



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN  
MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Participación de la progesterona en la secreción y  
expresión de la MMP-2 y la MMP-9, y su papel en la  
activación de los factores de transcripción AP-1 y NF- $\kappa$ B  
en líneas celulares de cáncer de mama”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**BETZABETH MORENO GONZÁLEZ**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. ALFONSO BERNABÉ CARREÑO

CODIRECTOR DE TESIS: Dr. JOSÉ EDUARDO PÉREZ SALAZAR

CHILPANCINGO, GRO., NOVIEMBRE DE 2010.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio 42, del Departamento de Biología Celular, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del I.P.N., a cargo del Dr. José Eduardo Pérez Salazar, siendo becaria CONACYT de Septiembre de 2008 a Julio de 2010.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, agradezco a Dios por permitirme alcanzar con éxito esta meta, y por enseñarme que en la vida todo pasa por una razón, que siempre hay algo bueno destinado para nosotros, en el tiempo y momento adecuado.

Agradezco a mi director de tesis, Dr. Alfonso Bernabé Carreño por el apoyo en la realización de este trabajo y por ser el vínculo entre el CINVESTAV y la UAG.

Al Dr. José Eduardo Pérez Salazar, por brindarme su valioso apoyo en el transcurso de mi estancia en su laboratorio, durante la realización de la tesis.

A mi comité tutorial: Dr. Eduardo Castañeda Saucedo, Dr. Donaciano Flores Robles, Dr. Alejandro Millán Vega, por las valiosas aportaciones que hicieron posible la culminación de este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio 42 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV: Norita, Sócrates, Tito, Fernando, Pedrito, Raúl, Roberto, Adriana y Luis; por su apoyo y los conocimientos en la investigación brindados para la terminación de este trabajo.

A la Bióloga Paola Ramírez Macedo, por su asistencia y apoyo administrativo durante mi estancia en la MCB.

A mis compañeros de MCB y amigos.

## DEDICATORIAS

A mi madre, por su apoyo, esfuerzo y dedicación; mujer emprendedora, que me ha dado las herramientas para defenderme en la vida y a la que le debo parte de lo que soy.

A mi padre y a mi hermano, por su apoyo y cariño brindado de manera incondicional

A mi sobrina, por llenar de alegría y nuevos momentos la casa.

A las hermanas de mi mamá por su cariño, y en especial a mis tías, Domy y Cecy, por su valiosa ayuda en los momentos lejos en casa.

A mis grandes amigos, por darme su amistad sincera y los grandes momentos en los que me han dejado ser parte de su vida.

## ÍNDICE

	<b>Págs.</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>24</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>25</b>

## RESUMEN

La progesterona es una hormona esteroidea esencial en el desarrollo de la glándula mamaria, sin embargo, hay evidencia que indica que se encuentra involucrada en el desarrollo del cáncer de mama. A pesar de esto, poco se conoce sobre el efecto de la progesterona en la secreción de moléculas involucradas en procesos de migración como las metaloproteinasas (MMPs), específicamente la MMP-2 y MMP-9, así como la activación de factores de transcripción importantes para la proliferación y supervivencia celular como AP-1 y NF- $\kappa$ B. En este estudio observamos que la estimulación de las células MCF-7 con progesterona promueve la secreción de la MMP-9, además encontramos que la secreción de esta MMP se encuentra regulada por la activación de c-Src, del EGFR y parcialmente de la activación de las MAPKs. Demostramos que la progesterona induce la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF- $\kappa$ B de las células que fueron tratadas. Finalmente mostramos que la progesterona no tiene un efecto sobre la expresión de la MMP-2 y MMP-9 en la membrana plasmática. Estos resultados demuestran que la progesterona induce la secreción de la MMP-9 de manera dependiente de una vía de señalización que involucra a c-Src, EGFR y parcialmente MAPKs, por otra parte induce la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF- $\kappa$ B en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

*Palabras claves:* MCF-7, cáncer de mama, MMP-2, MMP-9, progesterona, c-Src, EGFR, MAPKs, AP-1, NF- $\kappa$ B.

## ABSTRACT

Progesterone is a steroid hormone that regulates the development of normal mammary gland. However, there is evidence indicating that this hormone is implicated in the growth of breast tumors. Little is known about the role of progesterone on the secretion of molecules involved in cell migration such as MMP-2 and MMP-9 and on the activation of transcription factors that regulate survival and proliferation such as AP-1 and NF- $\kappa$ B. Here, we demonstrated that stimulation of MCF-7 cells with progesterone promotes the secretion of MMP-9. We also found that this secretion is regulated by c-Src and EGFR activation and partially by activation of the MAPKs pathway. On the other hand, our results show that progesterone induces activation of AP-1 and NF- $\kappa$ B in MCF-7 cells. Finally, we assessed the effect of progesterone on the expression of MMP-2 and MMP-9 in the plasma membrane, and we found that progesterone does not affect MMP-2 or MMP-9 expression in the plasma membrane. Our results demonstrate for the first time that progesterone induces the secretion of MMP-9 via c-Src, EGFR and MAPKs signaling pathways. Moreover, we demonstrated that progesterone induces the activation of the transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B in MCF-7 cells.

*Key words:* MCF-7, breast cancer, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, progesterone, c-Src, EGFR, MAPKs, AP-1, NF- $\kappa$ B.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es considerado la primera causa de muerte en México por neoplasias en mujeres entre 45 a 54 años de edad. Sin embargo, el grupo de mujeres que se encuentran en un rango de edad entre los 35 a 44 años posee una tasa de mortalidad muy parecida (*Knaut F., et al., 2008*). En el caso particular del estado de Guerrero, las muertes registradas por cáncer de mama ocupan el segundo lugar después de las ocasionadas por el cáncer cérvicouterino (SSA, 2005). La incidencia de cáncer de mama presenta variaciones alrededor del mundo, debido a que los cambios en el estilo de vida pueden modificar el riesgo de desarrollar este padecimiento (*McTiernan A., 2003*). El desarrollo de cáncer de mama ha sido vinculado a factores de riesgo que poseen una asociación con los niveles hormonales, la edad, la aparición de la menarquía, el comienzo de la menopausia, el uso de contraceptivos y la terapia de reemplazo hormonal (*ESHRE Capri Workshop Group, 2004*), esto debido a que el comportamiento biológico del cáncer de mama depende en gran medida de la acción de hormonas, como estrógenos y progesterona (Pg) (*Haslam S., 2005*). En la glándula mamaria normal, los estrógenos son responsables del alargamiento y ramificación de los ductos mamarios (*Althius M. et al., 2004*), mientras que la Pg juega un papel importante en el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de los tejidos reproductivos femeninos (*Boonyaratanakornkit V. et al., 2007*). Ambas hormonas regulan una variedad de funciones celulares, principalmente a nivel transcripcional (*Ballaré et al., 2006*). La mayoría de las funciones de la Pg son mediadas por el receptor de la progesterona (PR), el cual se encuentra en dos isoformas: PR-A y PR-B (*Mulac-Jericevic B. y Conneely O., 2004*), pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción. La acción de estos receptores se caracteriza por la formación de complejos de manera directa o indirecta con elementos de respuesta en regiones no codificantes de genes blanco (*Conzen S., 2008; Chang E., 2006*), y su actividad es regulada a través de modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación (*Wu R. et al., 2005*). La señalización de la Pg mediada por su receptor ocurre a través de 2 distintas vías. En el modelo clásico o vía genómica, los receptores activados se unen directamente, a través de su dominio de unión al DNA (DBD), a elementos de respuesta a progesterona (PREs), situados en las regiones promotoras de genes

blanco (*Lange C., 2008*), reclutando a co-activadores o co-represores con los que interaccionan vía sus dominios activadores de la función 1 (AF-1) y AF-2 (*Cui X., et al., 2005; Mulac-Jericevic B. y Connely O., 2004; Bramley T., 2003*). En la vía no genómica o extracelular, la Pg se une a su receptor activando proteínas cinasas citoplásmicas, las cuales incluyen a la proteína cinasas activada por mitógeno (MAPK), la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y la cinasa p60-Src (*Saitoh M., 2005*), esta última puede interactuar con substratos citoplasmáticos y promover la señalización de moléculas río abajo de la cascada de señalización, como la cinasa de adhesión focal (FAK) o al substrato asociado a Crk (CAS), el cual juega un papel notable en la señalización mediada por integrinas (*Finn, R., 2008*).

Recientemente en varios modelos celulares se ha descrito la transactivación del receptor al factor de crecimiento epidermal (EGFR) por diferentes ligandos, además se ha observado que la expresión de las isoformas del PR, en respuesta a la Pg, requiere la presencia del factor de crecimiento epidermal (EGF), lo cual sugiere la existencia de una transactivación importante entre los EGFR y/o los miembros de esta familia con receptores hormona-esteroideos, específicamente PR (*Lange C., 2008*). Aunado a lo anterior, ha sido reportado que el EGF incrementa la proliferación de las ramificaciones ductales durante el desarrollo de la glándula mamaria normal (*Ruan W., 2005*); de la misma forma, la actividad del EGFR se ha detectado incrementada en todos los estados de la progresión tumoral de la glándula mamaria (*Vlahovic G. y Crawford J., 2003*), pero aún más en los estados tardíos, lo que sugiere que este receptor se encuentra desempeñando un papel importante en el proceso metastásico del cáncer de mama humano (*Biscardi J., 2000*). Para que la diseminación metastásica se lleve a cabo se requiere de la invasión de células tumorales, lo cual es un evento tardío, pero esencial para la progresión neoplásica (*Ozanne B., et al., 2007*), involucrando una cascada de eventos, que incluyen el rompimiento de la matriz extracelular (ECM) por metaloproteinasas de matriz (MMPs) (*Figueira R., et al., 2009*). Las MMPs comprenden una gran familia de endopeptidasas dependiente de zinc (*Illemann M. et al., 2006*), cuya actividad proteolítica es regulada principalmente a tres niveles, la transcripción, la activación de la proenzima y la inhibición (*Overall C. y López-Otín C., 2002*). Entre estas enzimas, la MMP-9 o gelatinasa de tipo B, y la MMP-2 o gelatinasa de tipo A, juegan un

papel importante en la invasión del tumor y la metástasis (*Cortes-Reynosa P. et al., 2007*) debido a su especificidad por el colágeno de tipo IV, principal componente de la lámina basal (*Lungu G. et al., 2008; Taniwaki K. et al., 2007*). Adicionalmente, ambas MMPs no son expresadas en el tejido mamario normal pero sí son comúnmente expresadas en el cáncer de mama (*American Society from Reproductive Medicine, 2007*).

La proteína activadora-1 (AP-1) y el factor nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) son factores de transcripción importantes en la regulación de la transcripción del gen de la MMP-9, debido a que el promotor del gen de esta MMP contiene sitios de unión tanto para AP-1 como para NF- $\kappa$ B (*Lungu G. et al., 2008*), por lo cual su activación ha sido asociada a la invasión de células tumorales. AP-1 es un factor de transcripción que transduce múltiples señales de crecimiento mediadas por factores de crecimiento, principalmente EGF y hormonas esteroideas, como estrógenos y progesterona (*DeNardo D. et al., 2005*). NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción pro-inflamatorio asociado con el desarrollo y progresión de diversos cánceres, entre ellos se encuentra el cáncer de mama. La vía de señalización que estimula la activación de este factor de transcripción es mediada por diversas moléculas que incluyen el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el EGF, la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), los lipopolisacáridos (LPS), las proteínas virales, así como también por el estrés celular y los virus (*Sethi G., et al., 2008*).

Diversos estudios indican que tanto la Pg como su receptor están involucrados en el desarrollo y control de la tumorigénesis en la glándula mamaria, a pesar de esto poco se sabe de la respuesta celular a la Pg con una delimitación clara de los efectos dependientes del PR en vías de señalización a receptores de factores de crecimiento (EGFR), secreción de moléculas involucradas en procesos de migración e invasión (MMP-2 y MMP-9), así como de la participación de los factores de transcripción (AP-1 y NF- $\kappa$ B), importantes para la proliferación y la supervivencia celular. Por lo anterior, planteamos la hipótesis de que la Pg induce la secreción y expresión en membrana citoplasmática de la MMP-2 y la MMP-9, así como la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF- $\kappa$ B en líneas celulares de cáncer de mama.

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar el efecto de la Pg sobre la secreción y expresión en la superficie de la membrana plasmática de la MMP-2 y

la MMP-9 en líneas celulares de cáncer de mama, y las posibles vías de señalización (EGFR, PI3K, mTOR) involucradas en este proceso, así como el papel de la Pg en la activación de los factores de transcripción como AP-1 y NF- $\kappa$ B.

El tener conocimientos más claros sobre los efectos de la Pg y la señalización de su receptor en la progresión del cáncer de mama pueden proveer nuevos blancos moleculares para el tratamiento de este padecimiento, puesto que a la fecha existe poca información al respecto.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Cultivos celulares**

Se realizó un estudio de tipo experimental en el Laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del I. P. N. Las células MCF-7 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% y anfotericina 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , así como células MCF-10A, que fueron cultivadas en medio DMEM/F-12 suplementado con SFB al 5%, hidrocortisona (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), insulina (0.12U/mL), EGF (5ng/mL), estreptomina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y penicilina (100U/mL), ambas crecieron en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>, permitiéndoles su crecimiento hasta la confluencia deseada.

### **Ensayos de estimulación con progesterona**

Para llevar a cabo estos ensayos, los cultivos de células MCF-7 con una confluencia del 100% fueron mantenidos en medio sin suero 24 horas antes de la estimulación, mientras que las células MCF-10A solo permanecieron 4 horas en medio sin suero antes del tratamiento con Progesterona (Pg), a diferentes tiempos y a diferentes concentraciones. La estimulación se concluyó colectando el medio para los ensayos de Zimograma y solubilizando las células en 0.5 mL de buffer RIPA (ortovanadato de sodio 1mM, pirofosfato de sodio 10 mM, fluoruro de sodio 10 mM, glicerol 10%, triton X-100 1%, tris 50 mM, cloruro de sodio 150mM, bicloruro de magnesio 1.5mM, EGTA 1mM, SDS 0.1%, PMSF 1mM y desoxicolato de sodio 1%, pH 7.4) a 4°C. Los extractos se centrifugaron a 12,000 r.p.m. a 4°C por 10 min y los sobrenadantes se colectaron en tubos Eppendorf para la cuantificación de proteínas.

### **Cuantificación de proteínas**

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford, utilizando un estuche de la marca BioRad (Bradford, 1976) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

## **Zimograma**

Los sobrenadantes de los cultivos con o sin estimulación con Pg y tratados con o sin inhibidores, fueron concentrados mediante centrifugación en tubos centríficos con filtro (Millipore) a 4 °C, y separadas las proteínas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10% co-polimerizados con gelatina (1mg/mL). Al concluir el corrimiento electroforético los geles fueron lavados 3 veces por 30 minutos en agitación constante, empleando una solución de Tritón X-100 al 2.5% para retirar el exceso de SDS. Posteriormente, fueron incubados con buffer de activación de proteasas (Tris 0.050 M pH 7.4, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM y NaN<sub>3</sub> 0.02%) por 24 horas, para luego teñirlos con azul de Coomassie R-250, visualizando así las bandas de degradación.

## **Obtención de extractos nucleares**

Luego de ser lavados, los cultivos celulares fueron colectados y resuspendidos en 50 volúmenes de buffer hipotónico de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7.0, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 0.5 mM) e incubados por 5 min a 4°C, posteriormente se centrifugaron a 2500 r.p.m., a 4°C por 5 min; se descartó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en agitación suave, durante 5 min en buffer hipotónico con IGEPAL al 0.1%. Con la finalidad de remover el material citoplasmático residual, los núcleos fueron lavados en dos ocasiones con buffer hipotónico. Las proteínas contenidas en el núcleo se extrajeron mediante la adición de 50 µL de buffer hipertónico de extracción (HEPES 20 mM pH 7.9, NaCl<sub>2</sub> 420 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 0.5 mM y 25% de glicerol) con agitación vigorosa por 15 min y finalmente fueron centrifugadas por 15 min a 12,000 r.p.m., recuperándose el sobrenadante, el cual contiene las proteínas nucleares que fueron cuantificadas por el método de Bradford.

## **Ensayos de retardo de entrada al gel (EMSA)**

A los extractos nucleares estimulados con o sin Pg en presencia o ausencia de inhibidores se les adicionó 20 pmol de una sonda de doble cadena, la cual contiene sitios específicos de unión para AP-1 (5'-GATCCTTCGTGACTCAGCGGGATCCTTCGTGACTCAGCGG-3') y otra sonda

específica para NF- $\kappa$ B (5'–AGCTAAGGGACTTTC CGCTGGGGACTTCCAGG–3') marcándola con ATP( $\gamma$ - $^{32}$ P) mediante la T4 polinucleótido cinasa. Aproximadamente 1  $\mu$ g del oligonucleótido marcado fue incubado con 5  $\mu$ g de extracto nuclear en una mezcla de reacción conteniendo 3  $\mu$ g de poly (dl-dC) como competidor inespecífico, HEPES 0.25 M pH 7.5, KCl 0.6 M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 7.5 mM y glicerol al 9% por 20 min. Se utilizó un exceso de la misma sonda no marcada como control de competencia específico y un oligonucleótido irrelevante como competidor no específico (sonda específica para STAT-5). Las muestras fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 6% en solución amortiguadora de tris borato-EDTA 0.5x y analizadas por autoradiografía.

### **Citometría de Flujo**

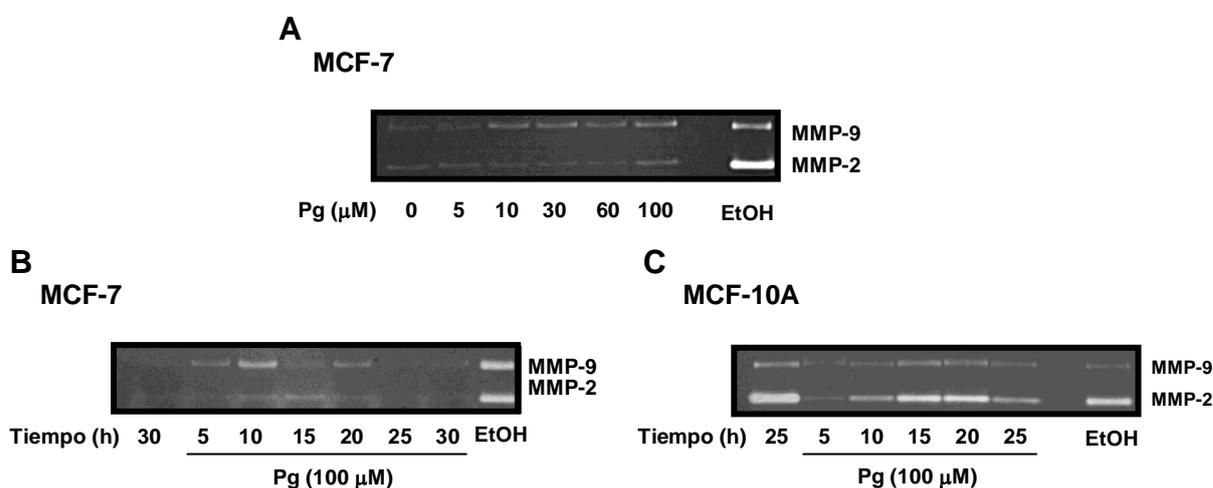
Los cultivos celulares tratados con o sin Pg fueron recolectadas con 1500  $\mu$ L de PBS 1x frío y centrifugadas por 5 min a 3000 r.p.m.; posteriormente fueron reconstituidas con 1250  $\mu$ L de DMEM no estéril sin suero, más 250  $\mu$ L de paraformaldehído al 2% por 10 min a temperatura ambiente (TA), para permitir la fijación de las células. Transcurrido este tiempo se centrifugó por 5 min a 3000 r.p.m. y se adicionó PBS 1x – BSA 0.5% para lavar las células 3 veces, retirándose el sobrenadante. Adicionalmente se añadió 100  $\mu$ L del anticuerpo primario de conejo contra MMP-2 y MMP-9 (Santa Cruz Biotechnology) en PBS 1x-BSA 0.5% a una dilución 1:50, incubando toda la noche a 4 °C. Posterior a esto se adicionó el anticuerpo secundario de ratón anti-conejo FITC (Zymed) en una dilución 1:5000, permitiéndose la interacción por un tiempo de 30 min a 1 h a TA. Finalmente las muestras fueron resuspendidas en 200  $\mu$ L de PBS 1x para ser analizadas por citometría de flujo en el FACScalibur™ (BD Biosciences®). Los datos resultantes se analizarán con el software Summit 4.3.

### **Análisis de Datos**

Los datos fueron analizados por medio del programa estadístico Prisma Graph pad versión 4.0, realizándose pruebas de ANOVA de una sola vía y Newmann-Keuls para medir la variabilidad entre los grupos. Los resultados fueron reportados como la media de al menos tres repeticiones de experimentos independientes para variables continuas.

## RESULTADOS

**La progesterona induce la secreción de la MMP-9 en la línea celular MCF-7.** Primero decidimos examinar el efecto de la Pg en la secreción de la MMP-2 y la MMP-9 en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Las células se mantuvieron en supresión de suero por 24 h y posteriormente fueron tratadas con diferentes concentraciones de Pg (0-100  $\mu$ M) por 24 h; transcurrido este tiempo el sobrenadante se sometió a ensayos de zimografía con gelatina. Como se muestra en la Fig. 1A, el tratamiento de las células con Pg induce un marcado incremento en la secreción de la MMP-9, alcanzando una secreción máxima con 100  $\mu$ M de Pg. Para una caracterización más precisa de la secreción de la MMP-9 en las células MCF-7, decidimos realizar una cinética de tiempo (0 a 30 h), utilizando la Pg a una concentración de 100  $\mu$ M, en la cual los niveles máximos de secreción se obtuvieron a las 10 h, observándose un comportamiento dependiente del tiempo (Fig. 1B). Estos resultados muestran que la Pg induce la secreción de la MMP-9 en la línea celular MCF-7, pero no en la línea celular de epitelio mamario normal MCF-10A (Fig. 1C). En estas líneas celulares no se observaron cambios significativos en la secreción de la MMP-2 (Fig. 1A, 1B, 1C).

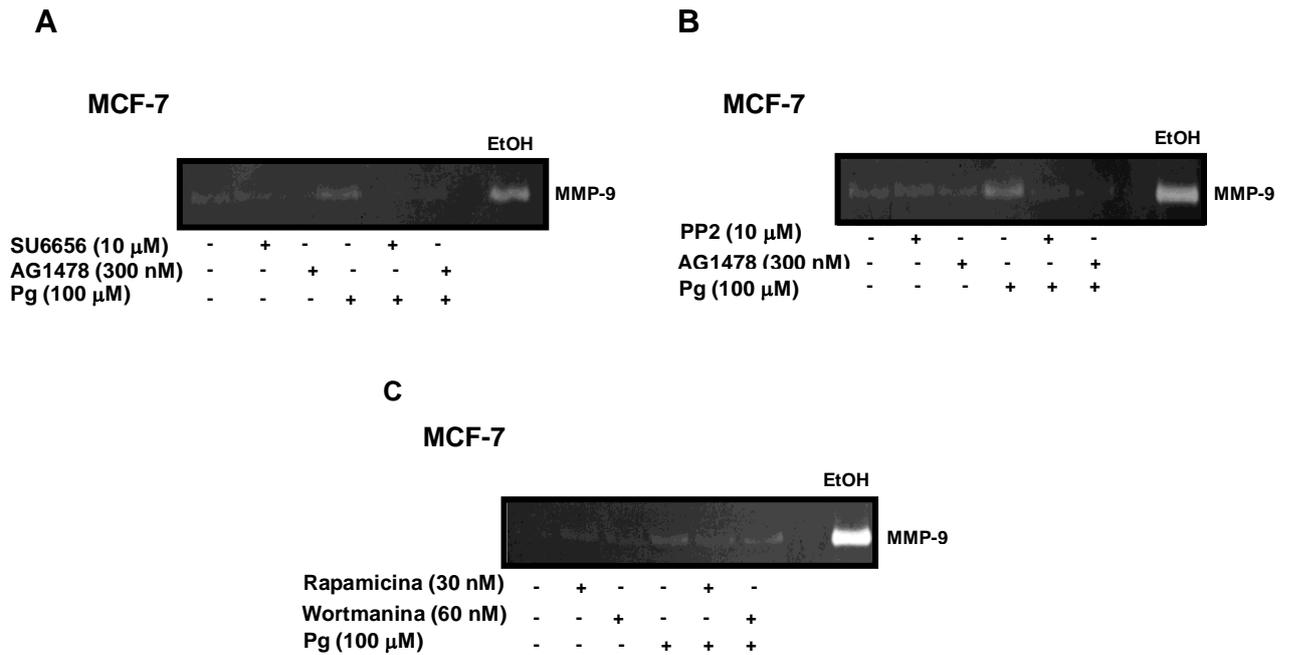


**Fig.1. La progesterona induce la secreción de la MMP-9.** En el panel A, las células MCF-7 fueron incubadas en medio DMEM sin suero por 24 h antes del tratamiento, posteriormente se trataron con Pg a diferentes concentraciones por 24 h. En el panel B, las células MCF-7 recibieron el mismo pretratamiento que en el panel A a excepción de las células MCF-10A, las cuales fueron mantenidas en medio DMEM sin suero 4 h en antes del tratamiento, después fueron tratadas con Pg a 100  $\mu$ M a diferentes tiempos. En ambos paneles, la actividad de la MMP-9 fue analizado sometiendo el medio de la células tratadas a geles de sustrato de gelatina (zimografía) como se describe en Material y métodos. El control positivo incluido es medio de células MCF-10A tratadas con etanol (EtOH) a una concentración de 400 mg/dL durante 25 h. Los experimentos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

**La secreción de la MMP-9 es dependiente de la actividad de c-Src y EGFR pero independiente de la vía de activación PI3K/mTOR.** Los efectos del PR son importantes para el desarrollo del cáncer de mama; numerosos estudios han demostrado que la Pg induce una activación de c-Src, esta molécula puede fosforilar al EGFR en la Tirosina-845 (Tyr845) contribuyendo a la activación de las vías de señalización dependientes de este receptor (*Biscardi J. et al., 1999*). Por lo anterior decidimos evaluar la participación de c-Src y EGFR en la secreción de la MMP-9 inducida por la Pg; para ello utilizamos inhibidores para c-Src (SU6656 y PP2) y EGFR (AG1478) en células MCF-7 y después de 10 h de estímulo con Pg observamos que la secreción de la MMP-9 se inhibe en presencia de los dos inhibidores (Fig. 2A, 2B).

El EGFR activa diversas vías de señalización, siendo la vía de PI3K/mTOR una de las principales, después de la vía de las MAPKs. Por lo cual empleamos inhibidores de PI3K (Wortmanina), mTOR (Rapamicina) para evaluar la participación de estas moléculas en la secreción de la MMP-9. Encontramos que el tratamiento con los inhibidores no inhibe la secreción de la MMP-9. Sin embargo, encontramos que al utilizar un inhibidor para ERK1/2, una molécula final de vía de las MAPKs, disminuye de manera parcial la secreción de la MMP-9 (Anexo 1A). Estos resultados muestran que la secreción de la MMP-9 inducida por Pg no depende de la vía de señalización PI3K/mTOR (Fig. 2C), pero si depende tanto de la actividad de c-Src como de EGFR y parcialmente de la activación de las MAPKs (Anexo 1A).

**La Pg induce la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 en la línea celular MCF-7.** Receptores a hormonas esteroideas como el ER (Receptor de estrógeno) inducen la activación tanto de AP-1 como de NF- $\kappa$ B (*DeNardo D., et al., 2005*), pero poco se sabe acerca de que si la Pg a través de su receptor puede mediar efectos similares. Por lo tanto, se propuso investigar si la Pg induce la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1. Para esto, se decidió realizar análisis por ensayos de retardo de entrada al gel (EMSA) utilizando oligonucleótidos específicos, primero para el factor de transcripción NF- $\kappa$ B en los extractos nucleares de células MCF-7 control y tratadas con Pg en un curso temporal. En la Fig. 3A se observa que el tratamiento con Pg induce una



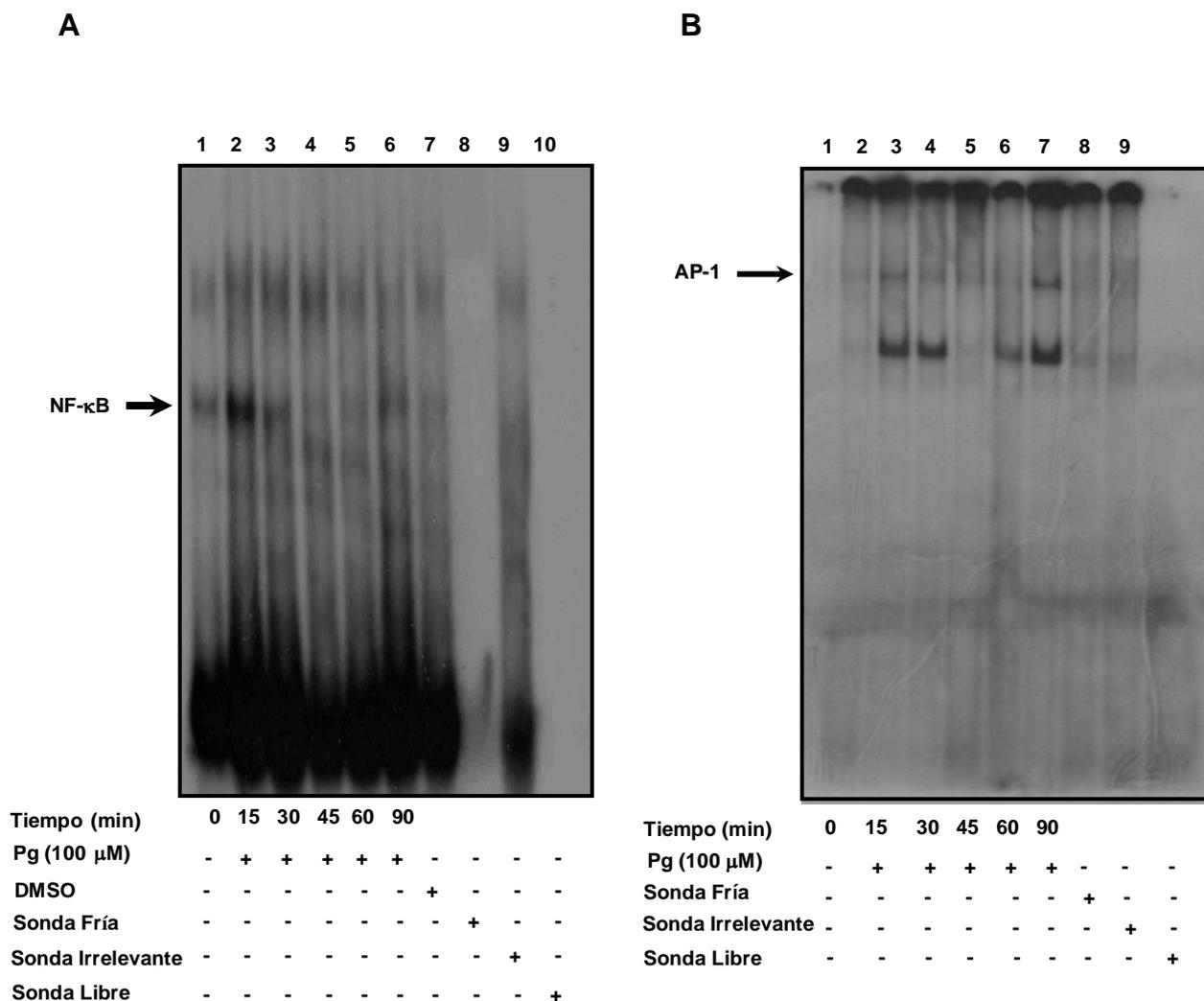
**Fig. 2. La secreción de la MMP-9 es dependiente de la actividad de c-Src y EGFR pero independiente de la vía de señalización PI3K/mTOR.** En el panel A, B y C las células MCF-7 se mantuvieron en supresión de suero 24 h. Panel A y B. 30 min antes del tratamiento con Pg, las células fueron tratadas con los inhibidores SU6656, PP2 y EGFR los dos primeros a concentraciones de 10  $\mu$ M y el último a 300 nM. Panel C, las células se trataron con los inhibidores Rapamicina y Wortmanina a concentraciones de 30 nM y 60 nM respectivamente 1h antes del tratamiento con Pg. En todos los paneles, pasando el tiempo de pre-tratamiento con los inhibidores se trataron con Pg a 100  $\mu$ M por 10 h a 37  $^{\circ}$ C. Se recolectaron los medios y fueron sometidos a zimografía como se indica en el Material y métodos. El control positivo incluido es medio de células MCF-10A tratadas con EtOH a una concentración de 400 mg/dL durante 25 h. Los experimentos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

marcada activación de NF- $\kappa$ B a los 15 min de tratamiento y que disminuye en relación al tiempo, comparada con las células control (MCF-7 no tratadas).

Utilizando los mismos extractos, se hizo el análisis de EMSA con oligonucleótidos específicos para AP-1. Como se muestra en la Fig. 3B el tratamiento con Pg aumenta la actividad de este factor de transcripción a un tiempo de 15 min, disminuye con el tiempo y se reactiva a los 90 min.

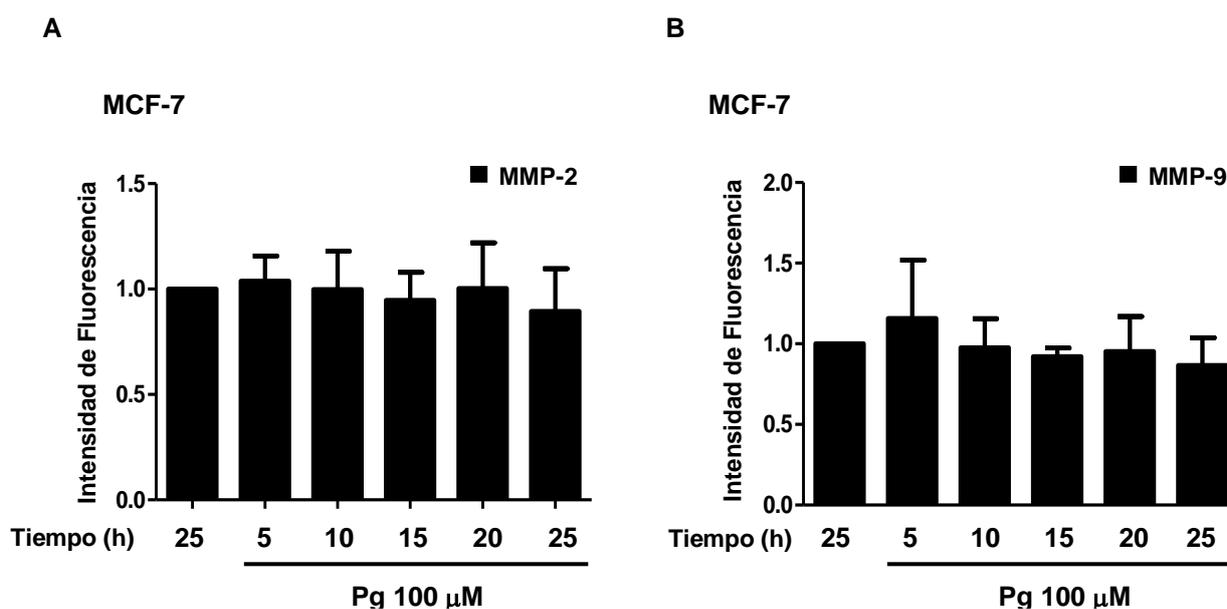
Estos datos nos indican que la Pg incrementa la actividad de NF- $\kappa$ B y AP-1 para unirse al DNA en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y que esta actividad es dependiente del tiempo.

MCF-7



**Fig. 3. La progesterona induce la activación del factor de transcripción NF-κB y AP-1.** Los ensayos EMSA fueron llevados a cabo para determinar la activación de NF-κB y AP-1 como se describe en el material y métodos. En el panel A y B el tratamiento de las células MCF-7 con Pg (100 μM) se realizó en tiempos de 0 a 90 min (carril 1 al 6), solo en el panel A el DMSO fue introducido para descartar la posibilidad de que los resultados obtenidos se debieran al diluyente de la Pg y no por acción de la hormona misma (carril 7). En ambos paneles, la sonda fría o de competencia fue una sonda no marcada específica para NF-κB (panel A) o AP-1 (panel B) contra una marcada, como sonda irrelevante se utilizó una secuencia conocida en este caso EBP (proteína de unión al enhancer) (panel A, carriles del 8 al 10; panel B, carriles del 7 al 9). En todos los carriles se agregó una solución de unión BDG 1x (solución de unión BDG 2x (HEPES 240 mM pH 7.8, EDTA 1mM pH 8.0, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, KCl 120 mM, Glicerol 50%), DTT 100 mM, H<sub>2</sub>O desionizada), espermidina 4 mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, poliDi:DC 0.1 μg/μL y sonda radio marcada a excepción del carril 10 (panel A) y 9 (panel B) que solo se les colocó los 4 primeros reactivos y la sonda radio marcada, sin muestra. Los experimentos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

**La Pg no induce cambios en la expresión en membrana de la MMP-2 y MMP-9.** Las proteasas, como las MMP's, pueden ser secretadas o ancladas en la membrana celular o ambas (Chakraborti S., et al., 2003; Nelson A. et al., 2000). Esto explicaría la especificidad de su actividad catalítica sobre substratos determinados en el espacio pericelular. El siguiente paso del trabajo fue demostrar que la Pg induce la expresión de la MMP-2 y la MMP-9 en la membrana plasmática mediante citometría de flujo, para lo cual las células MCF-7 estimuladas con Pg a diferentes tiempos y las células control fueron incubadas con anticuerpos primarios para la MMP-2 o la MMP-9 y posteriormente con anticuerpos secundarios acoplados a un fluorocromo, seguido de la lectura en el citómetro de flujo. La expresión de ambas MMPs en membrana no tuvo cambios significativos con respecto al tiempo comparadas con las células control (Fig.4A y 4B), por lo que podemos concluir que la Pg no altera la presencia de la MMP-2 y la MMP-9 en la membrana plasmática de las células MCF-7.



**Fig. 4. La Pg no induce cambios en la expresión de membrana de la MMP-2 y MMP-9.** En el panel A y B, las células fueron incubadas en medio sin suero 24 h antes del tratamiento con Pg. Posteriormente las células fueron tratadas con Pg a una concentración de 100 μM a diferentes tiempos, se retiró el medio y se recolectaron las células para ser sometidas a citometría de flujo siguiendo el protocolo marcado en el Material y métodos. Las células control son células MCF-7 sin estímulo. Los resultados son presentados como la media  $\pm$  2 SD de al menos tres experimentos independientes.

## DISCUSIÓN

La Pg es una hormona esteroidea ovárica que regula la reproducción y el desarrollo de la glándula mamaria en los humanos. Por otro lado la Pg y sus análogos sintéticos son empleados en la clínica como un método de contracepción y de terapia de reemplazo hormonal (TRH). Sin embargo, se ha demostrado que el uso de esta terapia confiere un mayor riesgo para el desarrollo del cáncer de mama (*Chlebowski R., et al., 2003*). Por otro lado, un estudio realizado *in vitro* reportó que los componentes de la TRH inducen un incremento en la expresión de la MMP-2 y la MMP-9 en células de cáncer de mama (*American Society from Reproductive Medicine, 2007*).

Con base a lo anterior, considerábamos que la Pg regularía la secreción de la MMP-2 y la MMP-9 en células de cáncer de mama. Nuestros resultados demuestran que la Pg induce un incremento en la secreción de la MMP-9, pero no de la MMP-2 en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. En células del epitelio mamario normal humano (MCF-10A), las cuales poseen una secreción constitutiva de estas MMPs y, sin embargo, el tratamiento con Pg no promueve en ellas el incremento de la MMP-9. Esto puede deberse a que la secreción de las MMPs en la glándula mamaria normal es un proceso fuertemente regulado por hormonas (progesterona, hidrocortisona y prolactina), y que varía con los diferentes estados del desarrollo de la mama (*Lee P., et al., 2001*). Apoyando nuestros resultados, se ha demostrado en un análisis de la expresión de la MMP-2, la MMP-9 y la MMP-14 en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, ZR-75-1, MDA-MB-231, MDA-MB-435 y Hs578, que la actividad y los niveles proteicos de estas MMPs se encuentran elevados en cultivos celulares sembrados con Matrigel, en comparación con los cultivos que no tenían (*Figueira R. et al., 2009*).

Los PRs pueden actuar rápidamente a través de vías de señalización extranucleares tales como la vía PI3K/Akt/mTOR o la vía c-Src/Erk1/2, las cuales juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama (*Boonyaratanakornkit V. et al., 2007; Boonyaratanakornkit V. et al., 2001*). Los efectos no genómicos de la Pg se han estudiado a través de experimentos realizados con progestina, un análogo sintético de la Pg, y se ha demostrado que el tratamiento de células de cáncer de mama T47D activa la transducción de

señales de la vía *c*-Src/p21<sup>ras</sup>/MAPK, la cual tiene como resultado un aumento en la proliferación de esta línea celular (*Castoria G. et al., 1999; Migliaccio A. et al., 1998*). Otro estudio realizado en una línea celular de cáncer mamario murino C4HD, coincide en que la progestina también activa vías como MEK1/2 MAPK y PI3K/Akt, pero la secreción de MMP-2 y MMP-9 por estas vías se ve inhibida por este tratamiento (*Carnevale P. et al., 2007*). Nuestros resultados con Pg en células MCF-7 demuestran la participación de *c*-Src en la secreción de la MMP-9 y la participación parcial de la vía Erk1/2 MAPK en la secreción de esta MMP. Como *c*-Src es una cinasa que puede inducir la activación de la vía Erk1/2 MAPK y se ha comprobado su implicación en la activación del EGFR mediante la estimulación con progestina en la línea de cáncer de mama T47D (*Faivre E. et al., 2007*), evaluamos el papel del EGFR en la secreción de la MMP-9 y demostramos que la activación de este receptor tirosina cinasa se requiere para la secreción de esta proteasa, además nuestros resultados sugieren fuertemente una transactivación del EGFR por *c*-Src en la secreción de la MMP-9.

La regulación de la Pg sobre la secreción de la MMP-9 por la vía PI3K/Akt/mTOR, en cáncer de mama, sigue siendo poco estudiada. Nuestros resultados obtenidos *in vitro* con Pg demuestran que la vía PI3K/Akt/mTOR no está participando en la secreción de esta MMP en células MCF-7; sin embargo, el tratamiento con MPA (acetato de medroxiprogesterona) en células T47D ha demostrado la activación de esta vía de señalización (*Saitoh M. et al., 2005*).

La activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y del complejo AP-1 constituye una respuesta universal a una amplia variedad de estímulos externos que incluyen factores de crecimiento, citocinas y componentes de la ECM (Matriz extracelular) (*Aggarwal B. et al. 2006; Chen R. et al., 1996*). El PR puede unirse a factores de transcripción como la proteína específica 1 (SP1), AP-1 y el activador y transductor de la señal de la transcripción 5 (STAT5) (*Faivre E., et al., 2008*). Además, en un estudio realizado en células de adenocarcinoma endometrial se observó que el PR puede activar directamente a AP-1 en ausencia completa de ligando o de otros estímulos extracelulares (*Mamberger A. et al., 1996*). Por otro lado, la regulación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 se encuentra alterada en células tumorales. Debido a esto y a que no existe literatura consistente que demuestre la regulación de la activación de ambos factores de transcripción por la Pg, evaluamos este efecto en células MCF-7 y nuestros

resultados muestran que la Pg puede inducir la activación de ambos factores de transcripción en esta línea celular. Sin embargo, permanecen por determinarse las vías de señalización por las que se regula esta activación y si el PR también participa en la misma.

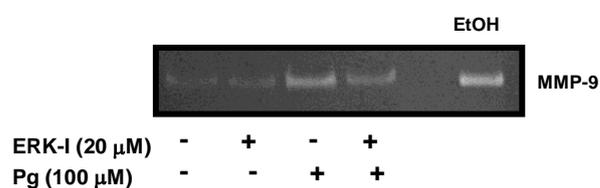
Muchos de los eventos de señalización extracelular que regulan el comportamiento celular ocurren en o cerca de la membrana celular y son regulados por proteólisis pericelular (*Werb Z. 1997*). Las MMPs secretadas pueden, sin embargo, estar localizadas en la superficie celular unidas a integrinas (*Brooks P. et al., 1996*), a CD44 (*Yu Q. 1999*) o a través de interacciones con proteoglicanos de heparán sulfato asociados a superficie celular, colágeno de tipo IV o con el inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular (EMMPRIN) (*Sternlicht M., et al., 2001*). Debido a que la Pg induce la secreción de la MMP-9 decidimos evaluar los niveles en membrana tanto de la MMP-2 como de la MMP-9, en la línea celular MCF-7. Nuestros resultados mostraron que no hubo cambios en la expresión de ambas MMPs en respuesta a la Pg. Esto puede deberse a que el anclaje en membrana de las MMPs sirve como reserva para requerimientos posteriores de la célula; en este caso en particular, las células responden al estímulo de la Pg y como prueba fehaciente de ello, observamos la degradación en geles co-polimerizados con gelatina. Sin embargo, esta línea celular no es altamente invasiva, sugiriendo que la secreción de la MMP-9 ayuda al establecimiento y crecimiento del tumor primario. Lo anterior puede efectuarse a través de la liberación de factores de crecimiento de la ECM (*Mañes S. et al., 1999*) o bien, a través de la regulación de señales de proliferación mediante integrinas (*Agrez M. et al., 1994*).

En resumen, hemos demostrado por primera vez, que la Pg induce la secreción de la MMP-9 de una manera dependiente de c-Src y EGFR y parcialmente dependiente de Erk1/2 MAPK; además de que la Pg es capaz de activar factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1. En contraste, el tratamiento con Pg no induce secreción de la MMP-2 y no produce cambios en la expresión en membrana de la MMP-2, así como tampoco de la MMP-9. Estos hallazgos nos permiten entender el papel de la señalización de la Pg en el establecimiento del tumor primario y nos proveen nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer de mama.

## ANEXOS

A

MCF-7



### **Anexo 1. La secreción depende parcialmente de la activación de la vía de las MAPKs.**

En el panel A, las células MCF-7 fueron incubadas en medio DMEM sin suero 24 h, transcurrido este tiempo las células se les colocó el inhibidor a una concentración de 20  $\mu$ M 1 h del tratamiento con progesterona. Posteriormente fueron tratadas con Pg a una concentración de 100  $\mu$ M por 10 h, se recolectó el sobrenadante, el cual fue sometido a zimografía como se indica en el Material y métodos para analizar la actividad de la MMP-9. El control positivo incluido es medio de células MCF-10A tratadas con EtOH a una concentración de 400 mg/dL durante 25 h. Los experimentos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

## REFERENCIAS

Aggarwal B., Sethi G., Nair A., Ichikawa H. (2006). Nuclear Factor- $\kappa$ B: a Holy Grail in Cancer Prevention and Therapy. *Curr Signal Transduct Ther*; 1:25–52.

Agrez M., Chen A., Cone R., Pytela R., Sheppard D. (1994). The  $\alpha$ v $\beta$ 6 Integrin Promotes Proliferation of Colon Carcinoma Cells Through a Unique Region of the  $\beta$ 6 Cytoplasmic Domain. *J Cell Biol*; 127:547-556.

Althuis M., Fergenbaum J., Garcia-Closas M., Brinton L., Sherman M. (2004). Etiology of Hormone Receptor–Defined Breast Cancer: A Systematic Review of the Literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 13:1558–68.

American Society for Reproductive Medicine. (2007). Effects of the Components of Hormone Therapy on Matrix Metalloproteinases in Breast-cancer Cells: an *in vitro* Study. *Fertility and Sterility*; 87:978-981.

Ballaré C., Vallejo G., Vicent P., Beato M. (2006). Progesterone signaling in breast and endometrium. *J Steroid Biochem & Mol Biol*; 102:2-10.

Bamberger A., Bamberger C., Gellersen B., Schulte H. (1996). Modulation of AP-1 Activity by the Human Progesterone Receptor in Endometrial Adenocarcinoma Cells. *Med Sciences*; 93:6169-6174.

Biscardi J., Maa M., Tice D., Cox M., Leu T., Parsons S. (1999). c-Src mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem*; 274:8335-8343.

Biscardi J., Ischizawar R., Silva Co., Parsons S. (2000). Tyrosine Kinase Signalling in Breast Cancer Epidermal Growth Factor Receptor and c-Src Interactions in Breast Cancer. *Breast Cancer Res*; 2:203-210.

Boonyaratanakornkit V., McGowan E., Sherman L., Mancini M., Cheskis B., Edwards P. (2007). The Role of Extranuclear Signaling Actions of Progesterone Receptor in Mediating Progesterone Regulation of Gene Expression and the Cell Cycle. *Mol Endocrinology*; 21:359–375.

Boonyaratanakornkit V., Scott M., Ribon V., Sherman L., Anderson J., Maller J., *et al.* (2001). Progesterone Receptor Contains a Proline-rich Motif that Directly Interacts with SH3 Domains and Activates c-Src Family Tyrosine Kinases. *Mol Cell*; 8:269-280.

Bramley T. (2003). Non-genomic Progesterone Receptors in the Mammalian Ovary: Some Unresolved Issues. *Reproduction*; 125:3-15.

Carnevale R., Proietti C., Salatino M., Urtreger A., Peluffo G., Edwards D., *et al.* (2007). Progestin Effects on Breast Cancer Cell Proliferation, Proteases Activation, and *in Vivo* Development of Metastatic Phenotype All Depend on Progesterone Receptor Capacity to Activate Signaling Pathways. *Molec Endocrinology*; 21:1335-1358.

Castoria G., Barone M., Di Domenico M., Bilancio A., Ametrano D., Migliaccio A., *et al.* (1999). Non-transcriptional Action of Oestradiol and Progestin Triggers DNA Synthesis. *EMBO J*; 18:2500-2510.

- Chang E., Frasor T., Komm B., Katznellenbogen B. (2006). Impact of Estrogen Receptor  $\beta$  on Gene Networks Regulated by Estrogen Receptor  $\alpha$  in Breast Cancer Cells. *Endocrinology*; 147:4831-4842.
- Chankraborti S., Mandal M., Das S., Mandal A., Chankraborti T. (2003). Regulation of Matrix Metalloproteinases: An Overview. *Molec and Cel Biochem*; 253:269-285.
- Chen R., Juo P., Curran T., Blenis J. (1996). Phosphorylation of *c-Fos* at the C-Terminus Enhances its transforming Activity. *Oncogene*; 7:1493-1502.
- Chlebowski R., Hendrix S., Langer R., Stefanick M., Gass M., Lane D., *et al.* (2003) Influence of Estrogen plus Progestin on Breast Cancer and Mammography in Healthy Postmenopausal Women. *JAMA*; 289:3243–3253.
- Conzen S. (2008). Nuclear Receptors and Breast Cancer. *Molec Endocrinology*; 22:2215-2228.
- Cortes-Reynosa P., Robledo T., Macias-Silva M., Wu S., Perez-Salazar E. (2008). Src Kinase Regulates Metalloproteinase-9 Secretion Induced by Type IV Collagen in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Matrix Biol*; 27:220-231.
- Cui X., Schiff R., Arpino G., Osborne K., Lee V. (2005). Biology of Progesterone Receptor Loss in Breast Cancer and Its Implications for Endocrine Therapy. *Clin Oncol*; 23:7721-7735.
- DeNardo D., Kim H-T., Hilsenbeck S., Cuba V., Tsimelzon A., Brown P. (2005). Global Gene Expression Analysis of Estrogen Receptor Transcription Factor Cross Talk in Breast Cancer: Identification of Estrogen/Activator Protein-1-Dependent Genes. *Molec Endocrinology*; 19:362-378.
- ESHRE Capri Workshop Group (2004). Hormones and breast cancer. *Hum Reproduc Upd*; 10:281–293.
- Faivre E., Daniel A., Hillard C., Lange C. (2008). Progesterone Receptor Rapid Signaling Mediates Serine 345 Phosphorylation and Tethering to Specificity Protein 1 Transcription Factors. *Molec Endocrinology*; 4:823-837.
- Faivre E., Lange C. (2007). Progesterone Receptors Upregulate Wnt-1 to Induce Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation and *c-Src*-Dependent Sustained Activation of Erk1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase in Breast Cells. *Molec and Cellular Biol*; 27:466-480.
- Figueira R., Gomes L., Neto J., Silva F., Silva I., Sogayar M. (2009). Correlation between MMPs and Their Inhibitors in Breast Cancer Tumor Tissue Specimens and in Cell Lines with Different Mestastatic Potencial. *B M C*; 9:9-20.
- Finn R. (2008). Targeting Src in Breast Cancer. *Annals of Oncol*; 19:1379–1386.
- Haslam S. (2005). Experimental Mouse Model of Hormonal Therapy Effects on the Postmenopausal Mamary Gland. *Breast Dis*; 24:71-78.
- Illemann M., Bird N., Majeed A., Sehested M., Laerum O., Lund L., *et al.* (2006). MMP-9 Is Differentially Expressed in Primary Human Colorectal Adenocarcinomas and Their Metastases, *Mol. Cancer Res*; 4:293-302.

- Knaul F. M., Nigenda G., Lozano R., Arreola-Ornelas H., Langer A., Frenk J. (2008). Breast Cancer in Mexico: a Pressing Priority. *Reproductive Health Matter*; 16:113-123.
- Lange C. (2008). Challenges to Defining a Role for Progesterone in Breast Cancer. *Steroids*; 73:914-921.
- Lange C. (2008). Integration of Progesterone Receptor Action with Rapid. Signaling Events in Breast Cancer Models. *J of Steroid Bioch and Mol Biol*; 108:203-212.
- Lee P., Hwang J., Mead L., Ip M. (2001). Functional Role of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Mammary Epithelial Cell Development. *J of Cellular Physiol*; 188:75-88.
- Lungu G., Covalada L., Mendes O., Martini-Stoica., Stoica G. (2008). FGF-1-Induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Breast Cancer Cells is Mediated by Increased Activities of NF- $\kappa$ B and Activating Protein-1. *Molec Carcinogenesis*; 47:424-435.
- Mañes S., Llorete M., Lacalle R., Gómez-Moutón C., Kremer L., Mira E., *et al.* (1999). The Matrix Metalloproteinase-9 Regulates the Insulina-like Growth Factor-tiggered Autocrine Response in DU-145 Carcinoma Cells. *J Biol Chem*; 274:6935-6945.
- McTiernan A. (2003). Behavioral Risk Factors in Breast Cancer: Can Risk Be Modified?. *Oncologist* 2003; 8:326-334.
- Mulac-Jericevic B., Conneely O. (2004). Reproductive Tissue Selective Actions of Progesterone Receptors. *Reproduction*; 128:139-146.
- Nelson A., Fingleton B., Rothenberg M., Matrisian L. (2000). *J of Clinical Oncol*; 18:1135-1149.
- Overall C., López-Otín C. (2002). Strategies for MMP Inhibition in Cancer: Innovations for the Post-trial Era. *Nat Rev Cancer*; 2:657-672.
- Ozzane B., Spence H., McGarry L., Hennigan R. (2007). Transcription Factors Control Invasion: AP-1 the first among equals, *Oncogene*; 26:1-10.
- Rodríguez-Cuevas S., Capurso-García M. (2006). Epidemiology of Breast Cancer. *Ginecol Obstet Mex*; 74:585-93.
- Ruan W., Monaco M., Kleiberg D. (2005). Progesterone Stimulates Mammary Gland Ductal Morphogenesis by Synergizing with and Enhancing Insuline-like Growth Factor-I Action. *Endocrinology*; 148:1170-1178.
- Saitoh M., Ohmichi M., Takahashi K., Kawagoe J., Ohta T., Doshiha M., *et al.* (2005). Medroxyprogesterone Acetate Induces Cell Proliferation Through Up-regulation of Cyclin D1 Expression Via Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt/Nuclear Factor-kappa B Cascade in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology*; 146:4917-4925.
- Sethi G., Sung B., Aggarwal B-B. (2008). Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation: From Bench to Beside. *Exp Biol Med*; 233:21-31.
- Sternlicht M., Werb Z. (2001). How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 17:463-516.

Taniwaki K., Fukamachi H., Komori K., Ohtake Y., Nonaka T., Sakamoto T., *et al.* (2007). Stroma-Derived Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 Promotes Membrane Type 1-MMP-Dependent Tumor Growth in Mice. *Cancer Research*; 67:4311-4319.

Torres-Arreola L., Vladislavovna S. (2006). Breast Cancer. Evidence and Recommendations for the Timely Detection in Primary Care. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.*; 45:157-66.

Vlahovic G., Crawford J. (2003). Activation of tyrosine kinases in Cancer. *The Oncologist*; 8:531-538.

Werb Z. (1997). ECM and Cell Surface Proteolysis: Regulating Cellular Ecology. *Cell*; 9:439-442.

Wu R., Smith L., O'Malley B. (2005). Transcriptional Regulation by Steroid Receptor Coactivator Phosphorylation. *Endocrinology Rev*; 26:393-399.

Yu Q., Stamenkovic I. (1999). Localization of Matrix Metalloproteinase 9 to the cell Surface provides a mechanism for CD44-mediated Tumor Invasion. *Genes Dev*; 13:35-48.

<http://www.salud.gob.mx>