<b>miR-501-5p</b>	3.19
<b>miR-1301-3p</b>	2.98
<b>miR-4788</b>	2.28
<b>miR-500a-5p</b>	2.13
<b>miR-6074</b>	1.98
<b>miR-4802-3p</b>	1.88
<b>miR-532-5p</b>	1.84
<b>miR-362-5p</b>	1.80
<b>miR-589-3p</b>	1.75
<b>miR-501-3p</b>	1.66
<b>Regulados negativamente</b>	
<b>miR-224-5p</b>	-4.01
<b>miR-4723-5p</b>	-2.53
<b>miR-3617-5p</b>	-2.47
<b>miR-6980-5p</b>	-2.04
<b>miR-6808-5p</b>	-2.04
<b>miR-4479</b>	-2.04
<b>miR-4722-5p</b>	-2.01
<b>miR-191-3p</b>	-2.00
<b>miR-595</b>	-1.98
<b>miR-130a-3p</b>	-1.96

Los diez principales miRNAs regulados positiva y negativamente por la expresión de la MT4-MMP (Tabla 1), se han asociado al cáncer. Entre los miRNAs regulados positivamente encontramos la asociación de su expresión con diferentes tipos de cáncer: el miR-501-5p con el cáncer gástrico [67] y el carcinoma hepatocelular [68]; el miR-1301-3p en el cáncer de mama [69]; el miR-4788 en el cáncer de mama [70]; el miR-500a-5p asociado con el cáncer de mama [71]; el miR-4802-3p se expresa en cáncer de mama [70]; el miR-532-5p en el cáncer de ovario [72] y en melanoma [73]; el miR-362-5p promueve el crecimiento tumoral y las metástasis en carcinoma hepatocelular [74]; el miR-589-3p en el cáncer colorectal [75]; el miR-6074 se expresa en endotelio bajo condiciones de hipoxia [72] y el miR-501-3p en el cáncer de páncreas y promueve la invasión a través de la E-caderina [76].

En cuanto a los miRNAs regulados negativamente, en la literatura encontramos que la baja expresión esta asociada con algunos tipos de cáncer: el miR-224-5p en cáncer de pulmón [77], en melanoma[78] y en cáncer de ovario [65]; el miR-4723-5p en el cáncer de mama [70]; el miR-4722-5p en el cáncer de mama [70]; el miR-191-3p promueve la proliferación, la migración, la quimioresistencia y la supervivencia en cáncer de mama [79]; el miR-595 en neuroblastoma [79]; el miR-130a-3p expresión negativa promueve el crecimiento y la invasión celular en glioma [80]; el miRNA-224 cuando es expresado en bajo niveles se asocia a un fenotipo de cáncer de mama más agresivo [81].

Interesantemente otros RNAs pequeños no codificantes (sncRNA), que también fueron interrogados en el microarreglo de expresión empleado, fueron modulados por la sobreexpresión de la MT4-MMP (Tabla 2).

Tabla 2. RNAs pequeños no codificantes modulados por la MT4-MMP

sncRNA	Nombre (Símbolo)	Biotipo	Fold change	P-val
<b>Regulados positivamente</b>				
ENSG00000199411	small nucleolar RNA SNORD62	snoRNA	1.88	0.0022
HBII-382	small Cajal body-specific RNA 2 (SCARNA2)	scaRNA	1.84	0.0461
U85	small Cajal body-specific RNA 10 (SCARNA10)	scaRNA	1.72	0.0112
ENSG00000265706	small nucleolar RNA, C/D box 53B (SNORD53B)	snoRNA	1.7	0.0229
U71d	small nucleolar RNA, H/ACA box 71D (SNORA71D)	snoRNA	1.53	0.0198
<b>Regulados negativamente</b>				
U70D	small nucleolar RNA H/ACA box 70D (SNORAD70D)	snoRNA	-2.16	0.0372
HBI-61	small nucleolar RNA, H/ACA box 81 (SNORA81)	snoRNA	-1.7	0.0365
HBI-100	small Cajal body-specific RNA 3 (SCARNA3)	scaRNA	-1.69	0.0431

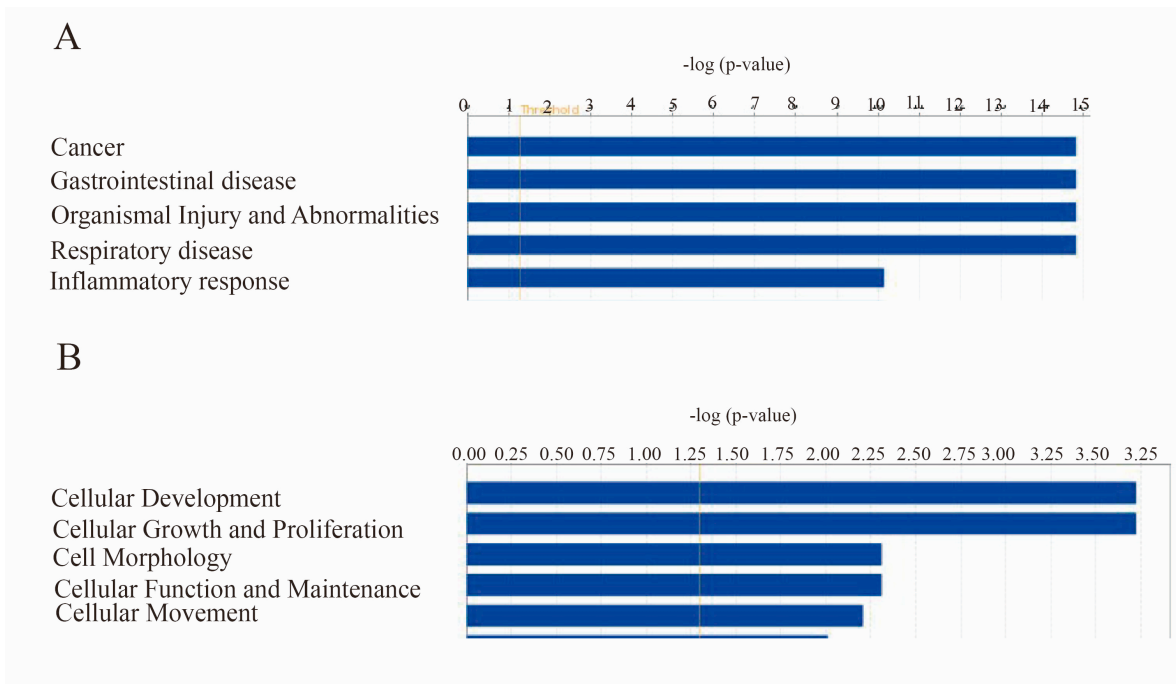
ENSG00000207098	small nucleolar RNA SNORA70	snoRNA	-1.66	0.0451
U32B	small nucleolar RNA, C/D box 32B (SNORD32B)	snoRNA	-1.62	0.0049
ENSG00000212383	small nucleolar RNA SNORA48	snoRNA	-1.58	0.0056
U77	small nucleolar RNA, C/D box 77 (SNORD77)	snoRNA	-1.51	0.0349

sncRNA modulados por la MT4-MMP en células de cáncer de mama, el análisis se realizó con la TAC Software 4.0.

### ***La MT4-MMP modula la expresión de miRNAs asociados a cáncer***

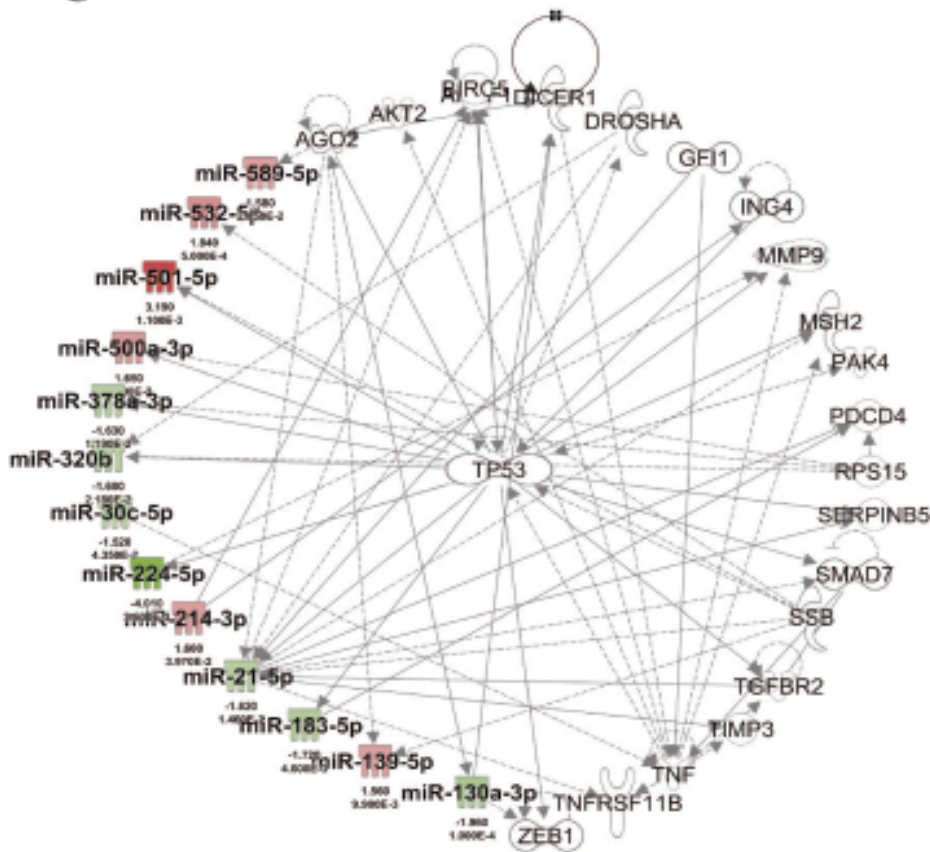
Como se mencionó anteriormente los miRNAs participan en la regulación de diversas patologías, para conocer más acerca de los procesos biológicos y celulares relacionados al perfil de miRNAs modulados por la MT4-MMP, los datos obtenidos fueron analizados de forma integral con el software IPA (Ingenuity Pathway Analysis). La principal enfermedad asociada con los miRNAs desregulados fue el cáncer, sin embargo, también se encontró una asociación con otro tipos de patologías como: las enfermedades gastrointestinales, las anormalidades y el daño orgánico, la enfermedad respiratoria y la respuesta inflamatoria (Figura 5A). Adicionalmente, el perfil de miRNAs modulados por la MT4-MMP se relacionó con procesos biológicos como: la tumorigénesis y la progresión del cáncer fueron significativamente enriquecidos, por ejemplo, el desarrollo celular, el crecimiento y la proliferación celular, la morfología celular, el

movimiento celular y el ciclo celular, entre otros (Figura 5B). En cuanto a las vías de señalización moduladas por los miRNAs el software estimó únicamente tres vías, de las cuales las dos principales estuvieron asociadas con el cáncer y son dependientes de la p53 (Figura 5C) y la E-caderina respectivamente (Figura 5D). Interesantemente en estas vías solo estuvieron presentes algunos de los principales miRNAs desregulados (ver figura 5).





C



D

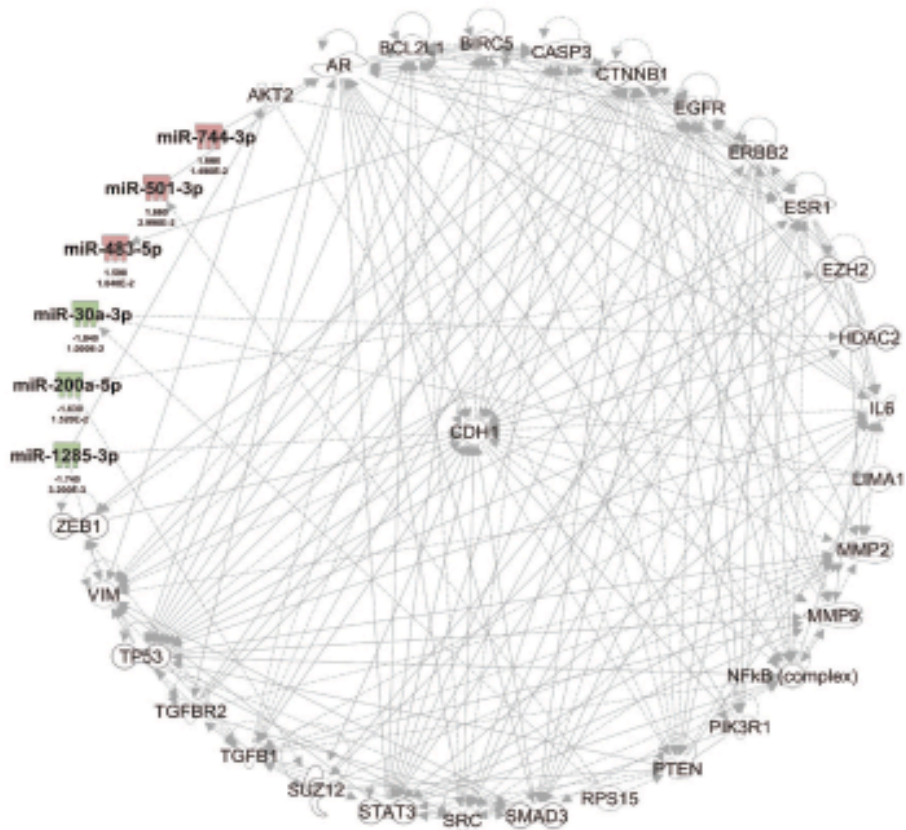
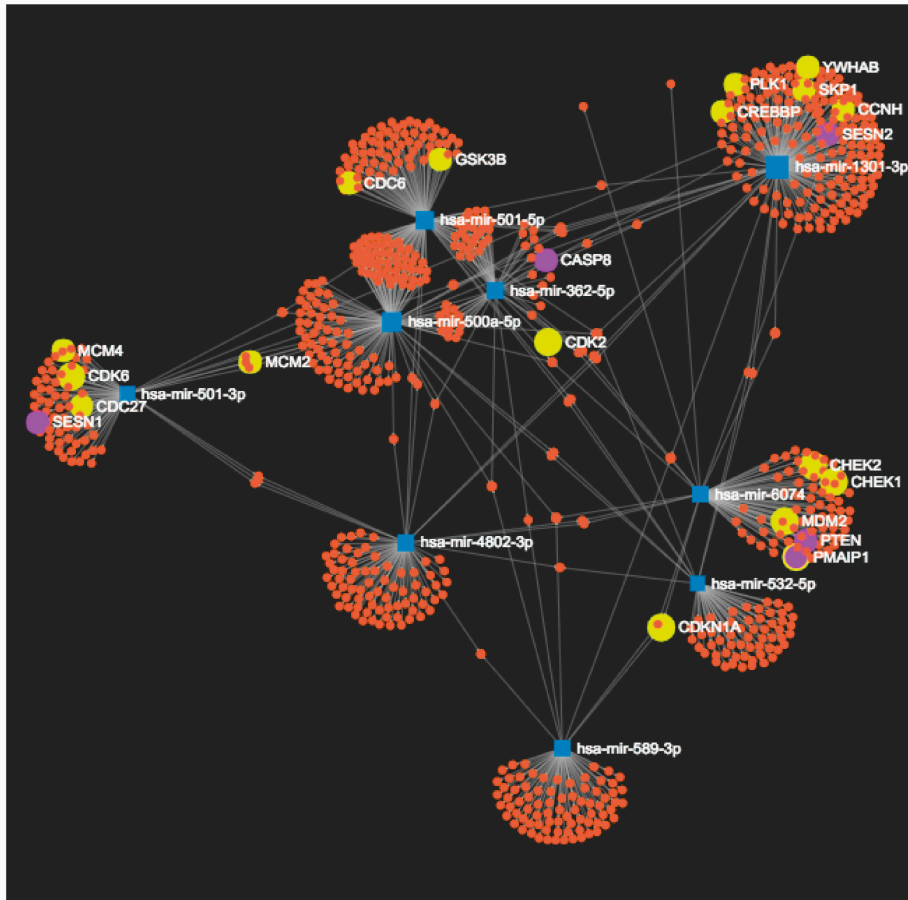


Figura 5. Predicción de las vías de señalización asociadas a los miRNAs modulados por la sobreexpresión de la MT4-MMP en las células MDA-MB-231. A) Las cinco principales enfermedades asociadas a la desregulación de miRNAs predichas por el software IPA. B) Las principales funciones moleculares y celulares moduladas por la desregulación de miRNAs. C) La vía de señalización 1 predicha en el software IPA muestra a TP53 como molécula central. En esta red estuvieron involucrados los siguientes miRNAs de los principales diez regulados positivamente: miR-589-5p, miR-532-5p y miR-501-5p, y de los principales diez miRNAs regulados negativamente, solo miR-130a-3p y miR-224-5p estuvieron presentes D) En la red 2 la molécula central fue la CDH1. En este vía solo uno de los principales diez miRNAs regulados positivamente estuvo presente, el miR-501-3p.

Debido a que pocos miRNAs de la Tabla 1 estuvieron presentes en las vías que arrojó el análisis con el software IPA, hicimos otro análisis considerando únicamente los principales miRNAs modulados por la MT4-MMP, tanto los regulados positiva como negativamente. Para realizar este análisis se utilizó la herramienta miRNet [66], con la cual encontramos las interacciones entre los genes blancos de cada miRNA y además realizamos un análisis de enriquecimiento de vías usando la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). En la figura 6 se muestran las interacciones entre los blancos predichos para los miRNAs regulados positivamente (Figura 6A), y para los miRNAs regulados negativamente (Figura 6B). Los blancos de los miRNAs regulados positivamente fueron significativamente enriquecidos en la vía de ciclo

celular y en la vía de p53 (Tabla 3), las moléculas involucradas en esta vía se resaltan en la figura 6A. Los blancos de los miRNAs regulados negativamente fueron enriquecidos significativamente en diferentes vías, por ejemplo las que están relacionadas con cáncer (moléculas resaltadas en la figura 6B), la vía de p53, ciclo celular, la vía de TGF-  $\beta$ , uniones adherentes, la vía de MAPK, la vía de ErbB, la vía de Wnt, la apoptosis y a las adhesiones focales (Tabla 3). Todas estas vías participan en los conocidos marcadores del cáncer [83].

A



B

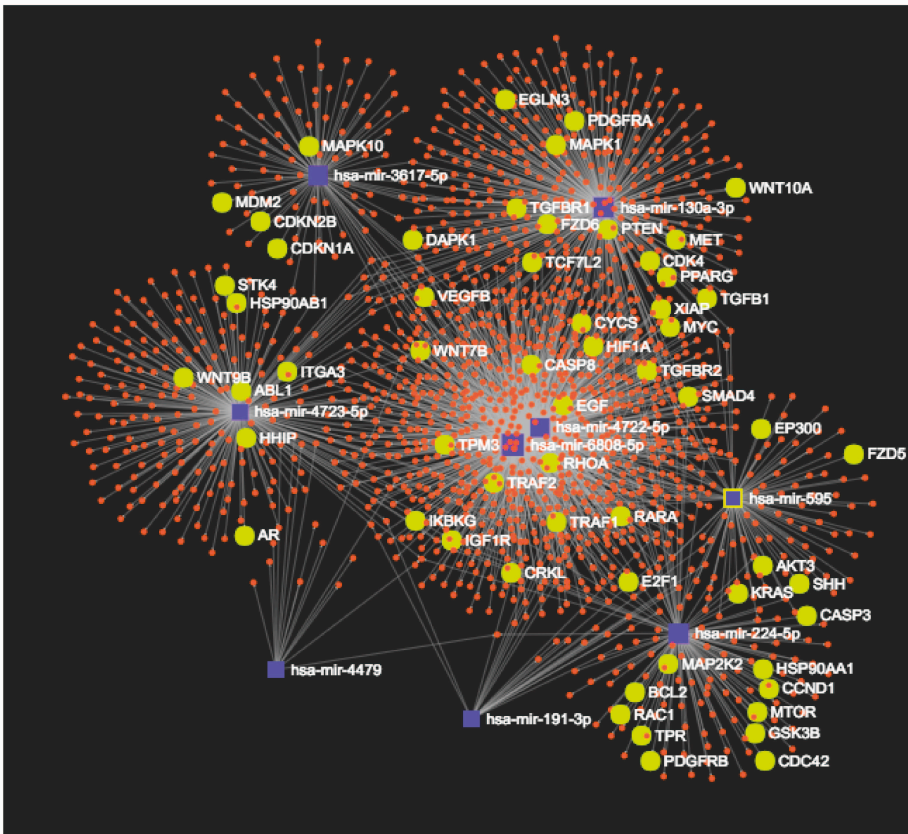


Figura 6. Predicción de las interacciones de los genes blanco de los miRNAs modulados por la sobreexpresión de la MT4-MMP. A) Esquema que muestra la interacción de los genes blancos de los diez principales miRNAs regulados positivamente. Las moléculas relacionadas con ciclo celular se resaltan en amarillo y las moléculas asociadas a p53 se resaltan en morado. B) Interacciones de los genes blanco de los diez principales miRNAs regulados negativamente. En amarillo se muestran las moléculas asociadas a cáncer.

Tabla 3. Funciones enriquecidas anotadas por KEGG.

<b>Nombre</b>	<b>Blancos</b>	<b>P-val</b>
<i>miRNAs regulados positivamente</i>		
Ciclo celular	16	0.0226
Vía de señalización de p53	16	0.0226
<i>miRNAs regulados negativamente</i>		
Vías en cáncer	59	0.00000699
Vía de señalización de p53	21	0.0000454
Ciclo celular	29	0.000105
Vía de señalización TGF-beta	21	0.000638
Uniones adherentes	18	0.00113
MAPK signaling pathway	40	0.014
Vía de señalización ErbB	17	0.0252
Vía de señalización Wnt	24	0.0317
Apoptosis	16	0.0323
Adhesiones focales	30	0.0419

## Los miRNAs modulados por la MT4-MMP están relacionados con la progresión en cáncer de mama

Finalmente, para analizar la significancia clínica de los miRNAs modulados por la MT4-MMP, realizamos una búsqueda en una base de datos públicos [84]. De los diez principales miRNAs regulados negativamente, solo la baja expresión del miR-130a se asoció con una baja sobrevida global en pacientes con cáncer de mama (Figura 7A, posibilidad de riesgo (HR) = 0.79 (rango 0.64 – 0.97) logrank P = 0.027). Interesantemente, la alta expresión de algunos de los diez principales miRNAs regulados positivamente fue asociada con el mal pronóstico en el cáncer de mama. En la Figura 7B, miR-501-5p HR = 1.39 (rango 1.14 – 1.7) logrank P = 0.0011; Figura 7C, miR-1301 HR = 1.34 (rango 1.08 – 1.65) logrank P = 0.0067; Figura 7D, miR-500a HR = 1.25 (rango 1.02 – 1.52) logrank P = 0.03; Figura 7E, miR-532-5p HR = 1.32 (rango 1.07 – 1.63) logrank P = 0.0092; Figura 7F, miR-362-5p HR = 1.34 (rango 1.1 – 1.64) logrank P = 0.0035; Figura 7G, miR-589 HR = 1.82 (rango 1.03 – 3.022) logrank P = 0.036; Figura 7H, miR-501-3p HR = 1.29 (rango 1.06 – 1.58) logrank P = 0.012). Estos datos apoyan la relevancia de los miRNAs modulados por la sobreexpresión de la MT4-MMP en cáncer de mama.

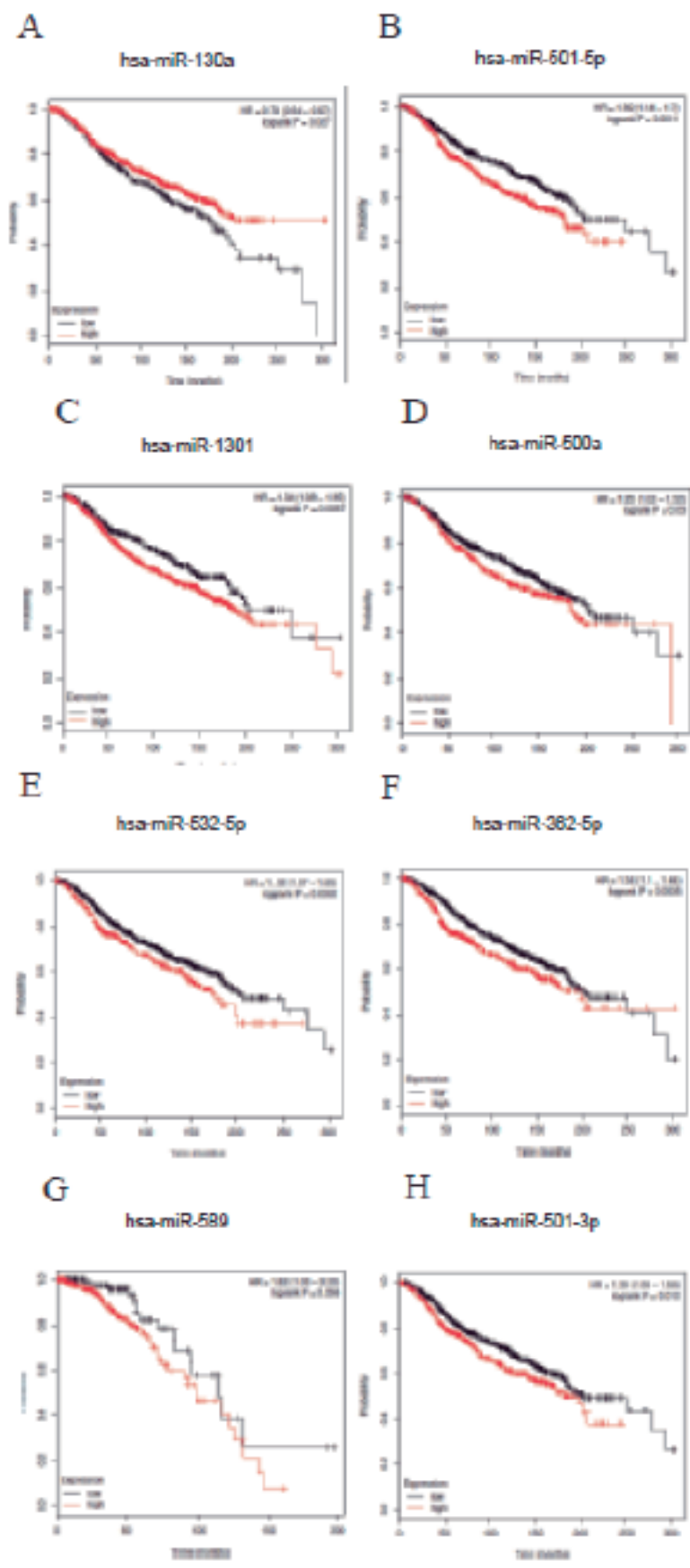


Figura 7. Significancia clínica de los miRNAs desregulados por la MT4-MMP en cáncer de mama. Gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia global de pacientes con cáncer de mama clasificadas por la expresión del miR-130a (A). B-H) Supervivencia global de pacientes con cáncer de mama clasificadas por la expresión de los miRNAs indicados en la figura.



## Discusión

Las metaloproteasas de matriz son miembros de una familia de proteasas que pueden degradar y remodelar la matriz extracelular. En condiciones fisiológicas las MMPs participan en distintos procesos celulares, como el desarrollo embrionario y la apoptosis. Además participan en condiciones patológicas como en la invasión tumoral y las metástasis [85]. La capacidad tumorigénica de las MMPs se lleva a cabo mediante la catálisis en los sustratos de la MEC y en moléculas que no son parte de la MEC, además se ha documentado la actividad no catalítica de las metaloproteasas [86].

La MT4-MMP es miembro de una subfamilia de MMPs tipo membrana y está anclada por una molécula de GPI [19]. La MT4-MMP es el miembro más diferente de la familia de las MT-MMPs y tiene un reducido número de sustratos de la MEC [21, 26], por esta razón su participación en el proceso de invasión tumoral es controversial [37, 44]. Sin embargo, se ha reportado la participación de la MT4-MMP en el crecimiento tumoral y en la progresión en cáncer de cabeza y cuello [37], cáncer de mama [44, 46, 47], melanoma [40] y cáncer gástrico [38].

En cáncer de mama se han estudiado la mayor parte de los mecanismos descritos por los cuales la MT4-MMP promueve el crecimiento tumoral y las metástasis. Se ha establecido que la MT4-MMP induce cambios en la arquitectura de los vasos sanguíneos tumorales [45] y además induce un switch en la angiogénesis [46],

estos procesos son dependientes de su actividad proteolítica. Interesantemente, la MT4-MMP estimula la proliferación al incrementar la señalización de EGFR, aunque este mecanismo es independiente de la actividad proteolítica de esta metaloproteasa [47].

Con el fin de obtener más información sobre los mecanismos de acción de la MT4-MMP, sobreexpresamos esta enzima en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Para analizar las propiedades tumorigénicas de las células que sobreexpresan la MT4-MMP, utilizamos un modelo de xenotransplante de pez cebra [87]. Similar al trabajo de Chabottaux y colaboradores [44], encontramos que la sobreexpresión de la MT4-MMP indujo un incremento en la incidencia tumoral de las células MDA-MB-231 en experimentos *in vivo* (Figura 3B).

Después evaluamos el perfil de expresión de los miRNAs modulados por la sobreexpresión de la MT4-MMP usando microarreglos de expresión de miRNAs. El análisis de datos de los microarreglos mostró la desregulación de 65 miRNAs, de los cuales 24 fueron regulados positivamente y 41 regulados negativamente (Figura 4A). Los microarreglos empleados en este trabajo, los microRNA 4.0 de Affymetrix, también evalúan la expresión de otros RNAs pequeños no codificantes. Interesantemente, la MT4-MMP moduló la expresión de diferentes RNA pequeños nucleolares (snoRNAs, por sus siglas en inglés) y algunos RNA pequeños específicos de Cajal (scaRNAs, por sus siglas en inglés) (Tabla 2). Los snoRNAs pueden ser clasificados como caja C/D y H/ACA y guían las modificaciones

enzimáticas de otros RNA, pero principalmente del RNA ribosomal (rRNA, por sus siglas en inglés) [88]. Debido a que se ha documentado que la biogénesis del rRNA es más frecuente en las células de cáncer en comparación con las células normales, se ha propuesto un papel de los snoRNA en el desarrollo del cáncer. Las alteraciones en la expresión de snoRNAs se han asociado a la iniciación y progresión del cáncer [88]. Recientemente, un estudio en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (TNBC), ha identificado la expresión específica de snoRNAs en cuatro subtipos transcripcionales de este tipo de cáncer de mama [89]. En el presente estudio, reportamos por primera vez la regulación de algunos de estos snoRNAs, como SNORD48, SCARNA3 y SNORA70 (Tabla 2). Estos datos pueden evidenciar la habilidad de la MT4-MMP de modular la expresión de moléculas nucleares en células de cáncer mama, un papel aún no descrito de esta metaloproteasa y de relevante importancia [82].

Con respecto a los miRNAs desregulados por la sobreexpresión de la MT4-MMP, el análisis de las vías reguladas por ellos reveló que están principalmente relacionados con cáncer (Figura 5A) y que modulan funciones celulares como crecimiento celular y proliferación, morfología celular, función celular y mantenimiento y movimiento celular (Figura 5B). Dos vías dependientes de p53 y E-cadherina, que están relacionadas con el cáncer se alteraron (Figura 5C). Sorprendentemente, en estas dos vías, solo algunos de los diez principales miRNAs regulados negativamente y positivamente estaban involucrados. Sin

embargo, el supresor tumoral p53 es el gen silenciado o mutado más frecuente en el cáncer. La proteína p53 actúa como guardián del genoma, ya que puede detener el ciclo celular e inducir apoptosis cuando se daña el DNA [90], adicionalmente hay nuevas pruebas que apoyan los papeles oncogénicos de p53 mutado [91]. Además, la E-cadherina, que participa en la adhesión célula-célula, también funciona como un gen supresor tumoral, y la pérdida de su expresión se ha relacionado con un mal pronóstico en cáncer [92].

Los reportes previos de diferentes grupos de investigación muestran asociaciones entre la expresión de los miRNAs y diferentes tipos de cáncer. De los miRNAs regulados positivamente por la expresión de la MT4-MMMP (Tabla 1), que participan en las vías de señalización analizadas por el IPA (Figura 5 B y C), se ha encontrado una mayor expresión en diferentes tipos de cáncer comparados con el tejido normal, por ejemplo: el miR-501-5p está regulado positivamente en cáncer gástrico [67] y carcinoma hepatocelular [68]; el miR-1301-3p tiene una expresión diferencial en cáncer de mama comparada con el tejido normal [69]; el miR-500a-5p tiene una mayor expresión el cáncer de mama comparado con tejido normal [71]; el miR-532-5p tiene alta expresión en cáncer de ovario [72] y está regulado positivamente en melanoma [73]; el miR-362-5p promueve el crecimiento tumoral y las metástasis en carcinoma hepatocelular [74]. En cuanto los miRNAs regulados negativamente encontramos que la baja expresión de miR-130a-3p

promueve el crecimiento y la invasión celular en glioma [80] y la baja expresión del miRNA-224 esta asociado a un fenotipo agresivo de cáncer de mama [81].

Como se menciono anteriormente, existe evidencia de la participación de los miRNAs de la Tabla 1 en el cáncer, sin embargo, es importante resaltar que varios de los miRNAs desregulados por la expresión de la MT4-MMP ya se ha asociado al cáncer de mama, entre los regulados positivamente: miR-1301-3p [69]; miR-500a-5p [71]; miR-4802-3p [70] y el miR-4788 [70] en cuanto a los miRNAs regulados negativamente tenemos: el miR-4723-5p [70]; el el miR-4722-5p [70]; el miR-191-3p [79] y el miRNA-224 [81]. Estos datos refuerzan los hallazgos encontrados en este trabajo.

Para investigar la relevancia de los miRNAs más modulados por la MT4-MMP (Tabla 1), analizamos las redes de interacción de sus genes blancos y determinamos en qué vías estaban más enriquecidos de acuerdo a la base de datos de KEGG [66]. De manera interesante, los genes blanco de los 10 principales miRNAs regulados positivamente y regulados negativamente están implicados en el ciclo celular y la señalización de p53 (Figuras 6A y B, y Tabla 3). Los blancos de los miRNAs regulados negativamente también estuvieron implicados en varias vías relacionadas con el cáncer, como las cascadas de TGF-beta, MAPK, ErbB y Wnt, y también en las uniones adherentes, la apoptosis y la adhesión focal (Tabla 3), estas vías participan en los marcadores del cáncer descritos por Hanahan y colaboradores [83]. En resumen, tanto el análisis de IPA

como el de miRNet demostraron que la proliferación era la principal función celular modulada (Figura 5 y Tabla 3). Sería interesante analizar la participación de la vía p53 en el papel proliferativo inducido por la MT4-MMP ya que la desregulación de la proliferación celular y la apoptosis da como resultado la pérdida de la homeostasis del tejido que conduce al desarrollo del cáncer.

También, encontramos alteraciones en los procesos de adhesión de célula a célula, como lo demuestra la participación de E-caderina y uniones adherentes en las vías analizadas con ambas herramientas bioinformáticas. La E-caderina mantiene la unión entre las células epiteliales a través de las uniones adherentes, y la pérdida de esta proteína permite a las células de cáncer invadir y hacer metástasis [83]. Además, las adherencias focales, que permiten las interacciones y las comunicaciones entre las células y la matriz extracelular fueron alteradas por el perfil de miRNAs inducido por la MT4-MMP. En las células de cáncer, las alteraciones en la dinámica de la adhesión focal dan como resultado un aumento de la migración y la metástasis [93]. Curiosamente, la vía Wnt también está desregulada en muchos cánceres y participa en la iniciación del tumor y la activación de las células madre del cáncer [94].

Finalmente, encontramos que uno de los diez principales miRNAs regulado negativamente, y siete de los diez principales miRNAs regulados positivamente tenían un valor pronóstico para predecir la sobrevivencia de los pacientes con

cáncer de mama (Figura 7), lo que resalta su relevancia clínica en esta enfermedad.

## **Conclusión**

En el presente trabajo, evaluamos por primera vez el perfil de expresión de miRNAs en células de cáncer de mama que sobreexpresan la MT4-MMP. La MT4-MMP indujo la desregulación de miRNAs involucrados en varias vías relacionadas con el cáncer. Algunos de los miRNAs desregulados mostraron una importancia pronóstica en la supervivencia de pacientes con cáncer de mama. Todos estos resultados sugieren que la modulación de miRNAs podría estar involucrada en los mecanismos por los cuales la MT4-MMP regula el crecimiento tumoral y la metástasis en el cáncer de mama.

## Perspectivas

La participación de la MT4-MMP durante el desarrollo del cáncer es relevante, debido a que participa en el crecimiento tumoral y las metástasis, además la expresión de esta MMP se ha asociado a diferentes estadios del cáncer e inclusive como marcador diagnóstico. Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales lleva a cabo estas funciones en la progresión tumoral. La regulación de miRNAs por parte de la MT4-MMP es un hallazgo interesante, ya que los micro RNAs están ampliamente asociadas a progresión tumoral y sería de gran utilidad establecer cómo es el mecanismo por el cual la MT4-MMP regula la expresión de los miRNAs y también a los snoRNAs. Además, se podría validar la participación de los miRNAs desregulados en los mecanismos que ya se han descrito para la MT4-MMP en cáncer de mama. También sería de gran importancia estudiar los miRNAs que modula la MT4-MMP en otros tipos de cáncer y su participación en la progresión tumoral.



## Literatura citada

1. Kleiner, D.E. and W.G. Stetler-Stevenson, *Matrix metalloproteinases and metastasis*. Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **43 Suppl**: p. S42-51.
2. Bissell, M.J. and W.C. Hines, *Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression*. Nat Med, 2011. **17**(3): p. 320-9.
3. Valastyan, S. and R.A. Weinberg, *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms*. Cell, 2011. **147**(2): p. 275-92.
4. Hynes, R.O., *Metastatic potential: generic predisposition of the primary tumor or rare, metastatic variants-or both?* Cell, 2003. **113**(7): p. 821-3.
5. Rydlova, M., et al., *Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases*. Anticancer Res, 2008. **28**(2B): p. 1389-97.
6. Stetler-Stevenson, W.G., *Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1237-41.
7. Brinckerhoff, C.E. and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 207-14.
8. Folgueras, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 411-24.
9. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 562-73.
10. Hadler-Olsen, E., J.O. Winberg, and L. Uhlin-Hansen, *Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets*. Tumour Biol, 2013. **34**(4): p. 2041-51.
11. Mannello, F., *Natural bio-drugs as matrix metalloproteinase inhibitors: new perspectives on the horizon?* Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2006. **1**(1): p. 91-103.
12. Madlener, M., W.C. Parks, and S. Werner, *Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair*. Exp Cell Res, 1998. **242**(1): p. 201-10.
13. Nabeshima, K., et al., *Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration*. Pathol Int, 2002. **52**(4): p. 255-64.
14. Nelson, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications*. J Clin Oncol, 2000. **18**(5): p. 1135-49.
15. Hernandez-Barrantes, S., et al., *Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(2): p. 131-8.

16. li, M., et al., *Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. **231**(1): p. 20-7.
17. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. **141**(1): p. 52-67.
18. Pei, D. and S.J. Weiss, *Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen*. Nature, 1995. **375**(6528): p. 244-7.
19. Sounni, N.E., et al., *MT-MMPS as Regulators of Vessel Stability Associated with Angiogenesis*. Front Pharmacol, 2011. **2**: p. 111.
20. Puente, X.S., et al., *Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma*. Cancer Res, 1996. **56**(5): p. 944-9.
21. Kajita, M., et al., *Human membrane type-4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) is encoded by a novel major transcript: isolation of complementary DNA clones for human and mouse mt4-mmp transcripts*. FEBS Lett, 1999. **457**(3): p. 353-6.
22. Sohail, A., et al., *MT4-(MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2008. **27**(2): p. 289-302.
23. Sohail, A., et al., *Characterization of the dimerization interface of membrane type 4 (MT4)-matrix metalloproteinase*. J Biol Chem, 2011. **286**(38): p. 33178-89.
24. Zhao, H., et al., *Identification and role of the homodimerization interface of the glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane type 6 matrix metalloproteinase (MMP25)*. J Biol Chem, 2008. **283**(50): p. 35023-32.
25. Kolkenbrock, H., et al., *Biochemical characterization of the catalytic domain of membrane-type 4 matrix metalloproteinase*. Biol Chem, 1999. **380**(9): p. 1103-8.
26. Itoh, Y., et al., *Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase*. J Biol Chem, 1999. **274**(48): p. 34260-6.
27. Wang, Y., et al., *Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 33043-9.
28. English, W.R., et al., *Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14046-55.
29. Gao, G., et al., *ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparan sulfate on syndecan-1*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10042-51.

30. Clemente, C., et al., *MT4-MMP deficiency increases patrolling monocyte recruitment to early lesions and accelerates atherosclerosis*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 910.
31. Srichai, M.B., et al., *Membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) modulates water homeostasis in mice*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17099.
32. Li, C., et al., *Synergistic activation of dopamine D1 and TrkB receptors mediate gain control of synaptic plasticity in the basolateral amygdala*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26065.
33. Clements, K.M., et al., *Matrix metalloproteinase 17 is necessary for cartilage aggrecan degradation in an inflammatory environment*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(4): p. 683-9.
34. Ariyoshi, W., et al., *Mechanisms involved in enhancement of the expression and function of aggrecanases by hyaluronan oligosaccharides*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(1): p. 187-97.
35. Plaisier, M., et al., *Membrane-type matrix metalloproteinases and vascularization in human endometrium during the menstrual cycle*. Mol Hum Reprod, 2006. **12**(1): p. 11-8.
36. Gauthier, M.C., et al., *Expression of membrane type-4 matrix metalloproteinase (metalloproteinase-17) by human eosinophils*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(12): p. 1667-73.
37. Huang, C.H., et al., *Regulation of membrane-type 4 matrix metalloproteinase by SLUG contributes to hypoxia-mediated metastasis*. Neoplasia, 2009. **11**(12): p. 1371-82.
38. Wang, Y., et al., *Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-17 and -25 in gastric cancer*. Oncol Lett, 2015. **9**(2): p. 671-676.
39. Nuttall, R.K., et al., *Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(5): p. 333-45.
40. Hieronimus, B., et al., *Expression and Characterization of Membrane-Type 4 Matrix Metalloproteinase (MT4-MMP) and its Different Forms in Melanoma*. Cell Physiol Biochem, 2017. **42**(1): p. 198-210.
41. Hotary, K., et al., *A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program*. Genes Dev, 2006. **20**(19): p. 2673-86.
42. Rizki, A., et al., *A human breast cell model of preinvasive to invasive transition*. Cancer Res, 2008. **68**(5): p. 1378-87.
43. Hegedus, L., et al., *Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness*. J Cell Physiol, 2008. **216**(2): p. 480-5.
44. Chabottaux, V., et al., *Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases*. Cancer Res, 2006. **66**(10): p. 5165-72.

45. Chabottaux, V., et al., *Membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) induces lung metastasis by alteration of primary breast tumour vascular architecture*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(9B): p. 4002-13.
46. Host, L., et al., *The proteolytic activity of MT4-MMP is required for its pro-angiogenic and pro-metastatic promoting effects*. Int J Cancer, 2012. **131**(7): p. 1537-48.
47. Paye, A., et al., *EGFR activation and signaling in cancer cells are enhanced by the membrane-bound metalloprotease MT4-MMP*. Cancer Res, 2014. **74**(23): p. 6758-70.
48. Yip, C., et al., *MT4-MMP and EGFR expression levels are key biomarkers for breast cancer patient response to chemotherapy and erlotinib*. Br J Cancer, 2017. **116**(6): p. 742-751.
49. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
50. Esteller, M., *Non-coding RNAs in human disease*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(12): p. 861-74.
51. Iorio, M.V. and C.M. Croce, *microRNA involvement in human cancer*. Carcinogenesis, 2012. **33**(6): p. 1126-33.
52. Holley, C.L. and V.K. Topkara, *An introduction to small non-coding RNAs: miRNA and snoRNA*. Cardiovasc Drugs Ther, 2011. **25**(2): p. 151-9.
53. Jin, H.Y. and C. Xiao, *MicroRNA Mechanisms of Action: What have We Learned from Mice?* Front Genet, 2015. **6**: p. 328.
54. Iorio, M.V. and C.M. Croce, *Causes and consequences of microRNA dysregulation*. Cancer J, 2012. **18**(3): p. 215-22.
55. Pencheva, N., et al., *Convergent multi-miRNA targeting of ApoE drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis*. Cell, 2012. **151**(5): p. 1068-82.
56. Ma, L., J. Teruya-Feldstein, and R.A. Weinberg, *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer*. Nature, 2007. **449**(7163): p. 682-8.
57. Ebert, M.S. and P.A. Sharp, *Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes*. Cell, 2012. **149**(3): p. 515-24.
58. Mannoor, K., J. Liao, and F. Jiang, *Small nucleolar RNAs in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1826**(1): p. 121-8.
59. Williams, G.T. and F. Farzaneh, *Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer?* Nat Rev Cancer, 2012. **12**(2): p. 84-8.
60. Goeze, A., et al., *Chromosomal imbalances of primary and metastatic lung adenocarcinomas*. J Pathol, 2002. **196**(1): p. 8-16.
61. Dong, X.Y., et al., *SnoRNA U50 is a candidate tumor-suppressor gene at 6q14.3 with a mutation associated with clinically significant prostate cancer*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(7): p. 1031-42.

62. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
63. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2257-61.
64. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7065-70.
65. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA signatures in human ovarian cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8699-707.
66. Fan, Y., et al., *miRNet - dissecting miRNA-target interactions and functional associations through network-based visual analysis*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(W1): p. W135-41.
67. Fan, D., et al., *Upregulation of miR-501-5p activates the wnt/beta-catenin signaling pathway and enhances stem cell-like phenotype in gastric cancer*. J Exp Clin Cancer Res, 2016. **35**(1): p. 177.
68. Huang, D.H., et al., *MiR-501-5p regulates CYLD expression and promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma*. Jpn J Clin Oncol, 2015. **45**(8): p. 738-44.
69. Nygaard, S., et al., *Identification and analysis of miRNAs in human breast cancer and teratoma samples using deep sequencing*. BMC Med Genomics, 2009. **2**: p. 35.
70. Persson, H., et al., *Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene*. Cancer Res, 2011. **71**(1): p. 78-86.
71. Degli Esposti, D., et al., *miR-500a-5p regulates oxidative stress response genes in breast cancer and predicts cancer survival*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 15966.
72. Voellenkle, C., et al., *Deep-sequencing of endothelial cells exposed to hypoxia reveals the complexity of known and novel microRNAs*. RNA, 2012. **18**(3): p. 472-84.
73. Kitago, M., et al., *Regulation of RUNX3 tumor suppressor gene expression in cutaneous melanoma*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(9): p. 2988-94.
74. Ni, F., et al., *MicroRNA-362-5p promotes tumor growth and metastasis by targeting CYLD in hepatocellular carcinoma*. Cancer Lett, 2015. **356**(2 Pt B): p. 809-18.
75. Cummins, J.M., et al., *The colorectal microRNAome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3687-92.
76. Ling, Q., et al., *The prognostic relevance of primary tumor location in patients undergoing resection for pancreatic ductal adenocarcinoma*. Oncotarget, 2017. **8**(9): p. 15159-15167.
77. Yanaihara, N., et al., *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 189-98.

78. Schultz, J., et al., *MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth*. Cell Res, 2008. **18**(5): p. 549-57.
79. Nagpal, N., et al., *MicroRNA-191, an estrogen-responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human breast cancer*. Carcinogenesis, 2013. **34**(8): p. 1889-99.
80. Tang, C., et al., *Downregulation of miR-130a promotes cell growth and epithelial to mesenchymal transition by activating HMGB2 in glioma*. Int J Biochem Cell Biol, 2017. **93**: p. 25-31.
81. Liu, F., et al., *MicroRNA-224 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells by down-regulating Fizzled 5 expression*. Oncotarget, 2016. **7**(31): p. 49130-49142.
82. Marshall, E.A., et al., *Small non-coding RNA transcriptome of the NCI-60 cell line panel*. Sci Data, 2017. **4**: p. 170157.
83. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
84. Gyorffy, B., et al., *An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **123**(3): p. 725-31.
85. Mittal, R., et al., *Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions*. J Cell Physiol, 2016. **231**(12): p. 2599-621.
86. Shay, G., C.C. Lynch, and B. Fingleton, *Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis*. Matrix Biol, 2015. **44-46**: p. 200-6.
87. Wyatt, R.A., N.P.V. Trieu, and B.D. Crawford, *Zebrafish Xenograft: An Evolutionary Experiment in Tumour Biology*. Genes (Basel), 2017. **8**(9).
88. Mleczko, A.M. and K. Bakowska-Zywicka, *When small RNAs become smaller: emerging functions of snoRNAs and their derivatives*. Acta Biochim Pol, 2016. **63**(4): p. 601-607.
89. Guo, Y., et al., *The Landscape of Small Non-Coding RNAs in Triple-Negative Breast Cancer*. Genes (Basel), 2018. **9**(1).
90. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
91. Walerych, D., et al., *The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer*. Carcinogenesis, 2012. **33**(11): p. 2007-17.
92. Huang, R., P. Ding, and F. Yang, *Clinicopathological significance and potential drug target of CDH1 in breast cancer: a meta-analysis and literature review*. Drug Des Devel Ther, 2015. **9**: p. 5277-85.
93. Maziveyi, M. and S.K. Alahari, *Cell matrix adhesions in cancer: The proteins that form the glue*. Oncotarget, 2017. **8**(29): p. 48471-48487.

94. de Sousa, E.M.F. and L. Vermeulen, *Wnt Signaling in Cancer Stem Cell Biology*. Cancers (Basel), 2016. **8**(7).



## BIOMEDICAL

## MT4-MMP Modulates the Expression of miRNAs in Breast Cancer Cells

Alejandra Cervantes-Garduño,<sup>a,b</sup> Cecilia Zampedri,<sup>a</sup> Magali Espinosa,<sup>a</sup> Vilma Maldonado,<sup>c</sup>  
Jorge Melendez-Zajgla,<sup>a</sup> and Gisela Ceballos-Cancino<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Genómica Funcional, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, México

<sup>b</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México

<sup>c</sup>Laboratorio de Epigenética, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, México

Received for publication January 22, 2018; accepted February 1, 2019 (ARCMED-D-2018-00045).

**Background.** MT4-MMP is a member of the metalloproteinases family, although with a controversial role in the extracellular matrix remodeling. Overexpression of this metalloproteinase has been observed in breast cancer and it has been suggested that it can regulate tumor growth and cancer progression. The mechanisms by which MT4-MMP participates in breast cancer includes tumor blood vessels destabilization, the activation of an angiogenic switch, and increase of EGFR signaling. However, all the mechanisms by which MT4-MMP participates in breast cancer are still unknowns.

**Aim of the study.** To study if MT4-MMP could modulate the expression of microRNAs (miRNAs) related to biological processes associated with tumor formation and progression.

**Methods.** MT4-MMP was ectopically overexpressed in MDA-MB-231 cells and the miRNAs expression profile modulated by the metalloproteinase was studied by using miRNAs microarrays. Microarray data were analyzed with different tools to find the molecular and cellular functions related to the differentially expressed miRNAs. The clinical relevance of some miRNAs was analyzed using a public database.

**Results.** MT4-MMP overexpression in breast cancer cells induced the modulation of 65 miRNAs, which were related to the alteration of pathways dependent of p53, TGF- $\beta$ , MAPK, ErbB, and Wnt, as well as processes such as cell cycle, adherens junctions, apoptosis, and focal adhesion. Several of the upregulated miRNAs were associated to a worse prognosis in breast cancer patients.

**Conclusions.** In breast cancer cells, the overexpression of MT4-MMP modulates the expression of miRNAs involved in several biological processes associated with tumor formation and progression and with clinical relevance. © 2019 IMSS. Published by Elsevier Inc.

**Key Words:** MT4-MMP, miRNAs, Breast cancer, Tumorigenesis, Cancer progression.

### Introduction

The family of matrix metalloproteinases (MMPs) is formed by 26 proteins that are involved in the degradation and remodeling of the extracellular matrix (ECM) (1,2). Membrane-type metalloproteinases (MT-MMPs), a particular subfamily of MMPs, are anchored to the membrane through a single domain that differentiates them from the

rest of the MMPs (3,4). The MT-MMPs are sub-divided by their type of anchoring in transmembrane MT-MMPs (TM-MT-MMP) (5), and two of the six MT-MMPs are anchored by glycosyl phosphatidyl inositol (GPI-MT-MMP) as MT4-MMP (6).

MT4-MMP was cloned for the first time from a cDNA library derived from breast cancer cells (7). RNA expression was found in different tissues such as: brain, leukocytes, colon, breast, ovaries, and testes (7,8). MT4-MMP preserves the characteristic domains of the MMPs, it also contains a stem region that links the hemopexin domain with the GPI domain (9,10). MT4-MMP, through its

Address reprint requests to: Gisela Ceballos-Cancino, Periférico Sur 4809, Ciudad de México, 14610 México; Phone: (+52) (55) 5350-1967; E-mail: gceballos@inmegen.gob.mx



catalytic domain, is able to degrade few substrates that are components of the ECM (8,11). MT4-MMP is only capable of processing gelatin, fibrinogen, and fibrin. Additionally, other substrates, which are not components of the ECM have been described, such as pro-TNF- $\alpha$  and ADAMTS-4 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motif 4) (12–15).

The participation of MT4-MMP in different processes associated with cancer and tumor progression has been documented. In head and neck cancer, the expression of MT4-MMP is regulated by hypoxia through the HIF-1 $\alpha$  and Slug transcription factors, and the expression of MT4-MMP induced lung metastasis (16). In this study, the SAS cell line from tongue squamous cell carcinoma was used, in which reduced MT4-MMP levels by siRNAs showed a reduced lung metastases formation (16). In this work, the expression of MT4-MMP increased invasion, but not cell migration (16). In breast cancer, a higher expression of MT4-MMP was found in tumor samples in comparison with normal epithelial cells. Overexpression of MT4-MMP in breast cancer cells induced tumor growth and lung metastasis, although no effects on cell proliferation or invasion were observed (17). It has been proposed that MT4-MMP promotes breast cancer metastasis through blood vessel enlargement (17) and by altering their integrity, thus promoting tumor cell intravasation (18). In addition, it has been observed that MT4-MMP promotes an angiogenic switch to promote lung metastasis and its proteolytic activity is important for this process (19). Moreover, it has been reported that MT4-MMP induces EGFR activation and signaling to promote tumor cell proliferation, for which it does not require its proteolytic activity (20). Interestingly, MT4-MMP was coexpressed with EGFR in a triple negative subpopulation of breast tumors, where high levels of MT4-MMP were associated to a better prognosis in patients treated with chemotherapy. As assessed by *in vitro* assays in a triple negative breast cancer cell line, the overexpression of MT4-MMP sensitized it to a combination of DNA-targeting chemotherapeutic agents and anti-EGFR drugs (21). MT4-MMP has an important participation in cancer and during tumor progression, although the mechanisms by which it modulates these processes have not been fully elucidated.

MiRNAs are small non-coding RNAs that can downregulate the expression of their target genes by degrading the messenger RNAs or repressing translation (22). More recently, it has been recognized that dysregulation of miRNAs has a key role not only in tumor initiation, but also in cancer progression. MiRNAs exerts their oncogenic roles by regulating the expression of oncogenes and tumor suppressor genes, and also regulating the expression of proteins that participate in processes such as cell migration, proliferation, and neo-angiogenesis (23).

Due to the lack of information regarding the participation of miRNAs in the functions of MT4-MMP in cancer,

the aim of the present study was to determine if MT4-MMP could regulate the expression of miRNAs related with tumor formation and progression. Then, we overexpressed MT4-MMP in the MDA-MB-231 breast cancer cell line and the expression profile of miRNAs was analyzed by using microRNA arrays.

## Materials and Methods

### Cell Culture

MDA-MB-231 cells were purchased in American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal bovine serum. Cultured cells were incubated at 37°C in a humid chamber containing 5% CO<sub>2</sub>.

### Cell Transfections

To overexpress MT4-MMP in MDA-MB-231 cells, 250,000 cells were seeded in six well plates. Cells were transfected with Fugene HD (Promega, Madison, WI, USA) following manufacturer's instructions. To obtain stable cell lines, cells were selected with G418 (1.5 mg/mL) for 30 d.

### Plasmids

The construction of MT4-MMP in pcDNA3.1 was kindly provided by Dr Xose Puente. As control, an empty vector pcDNA3.1 (Invitrogen, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA) was used.

### Reverse Transcription and Quantitative PCR

Total RNA was isolated from MDA-MB-231 cells (MDA-MB-231 PCDNA3.1 and MDA-MB-231 MT4) with TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed with SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. GAPDH expression was used as an endogenous control. All reactions were performed in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem).

PCR primers were GAPDH-F 5'- CCGGTTTCTA-TAAATTGAGCCCGCA-3', GAPDH-R 3'-GAGCGATG-TGGCTCGGCTG-5'. MT4-F 5'-CACCAAGTGGAA-CAAGAGGAACCT-3', MT4-R 5'-TGGTAGTACGGCCG-CATGATGGAGTGTGCA-3'. Conditions: GAPDH 95°C 2 m 1 cycle; 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s 40 cycles.

MT4 95°C 2 m 1 cycle; 95°C 30 s, 57.5°C 30 s, 72°C 30 s for 40 cycles.

#### Xenotransplant/Zebrafish Husbandry and Cell Microinjection

The zebrafish AB wild type strain was bred and maintained normally (temperature, 28.5°C; pH 7.2–7.4; 12 h on and 12 h off light cycle). Fish embryos were obtained by natural crosses. MDA-MB-231 PCDNA3.1 and MDA-MB-231 MT4 cells were harvested at a concentration of  $4 \times 10^7$  cells/mL. This mixture was loaded into a borosilicate glass needle pulled by a Flaming/Brown micropipette puller. 5–10 nanoliters suspension containing 125 or 250 cells were implanted into each zebrafish embryo through the yolk space in a single injection by using an electronically regulated air-pressure microinjector. After injection, zebrafish were washed once and maintained at 34°C. Embryos were monitored for 5 d post injection (DPI) for tumor formation and documented photographically. The proportion of individuals that formed tumors in each group was related to the tumorigenic capacity of the injected cells.

#### Microarrays and Analysis

Total RNA of three biological replicates was hybridized with GeneChip miRNA 4.0 (Affymetrix, USA). MiRNA expression analysis was performed using Transcriptome Analysis Console (24) Software 4.0 (Affymetrix, USA). Data normalization of differentially expressed miRNAs was done with the following parameters: RMA+DABG (Human Only) and expression analysis settings: fold change  $< -1.5$  or  $> 1.5$ , gene-Level  $p$  value  $< 0.05$  and Anova Method: ebayes. IPA (Ingenuity Pathway Analysis) (Qiagen Silicon Valley, USA) software was used to analyze the interactions of differentially expressed miRNAs. A Core analysis was performed to overview the principal functions and molecular networks. To analyze the principal cellular and biological functions of the top ten miRNAs the miRNet tool (25) was used.

#### MiRNA Expression Analysis by Quantitative PCR

For miRNAs expression validation ten nanograms of total RNA were reverse-transcribed using TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to manufacturer's instructions. The cDNA was amplified using the following Taqman microRNA assays: hsa-miR-130a (000454), hsa-miR-224 (000599) and RNU6B (001093) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The expression of RNU6B was used as control to normalize the data. To calculate the relative expression of miRNAs we used the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

## Results

### MT4-MMP Overexpression in Breast Cancer Cells Increased Tumor Formation in Zebrafish Xenotransplants

To explore the possibility of miRNAs participation in the effects mediated by the MT4-MMP in breast cancer, first we created a stable cell line, MDA-MB-231 MT4, with high levels of this metalloproteinase and the overexpression was confirmed by qPCR (fold change of 51).

Next, we evaluated the tumorigenicity of MT4-MMP-overexpressing cells in a model of xenotransplantation in zebrafish. Figure 1 shows that MT4-MMP overexpression induced an increase in the number of embryos with tumor, in comparison with those injected with control cells. These results demonstrated the tumorigenic ability of MT4-MMP.

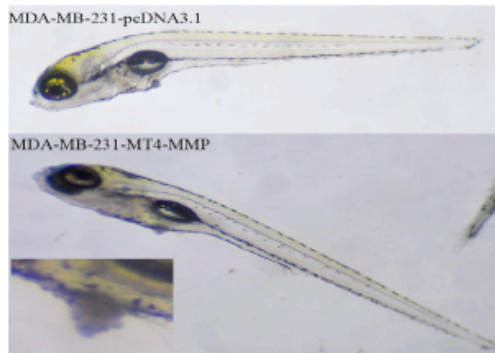
### MiRNA Expression Profile of MT4-MMP-overexpressing Breast Cancer Cells

Next, the profile of miRNAs differentially modulated in MT4-MMP-overexpressing cells was analyzed using microRNA arrays in three biological replicates. The number of miRNAs modulated by MT4-MMP (fold change  $\geq 1.5$ ,  $p < 0.05$ ); briefly, a total of 65 miRNAs were modulated;

**A**

Cell line	Number of injected cells/embryo	Embryos with tumor
pcDNA3.1	300	2/8 (25%)
	400	2/8 (25%)
	500	3/7 (43%)
MT4-MMP	300	2/8 (25%)
	400	5/8 (62.5%)
	500	6/8 (75%)

**B**



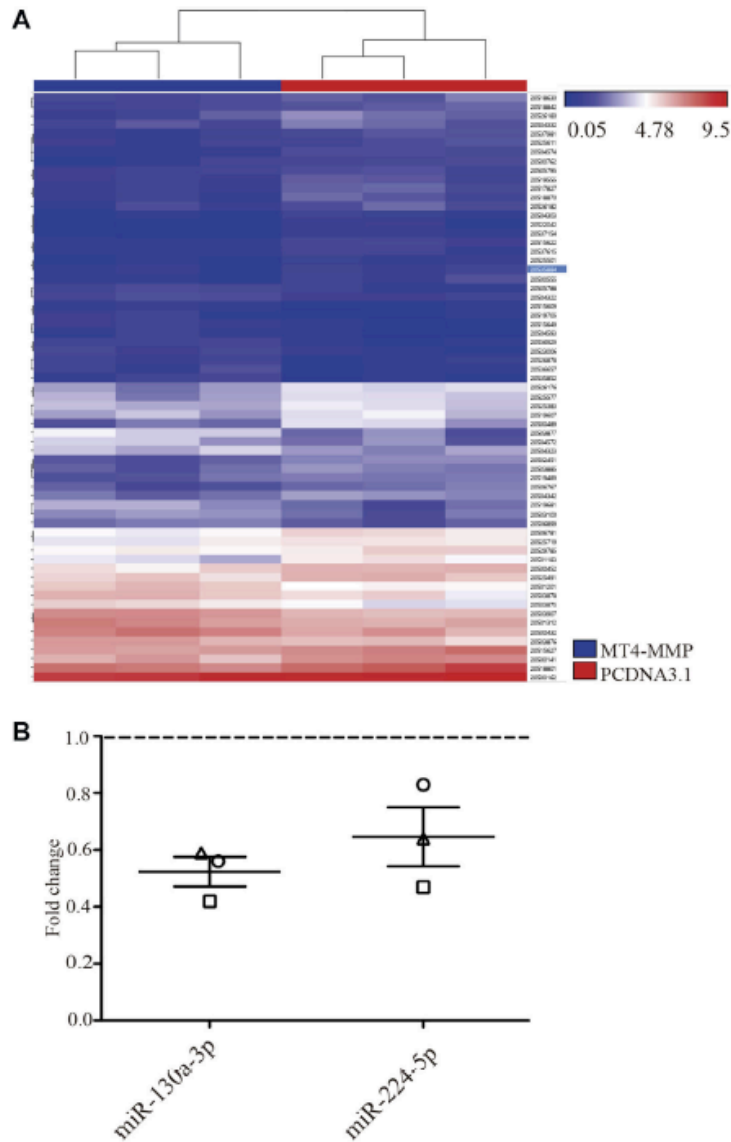
**Figure 1.** Overexpression of MT4-MMP in MDA-MB-231 cells increased the number of tumors in zebrafish xenotransplants. (A) More tumors were formed in the embryos injected with the MDA-MB-231 cells, overexpressing the MT4-MMP, versus the embryos that were injected with the MDA-MB-231 PCDNA3.1 cells, at different densities. (B) Representative photographs of the embryos are shown; a representative tumor formed by cells overexpressing MT4-MMP is shown in a box.

from these, 24 miRNAs were upregulated and 41 miRNAs were downregulated. This expression profile grouped the samples according to the MT4-MMP expression, as shown in Figure 2A.

A list with the top ten modulated miRNAs is shown in Table 1. From this list, we randomly selected two

downregulated miRNAs for microarray data validation by qPCR. As it is shown in Figure 2B, miR-130a-3p and miR-224-5p had a minor expression in MT4-MMP-overexpressing cells, accordingly with microarray data.

Moreover, other small non-coding RNAs were also modulated by MT4-MMP overexpression (Supplementary



**Figure 2.** Differential expression of miRNAs modulated by MT4-MMP. (A) Heatmap of the miRNAs differentially expressed in the MDA-MB-231 cells with high levels of MT4-MMP and control cells (MDA-MB-231 PCDNA3.1). Downregulated genes are shown in blue while upregulated genes are shown in red. The dendrogram on top shows the clustering of the cell lines analyzed. (B) Expression levels of miR-130a-3p and miR-224-5p were validated by qPCR. Graph shows mean  $\pm$ SEM, the dashed line represents the expression levels of control cells. Expression of RNU6B was used to normalize the data.



**Table 1.** Top ten regulated miRNAs by MT4-MMP overexpression

miRNA	Fold change
Upregulated	
miR-501-5p	3.19
miR-1301-3p	2.98
miR-4788	2.28
miR-500a-5p	2.13
miR-6074	1.98
miR-4802-3p	1.88
miR-532-5p	1.84
miR-362-5p	1.80
miR-589-3p	1.75
miR-501-3p	1.66
Downregulated	
miR-224-5p	-4.01
miR-4723-5p	-2.53
miR-3617-5p	-2.47
miR-6980-5p	-2.04
miR-6808-5p	-2.04
miR-4479	-2.04
miR-4722-5p	-2.01
miR-191-3p	-2.00
miR-595	-1.98
miR-130a-3p	-1.96

Table 1). These data support the ability of MT4-MMP to modulate the expression of small-non coding RNAs, mainly miRNAs.

#### *MT4-MMP Modulates the Expression of miRNAs Related to Cancer*

To gain more insight about the biological and cellular processes related to the miRNAs profile modulated by MT4-MMP, data were analyzed with the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software. Among the diseases associated with the modulated miRNAs, the first one was Cancer (Figure 3A). Additionally, several biological processes related to tumorigenesis and cancer progression resulted significantly modulated, such as Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Cell Morphology, Cellular Movement and Cell Cycle, among others (data not shown). Three signaling networks were modulated by the miRNA profile; the two main networks were related to cancer and were dependent on p53 and E-cadherin (CDH1) (Figures 3B and C, respectively). In these networks, only some of the top ten modulated miRNAs were found.

To analyze the pathways that could be regulated by the principal miRNAs modulated by MT4-MMP, we used the miRNet tool to predict the targets of these miRNAs and to perform a pathway enrichment analysis by using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database. Only the top ten miRNAs upregulated and downregulated from the analysis with IPA software were considered. The targets of upregulated miRNAs were significantly enriched in Cell cycle and p53 signaling pathway (Table 2).

The targets of downregulated miRNAs were significantly enriched in several pathways, such as those related to cancer, p53 signaling, cell cycle, TGF-beta signaling, adherens junctions, MAPK signaling, ErbB signaling, Wnt signaling, apoptosis, and focal adhesion (Table 2). All these data support the modulation of miRNAs relevant in cancer by MT4-MMP expression in breast cancer cells.

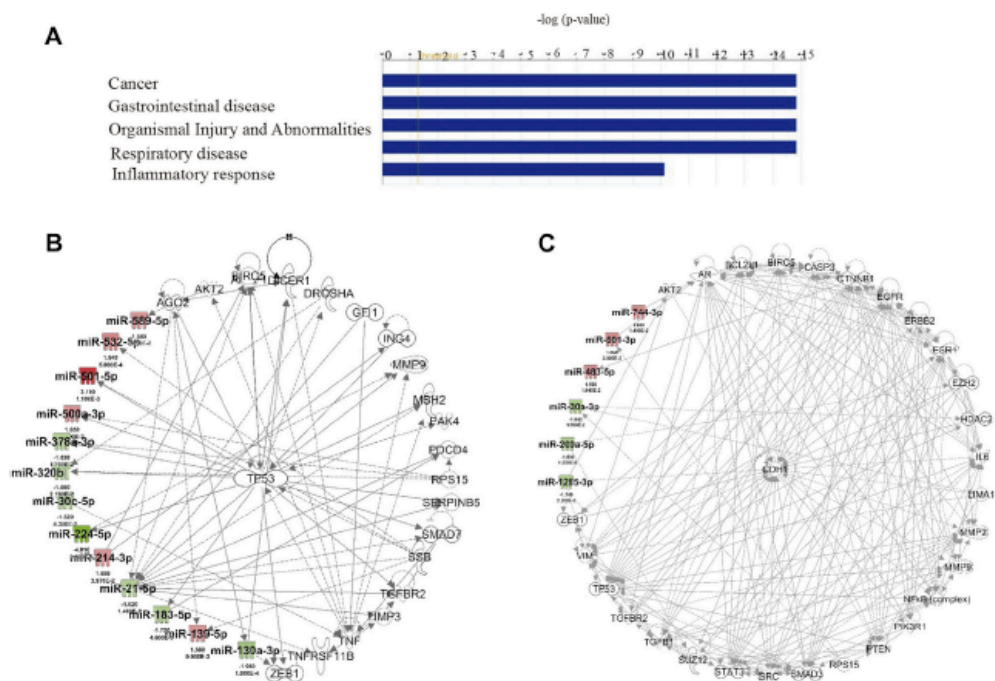
#### *MiRNAs Modulated by MT4-MMP are Related to Prognosis in Breast Cancer*

Finally, to analyze the clinical significance of the miRNAs modulated by MT4-MMP, we searched in a public database (26). From the top ten downregulated miRNAs, only the low expression of miR-130a was associated with a low overall survival ( $p = 0.027$ ) (Table 3). Interestingly, the patient's overall survival was significantly lower in patients in the high expression groups of seven of the top ten upregulated miRNAs by MT4-MMP (Table 3). These data support the clinical relevance of the miRNAs modulated by MT4-MMP in breast cancer patients.

#### **Discussion**

Matrix metalloproteinases are part of a large family of proteinases that can degrade and remodel the extracellular matrix. In physiological conditions, MMPs participate in cellular processes ranking from embryological development to apoptosis, and it also participate in pathological conditions, such as in tumor invasion and metastasis (27). To exert their tumorigenic properties, MMPs perform catalytic activities on MEC substrates and non-matrix molecules, although non proteolytic activities have been documented (28). However, to date, there are not reports about the participation of miRNAs in the action mechanisms of any member of the metalloproteinase family.

MT4-MMP belongs to the subfamily of membrane-type MMPs and it is anchored by a GPI molecule (6). MT4-MMP is the most dissimilar member of the MMP family, and it has a restricted number of substrates from MEC (8,11); for this reason, it has a controversial role in cell invasion (16,17). However, a role in tumor growth and progression has been reported for this metalloproteinase in head and neck cancer (16), breast cancer (17,19,20), and gastric cancer (29). The activities of MT4-MMP promoting tumor growth and metastasis in breast cancer have been studied more. It has been established that MT4-MMP induces changes in the architecture of tumor blood vessels (18) and also induces an angiogenic switch (19), in a catalytic-dependent way. However, it also stimulates tumor cell proliferation by increasing EGFR signaling, for which it does not need its metalloproteinase activity (20). Thus, the mechanisms by which MT4-MMP exerts its effects in breast tumors have not been fully elucidated.



**Figure 3.** Signaling networks associated with the miRNAs modulated by overexpression of MT4-MMP in MDA-MB-231 cells. (A) The graph shows the five main diseases associated with the miRNAs profile modulated by MT4-MMP, predictions were made with the IPA software. (B) Network 1 predicted in the IPA software shows TP53 as the central molecule. From the top ten upregulated miRNAs, miR-589-5p, miR-532-5p, and miR-501-5p, are involved in this network; and from the top ten downregulated miRNAs, only miR-130a-3p and miR-224-5p are present. (C) In Network 2, the E-cadherin (CDH1) is the central molecule. In this network, from the top ten upregulated miRNAs, only miR-501-3p is present.

We overexpressed the MT4-MMP in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. To analyze the tumorigenic and prometastatic properties of MT4-MMP-overexpressing cells, we used the zebrafish xenotransplant model for it replicates 3D culture and it also allows to study the

interactions between cancer cells and a new microenvironment (30). Similarly to Chabottaux and colleagues (17), we found that MT4-MMP overexpression induced an increase in tumor incidence of MDA-MB-231 cells in *in vivo* experiments (Figures 1A and B).

**Table 2.** Enriched functions annotated from KEGG

Name	Molecules	p
Upregulated miRNAs		
Cell cycle	16	0.0226
p53 signaling pathway	16	0.0226
Downregulated miRNAs		
Pathways in cancer	59	0.0000699
p53 signaling pathway	21	0.0000454
Cell cycle	29	0.000105
TGF- $\beta$ signaling pathway	21	0.000638
Adherens junction	18	0.00113
MAPK signaling pathway	40	0.014
ErbB signaling pathway	17	0.0252
Wnt signaling pathway	24	0.0317
Apoptosis	16	0.0323
Focal adhesion	30	0.0419

**Table 3.** Hazard ratio for breast cancer patients and the miRNAs expression

miRNA	HR (95% CI)	p
Downregulated miRNAs		
miR-130a	0.79 (0.64–0.97)	0.027
Upregulated miRNAs		
miR-501-5p	1.39 (1.14–1.7)	0.0011
miR-1301	1.34 (1.08–1.65)	0.0067
miR-500a	1.25 (1.02–1.52)	0.03
miR-532-5p	1.32 (1.07–1.63)	0.0092
miR-362-5p	1.34 (1.1–1.64)	0.0035
miR-589	1.82 (1.03–3.022)	0.036
miR-501-3p	1.29 (1.06–1.58)	0.012

HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

The patients were divided into two groups as having higher or lower expression of the miRNA.

Next, we studied the alteration of small non coding RNAs, such as miRNAs, small nucleolar RNAs (snoRNAs), and small Cajal body-specific RNAs (scaRNAs), since alterations in their expressions have been related to several diseases such as neurodegenerative, viral, cardiovascular, inflammatory, autoimmune and specially to, oncological diseases (31,32). For this purpose, we used miRNA microarrays. Microarray data analysis showed the modulation of 65 miRNAs, 24 of them were upregulated and 41 were downregulated. Interestingly, MT4-MMP also modulated the expression of several small nucleolar RNAs (snoRNAs) and some small Cajal body-specific RNAs (scaRNAs) (Supplementary Table 1). SnoRNAs can be classified in C/D and H/ACA box, they guide enzymatic modifications of others RNAs, but principally of ribosomal RNA (rRNA) (33). Since it has been documented that rRNA biogenesis is more robust in cancer cells in comparison with normal cells, it has been proposed a role of snoRNAs in cancer development. Alterations in snoRNAs expression have been associated to cancer initiation and progression (33).

Recently, a study in triple negative breast cancer (TNBC) cell lines, has identified the specific expression of snoRNAs in four transcriptional subtypes of this kind of breast cancer (34). In the present study, we observed the regulation of some of these snoRNAs by MT4-MMP, such as SNORD48, SCARNA3, and SNORA70 (Supplementary Table 1).

Regarding the modulated miRNAs, the analysis of the pathways regulated by them revealed that they were mainly related to cancer (Figure 3A). Two pathways related to cancer were altered and these pathways were dependent of p53 and E-cadherin (Figures 3B and C, respectively). Surprisingly, in these two pathways, few of the top ten downregulated and upregulated miRNAs were involved. However, the tumor suppressor p53 is the most frequent silenced or mutated gene in cancer. Activated p53 acts as a genome guardian, since it can arrest the cell cycle and induce apoptosis when DNA is damaged (35), although new evidence supports oncogenic roles for mutated p53 (36). Besides, E-cadherin, which participates in cell-cell adhesion, also functions as a tumor suppressor gene, and the loss of its expression has been related to poor prognosis in cancer (37).

To study the relevance of the most altered miRNAs by MT4-MMP (Table 1), we performed the targets interaction networks and enrichment analysis using the miRNet tool (25). Interestingly, the target genes of top ten upregulated and downregulated miRNAs were involved in cell cycle and p53 signaling (Table 2). The targets of downregulated miRNAs were also involved in several pathways related to cancer, such as TGF- $\beta$ , MAPK, ErbB, and Wnt cascades, and also in adherens junctions, apoptosis, and focal adhesion (Table 2). All of these pathways participate in multiple "hallmarks of cancer" (38). Accordingly, both analysis, with IPA and miRNet tools, showed that proliferation was the principal cellular function modulated

(Table 2). It would be interesting analyze the participation of p53 pathway in the proliferative role of MT4-MMP. Deregulation of cell proliferation and apoptosis results in loss of tissue homeostasis driving to cancer development. Moreover, another function, cell to cell adhesion, resulted modulated by miRNAs dysregulated by MT4-MMP, as demonstrated by the participation of E-cadherin and adherens junctions in the pathways analyzed with both bioinformatic tools (Figure 3C and Table 2). E-cadherin maintains the attachment between epithelial cells through adherens junctions, and the loss of this protein enables cancer cells to invade and metastasize (38). Additionally, focal adhesions, which enable interactions and communications between cells and ECM, were also altered by the miRNAs profile induced by MT4-MMP. In cancer cells, alterations in the dynamic of focal adhesion results in increased migration and metastasis (39). Interestingly, the Wnt pathway is also deregulated in many cancers and participates in tumor initiation and the activation of cancer stem cells (40).

Finally, we found that one downregulated and seven upregulated miRNAs by MT4-MMP had a prognostic value in predicting the survival of breast cancer patients (Table 3), which highlights their clinical relevance in this disease.

## Conclusion

In the present work, we evaluated the miRNAs expression profile of breast cancer cells that overexpressed to MT4-MMP. Interestingly, MT4-MMP induced the modulation of miRNAs involved in several pathways related to cancer. Some of the modulated miRNAs showed a prognostic significance in the survival of breast cancer patients. Further functional studies are necessary to identify the most relevant miRNAs for MT4-MMP activities in breast cancer. Together, these results suggested that the modulation of miRNAs could be involved in the mechanisms by which MT4-MMP regulates tumor growth and metastasis in breast cancer, revealing a new mechanism for this metalloproteinase.

## Acknowledgments

We thank Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), for the academic training received for Alejandra Beatriz Cervantes Garduño. The publication of this work is a requisite for obtaining the degree of Doctora en Ciencias from Posgrado en Ciencias Biológicas. This work was supported by Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) grant 25/2015/I.

## Conflict of Interest

The authors declare not conflicts of interest in the present work.



## Supplementary Data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2019.02.001>.

## References

- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:207–214.
- Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, et al. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 2004;48:411–424.
- Li M, Yamamoto H, Adachi Y, et al. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:20–27.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010;141:52–67.
- Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 1995;375:244–247.
- Sounni NE, Paye A, Host L, et al. MT-MMPS as Regulators of Vessel Stability Associated with Angiogenesis. *Front Pharmacol* 2011;2:111.
- Puente XS, Pendas AM, Llano E, et al. Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:944–949.
- Kajita M, Kinoh H, Ito N, et al. Human membrane type-4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) is encoded by a novel major transcript: isolation of complementary DNA clones for human and mouse mt4-mmp transcripts. *FEBS Lett* 1999;457:353–356.
- Sohail A, Sun Q, Zhao H, et al. MT4-(MMP17) and MT6-MMP (MMP25). A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2008;27:289–302.
- Sohail A, Marco M, Zhao H, et al. Characterization of the dimerization interface of membrane type 4 (MT4)-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 2011;286:33178–33189.
- Itoh Y, Kajita M, Kinoh H, et al. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *J Biol Chem* 1999;274:34260–34266.
- Wang Y, Johnson AR, Ye QZ, et al. Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *J Biol Chem* 1999;274:33043–33049.
- Kolkenbrock H, Essers L, Ulbrich N, et al. Biochemical characterization of the catalytic domain of membrane-type 4 matrix metalloproteinase. *Biol Chem* 1999;380:1103–1108.
- English WR, Puente XS, Freije JM, et al. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J Biol Chem* 2000;275:14046–14055.
- Gao G, Plaas A, Thompson VP, et al. ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparan sulfate on syndecan-1. *J Biol Chem* 2004;279:10042–10051.
- Huang CH, Yang WH, Chang SY, et al. Regulation of membrane-type 4 matrix metalloproteinase by SLUG contributes to hypoxia-mediated metastasis. *Neoplasia* 2009;11:1371–1382.
- Chabottaux V, Sounni NE, Pennington CJ, et al. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases. *Cancer Res* 2006;66:5165–5172.
- Chabottaux V, Ricaud S, Host L, et al. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) induces lung metastasis by alteration of primary breast tumour vascular architecture. *J Cell Mol Med* 2009;13:4002–4013.
- Host L, Paye A, Detry B, et al. The proteolytic activity of MT4-MMP is required for its pro-angiogenic and pro-metastatic promoting effects. *Int J Cancer* 2012;131:1537–1548.
- Paye A, Truong A, Yip C, et al. EGFR activation and signaling in cancer cells are enhanced by the membrane-bound metalloproteinase MT4-MMP. *Cancer Res* 2014;74:6758–6770.
- Yip C, Foidart P, Somja J, et al. MT4-MMP and EGFR expression levels are key biomarkers for breast cancer patient response to chemotherapy and erlotinib. *Br J Cancer* 2017;116:742–751.
- Jin HY, Xiao C. MicroRNA Mechanisms of Action: What have We Learned from Mice? *Front Genet* 2015;6:328.
- Iorio MV, Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer J* 2012;18:215–222.
- Wang KC, Yang YW, Liu B, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* 2011;472:120–124.
- Fan Y, Siklenka K, Arora SK, et al. miRNet - dissecting miRNA-target interactions and functional associations through network-based visual analysis. *Nucleic Acids Res* 2016;44:W135–W141.
- Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat* 2010;123:725–731.
- Mittal R, Patel AP, Debs LH, et al. Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. *J Cell Physiol* 2016;231:2599–2621.
- Shay G, Lynch CC, Fingleton B. Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. *Matrix Biol* 2015;44–46:200–206.
- Wang Y, Yu SJ, Li YX, et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-17 and -25 in gastric cancer. *Oncol Lett* 2015;9:671–676.
- Wyatt RA, Trieu NPV, Crawford BD. Zebrafish Xenograft: An Evolutionary Experiment in Tumour Biology. *Genes (Basel)* 2017;8.
- Ardekani AM, Naeini MM. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna J Med Biotechnol* 2010;2:161–179.
- Stepanov GA, Filippova JA, Komissarov AB, et al. Regulatory role of small nucleolar RNAs in human diseases. *Biomed Res Int* 2015;2015:206849.
- Mieczko AM, Bakowska-Zywicka K. When small RNAs become smaller: emerging functions of snoRNAs and their derivatives. *Acta Biochim Pol* 2016;63:601–607.
- Guo Y, Yu H, Wang J, et al. The Landscape of Small Non-Coding RNAs in Triple-Negative Breast Cancer. *Genes (Basel)* 2018;9:29–43.
- Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002;2:594–604.
- Walerych D, Napoli M, Collavin L, et al. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis* 2012;33:2007–2017.
- Huang R, Ding P, Yang F. Clinicopathological significance and potential drug target of CDH1 in breast cancer: a meta-analysis and literature review. *Drug Des Devel Ther* 2015;9:5277–5285.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–674.
- Maziveyi M, Alahari SK. Cell matrix adhesions in cancer: The proteins that form the glue. *Oncotarget* 2017;8:48471–48487.
- de Sousa EMF, Vermeulen L. Wnt Signaling in Cancer Stem Cell Biology. *Cancers (Basel)* 2016;8:60–77.