

PREVALENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIPO ÚNICO ARG574PRO DEL GEN *MMP-9* Y ALA38VAL DEL GEN *MMP-11* EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Nora R. Mohr¹, Ángel D. Martínez¹, Ariel Checo Rossi¹, Laura A. Sánchez², María M. Tiscornia²

¹Servicio de Oncología, Sanatorio Boratti, ²Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología de Misiones, Posadas, Misiones, Argentina

Dirección postal: Nora R. Mohr, Servicio de Oncología Sanatorio Boratti, Mitre 2330, 3300 Posadas, Misiones, Argentina
e-mail: mohrkrause@hotmail.com

Resumen

El cáncer de mama (CM) es uno de los más frecuentes en Argentina y primera causa de muerte por cáncer en mujeres. Las metaloproteasas son endopeptidasas que degradan la matriz extracelular, facilitando la invasión tumoral y las metástasis. Se observó la utilidad de la *MMP-9* como un marcador diagnóstico, pronóstico y de seguimiento en pacientes con CM. La *MMP-11* parece tener un efecto dual en cáncer, su aumento se asocia a un incremento de tumores primarios de mama, pero con una represión en el desarrollo de metástasis. En el trabajo se analizaron los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) Arg574Pro del gen *MMP-9* y Ala38Val del *MMP-11*, con relación a las metástasis de CM. Se tomaron muestras de sangre de pacientes con CM metastásico y no metastásico (controles), con receptores de progesterona+, estrógeno+ y HER2-neu+/- . Se extrajo ADN de 25 muestras y se diseñaron cebadores para amplificar la región que contenían los SNPs Arg574Pro y Ala38Val. Se estandarizó la PCR para los SNPs correspondientes, aclarando que el cebador izquierdo que amplifica Arg574Pro, hibrida sobre los polimorfismos rs146961494 y rs35691798. Se realizó el análisis de las enzimas de restricción, *MbiI* para Arg574Pro y *AatII* para Ala38Val. Se concluye que para *MMP-9*, el polimorfismo presenta el alelo C como el G sólo en el grupo metastásico. En cuanto al gen *MMP-11*, se encuentra en alta frecuencia la variante alélica T, la cual no corresponde al alelo ancestral, indicando que puede estar su función/expresión relacionada con el carcinoma mamario. Estos hallazgos son preliminares.

Palabras clave: cáncer de mama, metástasis, metaloproteasas, *MMP9*, *MMP11*, SNPs

Abstract

Breast cancer (BC) is one of the most common in Argentina and the leading cause of cancer death in women. Metalloproteases are endopeptidases that degrade the extracellular matrix, facilitating tumor invasion and metastases. The utility of *MMP-9* was observed as a diagnostic, prognostic and follow-up marker in BC patients. *MMP-11* appears to have a dual effect on cancer. High levels are associated with an increase in primary breast tumors, but with repression in the development of metastases. Arg574Pro SNPs of the *MMP-9* gene and Ala38Val of *MMP-11* gene were analyzed in relation to BC metastases. Blood samples were taken from patients with BC metastatic and non-metastatic (controls), with progesterone+, estrogen+ and HER2-neu+/- receptors. DNA from 25 samples was drawn and primers were designed to amplify the region containing the SNPs Arg574Pro and Ala38Val. PCR was standardized for the corresponding SNPs, clarifying that the Arg574Pro amplified left primer hybridizes to polymorphisms rs146961494 and rs35691798. The restriction enzyme analysis was performed, *MbiI* for Arg574Pro and *AatII* for Ala38Val. It is concluded that for *MMP-9*, the polymorphism presents the C allele as the G only in the metastatic group. As for the *MMP-11* gene, the allelic variant T is found in high frequency, which does not correspond to the ancestral allele, indicating that its function/expression may be related to mammary carcinoma. These findings are preliminary.

Key words: breast cancer, metastases, metalloproteases, *MMP9*, *MMP11*, SNPs

Introducción

La invasión es una característica común a casi todos los tumores malignos. En algunos de ellos, las células neoplásicas invaden el tejido vecino precozmente, esto conlleva a la migración de las células malignas a órganos distantes, fenómeno denominado metástasis¹. La migración celular esta mediada por mecanismos de señalización, así como por la secreción de factores autócrinos y parácrinos dados por la activación de células estromales en el microambiente del tejido mamario². El mismo está compuesto por matriz extracelular (MEC), células como fibroblastos y macrófagos, entre otras³.

La degradación de la MEC es crucial para el crecimiento tumoral maligno, invasión, metástasis y angiogénesis². En la progresión tumoral, la disrupción de las barreras naturales está vinculada con enzimas proteolíticas de la MEC, como lo son las metaloproteasas (MMPs). Las mismas son endopeptidasas expresadas por las células estromales que permiten a las células neoplásicas invadir los tejidos^{2,4}. Sin embargo, no todas están involucradas en la progresión de la carcinogénesis, como es el caso de la MMP-8 que se ha establecido como un gen supresor de tumores⁵.

Las MMPs son secretadas en forma latente y requieren el ion Zn²⁺ o Ca²⁺ en su sitio activo para llevar a cabo su función proteolítica, siendo inhibidas por los inhibidores tejidos-específicos de metaloproteasas (TIMPs). Las MMPs están constituidas por al menos 25 endopeptidasas, estas enzimas están codificadas por 24 genes en humanos y se las divide en 5 grupos: gelatinasas, matrilisinas, estromalisinas, colagenasas intersticiales y MMP de membrana (MT-MMP)^{2,5}.

La expresión de las MMPs es inducida por una variedad de estímulos externos tales como citosinas, interferones, interleucinas, factor de crecimiento (FGF), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) o beta (TNF- β), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el inductor de MMPs de matriz extracelular (EMPRIN) (*Extracellular Matrix Metaloproteinase Inducer*)⁶.

Existe una clasificación molecular en base a los perfiles de expresión con diferencias entre tumores positivos o negativos para receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y receptor del factor de crecimiento epidermal humano-2 (HER2)⁷.

Las variaciones heredadas en una sola base (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) representan el 90% de la diversidad fenotípica

humana, pudiendo alterar la expresión proteica. En este sentido, en los genes *MMP-9* y *MMP-11*, existen SNPs que podrían llevar a una alteración en la expresión o función de estas proteasas en la MEC, degradando la misma y favoreciendo a las células tumorales la invasividad⁸.

En el CM metastásico se ha observado un incremento de las *MMP-9* y *11*. La *MMP-9* pertenece al grupo de las gelatinasas, cuya actividad proteolítica está dirigida contra el colágeno intersticial desnaturalizado^{9,10}. La *MMP-9* o gelatinasa-B es débil o ausente en los tejidos normales, y se encuentra limitada a monocitos y macrófagos. Sin embargo, su expresión puede ser inducida en caso de remodelación tisular, como sucede durante el desarrollo embrionario. Actualmente, se ha observado que se encuentra involucrada en el proceso de la metástasis en asociación con la transición epitelio mesénquima (TEM), este complejo mecanismo de la progresión está asociado a la producción de fibroblastos específicos productores de *MMP-9*⁴.

La *MMP-11* pertenece al grupo de la estromalisinas. En estudios llevados a cabo en cánceres de mama humanos se ha informado que los fibroblastos del estroma que rodeaban a las células tumorales, no las células neoplásicas mismas, son responsables de producir las estromalisinas¹¹. Una posible explicación a este fenómeno fue el hallazgo del inductor de MMP de la MEC (EMMPRIN).

Los genes que codifican para las metaloproteasas de interés están ubicados en los loci 20q11.2-q13-1 para MMP9¹² y 22q11.2-22q11.23 para MMP11¹³.

Basándonos en la frecuencia alélica y en la región del gen afectada, seleccionamos de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), los SNPs Arg574Pro del gen *MMP-9* y Ala38Val del *MMP-11*.

El objetivo general del trabajo es analizar los SNPs Arg574Pro (rs2250889) del gen *MMP-9* y Ala38Val (rs738792) del *MMP-11*, con relación a las metástasis del cáncer de mama.

Materiales y métodos

Se utilizaron muestras extraídas mediante punción venosa de pacientes con cáncer mamario. Se tomaron criterios de selección: receptor estrógeno+, con un valor de corte ≥ 50 ; receptores de progesterona y HER2-neu positivo o negativo; además, separando los pacientes en dos grupos: metastásicos y no metastásicos. Este

trabajo fue aprobado por un comité de bioética. Todas las muestras fueron clasificadas con un código para preservar la identidad del paciente y la información obtenida es confidencial siguiendo las reglamentaciones éticas, legales y jurídicas establecidas en las normas bioéticas nacionales.

Extracción de ADN¹⁴ (modificación de *salting-out*): se realizaron lavados sucesivos con *buffer* de lisis de glóbulos rojos (Tris-HCl 10mM, Tritón X 100 1% y sacarosa 11%). Se colocó al pellet en *buffer* de lisis de glóbulos blancos (Tris-HCl 10mM, NaCl 400mM y EDTA 2mM), proteinasa K y SDS. Se dejó 1h a 65°C y se adicionó acetato de potasio 3M, luego se precipitó el ADN con isopropanol y se lavó con etanol al 70%. Se conservó el ADN en agua destilada libre de ADNasas y a -20°C.

Diseño y selección de cebadores (*primers*): se utilizó las bases de datos NCBI, de las cuales se obtuvieron los registros de los SNPs de los genes *MMP-9* y *MMP-11*. Se diseñaron los cebadores para las regiones que incluyeran los SNPs Arg574Pro (rs2250889) del gen *MMP-9* y Ala38Val (rs738792) del *MMP-11*, con el programa Primer3¹⁵. Se utilizaron las secuencias con el código de acceso del *GenBank* para *MMP-9* NC_000020.10 y para *MMP-11* NC_000022.10.

Puesta a punto de la PCR: se estandarizaron las condiciones de PCR a partir de un volumen final de 20µl en 1X de *buffer* y 0.5 U de Taq polimerasa. Se trabajó con un rango de 1.5 y 6mM de cloruro de magnesio; entre 50 y 200 µM de dNTPs; y entre 0.5 y 0.25 µM de cada *primer*. El ciclado constó de una etapa inicial de 3 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos de amplificación, con un período de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, de hibridación (*T_m*) variable para la puesta a punto y de extensión a 72°C por 30s, con un periodo final de extensión a 72°C por 5 minutos. Posteriormente, se verificaron los

resultados en geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un equipo termociclador *MultiGENE II Thermal Cycler* (TC 020A-230V), los *primers* utilizados fueron sintetizados por OPERON (Technologies, Alemania). Además, se realizó el análisis de las enzimas de restricción que detectan los SNPs seleccionados para cada gen con los programas Clone manager Versión 4.01 y Custer (disponible *on-line*).

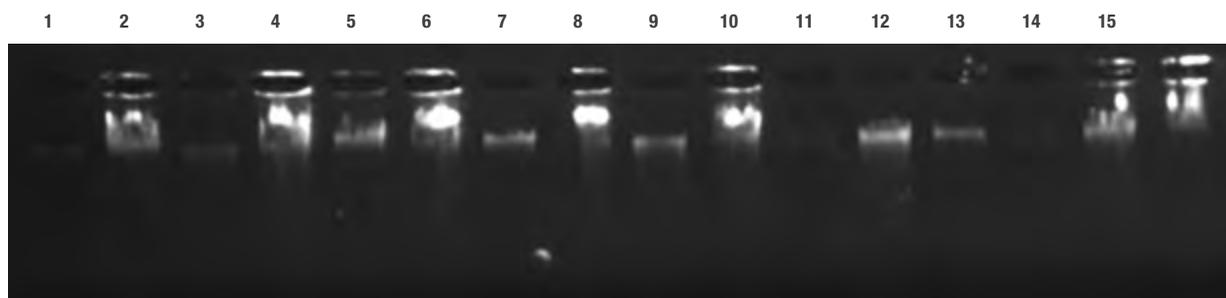
Determinación de los SNPs: mediante la técnica RFLP-PCR, para la digestión enzimática utilizamos la enzima de restricción MbiI para el SNPs rs2250889 del gen *MMP-9* y la AatII para rs738792 del *MMP-11*. En ambos casos se probaron distintos tiempos de incubación y volúmenes de PCR para optimizar. Se realizaron geles de poliacrilamida al 10% en *buffer* TBE 0.5X teñidos con nitrato de plata. Posteriormente, se correlacionó las secuencias obtenidas de los individuos con el patrón de corrida.

Resultados

Obtención de muestras y extracción de ADN: se obtuvieron 25 muestras de punción venosa de pacientes diagnosticadas con cáncer mamario. En la Tabla 1 se muestran las características clínicas y patológicas de las pacientes y los controles utilizados para la extracción de ADN. Las mismas se clasificaron en los siguientes grupos: 1) receptores ER+ y PR+, Her2- metastásico: 11, 2) receptores ER+ y PR+, Her2+ metastásico: 5, 3) receptores ER+ y PR-, Her2- no metastásico: 1, 4) receptores ER+ y PR+, Her2- no metastásico: 6.

El rango de edad observado para no metastásicas fue de 49 a 75 y metastásicas de 38 a 80. De las 25 muestras se observan 16 de ellas (Figura 1), con una cantidad apreciable de ADN óptimo para amplificación.

Figura 1. ADN extraído de muestras obtenidas por punción venosa



Se observa un gel de agarosa al 1%, del carril 1 al 16 se sembraron 16 ADN extraídos de distintas pacientes

Tabla 1. Características clínicas y patológicas de los pacientes con cáncer de mama y controles

| Cáncer de mama | Punción venosa |
|--------------------------------------|----------------|
| Casos | n=25 |
| Rango de edad (en años) | 37-80 |
| Promedio de edad de diagnóstico | 58 |
| Receptores de estrógenos | n=23 |
| Positivos | 23 |
| Negativos | 0 |
| Her2-neu | n=23 |
| Positivos | 5 |
| Negativos | 18 |
| Clasificación Histopatológica | n=10 |
| Ductal | 8 |
| Lobulillar | 2 |
| Controles | n=20 |
| Rango de edad (años) | 28-83 |

Se observa la suma total de los pacientes, expresión de receptores, clasificación histológica. No suman el total de pacientes analizados, debido a que no se pudieron obtener los datos de algunos individuos

Diseño de cebadores: para ello se tuvo en cuenta que el %GC esté dentro de 40 a 60%, la Tm de ambos cebadores no presentan una diferencia mayor a 5°C, y las complementariedades se encuentran dentro de los rangos óptimos^{15,16}. Se obtuvieron cebadores específicos para el exón 10 del gen *MMP-9*. En el caso del gen *MMP-11*, se diseñaron cebadores para el exón 2 en donde se encuentra el SNP Ala38Val.

Condiciones de PCR: para la optimización de las condiciones de amplificación se tuvo en cuenta la concentración de cloruro de magnesio, el cual afecta en la especificidad de la reacción. En la Tabla 2 se observan las concentraciones utilizadas para la amplificación de los genes *MMP-9* y *MMP-11* y de su ciclado en la Tabla 3. La primera combinación de cebadores para *MMP-9* en algunas casos amplificaba y en otros no, consultando la base de datos dbSNP de NCBI se encontró que el cebador izquierdo hibridaba con dos polimorfismos. Por esta razón, se diseñó otro cebador izquierdo.

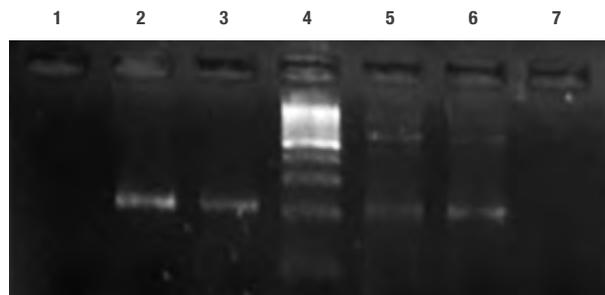
En la Figura 2A se observa las amplificaciones obtenidas para ambos genes en estudio, observándose la estandarización de un fragmento de 215pb para el gen *MMP-11* y para el *MMP-9* de 222pb, aunque también existen bandas inespecíficas. En todos los ensayos se incorporaron controles negativos para cada par de cebadores. En la Figura 2 se observan los fragmentos obtenidos con la segunda combinación de cebadores para *MMP-9*.

Tabla 2. Concentraciones óptimas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

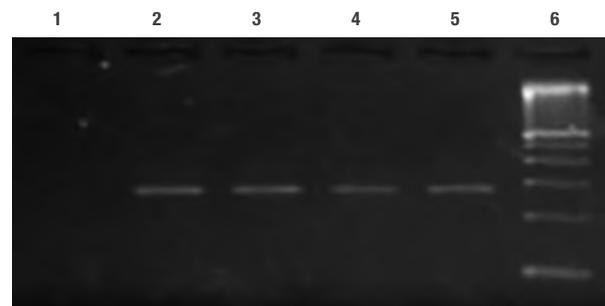
| Reactivos | Concentración MMP9-A | Concentración MMP9-B | Concentración MMP11 |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| Buffer | 1X | 1X | 1X |
| MgCl2 | 4.5mM | 1.5mM | 1.5mM |
| dNTPs | 100µM | 100µM | 100µM |
| Cebador izquierdo | 0.5 µM | 0.5µM | 0.5µM |
| Cebador derecho | 0.5 µM | 0.5µM | 0.5µM |
| Taq polimerasa (Fermentas®) | 0.5U | 0.5U | 0.5U |

Tabla 3. Condiciones de ciclado para el gen *MMP-11* y *MMP-9*

| Condiciones | MMP11 | MMP9-A |
|------------------------------|------------------|------------------|
| Pre-desnaturalización | 94°C 3 minutos | 94°C 30 minutos |
| Desnaturalización | 94°C 30 segundos | 94°C 30 segundos |
| Hibridación | 55°C 30 segundos | 57°C 30 segundos |
| Elongación | 72°C 30 segundos | 72°C 30 segundos |
| Post-elongación | 72°C 30 segundos | 72°C 30 segundos |

Figura 2. Amplificaciones de los fragmentos de los genes de *MMP-9* y *MMP-11*

A: Amplificación de los fragmentos de los genes *MMP-9* y *MMP-11*: Gel de agarosa al 2 %. Carril 1: Control negativo (-) *MMP-11*, Carril 2: Muestra (M) 1 para *MMP-11*, Carril 3: M2 *MMP-11*, Carril 4: PM (peso molecular), Carril 5: M1 *MMP-9*, Carril 6: M2 *MMP-9*, Carril 7: (-) *MMP-9*.

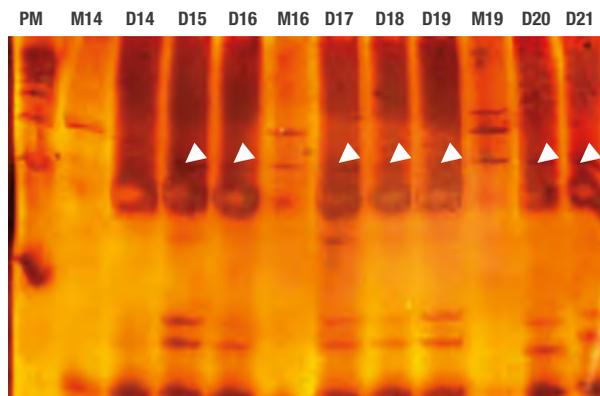


B: Amplificación con la 2ª combinación de los cebadores para *MMP-9*: Gel de agarosa al 2 %. Carril 1: Control negativo (-) *MMP-9*, Carril 2-5: Muestra (M) 1-4, Carril 6: PM (peso molecular).

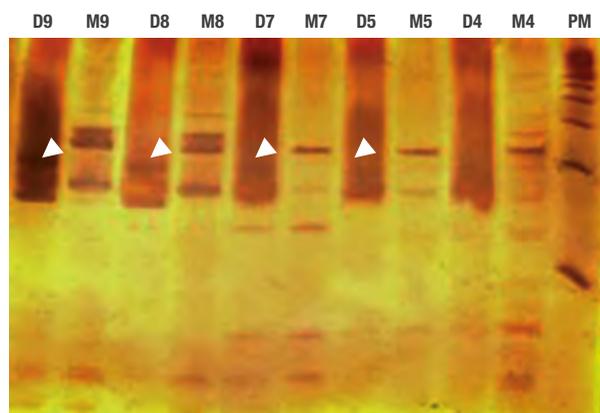
Para la técnica RFLP-PCR se utilizaron las enzimas de restricción MbiI para el SNP rs2250889 de *MMP-9* y AatII para rs738792 de *MMP-11*¹⁷. Para ambas enzimas se utilizaron las mismas condiciones descriptas por el proveedor. Se obtuvieron amplicones de 267pb para *MMP-9* y de 215pb para *MMP-11*. La incubación se realizó a 37° entre 1-16h, para la inactivación se utilizó 65° 20 min y se guardó a -20°C. Luego de realizar la digestión, los fragmentos fueron corridos en geles de poliacrilamida (Figura 3 A y B).

Las frecuencias genotípicas obtenidas para el SNP de *MMP-9* para los individuos metastásicos fue: CC=0.52, CG=0.13, GG=0.04; para individuos no metastásicos fue: CC=0.30 (Tabla 4). Las frecuencias genotípicas obtenidas para el SNP de *MMP-11* para el grupo metastásico fue de: CC=0.04, CT=0.30, TT=0.35; para el grupo no metastásicos: CT=0.09; TT=0.22 (Tabla 5).

Figura 3. Fragmentos obtenidos de la digestión enzimática



A: Fragmentos obtenidos por el corte de restricción de MbiI para el gen *MMP-9* en un gel de poliacrilamida. Carril 1: PM (peso molecular). Carril 2-12: Muestra (M), Digestión (D); para los individuos 14-19. Las flechas blancas indican el fragmento de corte de 196 pb en las digestiones.



B: Fragmentos obtenidos por el corte de restricción de AatII para el gen *MMP-11* en un gel de poliacrilamida. Carril 1-10: Digestión (D); Muestra (M); para los individuos 9-7 y 5,4; Carril 11: PM (peso molecular). Las flechas blancas indican el fragmento de corte de 181 pb en las digestiones.

Tabla 4. Genotipos encontrados por grupo de pacientes

| Grupo/Genotipo | C/C | C/G | G/G | Total |
|--|-----|-----|-----|-------|
| Receptores ER y PR positivos, Her2-neu negativo-metastásico | 7 | 3 | 1 | 11 |
| Receptores ER y PR positivos, Her2-neu positivo-metastásico | 5 | 0 | 0 | 5 |
| Receptores ER positivo, PR y Her2-neu negativos-no metastásico | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Receptores ER y PR positivos, Her2-neu negativo-no metastásico | 6 | 0 | 0 | 6 |

Se observa el número de individuos por grupo para el SNP NM_004994.2: c.1721G>C (rs2250889) del gen *MMP-9* (alelo ancestral C)

Tabla 5. Genotipos encontrados por grupo de pacientes

| Grupo/Genotipo | C/C | C/G | G/G | Total |
|--|-----|-----|-----|-------|
| Receptores ER y PR positivos, Her2-neu negativo-metastásico | 0 | 5 | 6 | 11 |
| Receptores ER y PR positivos, Her2-neu positivo-metastásico | 1 | 2 | 2 | 5 |
| Receptores ER positivo, PR y Her2-neu negativos-no metastásico | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Receptores ER y PR positivos, Her2-neu negativo-no metastásico | 0 | 2 | 4 | 6 |

Se observa el número de individuos por grupo para el SNP NM_005940.3: c.113C>T (rs738792) del *MMP-11* (alelo ancestral C)

Discusión

El cáncer de mama es un problema de salud mundial, es el cáncer más común en todo el mundo ubicándose como la quinta causa principal de muerte relacionada con el cáncer¹⁸. En Argentina es uno de los tipos más frecuentes y primera causa de muerte, con un promedio de 19.386 de nuevos casos y 5.600 muertes por año, según el Instituto Nacional del Cáncer. La existencia de polimorfismos en el promotor del gen de *MMP-9* afecta la expresión, la habilidad para degradar el tejido conectivo y la progresión tumoral¹⁹. Uno de ellos es el SNPs rs3918242 (-1562) ubicado en la región promotora, el cual influencia la expresión de *MMP-9*. Esto ocurre debido a que en la región promotora del gen se produce la transición del alelo C por el alelo T (-1562). En esta región se encuentra un elemento regulador importante, que parece ser un sitio de unión para una proteína represora de la transcripción. Por lo tanto, la sustitución C> T en el sitio polimórfico suprime la interacción ADN-proteína, resultando en una mayor actividad del promotor^{19,20}.

En estudios anteriores se ha observado que el aumento de la expresión *MMP-11* estaría correlacionada con características clínicas más agresivas²¹. Se han detectado cerca de 71 SNPs en el gen *MMP-11*²², se ha estudiado en cáncer

gástrico^{23,24}, sugiriendo que *MMP-11* contribuye a un fenotipo tumoral más agresivo y participa en la supresión de la apoptosis celular mediante la activación de la vía p42/p44 MAP-quinasa²⁵.

Del análisis de los resultados se desprende que para el polimorfismo Arg574Pro (rs2250889) del gen *MMP9*, en algunos casos se encontró el alelo ancestral C con mayor frecuencia; sin embargo, el alelo G sólo se encontró en el grupo de pacientes con metástasis. En cuanto al polimorfismo Ala38Val (rs738792) del gen *MMP-11* se observó que se encuentra en alta frecuencia la variante alélica T, la cual no corresponde al alelo ancestral, indicando que este SNPs podría estar afectando la expresión y función de la proteína *MMP-11* en relación con el carcinoma mamario. Interpretamos nuestros resultados coherentes con las conclusiones de otros informes que mencionan al gen *MMP-9* y *MMP-11* y su relación con la metástasis en CM. Estos hallazgos son preliminares, para poder corroborar se ampliará el estudio con un mayor número de pacientes y se comparará con controles, es decir, una población que no desarrolle cáncer.

En conclusión, el estudio nos podría ayudar a comprender la importancia clínica de las variantes génicas de *MMP-9* y *MMP11* en la mama de pacientes de mal pronóstico y podría en un futuro ayudar a identificar individuos con riesgo de desarrollar cáncer de mama.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

- Chin D, Boyle GM, Kane AJ, et al. Invasion and metastasis markers in cancers. *Br J Plast Surg* 2005; 58: 466-74.
- Angosto Cascales M, Álvarez Gómez JA. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An R Acad Nac Farm* 2010; 76: 59-84.
- Maller O, Martinson H, Schedin P. Extracellular matrix composition reveals complex and dynamic stromal-epithelial interactions in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15: 301-18.
- Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15: 201-12.
- López-Otín C, Palavalli LH, Samuels Y. Protective roles of metalloproteinases: from mouse models to human cancer. *Cell Cycle* 2009; 8: 3657-62.
- Beridze Vaktangova N. Tesis doctoral: Identificación de factores biológicos asociados con la afectación del ganglio centinela y/o los ganglios no centinelas en el cáncer de mama, 2014. En: <http://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/29990>; consultado el 24/7/2017.
- Chacón RD, Costanzo MV. Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; Suppl 2: S3.
- Zhang B, Beeghly-Fadiel A, Lu W, et al. Evaluation of functional genetic variants for breast cancer risk: results from the Shanghai breast cancer study. *Am J Epidemiol* 2011; 173: 1159-70.
- Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 2005; 87: 287-97.
- DeClerck YA. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinase in cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1258-68.
- Sternlicht MD, Bissett MJ, Werb Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene* 2000; 19:1102-13.
- St Jean PL, Zhang XC, Hart BK, et al. Characterization of a dinucleotide repeat in the 92 kDa type IV collagenase gene (CLG4B), localization of CLG4B to chromosome 20 and the role of CLG4B in aortic aneurysmal disease. *Ann Hum Genet* 1995; 59: 17-24.
- Levy A, Zucman J, Delattre O, Mattei MG, Rio MC, Basset P. Assignment of the human stromelysin 3 (STM3) gene to the q11.2 region of chromosome 22. *Genomics* 1992; 13: 881-3.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- Rozen S, Skaletsky HJ. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In S. Misener and S. A. Krawetz (eds). *Methods in molecular biology*, vol. 132: Bioinformatics methods and protocols. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press, 2000, pp 365-86.
- Claros Díaz MG, Ávila Sáez C, Cánovas Ramos FM. *Biología aplicada: diseño experimental y análisis de datos*. Asturias: Septem Ediciones, 2001, pp 294.
- Zavalla Castro JE. *Manual de técnicas básicas de Biología Molecular*. Yucatán: Universidad Autónoma de Yucatán, 2005, pp 195.
- Zhang X, Jin G, Li J, Zhang L. Association between four MMP-9 polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. *Med Sci Monit* 2015; 21: 1115-23.
- Chiranjeevi P, Spurthi KM, Rani NS, et al. Gelatinase B (-1562C/T) polymorphism in tumor progression and invasion of breast cancer. *Tumor Biol* 2014; 35: 1351-6.
- Glebauskiene B, Liutkeviciene R, Vilkeviciute A, et al. Does MMP-9 gene polymorphism play a role in pituitary adenoma development? *Dis Markers* 2017; 2017: 5839528.
- Cheng CW, Yu JC, Wang HW, et al. The clinical implications of MMP-11 and CK-20 expression in human breast cancer. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 234-41.
- Ban JY, Kim SK, Kang SW, Yoon KL, Chung JH. Association between polymorphisms of matrix metalloproteinase 11 (MMP-11) and Kawasaki disease in the Korean population. *Life Sci* 2010; 86: 756-9.
- Deng H, Guo RF, Li WM, Zhao M, Lu YY. Matrix metalloproteinase 11 depletion inhibits cell proliferation in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326: 274-81.
- Skoglund J, Emterling A, Arbman G, Anglard P, Sun XF. Clinicopathological significance of stromelysin-3 expression in colorectal cancer. *Oncology* 2004; 67: 67-72.
- Formigué O, Louis K, Wu E, et al. Active stromelysin-3 (MMP-11) increases MCF-7 survival in three-dimensional Matrigel culture via activation of p42/p44 MAP-kinase. *Int J Cancer* 2003; 106: 355-63.