



---

---

**Universidad Veracruzana**

**Instituto de Investigaciones Cerebrales**

**Doctorado en Investigaciones Cerebrales**

**“Efecto de la adición de prolactina y estradiol sobre la expresión de MMP-13 y su participación en la migración de la línea celular de cáncer de mama MCF-7”**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de:**

**Doctor en Investigaciones Cerebrales**

Presenta:

**Q.C. Jesús Antonio Lara Reyes**

Director:

**Dr. Fausto Rojas Durán**

Codirectora:

**Dra. Deissy Herrera Covarrubias**

Xalapa Veracruz

2021

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Investigaciones Cerebrales de la Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz. Bajo la dirección del Dr. Fausto Rojas Durán y la codirección de la Dra. Deissy Herrera Covarrubias. Con apoyo por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con la beca de doctorado con número 467819.

## **AGRADECIMIENTOS**

A quienes hicieron posible esta meta, aquellos que caminaron junto a mí en todo momento y fueron inspiración, apoyo y fortaleza.

A mi familia, es especial a mi tía Lucia y mi esposa Cecilia. Muchas gracias por demostrarme que el verdadero amor no es otra cosa que el deseo inevitable de apoyar al otro para que sea la mejor versión posible de sí mismo.

A mi director de Tesis Dr. Fausto Rojas Duran, por la confianza y apoyo brindado en todo momento.

A mi co-directora la Dra. Deissy Herrera Covarrubias, por siempre apoyarme y alentarme.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Ma. Elena Hernández, Dr. Gonzalo Aranda, Dra. Clara Sampieri y Dr. Arnoldo Aquino, por acompañarme durante estos 4 años y aportar toda su experiencia y valiosos conocimientos para mejorar este trabajo.

A mis amigos y compañeros; Victoria, Alejandra, Sergio, Ricardo, Alejandro, Viridiana, Jorge y Mariana, sin los cuales esta aventura no hubiese sido tan especial.

A la maestra Rita Licea por siempre brindarme su apoyo cuando lo necesite.

Al Instituto de Investigaciones Cerebrales por abrirme sus puertas y a todos mis maestros por su dedicación y esfuerzo a mi formación académica.

## DEDICATORIAS

*A mis Abuelos Ofelia† y Lorenzo†, el viento bajo mis alas.*

*A mi esposa Cecilia, por su amor y apoyo incondicional.*

*A mis hijos Edah† e Itzae, el motivo más grande para seguir superandome.*

# INDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>2. MARCO TEORICO</b> .....	7
<b>2.1 Glándula mamaria</b> .....	7
<b>2.2 Cáncer de mama</b> .....	9
<b>2.2 Metástasis</b> .....	13
<b>2.5 E-cadherina</b> .....	21
<b>2.6 Metaloproteasas de la Matriz</b> .....	23
<b>2.7 MMPs y Cáncer de Mama</b> .....	25
<b>2.8 MMP-13</b> .....	26
<b>2.10 Estradiol</b> .....	31
<b>2.11 Transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT)</b> .....	34
<b>2.11.1 STAT3</b> .....	35
<b>2.12 Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)</b> .....	36
<b>2.12.1 ERK1/2</b> .....	36
<b>2.13 Migración Celular y Segundos Mensajeros</b> .....	38
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	39
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	40
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	40
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	40
<b>7. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	41
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	42
<b>8.1 Adaptación y proliferación de las células MCF-7 en medio de cultivo RPMI-1640</b> .....	42
<b>8.2 Cultivo y mantenimiento de la línea celular MCF-7</b> .....	42
<b>8.3 Curva de proliferación celular</b> .....	43
<b>8.4 Ensayos de migración celular</b> .....	43
<b>8.5 Determinación de la concentración de FBS a usar en los ensayos de migración</b> .....	44

8.6 Determinación de la concentración de PRL y E2 a utilizar por la técnica de raspado y cicatrización de herida en las células MCF-7.....	44
8.7 Western blot para la determinación de MMP-13, STAT-3, ERK1/2, E-cadherina y GAPDH.....	45
8.8 Ensayo por zimografía para medir la actividad de MMP-2 y MMP9 en medio de cultivo.....	47
8.9 Análisis Estadístico.....	48
9. RESULTADOS.....	49
9.1 La PRL incrementa la migración celular en las células MCF-7 .....	49
9.2 Actividad proteolítica de MMP2 y MMP9 en el medio de cultivo .....	51
9.3 Expresión de la proteína MMP-13.....	52
9.4 Expresión de la proteína STAT-3.....	53
10. DISCUSIÓN .....	56
11. CONCLUSIONES .....	63
11. PROSPECTIVAS .....	64
12. ANEXOS. ....	65
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....	82

## ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
BCA	Ácido bicinconínico
CDC	Centro de control de enfermedades
E2	Estradiol
EGFR	Recetor del fator de crecimiento epidérmico
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
FBS	Suero fetal bovino
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GPR30	Receptor de estrógenos acoplado a proteína G
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Información
JAK	Quinasas Janus
JNK	Quinasas c-Jun N-terminal
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasas de la matriz
MMP-2	Metaloproteinasa de la matriz 2
MMP-9	Metaloproteinasa de la matriz 9
MMP-13	Metaloproteinasa de la matriz 13
NFkB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PIF	Factor inhibidor de prolactina
PRL	Prolactina

PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RE $\alpha$	Receptor de estrógenos alfa
RE $\beta$	Receptor de estrógenos beta
RPRL	Receptor a prolactina
SAPK	Quinasas activadas por estrés
SDS	Dodecilsulfato sódico
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TEM	Transición epitelial-mesenquimal
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasa



## RESUMEN

La PRL es una hormona polipeptídica que participa en el desarrollo de la glándula mamaria y en la producción de proteínas de la leche en el embarazo y lactancia. El E2 es una hormona esteroidea del grupo de los estrógenos, tiene efectos en el crecimiento, desarrollo y diferenciación de diversos tejidos entre ellos la glándula mamaria. Adicionalmente, a las funciones fisiológicas de ambas hormonas, se ha mostrado que también participan en el desarrollo de patologías como el cáncer de mama, sin embargo, no es claro si estas hormonas tienen un papel en la migración celular, un proceso crucial en el desarrollo de la metástasis, así como en la regulación de la expresión de MMP-13 y actividad de MMP-2 y MMP-9, que están involucradas en la degradación de la matriz extracelular y en el proceso de migración celular. El objetivo de este estudio fue evaluar si la PRL y/o estradiol promueven un aumento de la migración celular mediante la regulación de MMP-13, a través de las vías de señalización de STAT3 y/o ERK1/2 en las células MCF-7 de cáncer de mama, así como el efecto que podrían tener sobre la expresión de E-cadherina. Los resultados muestran que la PRL produjo un incremento en la migración de las células MCF-7 sin alterar los niveles de expresión de E-cadherina, y no tuvo efecto en la expresión de ERK1/2, STAT3 y MMP13, así como tampoco en la actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9. Por su parte, el E2 no produjo cambios sobre la migración celular, ni en la expresión de ERK1/2 y MMP-13, ni en la actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9, pero si produjo un incremento en la expresión de la proteína STAT3 fosforilada. De los resultados se puede concluir que en las células MCF-7 la PRL es capaz de inducir migración celular, siendo esta migración, probablemente, de tipo colectivo, ya que la PRL no redujo los niveles de expresión de E-cadherina. Sin embargo, dichos efectos no son regulados a través de ERK1/2, STAT3 y MMP13, ni por la activación de MMP-2 y MMP-9. Por último, el E2, si bien no indujo migración en las células MCF-7, si incremento los niveles de expresión de la proteína STAT3 fosforilada, indicando su participación en la regulación de esta vía de señalización.

## **ABSTRACT**

PRL is a polypeptide hormone that participates in the development of the mammary gland and in the production of milk proteins in pregnancy and lactation. E2 is a steroid hormone from the group of estrogens, it has effects on the growth, development, and differentiation of various tissues, including the mammary gland. In addition, to the physiological functions of both hormones, it has been shown that they also participate in the development of pathologies such as breast cancer, however, it is not clear if these hormones play a role in cell migration, a crucial process in development of metastasis, as well as in the regulation of MMP-13 expression and MMP-2 and MMP-9 activity, which are involved in the degradation of the extracellular matrix and in the cell migration process. The objective of this study was to evaluate whether PRL and / or estradiol promote an increase cell migration through regulation of MMP-13 and the STAT3 and / or ERK1 / 2 signaling pathways in MCF-7 cells of breast cancer, as well as the effect they could have on the expression of E-cadherin. The results show that PRL produced an increase in the migration of MCF-7 cells without altering the expression levels of E-cadherin and had no effect on the expression of ERK1/2, STAT3 and MMP13, as well as on the enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9. For its part, E2 did not produce changes on cell migration, neither in the expression of ERK1/2 and MMP-13, nor in the enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9, but it did produce an increase in the expression of the phosphorylated STAT3 protein. From the results, it can be concluded that in MCF-7 cells, PRL is capable of inducing cell migration, this migration being probably collective, since PRL did not reduce E-cadherin expression levels. However, these effects are not regulated through ERK1/2, STAT3 and MMP13, nor by the activation of MMP-2 and MMP-9. Lastly, E2, although it did not induce migration in MCF-7 cells, did increase the expression levels of the phosphorylated STAT3 protein, indicating its participation in the regulation of this signaling pathway.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común que afecta actualmente a las mujeres en el mundo. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2015) señalan que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad. La Organización Panamericana de la Salud (OPS), estima que para el año 2030 se presentarán más de 59,600 casos nuevos y más de 142,100 muertes en la región de América Latina y el Caribe. En México el cáncer de mama es el de mayor presencia entre el total de casos de cáncer con 28.2%, por lo que por su frecuencia y mortalidad constituyen un problema de salud pública importante.

Uno de los principales problemas del cáncer de mama, como muchos otros tumores sólidos, es cuando adquiere la capacidad de producir metástasis, siendo esta la principal causa de mortalidad en los pacientes que padecen cáncer. El aumento en la migración celular es el principal proceso requerido para que las células cancerígenas invadan y hagan metástasis durante el desarrollo del cáncer, por lo que conocer los mecanismos que regulan el movimiento de las células es uno de los principales objetivos en la investigación contra el cáncer. Adicionalmente, para que esta migración celular se lleve a cabo exitosamente se requiere de la participación de otros factores, en particular de la función de enzimas que tengan la capacidad de degradar los componentes de la matriz extracelular, siendo las MMPs unas de las principales enzimas que pueden facilitar este proceso. De todas las MMPs, la primera que se identificó en el cáncer de mama fue MMP-13 y se sabe que su sobreexpresión tiene la capacidad de incrementar la migración celular y por lo tanto promover metástasis (Wu et al., 2013). Sin embargo, en líneas celulares de cáncer de mama humano la participación de MMP-13 en la migración celular es poco conocida, y menos aún los mecanismos a través de los cuales pudiese llevar a cabo este proceso. A este respecto se sabe que tanto la PRL como el E2, hormonas que participan en la fisiología y desarrollo de la glándula mamaria, están involucradas en la patogénesis y progresión del cáncer de mama, pero los

mecanismos por los que estas hormonas actúan para ejercer sus efectos en células de cáncer de mama no han sido bien dilucidados. Se sabe que MMP-13 puede ser regulada o activada por otras MMPS (por ejemplo, MMP-2 y MT1-MMP) así como otras moléculas implicadas en el desarrollo del cáncer de mama, como el E2 y la PRL, cuyos niveles altos están asociados con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama.

Se sabe que en la migración celular la señalización de JAK-STAT3, la cual regula muchos de los aspectos del desarrollo y progresión del cáncer puede promover la invasión y metástasis. Además, se ha demostrado que también la vía de señalización de las MAPKs, incluyendo Erk1/2, juegan roles cruciales en la migración celular. Ambas vías de señalización podrían ser utilizadas o reguladas tanto por E2 como por PRL. Por lo anterior, el propósito de este trabajo de investigación fue estudiar la participación del E2 y la PRL en la migración de la línea celular de cáncer de mama MCF-7, nuestro modelo de estudio, su interacción con MMP-13, así como las vías de segundos mensajeros implicadas en dicho proceso.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1 Glándula mamaria

Las mamas femeninas están compuestas por un tejido glandular (secretor) y otro adiposo sostenido por tejido conectivo fibroso llamado ligamentos de Cooper. El tejido secretor es drenado por un sistema de ductos que almacena y transporta la leche al pezón durante la lactancia. Las glándulas mamarias son exclusivas de los mamíferos, tienen la función específica de sintetizar, secretar y suministrar leche al recién nacido, y es solo durante el ciclo de embarazo y lactancia que alcanza un estado de desarrollo maduro debido a influencias hormonales a nivel celular que tienen como resultado la remodelación de la glándula en un órgano secretor de leche. Las mamas están compuestas por tejido glandular, formado por múltiples lóbulos y lobulillos en los cuales se produce la leche y estos a su vez están unidos por una serie de tubos denominados ductos o conductos galactóforos que conducen la leche al pezón, y tejido adiposo de sostén que proporciona consistencia y volumen a la mama (Figura 1) (Hassiotou y Geddes, 2013).

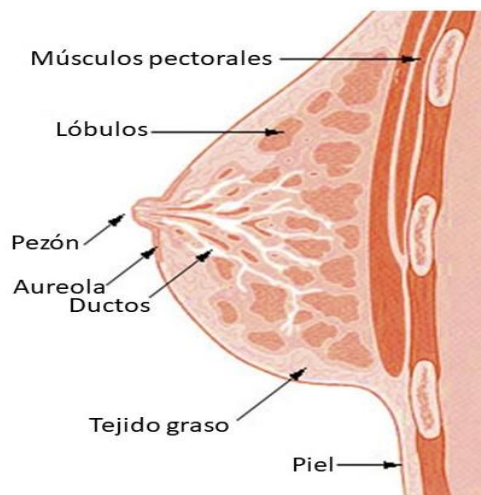


Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria (*Breast Anatomy | SEER Training*).

Histológicamente la mama consta de tejido epitelial ductal incrustado en un estroma fibroso. Cada pared del conducto se encuentra revestida por dos capas de células

epiteliales, una interna que encapsula la luz del conducto (luminal) y que está formada por células cuboidales, algunas de las cuales tiene la capacidad de diferenciarse en células secretoras de leche durante la lactancia, y una capa basal externa formada por células mioepiteliales contráctiles que rodean la capa luminal (Visvader, 2009). La matriz extracelular en las mamas está compuesta principalmente por colágeno tipo I, III y V, fibronectinas, lamininas, entre otros componentes, los cuales se pueden alterar durante un proceso canceroso metastásico (Figura 2) (Insua-Rodríguez y Oskarsson, 2016).

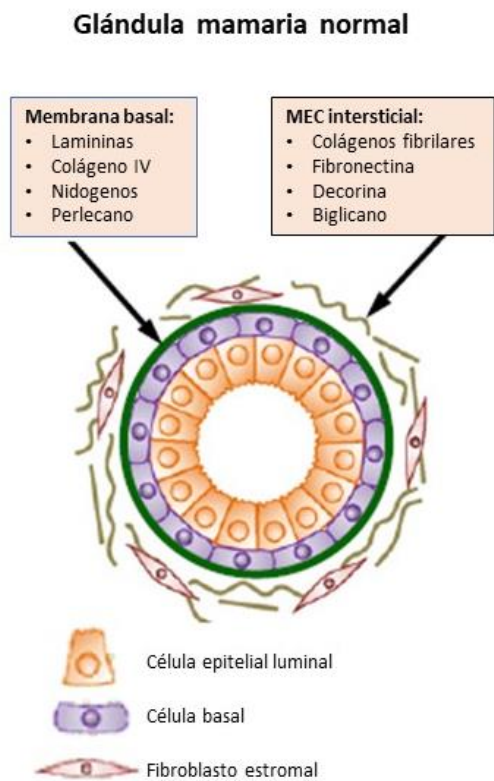


Figura 2. Componentes de la MEC de la glándula mamaria normal. La MEC de la glándula mamaria esta compuesta principalmente por colágenos fibrilares tipo I, III, V, fibronectina, decorinas y biglicanos (modificado de Insua-Rodríguez y Oskarsson, 2016).

## 2.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama se considera una enfermedad con mayor incidencia dentro de la población femenina. En las tres últimas décadas se ha observado un aumento preocupante en la incidencia y mortalidad en la población femenina (Beltran, 2013). A nivel mundial se presentan 14.1 millones de nuevos casos cada año, causando alrededor de 8.2 millones de decesos (OMS 2012). Es una enfermedad en la cual las células de la mama se multiplican sin control, tienden a invadir tejidos adyacentes, así como órganos distantes (metástasis), y es el cáncer más común que afecta a las mujeres en el mundo (*Breast Cancer/CDC*).

Si bien las causas del cáncer de mama no son completamente conocidas, como cualquier cáncer, el de mama parece ser el resultado de mutaciones o cambios en los genes que regulan la proliferación de las células, que adquieren la capacidad de dividirse sin ningún tipo de control, por lo que se generan más células iguales y se forma un tumor canceroso. Generalmente se origina en las células de los lobulillos o en los conductos y con menos frecuencia en los tejidos estromales. Debido a que es resultado de cambios en el ADN, se han estudiado genes que tienen la capacidad de provocar el crecimiento y división celular, a los que se les denomina oncogenes; uno de especial importancia es el oncogén HER2, que se encuentra amplificado y sobre expresado a niveles muy altos en aproximadamente el 20% de los carcinomas de mama (Colomer et al., 2000).

El riesgo de padecer cáncer de mama se debe a una combinación de factores y aunque se presenta en ambos sexos los principales son: ser mujer y envejecer, ya que la mayoría de los cánceres de mama se detectan en mujeres de 50 años o más. Otros factores son: mutaciones genéticas heredadas en ciertos genes como el BRCA1 y BRCA2, inicio temprano de la menstruación, embarazo tardío o ningún embarazo, comienzo de la menopausia después de los 55 años, no mantener actividad física, sobrepeso u obesidad, usar terapia hormonal combinada, anticonceptivos orales, antecedentes familiares de cáncer de mama, tomar alcohol (CDC, 2016).

Respecto al primer factor, ser mujer y envejecer, se relaciona a la producción de estrógenos ya que estos estimulan la proliferación de las células epiteliales del tejido mamario y conforme avanza la edad se incrementa la exposición y por ende los ciclos de proliferación celular (World Cancer Research Fund, 2018). Este factor está directamente relacionado con la aparición de una menarquia temprana y una menopausia tardía ya que el tiempo de exposición a los estrógenos se ve incrementado. Por lo tanto, el uso de terapia hormonal de reemplazo y anticonceptivos orales incrementa el riesgo de desarrollar cáncer mama hasta en un 35% (Key et al., 2017).

En cuanto al embarazo, las mujeres que han tenido descendencia por lo menos una vez, tienen 25% menos riesgo de desarrollar cáncer de mama en comparación con una mujer nulípara (Ewertz et al., 1990; Layde et al., 1989).

El sobrepeso u obesidad se encuentra relacionado directamente con niveles elevados de estrógenos debido a una alta síntesis de estos mediante la aromatasa en el tejido adiposo. Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, un 25% de los cánceres están asociados con el sobrepeso y la obesidad (World Cancer Research Fund, 2018).

El factor genético es de gran importancia, ya que las mujeres con un familiar directo con cáncer de mama presentan aproximadamente el doble de riesgo de desarrollar cáncer de mama (Pharoah et al., 1997). Se ha asociado al cáncer de mama con mutaciones germinales en 10 diferentes genes en vías críticas para mantener una integridad genómica. Además de los ya mencionados *BRCA1* y *BRCA2*, mutaciones en *p53* y *PTEN* se relacionan con un alto riesgo de desarrollar cáncer de mama asociado con raros síndromes cancerígenos. Mutaciones en *CHEK2*, *ATM*, *NBS1*, *RAD50*, *BRIP1* y *PALB2* representan el doble de riesgo de desarrollar cáncer de mama (Walsh y King, 2007).

El proceso a través del cual se origina el cáncer se denomina carcinogénesis y se desarrolla de la siguiente manera: 1) factores de riesgo (mencionados anteriormente); 2) ADN y errores espontáneos en su replicación, que pueden



resultar en una alteración irreversible de la estructura molecular del ADN nativo que puede afectar a genes supresores, cuya función es mantener la integridad del genoma y evitar que las células mutadas proliferen, y oncogenes; 3) disminución de la actividad de genes supresores y aumento de la actividad de oncogenes; 4) célula iniciada con capacidad de evadir los mecanismos de control; 5) fenotipo neoplásico; 6) heterogeneidad tumoral, lo que implica la aparición de diferentes células con características y capacidades diferentes unas de otras; 7) invasión y metástasis (Hernández, 2016).

Existen diferentes tipos de cáncer de mama que se clasifican de acuerdo al grado de invasión del tumor, lugar donde se origina el tumor y las características biológicas y genéticas de las células (tabla 1) (Martin et al., 2015).

La mayoría de los cánceres de mama comienzan en las células que recubren los ductos. Algunos en las células que recubren los lóbulos, mientras que un pequeño porcentaje comienza en otros tejidos. El carcinoma ductal infiltrante es el más común de los tipos de cáncer, abarca el 80% de todos los diagnósticos de cáncer, mientras que el segundo tipo más común es el carcinoma lobulillar infiltrante que representa del 10 a 15.5% de todos los diagnósticos de cáncer de mama (Sharma et al., 2010).

El estadio o la etapa del cáncer de mama se puede dividir según el grado de extensión del mismo (Pérez-Requena et al., 2002):

- A. Estadio 0: Crecimiento canceroso *in situ*. Las células tumorales están localizadas en el interior de los conductos mamarios.
- B. Estadio 1: El tumor se concreta en el nódulo inferior, menor a 2 cm de diámetro, ausente de los ganglios y sin metástasis.
- C. Estadio 2: Tumor vascularizado, con un diámetro mayor de 2 cm y menor a 5 cm, que está presente en ganglios axilares, pero que aún no presenta metástasis
- D. Estadio 3: Tumor con un diámetro mayor a 5 cm y que ya se encuentra presente en nódulos supraclaviculares, ganglios axilares o mamarios.

E. Estadio 4: Las células cancerosas se han extendido a otros tejidos y órganos del cuerpo: Metástasis.

La metástasis es la principal causa de mortalidad en los pacientes que padecen cáncer y es la principal complicación del cáncer de mama (Chen y Nalbantoglu, 2014).

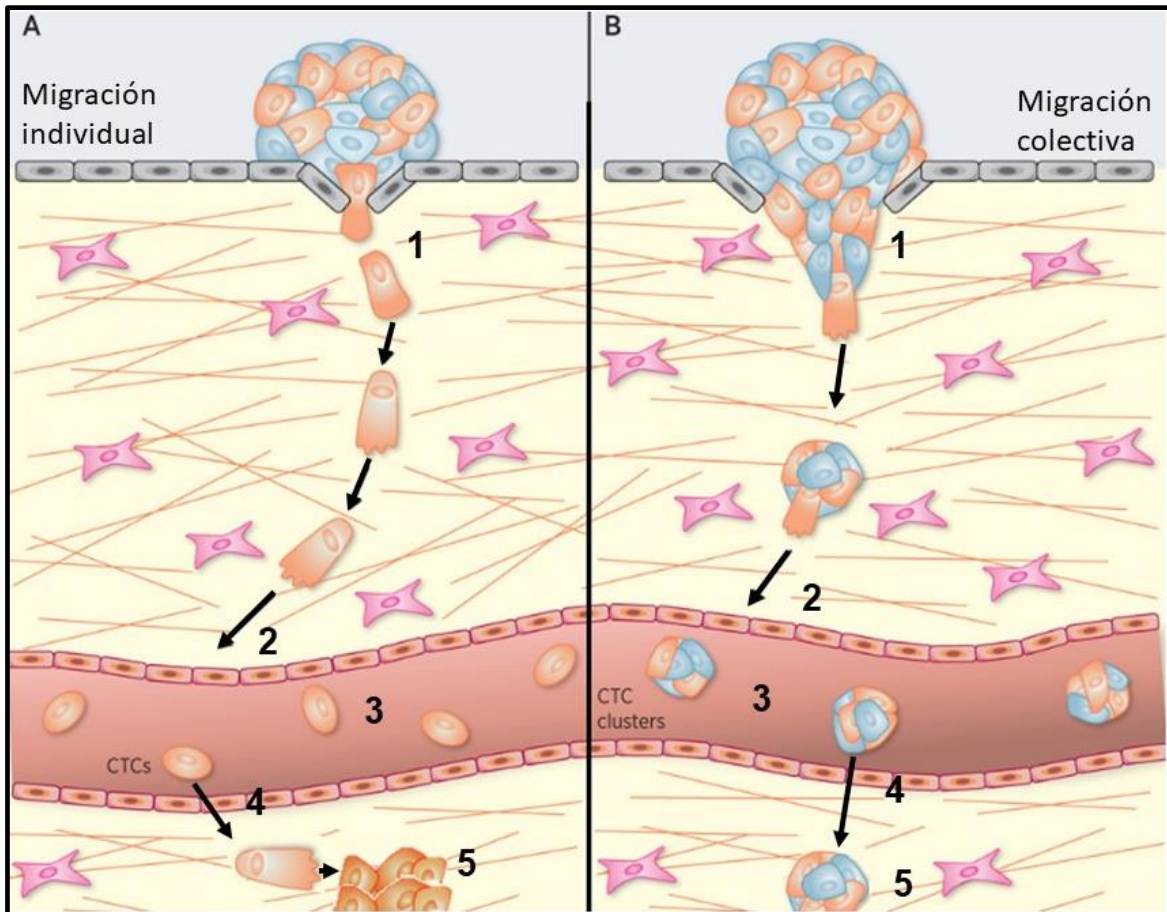
Grado de invasión del tumor	Origen y aspecto celular	Características genéticas y biológicas de las células
<p><b>In situ:</b> localizado dentro de los conductos galactóforos que conducen la leche hasta el pezón.</p> <p><b>Infiltrante:</b> sale del conducto galactóforo e invade la grasa de la mama.</p>	<p><b>Lobular:</b> originado en las glándulas que fabrican la leche.</p> <p><b>Ductal:</b> originado en las células del revestimiento de un conducto de la mama.</p> <p><b>Medular:</b> Las células cancerosas se encuentran agrupadas.</p> <p><b>Coloide y Tubular:</b> Es un tipo de carcinoma ductal infiltrante.</p> <p><b>Inflamatorio:</b> los vasos linfáticos de la piel se bloquean produciendo una inflamación en la mama</p>	<p><b>Basal-epitelial:</b> Se caracteriza por la ausencia de receptor de estrógeno (RE) y HER2 negativo.</p> <p><b>HER2 positivo:</b> Elevada expresión de receptor HER2.</p> <p><b>Luminal A:</b> Elevada expresión de RE.</p> <p><b>Luminal B y C:</b> Expresión de baja a moderada de genes específicos, incluyendo los del grupo de RE.</p>

Tabla 1. Tipos de cáncer que se pueden presentar en la mama. Modificado de Martín et al., 2015.

## 2.2 Metástasis

Las dos propiedades biológicas que determinan la malignidad en el cáncer son la infiltración y la metástasis. La metástasis es la propagación de células cancerosas del sitio original (primario) a otros sitios del cuerpo (secundario). Si esta propiedad de invadir no existiera, la extirpación quirúrgica bastaría para controlar la mayor parte de los tumores malignos (Arvelo y Cotte, 2006). Es un proceso muy complejo ya que las células deben tener la capacidad de desprenderse del tumor, llegar a la circulación linfática o sanguínea, escapar de los macrófagos, salir de la circulación y llegar a un sitio propicio para desarrollarse. Originalmente se pensaba que estos sitios propicios eran los que tenían una mayor irrigación sanguínea y linfática, sin embargo, se ha observado en modelos experimentales de melanoma en conejos, en los que se trasplanta tejido pulmonar en el musculo de las patas traseras, que la metástasis se produce a los pulmones y al tejido trasplantado a las patas traseras, lo que apoya la hipótesis de semilla y terreno adecuado, es decir, las células metastásicas necesitan de un tejido adecuado para desarrollarse (Hernández, 2016).

Como se mencionó anteriormente la metástasis (figura 3) es un fenómeno complejo que requiere que se lleven a cabo al menos 5 pasos: 1) invasión por las células tumorales de las estructuras adyacentes, como las membranas basales; 2) paso hacia la sangre o los vasos linfáticos con liberación de células tumorales hacia la circulación (intravasación); 3) supervivencia de las células tumorales en la sangre circulante y superación de la vigilancia inmunológica; 4) escape de la circulación (extravasación); 5) implantación en un tejido diferente con formación de un nuevo foco tumoral (Arvelo y Cotte, 2006). El aumento de la migración es el principal proceso para que las células cancerígenas invadan y hagan metástasis durante el desarrollo de la enfermedad (Chen y Nalbantoglu, 2014).



**Figura 3. Pasos del desarrollo de la metástasis.** Dibujo representativo donde se muestra por lo menos cinco pasos necesarios en el desarrollo de la metástasis que comprende la invasión (1), intravasación (2), supervivencia (3), extravasación (4) e implantación (5) (modificado de VanderVorst et al., 2019).

### 2.3 Migración Celular

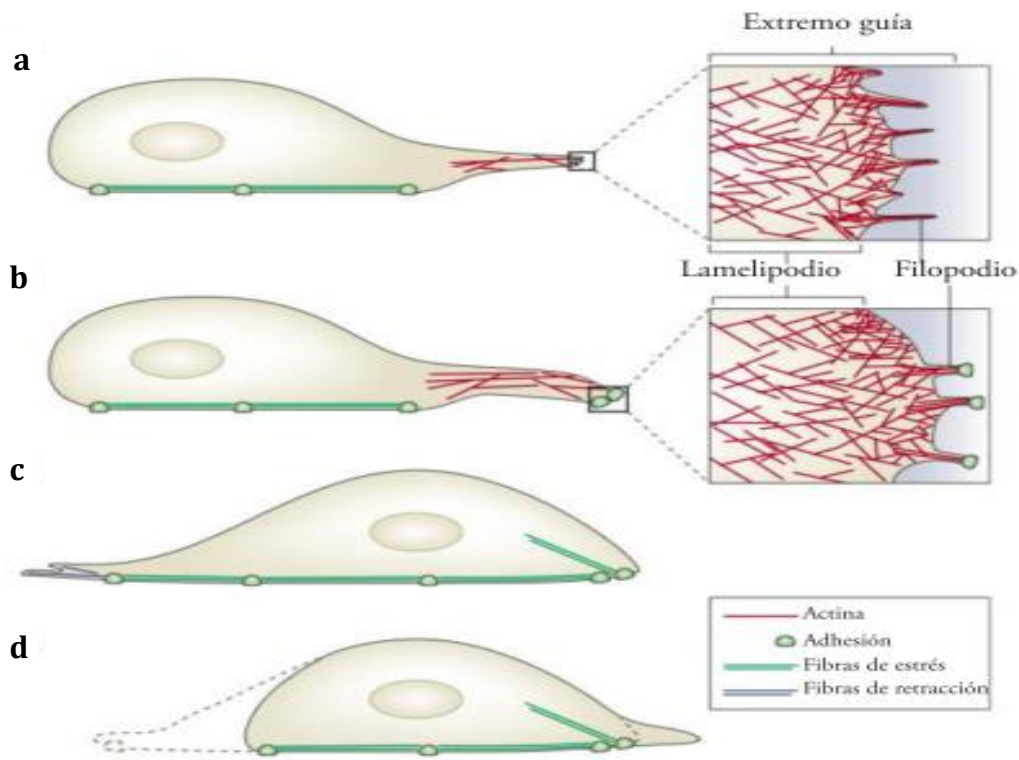
La migración celular es el proceso por el cual una célula se desplaza a través de los tejidos o en la superficie de una placa de cultivo, en el cual intervienen expansiones citoplasmáticas; es un proceso cíclico que resulta de la combinación de ciclos de extensión-contracción y de adhesión-desenganche (Justus et al., 2014). Involucra la coordinación espacial y temporal de los componentes celulares y está involucrada en múltiples procesos como las respuestas inflamatorias, embriogénesis,

organogénesis y cicatrización de heridas. Sin embargo, una migración celular anormal contribuye al desarrollo de enfermedades como el cáncer metastásico (Doyle et al., 2013).

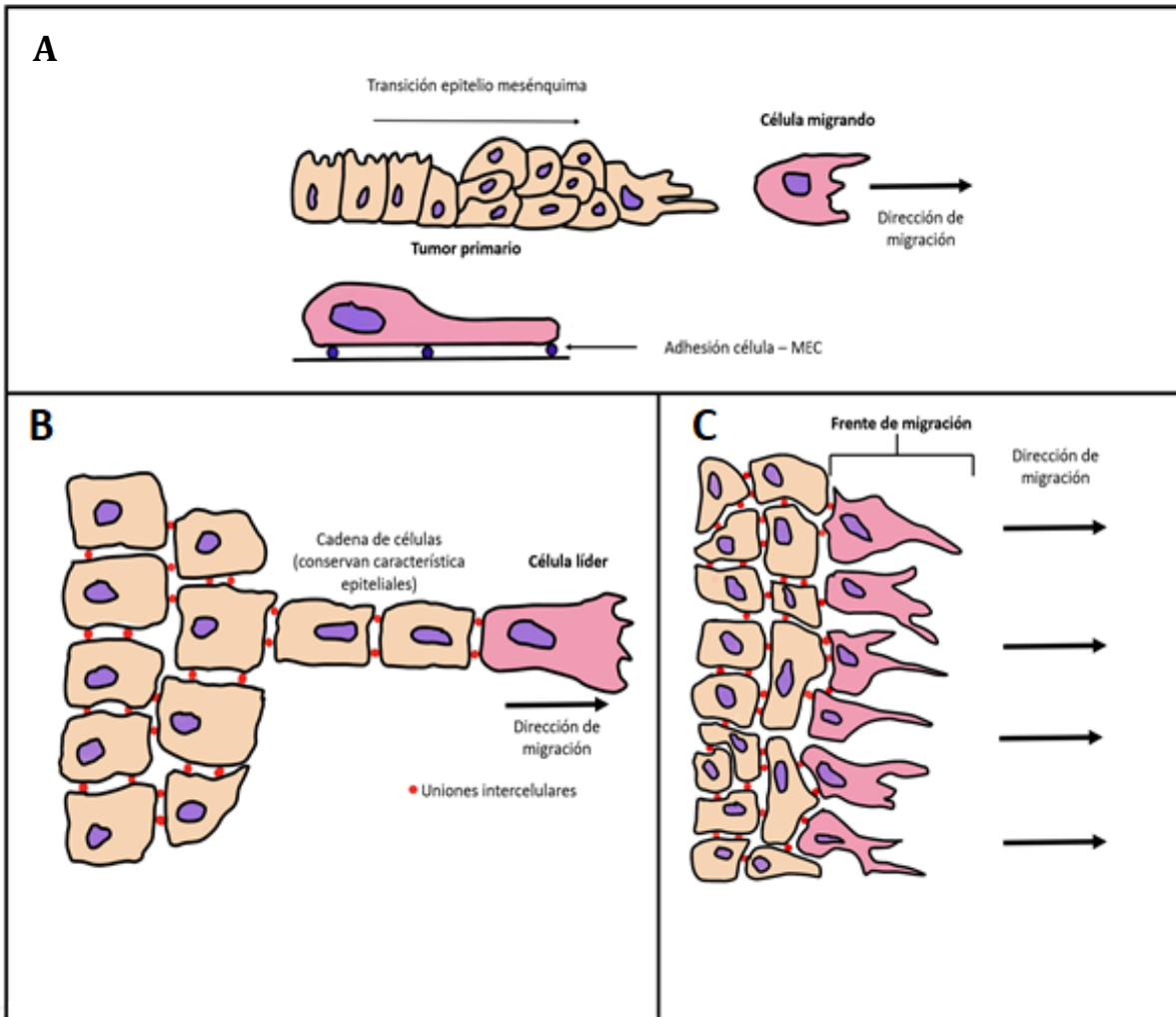
Para migrar, las células deben adquirir una asimetría espacial, una manifestación de esto es una morfología polarizada, es decir una distinción clara entre la parte frontal y trasera de la célula. Una consecuencia importante de esta polarización es la formación de lamelipodios y filopodios, principalmente en el frente de la célula (Lauffenburger y Horwitz, 1996). Los lamelipodios son anchos, planos, estructuras parecidas a laminas delgadas (0.1-0.2  $\mu\text{m}$ ), mientras que los filopodios son proyecciones delgadas (0.1-0.3  $\mu\text{m}$ ), cilíndricas, con forma de dedos o agujas. Los organelos celulares son excluidos de estas estructuras, que contienen abundantemente actina y proteínas asociadas a esta. En ambos casos, se presenta el rápido crecimiento de los extremos puntiagudos de filamentos de actina que se orientan hacia la membrana plasmática. Se pueden presentar también estructuras contráctiles llamadas fibras de estrés, compuestas de actina y miosina que proveen de fuerzas contráctiles para la migración celular y la morfogénesis (Mattila y Lappalainen, 2008). Estas estructuras no son excluyentes una de otra, una célula puede presentar ambas. Los filopodios son frecuentemente encontrados incrustados en o proyectados desde la misma red de actina de un lamelipodio. Si bien filopodios y lamelipodios son solo unos de varios tipos de elementos generados para la movilidad celular, estas dos estructuras son las más estudiadas. Algunas otras estructuras que se han descrito son los blebs y los ruffles de membrana (Schaks et al, 2019).

Entonces, el proceso de migración (figura 4) inicia con la formación de lamelipodios y filopodios que se extienden en dirección al frente de avance, durante esta extensión se forman nuevas adherencias con el sustrato, posteriormente el núcleo y el cuerpo celular se mueven hacia adelante debido a la contracción intracelular (figura 2). De esta forma, la parte trasera de la célula se contrae hacia adelante y se despegan las adherencias posteriores, generando un movimiento hacia el frente (Mattila y Lappalainen, 2008).

Se pueden presentar dos tipos principales de movimiento celular, la migración individual y la migración colectiva (figura 5). Las células que migran de manera individual son las provenientes de epitelios que mediante una transición epitelial-mesenquimal (TEM) se delaminan y se convierten en células mesenquimales con capacidad de migrar. En la migración colectiva se presenta un movimiento de varias células, formando parte de un grupo, fila o capa, que mantienen características similares a las de las células epiteliales, por lo que se considera que no se presenta una TEM propiamente dicha (Doyle et., 2009). De estos dos tipos de migración celular, es la colectiva la que presenta un mayor potencial para provocar metástasis, siendo este potencial de 23 a 50 veces mayor que la migración celular individual (Aceto et al., 2014).



**Figura 4. Migración celular.** (a) Formación de lamelipodios y filopodios en el frente de avance. (b) Formación de nuevas adherencias. (c) movimiento del cuerpo celular y núcleo hacia el frente (d) desmontaje de la parte trasera y contracción hacia el frente. Tomado y modificado de Mattila y Lappalainen, 2008.



**Figura 5. Tipos de migración celular.** A) migración celular individual; B) y C) migración celular colectiva.

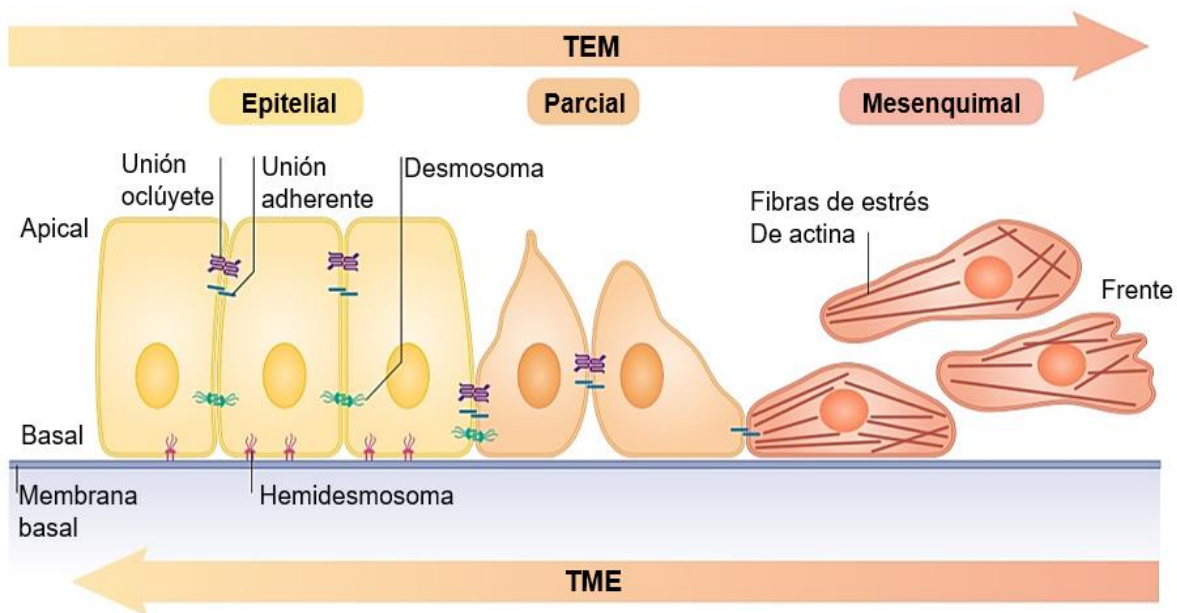
En tejidos, la migración celular se da a través de la matriz extracelular (MEC), la cual es una estructura no celular tridimensional presente en todos los tejidos y es esencial para estos (Naranjo et al., 2009). La Función de la MEC va más allá de solo proveer soporte físico para la integridad de los tejidos, es constantemente remodelada para mantener la homeostasis de los tejidos y las células interactúan constantemente con ella a través de adhesiones celulares compuestas de actina e integrina que funcionan como sensores para probar la rigidez del ambiente extracelular, mediar la adhesión, activar vías de señalización y remodelar la propia

MEC. Constituye un filtro biofísico que brinda protección y nutrición a las células, por lo que la alteración de la MEC podría significar la pérdida de funciones así como la pérdida de sustrato para las células mismas (Geiger et al., 2001; Naranjo et al., 2009). Es compleja, compuesta por cerca de 300 diferentes proteínas y varía dependiendo del tejido, se pueden diferenciar dos tipos de MEC dependiendo de su composición y localización; la matriz de tejido conectivo intersticial y la membrana basal (Bonnans et al., 2014), sin embargo, se puede decir en general que la constituyen 4 tipos de macromoléculas: colágenos, proteoglicanos, glucoproteínas no colagenosas y elastinas (Hynes y Naba, 2012), por lo que la degradación de la ECM y la membrana basal por proteasas, como las MMPs, es crítica para la migración e invasión de las células cancerosas (Yu et al., 2011). Se sabe que las MMPs participan en la metástasis, cuya principal función es la degradación de proteínas de la MEC (Benson., 2013), facilitando así la migración celular y la metástasis (Chen y Parks, 2009).



## 2.4 Transición Epitelial-Mesenquimal (TEM)

El proceso de transformación de células epiteliales a células mesenquimales móviles es conocido como TEM, y es fundamental en el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y contribuye en patologías como la fibrosis y la progresión del cáncer (Lamouille et al., 2014). Mediante este proceso las células pierden sus características epiteliales y ganan propiedades mesenquimales (figura 6) (Fujimoto *et al.*, 2019), y las interacciones célula-célula y/o célula-matriz extracelular se modifican, lo que permite que las células epiteliales pierdan adherencia unas con otras, así como de la membrana basal (Dongre y Weinberg, 2019).



**Figura 6. Esquema representativo de la TEM.** Las células epiteliales, que presentan una polaridad basal apical, uniones adherentes intercelulares, desmosomas y se encuentran adheridas a la membrana basal, durante el proceso de la TEM pierden las uniones intercelulares y la polaridad celular adquiriendo características mesenquimales, convirtiéndose en células móviles y con capacidades invasivas. Se pueden presentar estados parciales o intermedios. Modificado de Dongre y Weinberg, 2019.

Las células epiteliales forman laminas polarizadas que se anclan a la membrana basal para mantener la polaridad apical-basal, presentan uniones intercelulares y expresan ciertas proteínas como integrinas y E-cadherinas que forman parte de estas uniones (Madariaga et al., 2017). En contraste, las células mesenquimales se encuentran insertadas solas dentro de la MEC y rara vez establecen contacto con otras células vecinas, no tienen polaridad alguna y

expresan N-cadherina en lugar de E-cadherina (Tsai y Yang, 2013). Algunos de los cambios que se presentan durante la TEM son: la pérdida de la polaridad celular, desarrollo de una capacidad migratoria lo que les confiere un potencial invasor y resistencia a la apoptosis (Madariaga et al., 2017). Durante la TEM, las células sufren múltiples cambios bioquímicos que les permiten transformarse en células mesenquimales alargadas no polarizadas que carecen de uniones intercelulares y pueden moverse a través de la MEC (Nantajit et al., 2015).

Esta transición es mediada por una regulación molecular compleja en la que participa un gran número de vías de señalización, algunas actuando en forma independiente y otras interconectadas; la mayoría de estas vías convergen en el control de la expresión de la E-cadherina, cuya disminución es el evento molecular clave en este proceso (Benedetti y Reyes, 2015). Se han observado una serie de diferencias moleculares entre las células mesenquimales y epiteliales, el principal ejemplo es que las células mesenquimatosas no expresan E-cadherina, mientras que las células epiteliales sí (Thiery y Sleeman, 2006).

La TEM es un proceso que se ha descrito en diferentes situaciones y no es exclusivo de las células tumorales:

- TEM tipo 1, involucrada en procesos del desarrollo como la implantación del embrión, la embriogénesis y la organogénesis.
- TEM tipo 2, asociada a la cicatrización de heridas, regeneración de tejidos y fibrosis.
- TEM tipo 3, relacionada en la tumorigénesis, participando en la progresión de un carcinoma *in situ* a uno invasivo (Moreno-Jaime et al., 2016).

En lo que se refiere a neoplasias, la TEM confiere a las células cancerosas un mayor potencial metastásico y de iniciación de tumores (Dongre y Weinberg, 2019).

## 2.5 E-cadherina

Las cadherinas son moléculas de adhesión que tienen un papel muy importante en las funciones de las adherencias célula-célula, las uniones adherentes y los desmosomas. La regulación dinámica de las cadherinas en respuesta a varias señales extracelulares controla la clasificación, el reordenamiento celular y los movimientos celulares (Gumbiner, 2005).

La clasificación de las cadherinas se ha establecido en función del tejido donde se expresan de forma mayoritaria: Cadherina Epitelial (E-cadherina), Neural (N-cadherina), Renal (R-cadherina), Vascular (V-cadherina) y la Vasculo-Endotelial (VE-cadherina) entre otras (Gumbiner, 2005).

Las cadherinas son diferencialmente expresadas durante el desarrollo embrionario normal, es decir, presentan funciones distintas, relacionadas y no relacionadas con su capacidad adhesiva. La E-cadherina se encuentra en el epitelio promoviendo uniones adherentes célula-célula (Arvelo y Poupon, 2001).

La E-cadherina es una glicoproteína de 120 kDa calcio dependiente. Se localiza en la superficie celular de las células epiteliales, en las regiones de contacto celular. Posee un pequeño dominio intracelular citoplasmático, el cual interactúa con la actina citoplasmática a través de unas moléculas de unión llamadas alfa, beta y gamma cateninas, gracias a esta propiedad, funciona como pieza clave en la adhesividad y cohesividad del tejido epitelial (Arévalo y Morales, 2007).

Cuando un tumor es más invasivo es porque ha perdido su capacidad de adhesión intercelular, en este sentido, la E-cadherina es una de las moléculas más importantes que hacen posible la adhesión intercelular en los tejidos de estirpe epitelial (Yang et al., 2019)

La pérdida de expresión o función de la E-cadherina en carcinomas ha sido considerada como la razón principal para la ruptura del contacto estrecho entre las

células de los tejidos pudiendo, por lo tanto, conducir a la progresión de tumores a un estado invasivo metastático. De hecho, la función en las uniones intercelulares de la E-cadherina está ausente en muchos tipos de cáncer debido a: la inactividad de la E-cadherina o de genes de cateninas debido a mutaciones genéticas, represión transcripcional o proteólisis del dominio extracelular (Sánchez et al., 2005).

Informes recientes indican que algunas células cancerosas mantienen adherencias intercelulares y morfología epitelial durante la metástasis, es decir que lo hacen en forma de grupos de varias células sin características mesenquimales. Esto se traduce en un tipo de migración colectiva que por lo tanto requiere adherencias célula-célula (Friedl y Wolf, 2009).

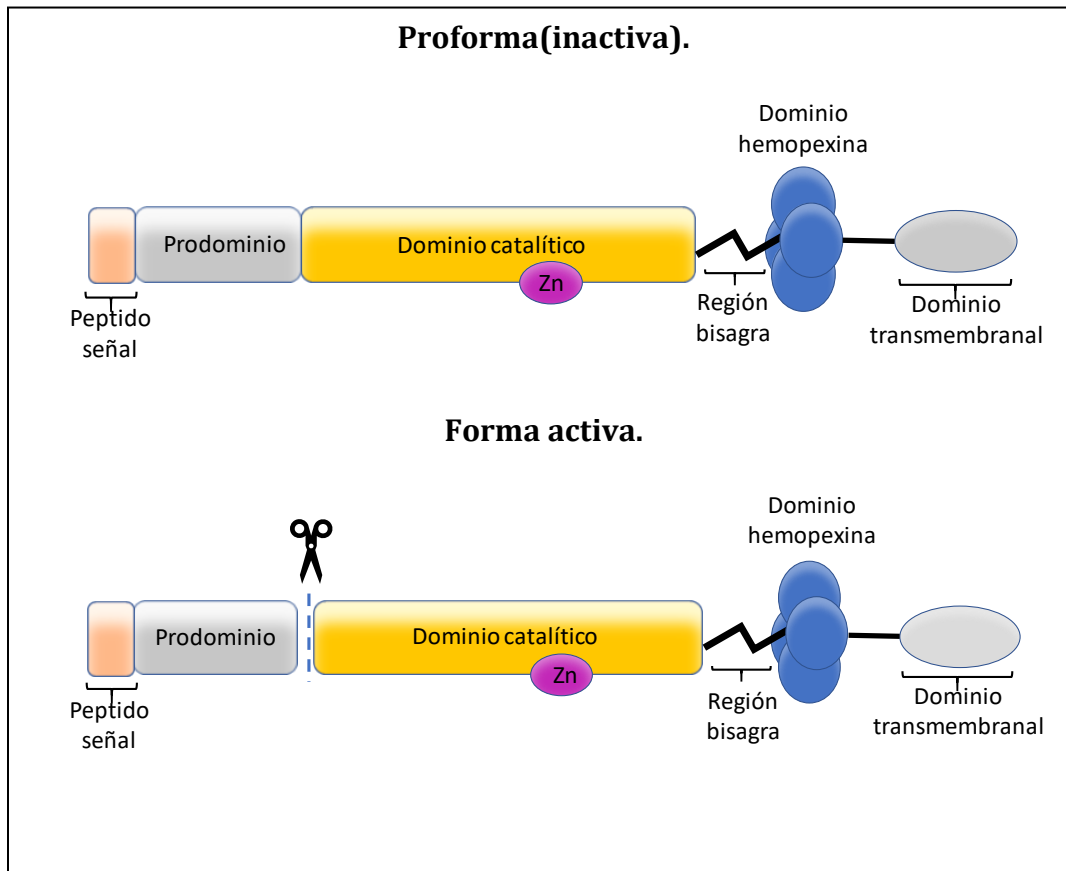
Se ha mostrado que la pérdida de E-cadherina es importante en la TEM y que incrementa la migración y capacidad de invadir de las células tumorales. Sin embargo, también se ha observado que la expresión de E-cadherina promueve la migración celular colectiva y el cáncer en varios modelos celulares (Mendonça et al., 2018). En el caso de la migración celular colectiva, se ha mostrado que las células líderes, que son altamente migratorias, conservan la expresión de E-cadherina (Cheung et al., 2013). Un estudio que investigó el rol de la activina A en la promoción de la migración de células SKOV3 y OVISE de cáncer de ovario, reportó que la activina A disminuye la expresión de E-cadherina y que esta disminución contribuye al aumento de la migración en estas líneas celulares (Y. Yi et al., 2019). Así mismo, se ha reportado que la sobreexpresión de Grhl3 disminuye la expresión de E-cadherina en células A431 de carcinoma de piel humana y MCF-7 de cáncer de mama, lo que significativamente incrementa la migración celular (Zhao et al., 2015). La E-cadherina se ha utilizado como marcador para analizar la TEM en modelos in vitro de cultivos primarios y de células MCF-7 de cáncer de mama (Moreno-Jaime et al., 2016).

## 2.6 Metaloproteasas de la Matriz

Las MMPs pertenecen a una familia de endopeptidasas dependientes del zinc cuya principal función es degradar la ECM. Son secretadas en forma latente (proenzima) y requieren ser activadas para llevar a cabo su actividad proteolítica. Se sabe que su actividad es bloqueada por los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPS). Las MMPs Intervienen en procesos fisiológicos normales como la organogénesis, remodelación de tejidos, ovulación y cicatrización de heridas, pero también en procesos patológicos donde su actividad se puede encontrar aumentada, como el cáncer, donde toman parte en la migración, metástasis, invasión celular, entre otras (Coronato et al, 2012).

En el ser humano se conocen hasta el momento 24 MMPs. Se las clasifica estructuralmente en cinco grupos, más una serie de MMPs que no encajan en estas categorías: 1) Colagenasas, MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-18 que son capaces de degradar el colágeno intersticial (colageno I, II y III); 2) Gelatinasas, MMP-2, MMP-9, que degradan el colágeno desnaturalizado o gelatina; 3) Estromalinas, MMP-3, MMP-10, MMP-11, que digieren diversos componentes de la MEC como la fibronectina, laminina y plasminógenos; 4) Matrilisinas, MMP-7, MMP-26, que actúan sobre las moléculas de la superficie celular como los proteoglicanos; 5) MMPs asociadas a la membrana (MT-MMP), que forman parte de las membranas celulares e intervienen en la actividad proteolítica de otras MMPs; 6) MMPs que no están clasificadas en las categorías anteriores, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-22, MMP-23, MMP-28 (Coronato et al., 2012).

Su estructura (figura 7) comprende varios dominios comunes en la mayoría de ellas: un prodominio o péptido señal, un dominio propéptido o prodominio, un dominio catalítico carboxiterminal, un dominito tipo hemopexina y un dominio transmembranas, en el caso de las MMPs asociadas a la membrana plasmática (Coronato et al., 2012).



**Figura 7. Esquema Estructural básico de las MMPs en su forma inactiva (proforma) y activa.** Se observan los diferentes dominios que conforman a las MMPs. Solo las MT-MMP presentan un dominio transmembranal.

Son producidas en forma inactiva o latente a la que se le denomina proforma (zimógeno). Su activación se lleva a cabo por clivaje del prodominio y el propéptido N-terminal. Esta activación puede ser autoproteolítica y se lleva a cabo por otras proteasas y las mismas MMPs (Leeman et al., 2002).

## 2.7 MMPs y Cáncer de Mama

La actividad de las MMPs, tanto en procesos fisiológicos normales como en patológicos, comprenden el rompimiento de la barrera histológica lo cual causa cambios en la arquitectura de los tejidos. Normalmente existe un proceso regulador efectivo que controla la función de las MMPs, que las inhibe una vez que han concluido su trabajo. Sin embargo, en los tumores metastáticos ocurre lo contrario, ya que han perdido o no responden a los mecanismos de control (Arvelo y Cotte, 2006).

Varios estudios han descrito la presencia y función de las MMPs en el cáncer de mama, por ejemplo, se ha descrito que la expresión de las MMP-1, -2, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -15, -19, -23, -24, -27 y -28 tienen una expresión aumentada en los tejidos de cáncer mamario en comparación con el tejido sano, además la expresión de alguna de estas MMPs depende del grado del tumor (Benson et al., 2013). Múltiples MMPs están relacionadas con la proliferación celular, la invasión del tumor, la metástasis y la angiogénesis por lo que están relacionadas con la progresión del cáncer de mama (Eiseler et al., 2009; Sternlicht y Bergers, 2000). Como se puede observar, existen muchas MMPs que están implicadas en el desarrollo del cáncer de mama, sin embargo, no es del todo entendido sus funciones.

## 2.8 MMP-13

La MMP-13 es una enzima proteolítica que pertenece a la familia de las MMPs, endopeptidasas capaces de degradar los componentes de la MEC (Leeman et al., 2002). Se ha demostrado en modelos de ratón que esta enzima tiene un papel importante en el proceso fisiológico de la migración celular, angiogénesis y en la cicatrización de heridas, ya que se ha demostrado que se encuentra presente en las células epidérmicas que lideran la migración celular en la heridas causadas en ratones, además esta migración fue suprimida en presencia de inhibidores de las MMPs, o cuando se utilizaron ratones KO para MMP-13, lo que confirma su importancia en este proceso (Hattori et al., 2009).

La primera MMP que se identificó en el cáncer de mama fue MMP-13 (Wu et al., 2013), la cual participa en la progresión y metástasis del tumor, así como en la invasión de este (Leeman et al., 2002). Es considerada como un blanco importante en enfermedades donde se encuentra sobre expresada o donde la degradación del colágeno está involucrada, como el carcinoma de esófago de células escamosas, cáncer nasofaríngeo, donde promueve la agresividad de la enfermedad, así como también en el desarrollo del cáncer de mama (Li y Johnson, 2011; Osako et al., 2016; You et al., 2015).

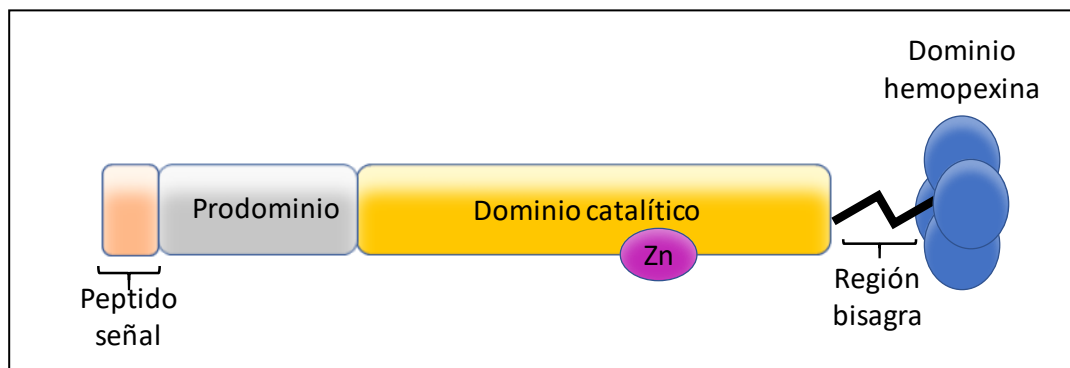
El interés en MMP-13, en el proceso tumoral, se basó en su incrementada expresión en el cáncer de mama y la ausencia de expresión detectable en tejidos normales de mama (Freije et al., 1994). Además, se ha mostrado que degrada la matriz del hueso lo que favorece la metástasis de las células de cáncer de mama a este (Benson et al., 2013). La sobreexpresión de MMP-13 incrementa la migración celular y promueve la metástasis, como se comprobó en estudios con modelos animales (ratón) y cultivos celulares (Wang et al., 2013). Sin embargo, a pesar de que MMP-13 fue la primera MMP que se identificó en el cáncer de mama, en líneas celulares de cáncer de mama humano la participación de MMP-13 en la migración celular es poco conocida, y menos aún los mecanismos a través de los cuales pudiese llevar a cabo este proceso.



MMP-13, también llamada colagenasa 3, es el tercer miembro de la subfamilia de las colagenasas en ser identificado y tiene características distintivas comparada con las otras colagenasas, rompe el colágeno tipo II 5 y 6 veces más rápido que el colágeno tipo I y el tipo III, respectivamente, probablemente a su función en la degradación del cartílago y hueso (Amar et al., 2017). Se ha mapeado el gen de MMP-13 en el cromosoma 11q22-23. La transcripción del gen de MMP-13 resulta en un mRNA de 2.7 kb (Leeman et al., 2002).

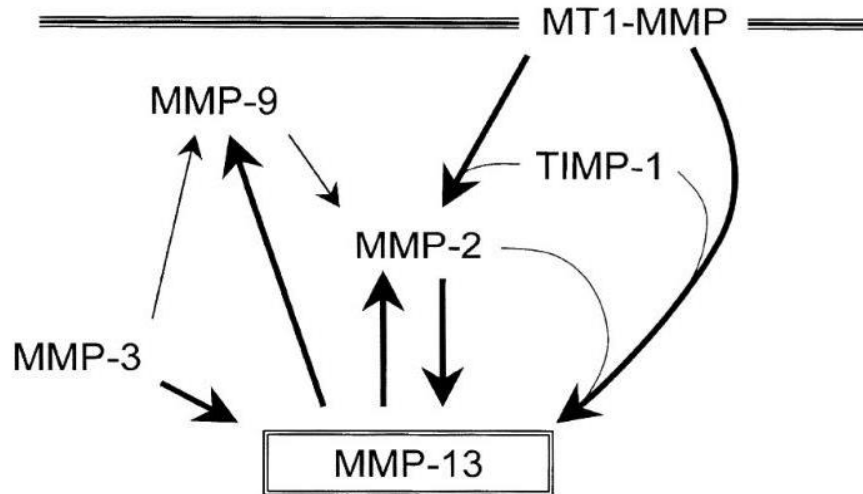
MMP-13 tiene todos los dominios característicos de una MMP (figura 8), está formada por 471 aminoácidos, es sintetizada como un precursor inactivo y es activada por clivaje proteolítico del propéptido N-terminal que se asocia con la forma inactiva, lo que deja libre el dominio catalítico constituido de un sitio de unión del zinc, así como de un dominio hemopexina (Saiganesh et al., 2018). La activación de MMP-13 puede ser auto proteolítica y catalizada por varias MMPs, como MMP-2 y MT1-MMP, y es inhibida por los TIMPs I, II y III en una relación estequiométrica de 1:1 (Leeman et al., 2002).

En el cáncer de mama se ha encontrado que MMP-13 es expresada por células estromales adyacentes a las células tumorales y en el citoplasma de células de cáncer de mama (Uría et al., 1997).



**Figura 8. Estructura de MMP-13.** Se observan los diferentes dominios que conforman a MMP-13, la cual es sintetizada como un precursor inactivo y activada por clivaje en el propéptido N-terminal.

MMP-13 ocupa una posición central en la cascada de activación de MMPs (figura 7). Así, MMP-13 es activada por MT1-MMP, MMP-2 y MMP-3, mientras que MMP-2 y -9 son activadas por MMP-13 (Figura 9) (Leeman et al., 2002).



**Figura 9. Rol central de MMP-13 en la cascada de activación de MMPs.** Tomado de Leeman et al., 2002.

Si bien MMP-13 tiene un papel central para promover la migración celular y metástasis en el cáncer de mama (Lei et al., 2013), los mecanismos a través de los cuales puede llevar a cabo dichos eventos son poco conocidos. Se sabe que las MMPs pueden ser activadas por otras MMPs e incluso por otras moléculas como las hormonas esteroideas o PRL. Sin embargo, no se sabe si MMP-13 puede ser blanco de hormonas como el estradiol o PRL para llevar a cabo procesos de migración celular. Por lo cual, uno de los propósitos de este estudio fue investigar la participación de MMP-13 en los procesos de migración celular y si ésta MMP pudo ser regulada por el E2, que participa en el desarrollo de la glándula mamaria, y por la PRL, hormona directamente implicada en la fisiología de la mama, principalmente en la producción láctea.

## 2.9 Prolactina (PRL)

La PRL es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada principalmente por células especializadas de la hipófisis. Participa en la producción de las proteínas de la leche en el embarazo y lactancia. Ejerce diversos efectos biológicos a través de su interacción con receptores específicos de membrana que se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo, para lo cual utiliza diversas vías de señalización celular internas (Ben-Jonathan et al., 1979). Sus efectos están relacionados con diversos procesos como la reproducción, el desarrollo y crecimiento, el equilibrio de líquidos y electrolitos y la regulación del sistema inmunológico. La PRL humana es sintetizada en la hipófisis, el miometrio uterino, la decidua placentaria y diversas células del sistema inmune. Actualmente la PRL es considerada no solo una hormona, sino también una citocina (Méndez et al, 2005).

Además de sus procesos fisiológicos, se ha demostrado que la PRL es capaz de favorecer la proliferación de células tumorales en el cáncer de mama a través de la activación de su receptor (Zambrano et al., 2009).

El control hipotalámico de la prolactina es principalmente inhibitorio y permanente, es decir, estímulos internos y externos regulan su secreción al provocar que las neuronas tubero-hipofisarias sintetizen los factores inhibidores de PRL (PIF) que inhiben tónicamente la secreción de PRL. El principal PIF, es la dopamina, que actúa sobre las células lactotropas inhibiendo la secreción de la PRL. Otro posible PIF, no dopaminérgico, es el GABA (Ascenzo., 1988).

La PRL responde a un mecanismo de retroalimentación negativo, en el que la propia PRL es el factor más significativo en su propio control de secreción, pues induce a las células del hipotálamo a segregar dopamina, la que suprime la secreción de la PRL en la pituitaria anterior (Méndez et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo utilizado por la PRL para ejercer sus efectos es a través de la unión a un receptor de membrana, el receptor a prolactina (RPRL), del cual se conocen diferentes isoformas. En el humano se han reportado tres isoformas; una larga, una intermedia y una corta., las cuales son

idénticas en su dominio extracelular y transmembranal, con diferentes longitudes de su dominio intracelular. Adicionalmente se ha reportado la existencia de un receptor denominado de unión a proteínas, que carece de dominio transmembranal e intracelular. A pesar de la diversidad de RPRL, se ha demostrado que la PRL tiene una afinidad igual por cada uno de ellos, sin embargo, la isoforma larga es la más frecuente en el humano localizándose en casi todos los tejidos y es esta isoforma la que se ha asociado con el aumento de la metástasis en cáncer de mama (Ben-Jonathan et al., 1979; Mathey et al., 2009; Shemanko, 2016).

En lo que respecta a las MMPs, se ha mostrado que la PRL es capaz de inhibir a TIMP-1 aumentando así la actividad de las MMPs (Nagafuchi., 1999), estimula la actividad de MMP-2 para llevar a cabo la degradación del colágeno tipo IV e inhibe la expresión génica de MMP-3 y MMP-12 en el cuerpo lúteo (Goto et al., 1999).

Por otra parte, existe poca información acerca de la participación de la PRL en los procesos de migración celular, sin embargo, la información existente deja de manifiesto su participación. Por ejemplo, cuando la línea celular de trofoblastos HTR-8/SVneo fue estimulada por 24 h con 100 y 1000 ng/ml de PRL la migración de estas células fue significativamente incrementada en un 125%, y 138% respectivamente, en comparación a las células control que no fueron estimuladas con la hormona (Stefanoska et al., 2013). Además, el incremento de la migración celular llevado a cabo por la PRL fue bloqueado cuando las células HTR-8/SVneo fueron estimuladas con 10 µg/ml del anticuerpo de ratón dirigido contra el RPRL (anti-RPRL IgG), el cual se sabe tiene la capacidad de neutralizar el receptor. De esta forma se confirmó que el efecto positivo de la PRL sobre la migración celular fue llevado a cabo a través del RPRL (Stefanoska et al., 2013). También en células de cáncer de ovario se ha evaluado la participación de la PRL sobre la migración celular. Cuando las células TOV112D fueron estimuladas con 500 ng/ml de PRL por 16 h se observó un incremento significativo del 30% en la migración de estas células con respecto a aquellas células que no fueron estimuladas con la hormona (Tan et al., 2011). En otros experimentos, mediante una técnica de raspado con navaja de

afeitar, se mostró que cuando las líneas celulares de cáncer de mama T47D, ZR75-1 y MCF-7 fueron estimuladas por 48 h con PRL (50 y 100 ng/ml) se observó un incremento significativo de la migración celular en las tres líneas celulares (Da Silva et al., 2015). No hubo diferencias significativas entre ambas concentraciones empleadas y se sabe que la PRL llevó a cabo estos efectos a través del RPRL. Adicionalmente se reportó que la PRL induce migración en las células LNCaP de cáncer de próstata (Rojas et al., 2017).

Si bien se ha demostrado que la PRL participa en la migración de células tumorales, en diferentes líneas celulares, implicando un posible papel en la metástasis, su participación en la migración de las células MCF-7 no se ha estudiado completamente.

## **2.10 Estradiol**

Los estrógenos son potentes hormonas esteroideas presentes en altos niveles en las mujeres y en bajos niveles en hombres. Transportadas por la circulación, viajan grandes distancias desde su sitio de síntesis en un órgano endocrino hasta un órgano blanco distante (Jordan, 1986).

El E2 es una hormona sexual esteroidea y el estrógeno natural más potente en los seres humanos (Jordan, 1986). Es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A, y un grupo beta-hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D (figura 10) (Wawrzak., 1988). Es un derivado del colesterol producido principalmente por las células de la granulosa de los ovarios en mujeres premenopáusicas, y en varones y mujeres postmenopáusicas la principal fuente es el estroma del tejido adiposo. El estradiol actúa sobre el desarrollo, mantenimiento y funciones de los órganos reproductores femeninos (Jordan, 1986).

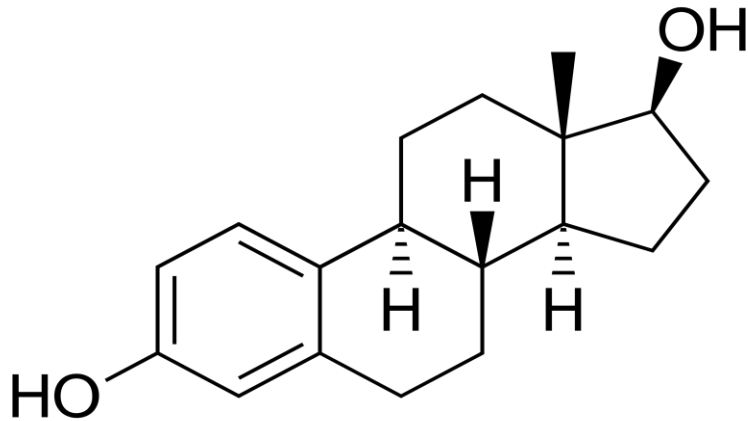


Figura 10. Estructura química del 17 $\beta$ -estradiol.

Los estrógenos tienen efectos sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación de tejidos, aunque su acción principal se observa en órganos reproductivos (Koehler et al., 2005). Se ha demostrado que, en tejidos como hígado, cerebro, sistema cardiovascular y hueso, también regulan procesos, tales como el mantenimiento de la densidad ósea y el equilibrio hidroelectrolítico. En hembras, existen tres principales estrógenos: estrona, estriol y estradiol siendo este último, el principal ligando para sus receptores y el más abundante (Bonkhoff y Berges, 2009).

Ejerce su función principalmente por medio de la regulación de genes que interactúan con 2 receptores nucleares, el receptor de estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) y el receptor de estrógenos  $\beta$  (RE $\beta$ ). Aunque estos dos receptores se pueden expresar juntos en los tejidos se sabe que tienen una distribución diferente en diversos órganos de cuerpo. El RE $\alpha$  se expresa mayoritariamente en hígado, ovarios y glándula mamaria y el RE $\beta$  en próstata, colon y pulmón. Los estrógenos activan al receptor de estrógenos mediante una interacción ligando-receptor, esta unión puede ocurrir en el citoplasma para después ser transportado al núcleo, o puede ocurrir directamente en el núcleo, teniendo ambas el mismo resultado que es ejercer un efecto sobre los elementos de respuesta estrogénicos (ERE) (Nilsson et al., 2001), lo que se conoce como mecanismo clásico. Se han descrito otros mecanismos a través de los cuales el RE ejerce efectos genómicos independientes de los ERE y algunos que no dependen de la presencia del ligando. Sin embargo,

algunos efectos producidos por los estrógenos se presentan tan rápido que no es posible que dependan de la activación de ARN o de la síntesis de proteínas, por lo que se ha descrito un mecanismo de acción no genómica, en el que el E2 se une a los REs presentes en la membrana celular y este complejo a su vez activa vías de segundos mensajeros como PI3K, AKT y ERK1/2 (Bjornstrom y Sjoberg, 2005; Knowlton, 2017).

Si bien el E2 tiene efectos fisiológicos en el desarrollo y crecimiento mamario, ya que estimula la proliferación de las células epiteliales (Foidart et al., 1998), también ha sido ligado al desarrollo y progresión de cánceres, como el cáncer de mama, el cáncer de ovario y el cáncer endometrial (Harris, 2007). En cuanto al papel del estradiol con las MMPs, se sabe que el E2 está involucrado en la regulación de las MMPs a través de su supresión a nivel transcripcional (Gunson y Arnett, 2010) y altas dosis inhiben la expresión de MMP1, MMP-13 y TIMP-1 (Wang et al., 2016). Por otro lado incrementa la expresión de MMP-2 y MMP-13 en fibrocondrocitos (Ahmad et al., 2018).

Los estrógenos promueven la metástasis del cáncer de mama, sin embargo, los mecanismos específicos permanecen desconocidos en su mayoría. Se ha descrito que el E2 incrementa la migración de las células T47-D y MDA-MB-231 de cáncer de mama por la activación de, que es una proteína de unión a actina, e incrementando la formación de lamelipodios y las adhesiones focales que son integrales para la migración celular (Azios y Dharmawardhane, 2005; Zheng et al., 2011). En contraste, otros estudios han reportado que el E2 no afecta significativamente la capacidad de migración de las células MCF-7 (Nunes et al., 2017).

## 2.11 Transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT)

Diversas vías de señalización intracelular se encargan de llevar o transducir las señales desde los receptores de superficie celular hasta el núcleo, donde regulan la transcripción génica. A estas vías se les denomina segundos mensajeros, el primer mensajero es el ligando que se une a los receptores de membrana, por ejemplo, las hormonas que se unen a sus receptores. Esta interacción ligando-receptor lleva a la activación de vías de señalización que pasan la señal iniciada por la hormona (primer mensajero) hasta el núcleo donde inducen un efecto fisiológico (Klampfer, 2006).

De muchas vías de señalización que se conocen, la vía de señalización Jak-STAT constituye una de las rutas más directas. De manera general, en estas vías los receptores de membrana activados, activan a una tirosina quinasa citoplasmática denominadas quinasas Janus (Jak) y estas a su vez fosforilan y activan a una serie de proteínas denominadas transductores de la señal y activadores de la transcripción (STAT), que a su vez se translocan al núcleo donde estimulan la transcripción de determinados genes (Alberts et al., 2002).

Se han descrito siete STATs; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6 y STAT7. En su estructura poseen 6 dominios; dominio N-terminal, dominio de superenrollamiento, dominio de unión al ADN, dominio linker, dominio de activación transcripcional y un dominio SH2, el cual tiene dos funciones: primero, el dominio SH2 facilita la unión de la proteína STAT a un sitio de fosfotirosina en un receptor activado, una vez unidas son fosforiladas por la Jak en residuos tirosina provocando su disociación del receptor (Mendiola y Cruz, 2005). Segundo, el dominio SH2 una vez liberado facilita la unión con otra proteína STAT formando un dímero, el cual se transloca a núcleo donde se une a elementos de respuesta en varios genes estimulando su transcripción (Alberts et al., 2002). Esta cascada de activación puede ocurrir rápidamente, con la llegada de las STATs activadas al núcleo en solo minutos (Berridge, 2012). Estas vías tienen un rol primario en la regulación del crecimiento, desarrollo y homeostasis del organismo. Sin embargo,



las alteraciones en la función de las STATs contribuyen al desarrollo de enfermedades. (Berridge, 2012; Levy y Jr, 2002).

### **2.11.1 STAT3**

Entre los 7 miembros de la familia de las STATs, STAT3 es la que más a menudo se relaciona con la tumorigénesis ya que representa un eje donde casi cualquier vía activada por citoquinas, factores de crecimiento y algunos oncogenes pueden converger (Segatto et al., 2018). STAT3 inicialmente fue descrita como un regulador de respuesta de fase aguda en el hígado, donde su actividad transcripcional es activada por fosforilación de un residuo de tirosina, posteriormente se descubrió que tienen un papel importante como mediador en diversos procesos celulares como la proliferación celular y la apoptosis (Banerjee y Resat, 2016; Hughes y Watson, 2018). STAT3 tiene dos sitios de fosforilación importantes, es activada a través de la fosforilación de la tirosina en el residuo 705 (Tyr705) en respuesta a factores de crecimiento, hormonas y citosinas, así como en la serina en el residuo 727 (Ser727) que se ha considerado un evento secundario después de la fosforilación de Tyr705 y modula la actividad transcripcional de STAT3 y es necesario para una actividad completa (Sakaguchi et al., 2012; Yeh et al., 2006).g

La activación constitutiva de STAT3 está asociada a diversos cánceres humanos, como neoplasias hematológicas y tumores sólidos como cáncer de próstata y cáncer de mama, entre otros. La señalización anormal de esta vía se ha ligado experimentalmente tanto a la iniciación como a la progresión tumoral a través de un amplio rango de procesos intracelulares, como la inhibición de apoptosis, inducción de la proliferación celular, angiogénesis, invasión, cambios en el metabolismo de ácidos grasos y glucosa, así como remodelación de la MEC (Klampfer, 2006; Priceman et al., 2013; Segatto et al., 2018).

## **2.12 Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)**

Las MAPK son un grupo de proteínas serina/threonina quinasas que son activas en respuesta a una variedad de estímulos extracelulares y median la transducción de señales de la superficie celular al núcleo (Su y Karin, 1996). Juegan un papel clave en una gran variedad de respuestas celulares, incluyendo proliferación, diferenciación y muerte celular, así como algunos cambios a corto plazo requeridos para la homeostasis y la respuesta hormonal (Chen et al., 2001; Maroni et al., 2004).

Hasta ahora, distintas MAPK expresadas en vertebrados, han sido identificadas y clonadas (Su y Karin, 1996). Tres de estas vías han sido implicadas en enfermedades humanas y se han caracterizado en detalle: las quinasas reguladas por señal extracelular 1 y 2 (ERK1/2), JNK/SAPK y P38 (Qi y Elion, 2005; Reddy et al, 2003).

### **2.12.1 ERK1/2**

Los primeros miembros descubiertos y mejor caracterizados de la familia de las MAPKs son los ERKs, compuesto por al menos seis isoformas (ERK1-5 y ERK7/8), de los cuales los más estudiados son ERK1/2, que fue el primer miembro en ser caracterizado (Boutros et al, 2008). ERK1-2 es expresado en una gran variedad de tejidos y puede ser activado por estímulos mitogénicos como factores de crecimiento y citoquinas las cuales son conocidas por activar una variedad de receptores y proteínas G (Chen et al., 2001; Qi y Elion, 2005).

Se sabe que ERK1/2 regula la proliferación, diferenciación y meiosis celular, así como el aprendizaje y la memoria en células del sistema nervioso (Qi y Elion, 2005). La activación anormal de ERK1/2 promueve la proliferación de células tumorales. En células metastásicas se ha demostrado que ERK tiene una actividad aumentada comparada con células no metastásicas. ERK1/2 puede activar una

serie de factores transcripcionales que incluyen la proteína de activación AP1, que se ha relacionado con la regulación de muchas enzimas proteolíticas como MMP-9 y MMP-13, que han sido implicadas en la progresión y proceso de invasión del cáncer ya que pueden degradar la MEC (Reddy et al., 2003). Se ha demostrado que una señalización reducida de ERK1/2 decrece la estabilidad de los microtúbulos en las células, llevando a una reducción en el desensamble de adhesiones focales reduciendo la migración celular, lo que sugiere que ERK1/2 puede afectar el proceso de metástasis por una activación directa de los mecanismos intracelulares involucrados en el movimiento de las células (Boutros et al., 2008; Chen et al., 2001; Reddy et al., 2003).

## 2.13 Migración Celular y Segundos Mensajeros

Se sabe que en la migración celular la señalización de JAK-STAT3, la cual regula muchos de los aspectos del desarrollo y progresión del cáncer, promueve invasión y metástasis a través de la activación de los principales genes promotores de metástasis como por ejemplo WASF3 (Teng et al., 2014). También se sabe que NFkB frecuentemente coopera con STAT3 regulando al alza genes promotores de metástasis tales como MMPs y citocinas (Teng et al., 2014). A todo esto, existe información que avala que tanto el estradiol, a través de receptores asociados a la membrana, como la PRL, a través de sus respectivos receptores, pueden activar la vía de las JAK-STAT (Bjornstrom y Sjoberg, 2002; Bole-Feysot et al., 1998).

Otros estudios han demostrado que las MAPKs, incluyendo JNK, p38 y Erk, juegan roles cruciales en la migración celular (Huang et al., 2004). A este respecto, se sabe que el E2 y la progesterona regulan varias vías de transducción de señal incluyendo a las MAPKs, fosfatidilinositol 3 quinasa y tirosina quinasa (Zielniok et al., 2014). De igual forma se sabe que la PRL es capaz de activar la vía de las MAPKs a través de sus receptores (Bole-Feysot et al., 1998).

Algunos estudios sugieren que la activación de ERK regula la expresión de MMP-9 y MMP-13 lo que regula la migración celular en algunas líneas celulares como la Tca8113 (Yu et al., 2011).

Por lo anterior, podemos inferir que tanto el E2 como la PRL pueden inducir la migración de las células MCF-7, posiblemente a través de la activación de las vías de señalización JAK-STAT y/o MAPKs y regulando la actividad de MMP-13.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Tanto la PRL como el E2 son hormonas que participan en el desarrollo normal de la glándula mamaria, sin embargo, se sabe que también participan en el desarrollo de patologías como el cáncer de mama. Respecto al cáncer, uno de los eventos más funestos es la metástasis, en donde es necesario que las células cancerosas tengan la capacidad de migrar. Si bien se sabe que la PRL y el E2 participan en el desarrollo del cáncer de mama, es poco lo que se sabe acerca de la participación de estas hormonas en la migración celular y por ende su posible participación en la metástasis. La migración celular es un proceso importante para que las células cancerosas metastaticen, por lo que conocer los mecanismos que controlan el movimiento de las células hacia órganos distantes es una de las principales metas en la investigación contra el cáncer. Se sabe que en este proceso participan las MMPs, especialmente MMP-13 que ocupa una posición central en la cascada de activación de MMPs. Se ha reportado que MMP-13 puede ser blanco no solo de MMPs sino también del E2, a través de la participación del  $RE\alpha$ , y la PRL, cuyos niveles altos están asociados con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama. Además, se ha mostrado que en la migración celular participan vías de segundos mensajeros como las vías de las JAK-STAT y de las MAPKs. Vías que son utilizadas por la PRL y el E2, por lo que podemos inferir que estas hormonas pueden inducir la migración celular a través de la activación de estas. Debido a que no se conoce por completo la participación de la PRL y el E2 sobre MMP-13, y su efecto en la migración de la línea celular de cáncer de mama MCF-7, así como las vías de segundos mensajeros que participan en dicho proceso, esta fue la finalidad del presente trabajo de investigación.

#### **4. HIPÓTESIS**

La PRL y el E2 promueven la migración en las células MCF-7 aumentando la actividad de MMP-13 y mediante la activación de las vías de señalización STAT-3 y ERK1/2.

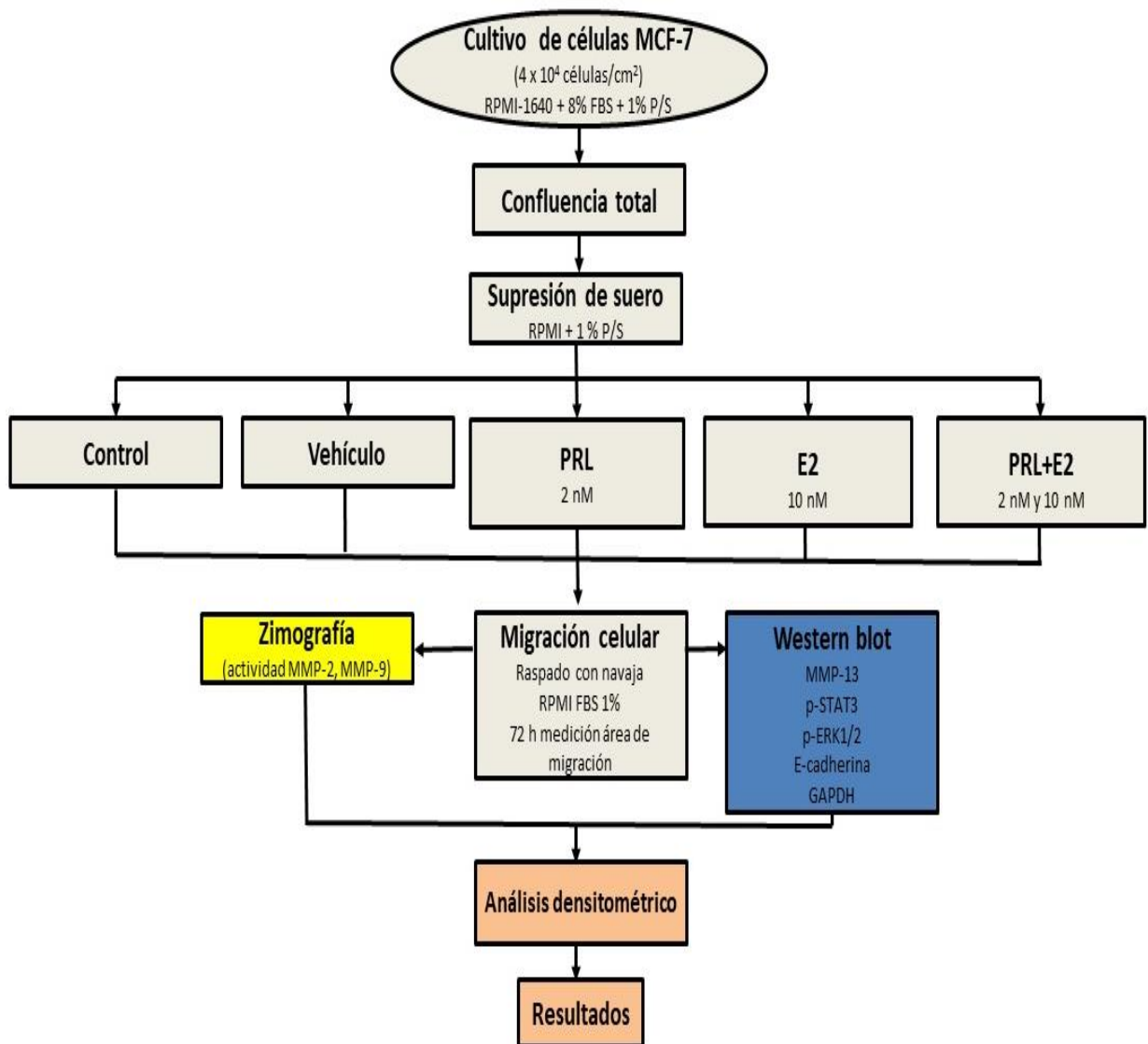
#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar en las células MCF-7 si la PRL y el E2 promueven un aumento de la migración celular mediante la regulación de MMP-13 a través de las vías de señalización de STAT3 y/o MAPK (ERK1/2).

#### **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar mediante la técnica de raspado y cicatrización de herida la migración de las células MCF-7 estimuladas con PRL y/o estradiol.
2. Evaluar mediante la técnica de zimografía la actividad de MMP-2 y MMP-9 en las células MCF-7 estimuladas con PRL y/o estradiol.
3. Evaluar mediante la técnica de Western-blot la expresión de MMP-13, STAT-3, ERK1/2 y E-cadherina en las células MCF-7 estimuladas con PRL y/o estradiol.

## 7. DISEÑO EXPERIMENTAL



## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Adaptación y proliferación de las células MCF-7 en medio de cultivo RPMI-1640**

Previamente, las células fueron adaptadas para crecer en medio RPMI-140, según el procedimiento recomendado por ATCC, de la siguiente forma: se subcultivó la línea celular usando una mezcla 1:1 de medio DMEM (SIGMA-ALDRICH) y RPMI-1640 (LONZA), posteriormente cada cambio de medio se fue aumentando la relación del medio RPMI-1640 1/3 (25% DMEM + 75% RPMI-1640), 1:7 (12.5% DMEM + 87.5% RPMI-1640) y finalmente solo medio RPMI-1640. Todos los medios utilizados fueron suplementados con 8% de suero fetal bovino (FBS) (Biowest) y 1% de P/S (Sigma-Aldrich). Al comparar la morfología de las células que crecieron en RPMI-1640 con las que crecieron en medio DMEM no se observaron diferencias morfológicas. Sin embargo, cuando se llevó a cabo la curva de proliferación de las células MCF-7 en medio RPMI-1640 (anexo 1) se encontró que el tiempo de duplicación fue de 40.43 h. Nuestro dato del tiempo de duplicación de las células que crecen en RPMI-1640 está muy próximo al reportado por ATCC (38 h).

### **8.2 Cultivo y mantenimiento de la línea celular MCF-7**

La línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 fue amablemente proporcionada por la Dra. Cynthia Fernández Pomares del Centro de Investigaciones Cerebrales. Las células fueron rutinariamente cultivadas en cajas Petri estériles de 90 x 20 mm (área de crecimiento de 46 cm<sup>2</sup>) (CORNING), utilizando medio de cultivo RPMI-1640 sin L-glutamina (LONZA) complementado con FBS sin inactivar (Biowest) al 8% (v/v) y penicilina/estreptomicina (P/S) (SIGMA-ALDRICH) a una concentración de 1% (v/v). Las células fueron incubadas utilizando



una incubadora (Nuair) mantenida a 37°C y con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. El medio de cultivo se cambió cada tercer día.

### **8.3 Curva de proliferación celular**

En una placa de 24 pozos (área de crecimiento 1.9 cm<sup>2</sup>) (CORNING) se sembraron aproximadamente 15,200 células por pozo en 1 ml de medio RPMI-1640 complementado con FBS sin inactivar (Biowest) al 8% (v/v) y penicilina/estreptomicina (P/S) (SIGMA-ALDRICH) a una concentración de 1% (v/v). A las 24, 48, 72, 96 y 120 h se retiró el medio por aspiración. Se agregaron 500 µl de tripsina a una columna (4 pozos) y se incubaron a 37°C por 15 minutos. Finalizado el periodo de incubación se adicionó 500 µl de medio RPMI-1640 sin L-glutamina complementado con FBS sin inactivar (Biowest) al 8% (v/v) y penicilina/estreptomicina (P/S) (SIGMA-ALDRICH) a una concentración de 1% (v/v) (para inactivar el efecto de la tripsina), se colectó el contenido en 4 tubos eppendorf de 1.5 ml. De esta suspensión se tomaron 20 µl y se mezclaron con 80 µl de azul de tripano (SIGMA-ALDRICH) para realizar el conteo celular de cada uno de los pozos en cámara de Neubauer. Cada 24 h se repitió el procedimiento, hasta completar un periodo de 120 h. Los valores correspondientes al número de células/cm<sup>2</sup> fueron graficados contra las horas de crecimiento, el tiempo de duplicación calculado de la población (PDT) fue de aproximadamente 40.43 h (anexo 1).

### **8.4 Ensayos de migración celular**

Las células MCF-7 se sembraron en placas de cultivo de 60 mm de diámetro (área de crecimiento 21 cm<sup>2</sup>) (CORNING), a una densidad de 1 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> en medio RPMI-1640 complementado con FBS sin inactivar (Biowest) al 8% (v/v) y

penicilina/estreptomicina (P/S) (SIGMA-ALDRICH) a una concentración de 1% (v/v), se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% hasta confluencia total. Con una navaja de afeitar estéril se hizo presión sobre la monocapa confluyente de células en la caja plástica para marcar la línea de comienzo, se rasparon las células hacia un lado de esa línea y las células se lavaron con PBS (Lara-Reyes et al., 2020). Posteriormente, las células fueron mantenidas en medio RPMI-1640 suplementado con 1% de FBS, sin o con PRL (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Mo, USA) a una concentración de 2 nM. Para el E2 se utilizó una concentración de 10 nM. Se tomaron fotos de cada pozo en un área delimitada cada 24 h hasta completar un total de 72 h (anexo 5).

### **8.5 Determinación de la concentración de FBS a usar en los ensayos de migración**

Para determinar la concentración de FBS para que las células reduzcan al mínimo la proliferación y de esta manera no se enmascare la migración celular, se llevó a cabo un ensayo de migración celular utilizando la técnica de raspado y cicatrización de herida (como se describió en el apartado 7.3) y utilizando concentraciones de FBS de 0, 1 y 5%. Se observó que la concentración de 1% de FBS fue la más efectiva en mantener a las células estables hasta las 72 h (anexo 2).

### **8.6 Determinación de la concentración de PRL y E2 a utilizar por la técnica de raspado y cicatrización de herida en las células MCF-7.**

Se llevó a cabo un ensayo de migración celular (raspado y cicatrización de herida) como se describió previamente. Se utilizó medio RPMI con concentraciones de FBS de 0% y 1%, y utilizando diferentes concentraciones de PRL y E2 (anexos 3 y 4).

## **8.7 Western blot para la determinación de MMP-13, STAT-3, ERK1/2, E-cadherina y GAPDH**

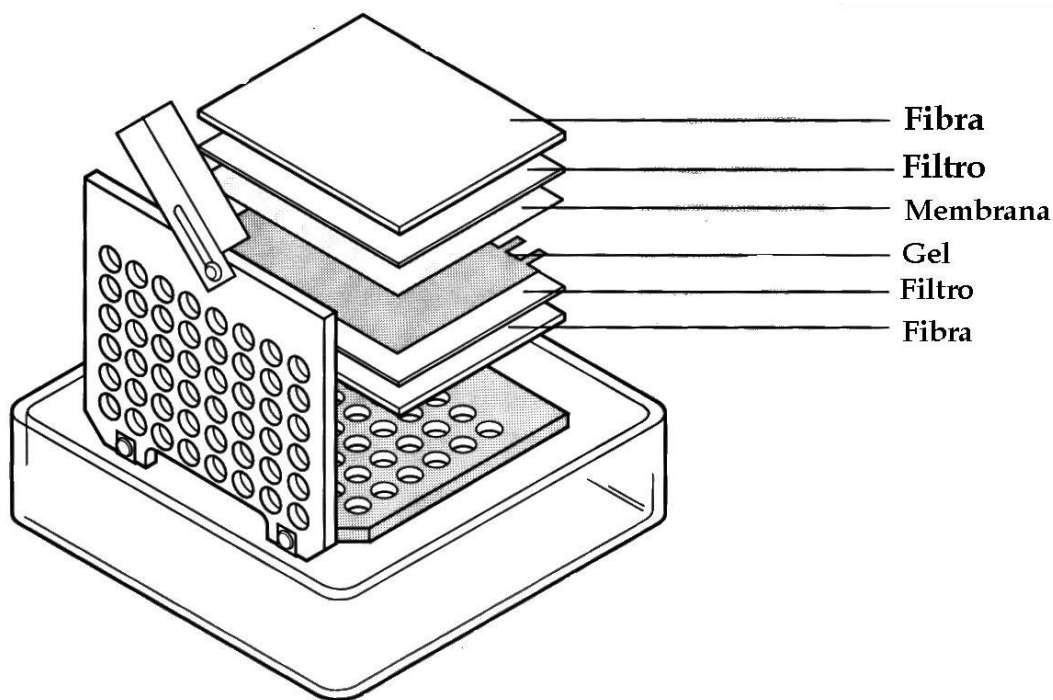
La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) es un método utilizado para separar proteínas basándose en los pesos moleculares de éstas. Se utiliza acrilamida para formar un polímero (poliacrilamida) en forma de gel, que funciona como una matriz a través de la cual van a migrar las proteínas (con carga negativa debido a la presencia de SDS en el gel) hacia el cátodo del sistema. En este caso se utilizaron las cámaras de electroforesis Mini-Protean III (Bio-Rad).

Las proteínas fueron extraídas de las células MCF-7, bajo los diferentes tratamientos, con buffer de lisis (NP-40) (Fluka) con inhibidores de proteasa (Complete Mini, EDTA-free, Roche) y fueron cuantificadas por el método del ácido bicinónico (BCA) (Thermo Scientific). Posteriormente, cada muestra se preparó en una solución amortiguadora con 2-β-mercaptoetanol (Bio Rad) al 2% y se calentaron a baño maría por 5 min a 95°C. El corrimiento total de las muestras problema en el gel desde la fase de empaquetamiento hasta su completa separación fue de aproximadamente de 1.5 h, utilizando 100 V.

Posteriormente, el "sándwich" se preparó colocando una fibra gruesa, papel filtro, el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa, papel filtro y por último otra fibra, como se muestra en la figura 11.

El "sándwich" se colocó en la cámara de transferencia (Bio-Rad) por espacio de 2 h a 100 V. Al finalizar la transferencia, la membrana se bloqueó a temperatura ambiente con 50 ml de solución bloqueadora de leche al 5% en TBS-1X + Tween 20 (0.1%) por 2 h y con agitación suave. Después del bloqueo la membrana se lavó con TBS-1X y se incubó con el primer anticuerpo anti-MMP-13 (hecho en ratón) (1:100), p-STAT-3 (hecho en ratón) (1:100), p-ERK 1/2 (hecho en ratón) (1:100), anti-E-cadherina (hecho en ratón) (1:200) y anti GAPDH (hecho en conejo) (1:100). Todos los anticuerpos usados fueron de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos fueron diluidos en solución de bloqueo de leche (5%) en TBS 1X + Tween 20 (0.1%) + Azida de Sodio (0.1%). La incubación fue a 4°C toda la noche. Una vez

transcurrido el tiempo, la membrana fue lavada con: 50 ml de TBS-1X (2 veces de forma rápida), 25 ml de una solución de leche al 2.5% en TBS-1X + Tween 20 (0.05%) (1 vez durante 15 min), y 25 ml de una solución de leche al 2.5% en TBS-1X + Tween 20 (0.05%) (3 veces durante 5 min). Todos los lavados fueron con agitación. Seguidamente, se incubo con el segundo anticuerpo (Abcam) acoplado a fosfatasa, diluido 1:2000 en solución de bloqueo por espacio de 2 h en agitación constante y a temperatura ambiente.



**Figura 11.** Preparación del “sándwich” para llevar a cabo la transferencia de las proteínas.

Después de la incubación se lavó con: 50 ml de TBS-1X (2 veces de forma rápida), 25 ml de una solución de leche al 2.5% en TBS-1X + Tween 20 (0.05%) (3 veces durante 5 min), y 50 ml de TBS-1X (1 vez durante 15 min). Posteriormente las membranas se revelaron con el Kit AP Conjugate Substrate (Bio-Rad) por espacio de 5 min o hasta que las bandas fueron observadas. La reacción se detuvo al desechar la solución reveladora y lavar la membrana con TBS-Tween 1X. En las muestras que no se logró observar una banda por el método anteriormente descrito, se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados anti-ratón (BA-2000, Vector

Laboratories, Burlingame, California, EUA) y anti-conejo (BA-1100, Vector Laboratories, Burlingame, California, EUA), ambos a una dilución 1:200. Finalmente, las proteínas fueron detectadas usando avidina y HRP biotinilada del Kit Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, California, EUA) y escaneadas mediante el equipo ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, California, EUA). La densitometría fue analizada con el software Image Lab 6.0.1. La expresión de las proteínas fue reportada como densidad relativa normalizada al control de carga.

### **8.8 Ensayo por zimografía para medir la actividad de MMP-2 y MMP9 en medio de cultivo**

Se monto la cámara de corrimiento, conforme al instructivo de Mini Protean III. Primero, se prepararon los geles al 8.5% con Buffer Tris pH 8.8 3.75 ml, acrilamida 2.83 ml, H<sub>2</sub>O 2.42 ml, gelatina (1 mg/ml) 1.0 ml, SDS (10%) 100 µl, APS (10%) 70 µl, TEMED 15 µl. El gel de empaquetamiento se preparó al 4 % con Buffer Tris pH (6.8) 1.25 ml, acrilamida 1.00 ml, H<sub>2</sub>O 7.75 ml SDS (10%) 50 µl, APS (10%) 50 µl, TEMED 15 µl. Este volumen fue suficiente para preparar dos geles.

Después, se colocaron en el sistema tomando en cuenta el instructivo del equipo Mini Protean III y se llenó la cámara con buffer de corrida 1X. Se cargaron las muestras del medio de cultivo, según el estímulo en cada uno de los pozos (tomando el volumen correspondiente a la concentración deseada). Se colocó la tapa y se conectó a la fuente de poder a 140 V por 1 h con 30 min.

Una vez terminado el corrimiento se colocó cada gel en recipientes pequeños, se les adicionó 30 ml de buffer de lavado (Tritón X-100 2,5%) (v/v), se colocó en agitación y se realizó un lavado durante toda la noche. Al siguiente día, se colocaron los geles en recipientes con el buffer de incubación (5 mM Tris base, 4 mM HCl, 20 mM NaCl, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>) por 18 h a 37°C. Al término de este se retiró el buffer de incubación y los geles se lavaron con H<sub>2</sub>O, después se les adicionó 30 ml de solución para teñir de azul de Coomassie y se dejaron en agitación por 1

h. Se desechó la solución para teñir, se adicionaron 30 ml de solución para desteñir y se dejaron en agitación por 1 h. Finalmente, los geles se lavaron con agua destilada y se tomó una fotografía. Se observaron bandas incoloras en donde hubo degradación por las MMPs.

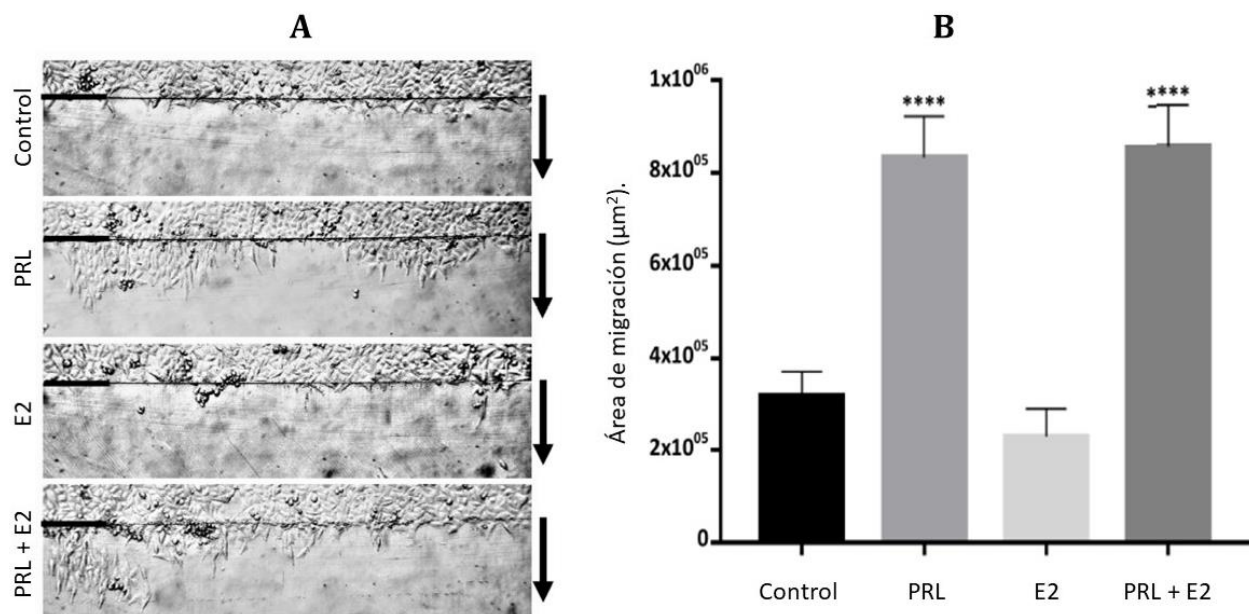
## **8.9 Análisis Estadístico**

Los datos de migración celular fueron analizados con ANOVA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Tukey. Los datos derivados de las pruebas de Western Blot y zimografía se analizaron con Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de Dunn. Se expresaron en las gráficas como error estándar de la media (S.E.M.).

## 9. RESULTADOS

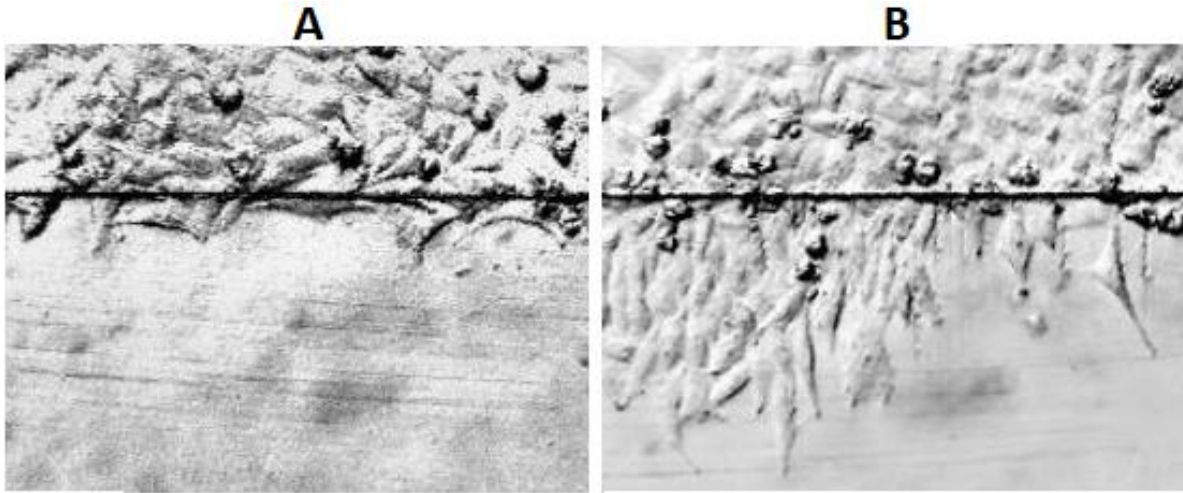
### 9.1 La PRL incrementa la migración celular en las células MCF-7

Los resultados obtenidos mediante una variante del método de herida y cicatrización utilizando una navaja de afeitar, muestran que la PRL (2 nM) y la combinación de PRL+E2 produjeron un incremento significativo en la migración celular después de 72 h de estimulación con respecto al control, mientras que el E2 no tuvo efecto (figura 12 A y B). En el caso de PRL+E2 no se observaron diferencias significativas contra el grupo de PRL, por lo que el efecto puede ser atribuible únicamente a la presencia de la PRL (figura 12 A y B). En lo que respecta a la morfología se aprecia un cambio importante en las células tratadas con PRL y la combinación de ambas hormonas, presentando una forma alargada o estrellada con prolongaciones citoplasmáticas que se encuentran orientadas hacia el área libre de células (dirección de la migración) (figura 13 B) con respecto a la morfología de las células del grupo control, la cual es irregular (figura 13 A).



**Figura 12.** A: Migración de las células MCF-7 después de 72 h de estimulación con PRL (2 nM), E2 (10 nM), y ambas hormonas. Las imágenes son representativas y fueron convertidas a escala de

grises. Las flechas señalan la dirección de la migración y la línea negra superior es la línea de inicio de la migración. B: Área cubierta por las células durante la migración ( $\mu\text{m}^2$ ) utilizando el software ImageJ. \*\*\*\*  $P < 0.0001$  contra el control, ANOVA de 1 vía, poshoc de Tukey. Los experimentos fueron repetidos 3 veces cada uno por triplicado.

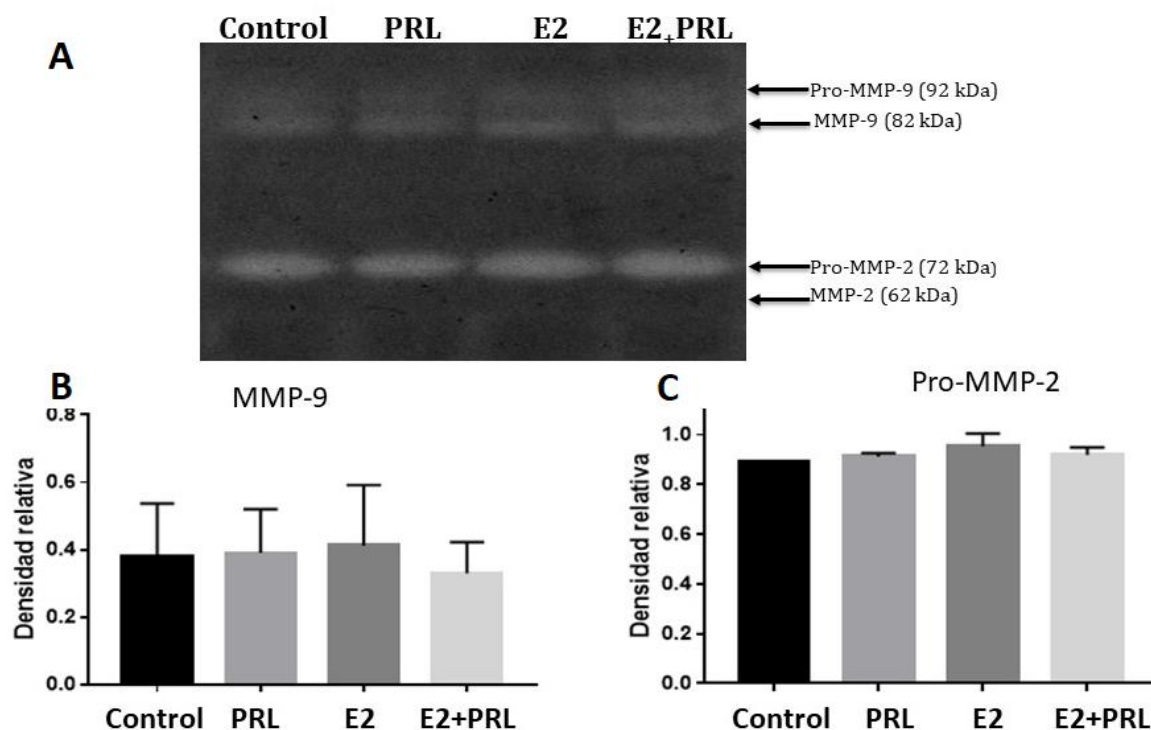


**Figura 13.** Morfología de las células MCF-7 después de 72 h de estimulación con PRL (2 nM). **A.** Imagen ampliada de las células correspondientes al grupo control, se observa que presentan una forma irregular si que se aprecie alguna orientación específica. **B.** Imagen ampliada correspondiente a las células tratadas con PRL, se observa que presentan una forma alargada o estrellada con prolongaciones citoplasmáticas orientadas hacia el área libre de células (flechas negras). Las imágenes son representativas y fueron convertidas a escala de grises.



## 9.2 Actividad proteolítica de MMP2 y MMP9 en el medio de cultivo

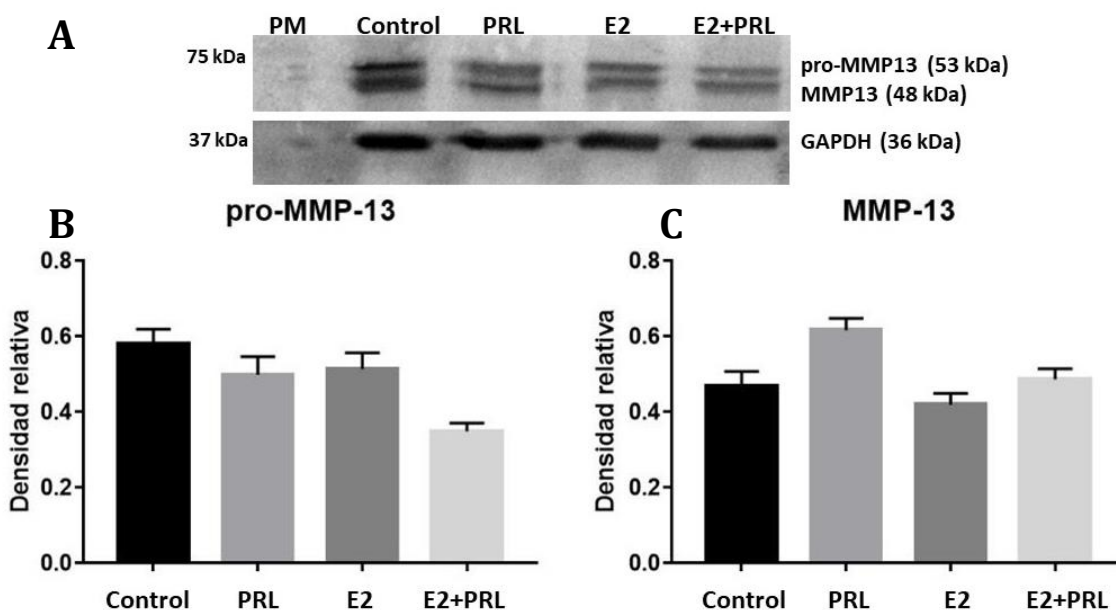
Para evaluar la actividad proteolítica de las metaloproteasas MMP-2 y MMP9 se empleó un ensayo de zimografía utilizando los medios de cultivo recuperados a las 72 h. Los resultados no muestran diferencias en la actividad proteolítica de MMP-2 y MMP-9 con respecto al control, tanto en su forma activa como en su proforma (figura 14).



**Figura 14. A)** Actividad proteolítica de las proMMP-9, MMP-9, proMMP-2 y MMP-2 en medio condicionado de células MCF-7 recolectado a las 72 h mediante la técnica de zimografía. Imagen representativa de tres experimentos independientes, cada uno por triplicado, y convertida a escala de grises. Se observa actividad enzimática que corresponde a la proMMP9 (92 kDa), MMP-9 (82 kDa) y proMMP-2 (72 kDa). No se observó actividad correspondiente a la MMP-2. **B)** Gráfica correspondiente al análisis estadístico de la densidad relativa de proMMP-2. **C)** Gráfica correspondiente al análisis estadístico de la densidad relativa de MMP-9. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post hoc de Dunn.

### 9.3 Expresión de la proteína MMP-13

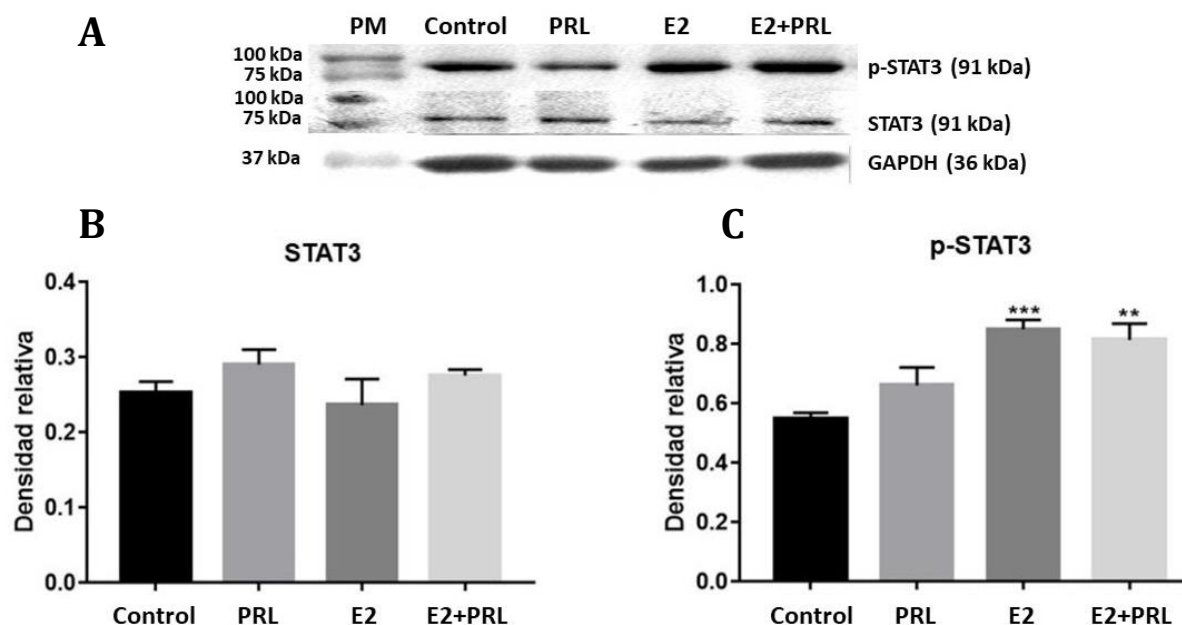
La expresión de la proteína MMP-13 se analizó utilizando la técnica de Western blot, utilizando las proteínas extraídas de las células tratadas con PRL, E2 y ambas hormonas. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos, sin embargo, se observó la presencia tanto de la forma activa como de la proforma, algo que no se había reportado con anterioridad con el anticuerpo empleado (figura 15).



**Figura 15.** Expresión de la proteína MMP-13 en células MCF-7 después de 72 h de tratamiento con PRL, E2, o ambas. **A)** Imagen representativa de tres experimentos independientes cada uno por triplicado y convertida a escala de grises. Se observan las bandas correspondientes a la proforma y la forma activa de MMP-13. **B)** y **C)** Gráficas correspondientes al análisis estadístico de la densidad relativa, no se observaron diferencias con respecto al control. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis, seguido del post hoc de Dunn.

## 9.4 Expresión de la proteína STAT-3.

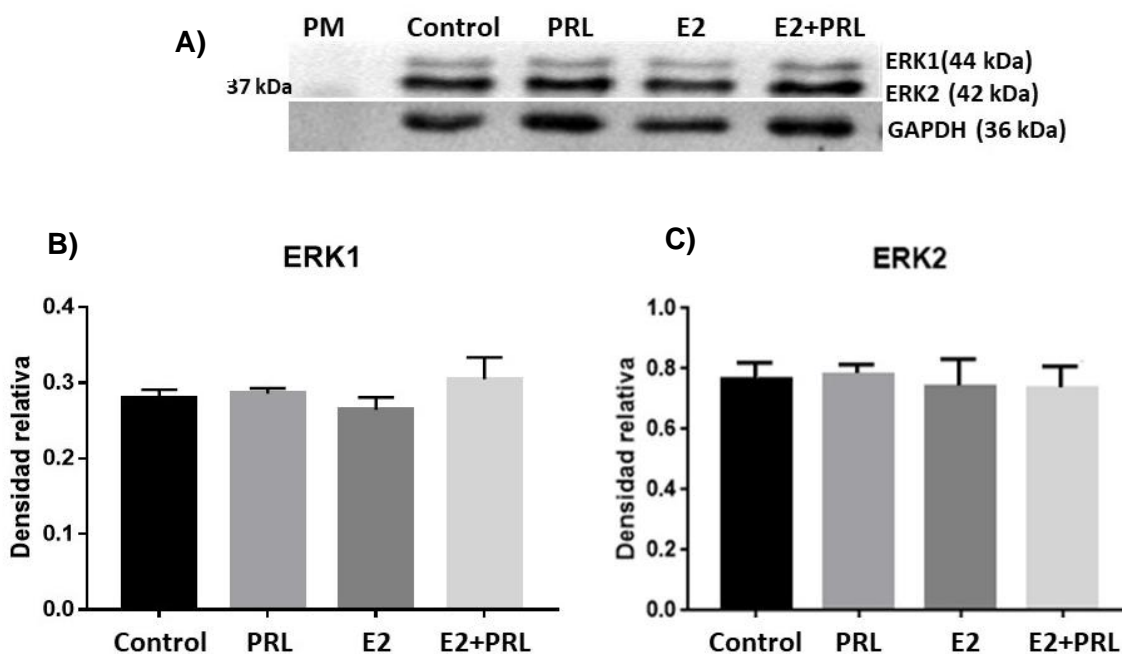
La expresión de las proteínas STAT3 fosforilada (p-STAT3, Ser 727) y total (STAT3) se analizaron mediante la técnica de Western blot utilizando las proteínas extraídas de las células de los diferentes grupos experimentales. Los resultados muestran un incremento estadísticamente significativo en la expresión de la proteína p-STAT3 en las células estimuladas con E2 y en la combinación de PRL y E2 con respecto al control, mientras que en las células tratadas solo con PRL no se encontraron diferencias. No hubo diferencias en la expresión de STAT3 total (figura16).



**Figura 16.** Expresión de la proteína STAT3 fosforilada (Ser 727) en células MCF-7 después de 72 h de tratamiento con PRL, E<sub>2</sub> y combinación de ambas hormonas, analizadas por Western blot. A) Imagen representativa de tres experimentos independientes cada uno por triplicado y convertida a escala de grises. B) y C) Gráficas correspondiente al análisis estadístico de la densidad relativa de STAT-3 y p-STAT-3. El análisis estadístico se realizó con el test de Kruskal-Wallis, seguido del post hoc de Dunn. \*\*\*P < 0.001 y \*\*P < 0.01 contra el control. En las imágenes no se ve cual es A y cual B.

## 9.5 Expresión de la proteína ERK1/2

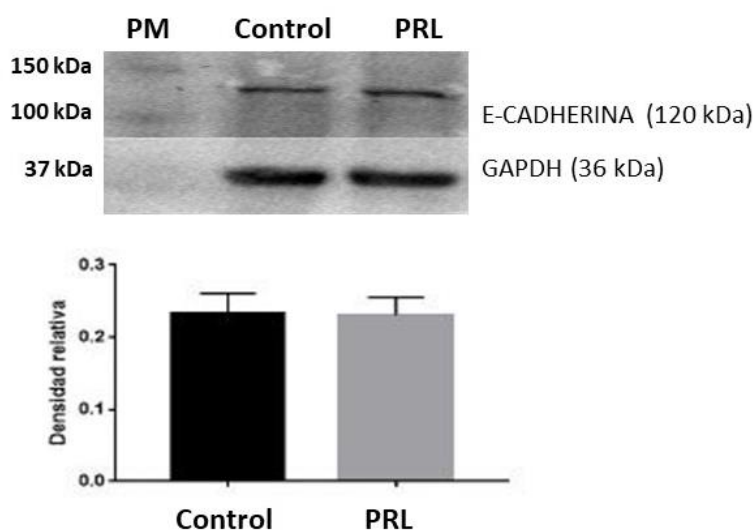
La expresión de las proteínas ERK1/2 fosforilada (p-ERK1/2, Thr 202) y total (ERK1/2) se llevó a cabo a través de la técnica de Western blot utilizando las proteínas extraídas de las células de los diferentes grupos de experimentales. Los resultados no mostraron diferencias en la expresión de la proteína ERK1/2 total entre los diferentes grupos. En el caso de p-ERK1/2 no fue posible detectar la proteína por el método utilizado, se comprobó el correcto funcionamiento de los anticuerpos utilizando como control positivo una muestra de proteínas extraídas de hipotálamo de rata (figura 17).



**Figura 17.** Expresión de la proteína ERK1/2 en células MCF-7 después de 72 h de tratamiento con PRL, E<sub>2</sub> y combinación de ambas hormonas, analizadas por Western blot. **A)** Imagen representativa de tres experimentos independientes cada uno por triplicado y convertida a escala de grises. **B)** y **C)** Gráficas correspondiente al análisis estadístico de la densidad relativa de ERK1 y ERK2 no se observaron diferencias significativas. No se observó la expresión de la proteína p-ERK1/2.

## 9.6 Expresión de la proteína E-cadherina

La expresión de la proteína E-cadherina se llevó a cabo a través de la técnica de Western blot utilizando las proteínas extraídas de las células de los diferentes grupos experimentales. Los resultados no mostraron diferencias entre los diferentes grupos (figura 18).



**Figura 18.** Expresión de la proteína E-cadherina en las células MCF-7 después de 72 h de tratamiento con PRL analizada por Western blot. A) Imagen representativa de tres experimentos independientes, cada uno por triplicado, y convertida a escala de grises. B) Gráfica correspondiente al análisis estadístico de la densidad relativa, no se observaron diferencias con respecto al control. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis.

## 10. DISCUSIÓN

Los datos muestran que la PRL incrementa la migración celular sin inducir una TEM en las células de cáncer de mama MCF-7. Cuando las células MCF-7 fueron tratadas con PRL (2 nM) por 72 h incrementaron significativamente el área de migración celular con respecto al control, y no indujo una disminución en la expresión de la E-cadherina, lo que probablemente indica que no se llevó a cabo una TEM. En contraste, el E2 no mostro ningún efecto en la migración de las células MCF-7, sin embargo, se observó un incremento en la expresión de la proteína STAT3 fosforilada lo que indica su participación en la regulación de esta vía de señalización. No se observaron cambios en la expresión de la proteína MMP-13 y ERK1/2, así como tampoco en la actividad proteolítica de MMP-2 y MMP-9.

A la fecha existen estudios que muestran la participación de la PRL en la migración de líneas celulares de cáncer de mama T-47D, MDA-231, MCF-7 y ZR75-1 (Da Silva et al., 2015; do Amaral et al., 2015) a través de inducir cambios en la remodelación de la actina del citoesqueleto, ya que mediante el marcaje con faloidina se observó la formación de ruffles de membrana, pseudopodios y fibras de estrés en las células MDA-231 y T-47D (Da Silva et al., 2015; Maus et al., 1999) lo que les permitiría desplazarse. Lo anterior sugiere que los efectos de la PRL pueden estar asociados a la MEC. Se cree que la formación de los ruffles de membrana y las fibras de estrés es debido a la participación de la PI3K; cuando esta quinasa de lípidos, que participa en la migración celular, es inhibida no se lleva a cabo la formación de estas estructuras en presencia de la PRL (Maus et al., 1999; Verret et al., 2019). Las proteínas c-Src, p-Tyr<sup>530</sup>c-Src, moesin, Thr<sup>558</sup>moesin, FAK, y Tyr<sup>397</sup>FAK, involucradas en la remodelación de la actina, aumentan significativamente su expresión en respuesta a PRL, proteínas que no se expresan cuando el RPRL se inhibe con siRNAs (Da Silva et al., 2015), evidenciando la participación de la PRL y su receptor en la remodelación de la actina del citoesqueleto de las células T-47D, ZR75-1 y MCF-7 (Da Silva et al., 2015). Si bien, en este trabajo de investigación no se evaluó el RPRL, es muy probable que el efecto de la PRL sobre las células MCF-

7 sea a través de su receptor independientemente de la isoforma. Si bien las concentraciones utilizadas por Da Silva y colaboradores son muy similares a la que utilizamos (2 nM), existen algunas diferencias como el tipo de PRL utilizada y los periodos de renovación o cambio del medio de cultivo, aun así, los resultados son muy parecidos a los obtenidos en nuestro estudio. Como se mencionó, la PRL tiene efectos en la remodelación de la actina del citoesqueleto para inducir la migración celular, sin embargo, su efecto en moléculas involucradas en uniones adherentes (importantes para la migración celular), como la E-cadherina, y su efecto sobre la TEM era prácticamente desconocida.

La TEM se ha relacionado directamente con el tipo de migración celular que se puede presentar. Las células que migran de manera individual son las provenientes de epitelios que mediante una TEM se deslaminan y se convierten en células mesenquimales con capacidad de migrar. Por otro lado, en la migración colectiva se presenta un movimiento de varias células, formando parte de un grupo, fila o capa, que mantienen características similares a las de las células epiteliales, por lo que se considera que no se presenta una TEM propiamente dicha (Doyle et al., 2009). De estos dos tipos de migración celular, la migración colectiva presenta un mayor potencial para provocar metástasis, siendo este potencial de 23 a 50 veces mayor que la migración celular individual (Aceto et al., 2014). Se han descrito diversos marcadores implicados en la TEM, como son los niveles proteicos de vimentina, N-cadherina, claudina y la expresión del factor de Snail (Inés Benedetti y Niradiz Reyes, 2015), sin embargo, uno de los más estudiados es la disminución de la expresión de E-cadherina, la cual puede considerarse como un marcador de que se lleva a cabo una TEM y ha sido utilizada para analizarla en cultivos celulares primarios y células MCF-7 de cáncer de mama (Moreno-Jaime et al., 2016). Una limitante del presente trabajo es el modelo utilizado ya que la TEM, como tal, es un proceso que se presenta *in vivo* donde se encuentran presentes estructuras como la membrana basal y la MEC, elementos con los que no se cuenta en el método de cultivo celular utilizado.

Durante la metástasis, las células pueden sufrir una TEM, lo que implica profundas variaciones fenotípicas, entre las que se encuentran las propiedades

migratorias e invasivas (Cai et al., 2017). Por lo tanto, un decremento en la expresión de E-cadherina puede estar relacionado con un aumento de la migración celular de tipo individual. Además, la pérdida de la expresión de E-cadherina se traduce en una pérdida de la inhibición por contacto, lo cual está asociado con incremento en la migración celular y estados avanzados del cáncer (Mendonça et al., 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que la PRL no disminuyó los niveles de E-cadherina por lo que la migración observada podría estar relacionada con una migración celular de tipo colectivo, ya que como se mencionó anteriormente, esta no requiere de una TEM. Este dato resulta de particular interés, ya que se ha relacionado la migración de tipo colectivo con una mayor capacidad para producir metástasis (Aceto et al., 2014). Si bien la información respecto a el efecto de la PRL sobre la expresión de E-cadherina es escasa, se ha reportado que en células epiteliales de la glándula mamaria bovina (MECs) la PRL es capaz de incrementar la proliferación de estas células, incrementando a su vez los niveles de expresión del mRNA y de la proteína E-cadherina y ciclina D1 (Tong et al., 2016). Se sabe también que, en el cuerpo lúteo, la PRL tiene efecto sobre la cadherina endotelial vascular (VE-cadherina) (Binart et al., 2010). Lo anterior deja de manifiesto que la PRL tiene efectos sobre la expresión de cadherinas para llevar a cabo procesos de proliferación y migración celular. Resultaría de gran interés estudiar algunos marcadores que se relacionan con la migración celular colectiva como la proteína CD44v8-10. Se ha demostrado en células madre cancerosas, que tienden a presentar migración colectiva sin presentar una TEM, que el estrés oxidativo induce la activación de *Wnt* lo que produce el incremento de CD44v8-10 por lo que es un marcador interesante para analizar el tipo de migración que se presenta (Yoshida y Saya, 2014).

Una observación que resulta de gran interés es el cambio en la morfología de las células tratadas con PRL que se presentó a la par del incremento en la migración, adquiriendo una forma alargada o estrellada con prolongaciones citoplasmáticas que probablemente estén asociados a la reorganización del citoesqueleto de actina y sean indicativos de la formación de filopodios, lamelipodios u otras estructuras involucradas en la migración celular (Da Silva et al., 2015;



Amaral et al., 2015; Gest et al., 2013), y que se encuentran orientadas hacia el área libre de células (dirección de la migración). Es necesario abordar este análisis a través de métodos que permitan la visualización del citoesqueleto de actina, como podría ser la inmunocitoquímica o microscopia confocal, que permitiría visualizar si esas prolongaciones citoplasmáticas realmente son el resultado de un reordenamiento de esta proteína.

Si bien se observó un efecto positivo de la PRL sobre la migración celular, no se observó ningún cambio en la expresión de las proteínas STAT3 y ERK-1/2, lo que indica que estas vías de señalización no están involucradas en la regulación de la migración celular, esto debido a que probablemente el receptor a través del cual está ejerciendo su efecto la PRL es la forma larga y esta isoforma principalmente se ha asociado a la activación de STAT5 (Bole-Feysot et al., 1998). Si bien existe información que avala la participación de las STATs (Teng et al., 2014) y MAPKs (Huang et al., 2004) en la migración celular, mismas que son utilizadas por la PRL, es muy probable que estén implicadas otras vías en donde JAK2 active otras moléculas independientemente de la activación de STAT3. Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión del gen pro-metastásico *WASF3*, si bien es regulado por STAT3, su capacidad para regular la invasión depende de su fosforilación directa por JAK2, independientemente de la activación de STAT3 (Teng et al., 2014). Se sabe también que la PRL, a través de JAK2, fosforila a PAK1 en las tirosinas 153, 201 y 285 lo que conlleva a un aumento en la migración e invasión de las células de cáncer de mama T-47D (Hammer et al., 2013; Hammer y Diakonova, 2016). Aunque los mecanismos específicos a través de los cuales la PRL actúa son inciertos, si se sabe que los cambios en la migración celular en las células MCF-7 son inducidos a través de la remodelación de actina (Da Silva et al., 2015; do Amaral et al., 2015), por lo que se debe prestar atención a proteínas que se sabe regulan la organización y ensamblaje de la actina en el citoesqueleto, siendo una de las principales las proteínas Rho (Valdespino-gómez et al., 2015). La hipótesis que proponemos es que la PRL, a través de su receptor, activa la vía de señalización Rho cuyos blancos corriente abajo incluyen a ROCK, que esta principalmente involucrada en la formación de fibras de estrés y adhesiones focales, y mDia que

tiene efectos sobre la polarización de la actina (Hanna y El-sibai, 2013). Adicionalmente, se sabe que las GTPasas como las proteínas Rho se interconectan con las vías de señalización MAPK, participando específicamente en las cascadas JNK y p38/SAPK (Morrison, 2012), que también pueden regular la organización de la actina en otros tipos celulares (Fregozo y Vega, 2012). Todas estas vías constituyen un blanco interesante a estudiar para conocer como la PRL pudiese estar regulando la migración de las células MCF-7.

Respecto al E2, que no mostro un efecto sobre la migración de las células MCF-7, los datos concuerdan con los reportados por Nunes y col. (Nunes et al., 2017) y son contrarios con otros estudios en células de cáncer de mama (Azios y Dharmawardhane, 2005; Park et al., 2016). Estas discrepancias probablemente sean debido a las diferencias en las líneas celulares y a las variaciones en las metodologías utilizadas, ya que en los estudios en los que se observa un aumento en la migración celular, las células fueron sometidas al estímulo por periodos cortos de una hora al inicio del experimento y posteriormente este fue reemplazado por medio de cultivo normal. En el caso de los datos que concuerdan con nuestros resultados la metodología fue similar a la utilizada en este estudio, con la diferencia de que la concentración de E2 empleada fue de 100 nM.

La ausencia de respuesta en la migración en las células sometidas al estímulo con E2, podría ser explicada analizando la forma en que este ejerce sus efectos a través de sus receptores: RE $\alpha$  y RE $\beta$ . Es conocido que el E2 tiene un papel crítico en el control de la proliferación y diferenciación en el cáncer de mama, y que este ejerce su función a través de sus receptores, de los cuales el RE $\alpha$  es el que se ha relacionado con el aumento en la proliferación celular y, por tanto, en el crecimiento y diseminación del tumor (Nunes et al., 2017). Durante el proceso metastásico se puede perder este receptor o modificar su funcionalidad, sin embargo, el RE $\beta$  se puede conservar, junto con algunas formas de los receptores unidos a membrana (RE $\alpha$ 36) (Jia et al., 2015), y este RE $\beta$  tiene efectos antiproliferativos y antimigratorios. Estudios *in vitro* han mostrado que la reexpresión del RE $\beta$  en líneas celulares de cáncer de mama (donde su expresión es disminuida

o se ha perdido) inhibe la proliferación celular, promueve la apoptosis y aumenta la efectividad de los agentes quimioterapéuticos (Jia et al., 2015).

Adicionalmente, aunque no se encontraron diferencias en la migración celular en el grupo tratado con E2, si se observó un incremento en la expresión de la proteína STAT3 fosforilada, lo que indica que el E2 participa en la regulación y activación de esta vía. La activación de la vía STAT3 se ha asociado con cáncer de mama (Yang et al., 2016). Se sabe que el E2 ejerce sus efectos a través de su unión con sus receptores nucleares o citoplasmáticos ( $RE\alpha$  y  $RE\beta$ ), es decir, un mecanismo clásico de activación dependiente de la unión a un ligando, después de lo cual el receptor se dimeriza y se une a los elementos de respuesta a estrógenos (EREs) en la región promotora de los genes, lo que se considera un mecanismo genómico (Bjornstrom y Sjoberg, 2002). Sin embargo, se han descrito efectos del estradiol que no se deben a una respuesta genómica (Kelly et al., 2001). Se ha reportado que el E2 incrementa la fosforilación de STAT3 en neuronas (Dziennis et al., 2007), sin embargo no hay reportes de esto en células de cáncer de mama como las MCF-7. El incremento de la fosforilación de la proteína STAT3, podría ser explicado por una acción del E2 a través de dos mecanismos de transactivación del EGFR (anexo 4); una en la que participa el  $RE\alpha$  por la vía de señalización  $RE\alpha/Shc/EGFR$  (Manavathi y Kumar, 2006), y otra que requeriría la activación de receptor GPR30 presente en las células-MCF-7 (Jacenik y Krajewska, 2020) que activaría la vía GPR30/Scr/EGFR (Peng et al., 2019). Ambas vías llevarían a la activación del EGFR que se conoce puede conducir a la fosforilación de STAT3 (Kwon et al., 2014; Peng et al., 2019). Aunque existe una tercera posibilidad que sugeriría un efecto del E2 disminuyendo las fosfatasas lo que llevaría al mantenimiento o incremento de la fosforilación de STAT3, esta es poco probable ya que se ha demostrado que los estrógenos pueden inducir la actividad de las fosfatasas en fibroblastos pulmonares humanos, células musculares lisas vasculares, células HT-22 de ratón y C6 de glioma de rata, lo que no concordaría con los resultados observados (Flores-Delgado et al., 2003; Takeda-Matsubara et al., 2002; R. D. Yi et al., 2005).

Por otra parte, las MMPs han sido implicadas como posibles mediadores de la invasión y la metástasis en algunos cánceres (Bartsch et al., 2003). Y MMP13, además de tener un rol central en la modulación de la actividad de otras MMPs, tiene funciones claves en la invasión y metástasis del tumor (Leeman et al., 2002). Cuando los niveles de expresión de la proteína MMP-13 fueron evaluados no se observó ningún efecto en los grupos tratados, sin embargo, un dato interesante es que se logró detectar tanto la proforma como la forma activa, situación que no había sido reportada con este anticuerpo en específico, sin embargo, este hallazgo es posible y se puede explicar debido a que el anticuerpo utilizado está dirigido contra los aminoácidos 242 a 471 mapeados en el dominio C terminal (también denominado hemopexina) de la MMP-13 de origen humano, y este dominio se conserva tanto en la forma activa como la proforma de MMP-13.

## **11. CONCLUSIONES**

La PRL incrementó la migración celular en las células MCF-7 sin inducir una TEM lo que podría estar relacionado con una migración de tipo colectiva, y no presento efecto en la expresión de ERK1/2, STAT3 y MMP13, así como tampoco en la actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9.

Por su parte, el E2 no produjo cambios significativos sobre la migración celular ni en la expresión de ERK1/2, MMP-13 ni en la actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9, por otro lado, si produjo un incremento en la expresión de la proteína STAT3 fosforilada.

## 11. PROSPECTIVAS

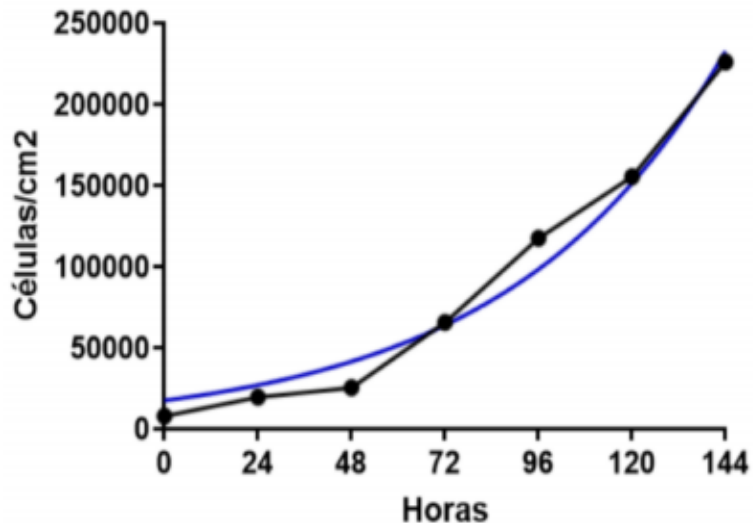
- Analizar el tipo de migración y la morfología celulares inducida por PRL con marcadores específicos como el CD44v8-10 además de ICQ para actina y E-cadherina.
- Analizar las vías de señalización que convergen en actina, principalmente Rho con PRL.
- Analizar el papel del receptor GPR30 en la fosforilación de STAT3 por parte del E2.

## 12. ANEXOS.

### Anexo 1. Adaptación y proliferación de las células MCF-7 en medio de cultivo RPMI-1640.

Debido a que las células se encontraban originalmente en medio DMEM, estas fueron adaptadas para crecer en medio RPMI-140 según el procedimiento recomendado por ATCC de la siguiente forma: se subcultivo la línea celular usando una mezcla 1:1 de medio DMEM y RPMI-1640, posteriormente cada cambio de medio se fue aumentando la relación del medio RPMI-1640 1/3 (25% DMEM + 75% RPMI-1640), 1:7 (12.5%DMEM + 87.5% RPMI-1640) y finalmente solo medio RPMI-1640. Las células MCF-7 fueron sembradas a una densidad de  $8 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>, el tiempo de duplicación de la población (PDT) fue aproximadamente de 40.43 h (Figura 19)

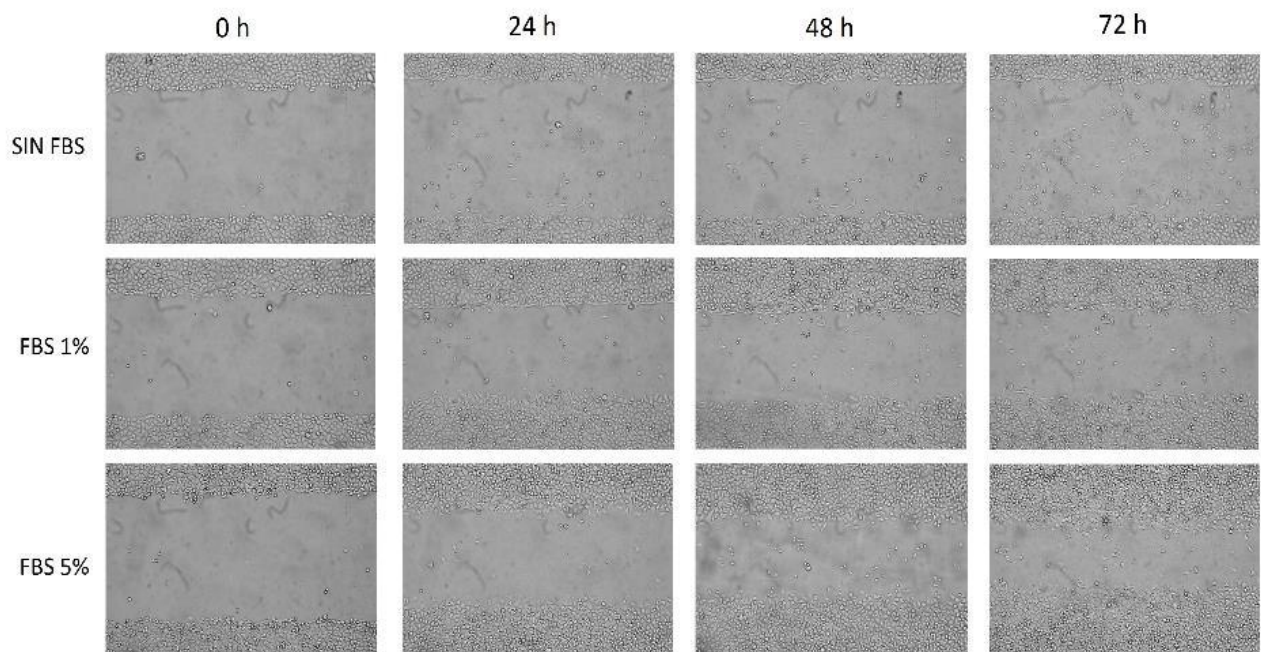
Nonlin fit		Data Set-A
		Y
1	Exponential growth equation	
2	Best-fit values	
3	Y0	19543
4	k	0.01715
5	Tau	58.32
6	Doubling Time	40.43
7	Std. Error	
8	Y0	2608
9	k	0.001031
10	95% CI (profile likelihood)	
11	Y0	14718 to 25294
12	k	0.01513 to 0.01931
13	Tau	51.79 to 66.09
14	Doubling Time	35.9 to 45.81
15	Goodness of Fit	
16	Degrees of Freedom	18
17	R square	0.9594
18	Absolute Sum of Squares	4014521120
19	Sy.x	14934



**Figura 19. Curva de proliferación de las células MCF-7.** Se observa que al análisis estadístico arrojó un tiempo de duplicación de las células MCF-7 de 40.43 h. La curva de proliferación fue realizada por cuadruplicado.

## Anexo 2. Determinación de la concentración de FBS a usar en los ensayos de migración celular.

Para determinar la concentración de FBS para que las células no proliferen tanto y no enmascare la migración celular, se llevó a cabo un ensayo de migración celular utilizando la técnica de raspado y cicatrización de herida (como se describió en el apartado 7.3) y utilizando concentraciones de FBS de 0, 1 y 5%. Se observó que la concentración de 1% de suero fue la más efectiva en mantener a las células estables hasta las 72 h (figura 20).

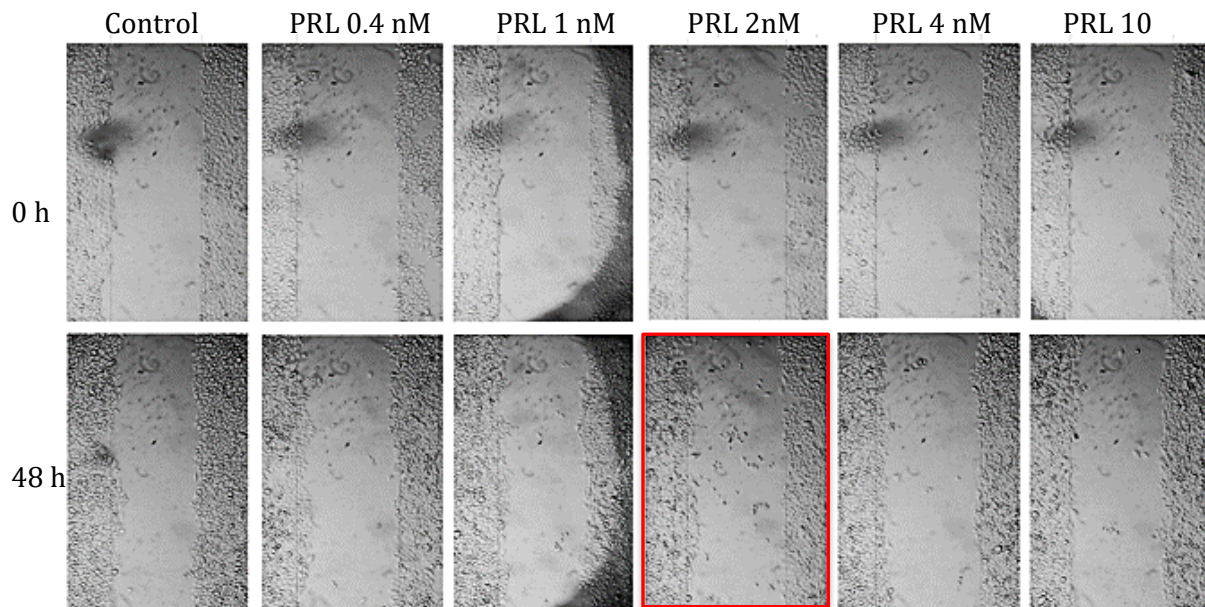


**Figura 20.** Efecto del FBS en la migración de las células MCF-7.

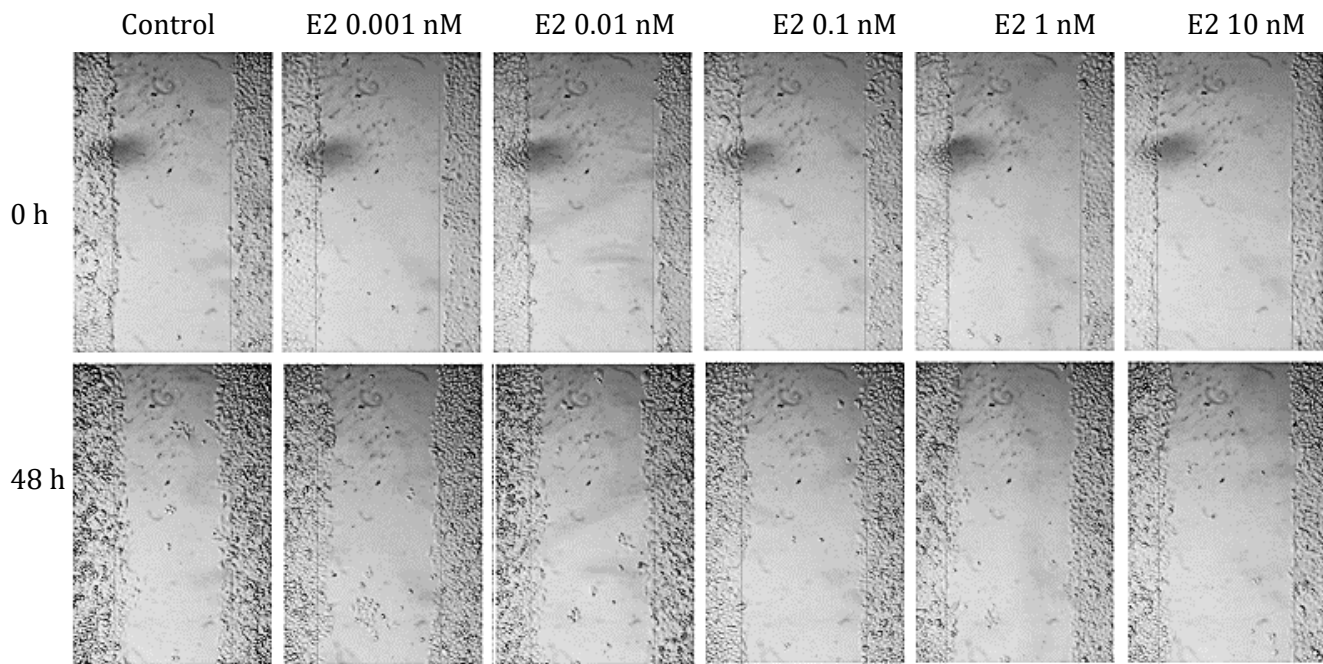


### Anexo 3. Determinación de la concentración de PRL y E2 a usar en los ensayos de migración celular.

Para analizar si la PRL, el E2 o la combinación de ambas hormonas, tienen un efecto en la migración de las células MCF-7, se llevaron a cabo ensayos dosis-respuesta utilizando diferentes concentraciones de PRL (0.4, 1, 2, 4 y 10 nM) y de E2 (0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 nM), en un ensayo de herida y cicatrización clásico. Solo se observó migración de las células hacia el centro de la herida cuando se utilizó la concentración 2 nM de PRL a las 48 h, por lo que se decidió utilizar esta concentración para futuros experimentos (figura 21). En el caso del E2 no se observó migración en ninguna de las concentraciones utilizadas, por lo que se tomó la decisión de utilizar la concentración de 10 nM por estar cercana a las concentraciones fisiológicas (figura 22).



**Figura 21.** Migración de las células MCF-7 en medio RPMI suplementado con FBS al 1% tras 48 horas de administración de diferentes concentraciones de PRL (nM). Las imágenes fueron convertidas a escala de grises. Se muestran fotografías a las 0 y 48 h



**Figura 22.** Migración de las células MCF-7 en medio RPMI suplementado con FBS al 1% tras 48 horas de administración de diferentes concentraciones de E2 (nM). Las imágenes fueron convertidas a escala de grises. Se muestran fotografías a las 0 y 48 h.

#### **Anexo 4. Estandarización del ensayo de raspado y cicatrización de herida con navaja.**

Se realizó un ensayo de raspado y cicatrización de herida con navaja. Brevemente, una navaja de afeitarse estéril se presionó sobre la capa confluyente de células MCF-7 dentro de la placa de cultivo para marcar la línea de inicio, posteriormente las células fueron removidas hacia un lado de esa línea mediante un movimiento de barrido. Las células se lavaron con PBS (figura 23). Se administró una dosis de 2 nM de PRL. Se tomaron fotos cada 24 h, hasta completar la 72 h. Se midió el área de avance de las células, delimitada en rojo, posterior a la línea de inicio en  $\mu\text{m}^2$  con el software ImageJ version 1.8.0\_172 para windows (figura 24).

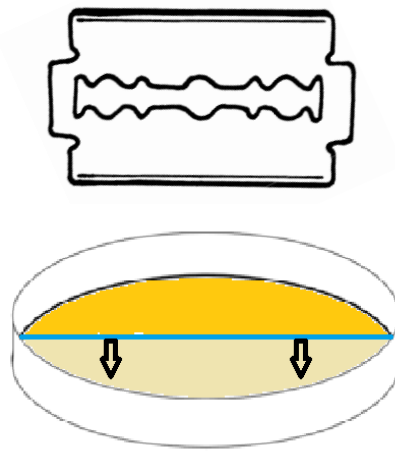
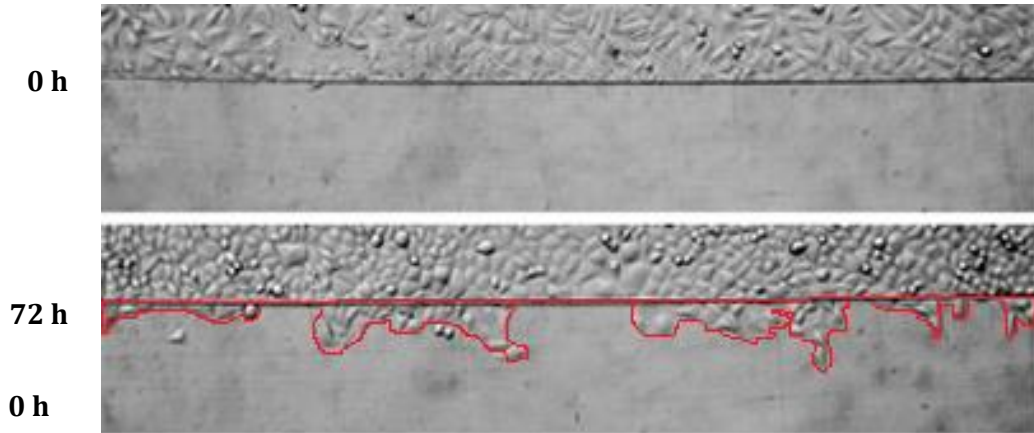


Figura 23. Esquema representativo del ensayo de raspado y cicatrización de herida con la técnica de navaja de afeitarse.

### CONTROL



### PRL 2 nM

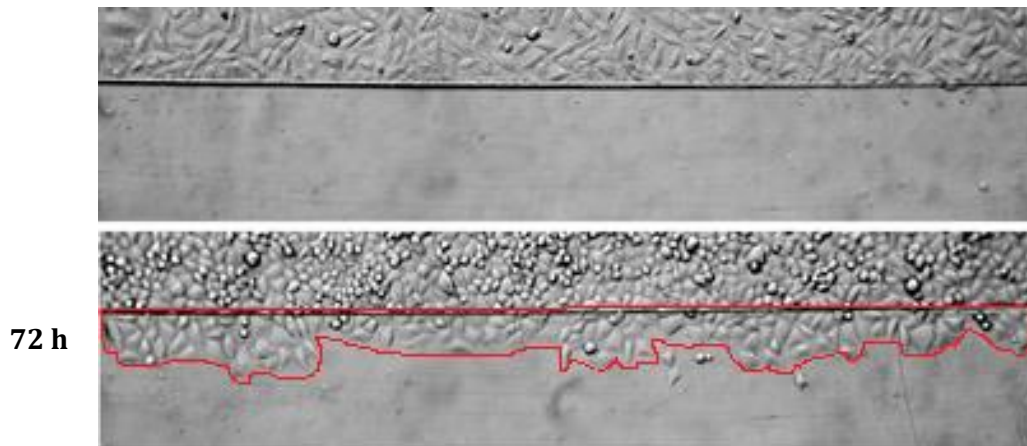


Figura 24. Migración de las células MCF-7 después de 72 h de administración de 2 nM de PRL. La línea negra superior indica donde comenzó la migración. El área cubierta por las células que migraron fue medida en  $\mu\text{m}^2$ . Las imágenes son representativas y fueron convertidas a escala de grises.

**Anexo 5. Esquema de las vías de señalización propuestas para la fosforilación de STAT3 por E2.**

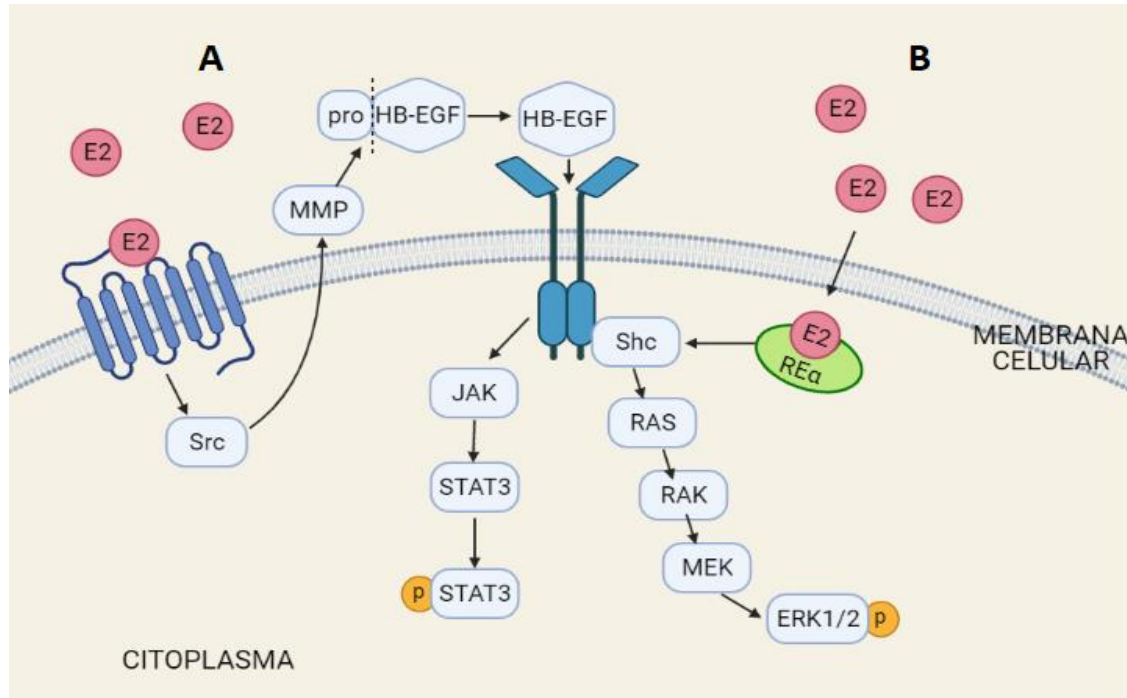


Figura 25. **A.** El E2 estimula la activación de EGFR vía Src convirtiendo la pro-HB-EGF en HB-EGF que a su vez es capaz de activar la vía de las JAK-STAT provocando la fosforilación de STAT3. **B.** El E2 se une al ERα que interactúa con Shc, lo que produce la activación de las vías dependientes de Ras, llevando principalmente a la activación de ERK1/2. Creado con BioRender.com



## Anexo 6. Artículos publicados

MethodsX 7 (2020) 101135



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

# MethodsX

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mex](http://www.elsevier.com/locate/mex)



Method Article

## Razor scrape assay, an alternative variation to wound and healing assays



Jesús Antonio Lara-Reyes<sup>a,\*</sup>, Mariana Giezi Jimenez-Buendia<sup>a</sup>,  
Gonzalo Emiliano Aranda-Abreu<sup>b</sup>, Deissy Herrera-Covarrubias<sup>b</sup>,  
Clara Luz Sampieri<sup>c</sup>, Arnoldo Aquino-Galvez<sup>d</sup>, Jorge Manzo-Denes<sup>b</sup>,  
María Elena Hernández-Aguilar<sup>b</sup>, Fausto Rojas-Durán<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Doctorado en Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

<sup>b</sup> Centro de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

<sup>c</sup> Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

<sup>d</sup> Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ciudad de México, México

### ABSTRACT

Cell migration is the process by which cells move through tissues, and it is crucial to carry out a wide variety of physiological and pathological processes. The study methods to evaluate cell migration are very useful tools for biomedical research. Among these methods, the wound and healing assay is one of the simplest, most economical and is widely used in research. However, one of its disadvantages is that the width and shape of the wound can vary among experimental samples since the scraping is carried out manually, representing a difficult variable to control. In the present article a variant of the razor scrape assay is addressed, which eliminates this variation in the width of the wound, thus facilitating the measurement and comparison using the total area of cell migration.

- A method that can be carried out under standard culture conditions.
- Avoids the disadvantage of variation in width and shape of the wound.
- It constitutes a simple, cheap option and multiple advantages over the traditional method.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

### ARTICLE INFO

*Method name:* Razor scrape assay

*Keywords:* Cell culture techniques, Cell migration assays, Cell movement

*Article history:* Received 23 September 2020; Accepted 5 November 2020; Available online 10 November 2020

\* Corresponding author.

E-mail address: [zs16024975@estudiantes.uv.mx](mailto:zs16024975@estudiantes.uv.mx) (J.A. Lara-Reyes).

<https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101135>

2215-0161/© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

### Specifications Table

Subject Area	Biochemistry, Genetics and Molecular Biology
More specific subject area	Cell Biology of Cell Migration
Method name	Razor scrape assay
Name and reference of original method	Simoncini T, Scorticati C, Mannella P, Fadiel A, Giretti MS, Fu X-D, et al. Estrogen Receptor $\alpha$ Interacts with $G\alpha_{13}$ to Drive Actin Remodeling and Endothelial Cell Migration via the RhoA/Rho Kinase/Moesin Pathway. <i>Mol Endocrinol</i> 2006;20:1756–71. Da Silva PL, Do Amaral VC, Gabrielli V, Montt MM, Mannella P, Baracat EC, et al. Prolactin promotes breast cancer cell migration through actin cytoskeleton remodeling. <i>Front Endocrinol (Lausanne)</i> 2015;6:1–8.
Resource availability	ImageJ: <a href="https://imagej.nih.gov/ij/download.html">https://imagej.nih.gov/ij/download.html</a>

Cell migration is the process by which cells move through tissues or on the surface of a culture plate (in vitro). It is crucial to carry out a wide variety of developmental and physiological processes, such as; embryo development, immune response, wound healing, etc., as well as in many pathological processes like inflammation and metastasis in cancer [1]. Because increased migration is the main process for cancer cells to invade and metastasize [2], knowing the mechanisms that control cell movement is one of the main goals of the research [3].

Study methods to evaluate cell migration are very useful tools for various disciplines in the biomedical sciences. Among the different methods available, the wound and healing assay is one of the simplest and cheapest. It provides information on the ability of cells to migrate collectively or individually, and morphological characteristics can even be observed during migration [1]. By measuring the distance or area of wound closure at a certain time, compared to a control, specific changes in migration can be revealed, including differences in the formation of lamellipodia, filopodia and direction movement.

Due to its importance, a great variety of techniques and commercial kits have been developed for its study. Several wound and healing assays based on mechanical, chemical, optical and electrical methods have been developed to create monolayer wound models with cells to study the process of cell migration. These approaches can result in different microenvironments for cells and possess diverse characteristics in terms of complexity, development, reproducibility and flexibility. However, low cost alternatives to carry out wound and healing studies are very few.

The wound and healing assay is widely used in research as it can be carried out under standard culture conditions using equipment available in most cell culture laboratories [4]. It is based on the observation of the behavior of a monolayer of confluent cells on a culture surface in which a wound or gap has been made with a micropipette tip, which will initially be a cell free area, the cells will move towards the inside area of it, images are captured in certain periods of time and compared to determine the differences.

One of the greatest advantages of this method is that no specialized material is required for the assay, which means they can be done in common cell culture multi-well plates and with a microscope with low magnification objectives (4X and 10X) regularly used in cell culture. Additionally, different types of cell matrices can be used if required.

However, this assay has some disadvantages, such as; variations in cell confluence; damage to the extracellular matrix layer as it is done through a scraping mechanism as well as variations in the width and shape of the wound between wells of the same experiment since they are carried out manually, making it difficult to measure and compare them [5].

Regarding this last point, a razor scrape assay has been described, which eliminates this variation in the width of the wound, facilitating measurement and comparison. In this variant a razor is pressed on the monolayer of cells in the plastic culture dish, thereby marking the starting line. The cells are removed on one side of that line and photographed at the beginning and at certain periods of time, the distance of the migration is measured in micrometers taking the starting line as a reference [6,7].

In this article we described a protocol base on this method modifying the measurement procedure, changing the distance per area. This method was applied in our studies with the MCF-7 breast cancer



cell line. We hope that the description of this low-cost method will be useful in the investigation of cell migration.

## Method details

### Materials

Materials and reagents	e.g. company	Comments
MCF-7 cell line	ATCC	This cell line was used for illustrative purposes only, any adherent cell line can be used in this method.
90 mm dishes	Corning	Routine cell culture and propagation.
60 mm dishes	Corning	Used for razor assay
RPMI-1640 culture medium	LONZA	Any other medium can be used.
Fetal bovine serum (FBS)	Biowest	Any other can be used.
Penicillin/streptomycin	Sigma/Aldrich	Any other can be used.
CO <sub>2</sub> incubator	Nuaire	Any other can be used.
Razor blades		Single (recommended) or double edge

### Cell culture

Culture the cells to be used in the appropriate medium and supplementation until you have enough cells to do a passage. In the present method the human breast cancer cell line MCF-7 was routinely cultured in sterile 90 × 20 mm Petri dishes (46 cm<sup>2</sup> growth area) (Corning), using RPMI-1640 culture medium without L-glutamine (LONZA) supplemented with non-inactivated FBS (Biowest) 8% (v/v) and penicillin/streptomycin (Sigma/Aldrich) 1% (v/v) concentration. The cells were incubated using an incubator (Nuaire) maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The culture medium was changed every other day.

### Procedure

- (1) Seed and culture cells in 60 mm culture dishes (21 cm<sup>2</sup> growth area) under appropriate medium, supplementation and incubation conditions (usually 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere) until they reach confluence >90%, that is, the percentage of the growing area surface that is covered with cells must be more than the 90%.

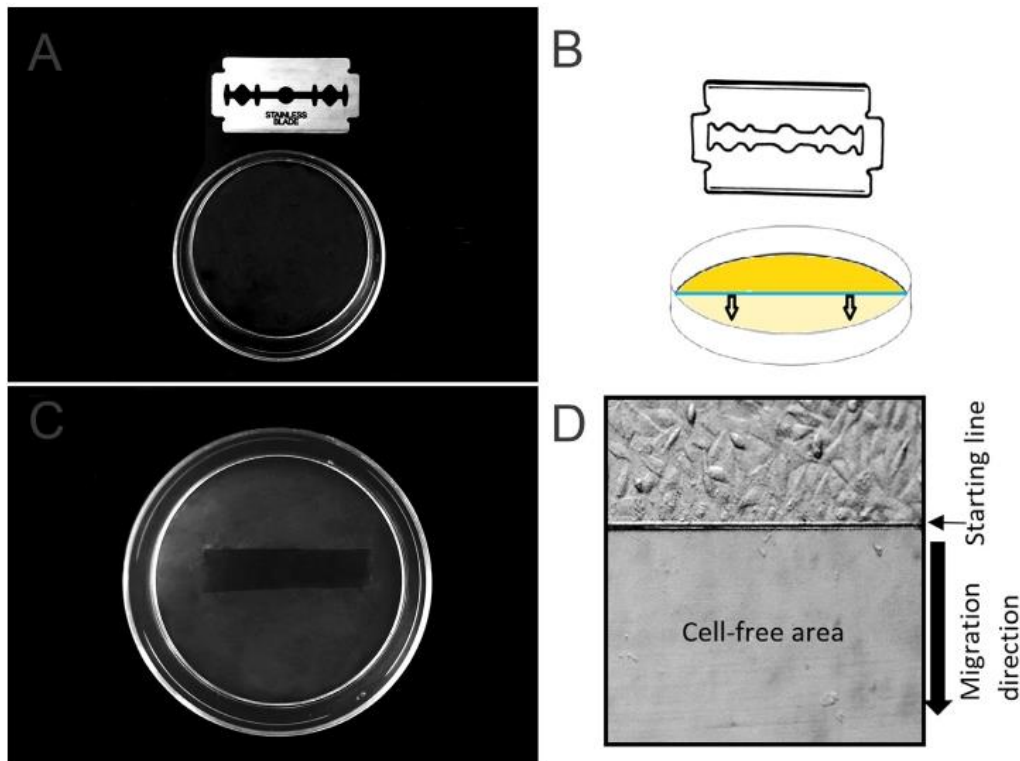
Note: the number of cells to be seeded and the time required to reach the confluence must be determined, which will depend on the size of the culture surface.

- (2) In a biosafety cabinet (sterile environment) a sterile razor blade is pressed onto the cell monolayer on the plastic culture dish, thereby marking the starting line (Fig. 1 A and B).
- (3) All cells on one side of the marked line are removed. They can be swept away with a scraper or with the same razor blade, but care must be taken not to use excessive force to avoid damaging the plate surface (Fig. 1 C and D).
- (4) Aspirate the culture medium and cell dendrites.
- (5) Do 3 washes by slowly adding PBS to the well walls until the surface is completely covered and removed by aspiration.
- (6) Slowly add culture medium with the corresponding substance to test along the walls of the well until completely covering the surface, taking care not to detach additional cells.

Note: It is recommended to perform the test under conditions of low serum concentration, which allows cells to migrate and does not cause cell death, but minimizes cell proliferation, since this could hide cell migration.

- (7) Observe under an inverted microscope, choose and mark the areas to be photographed.
- (8) Take the initial photograph (Fig. 1 D).





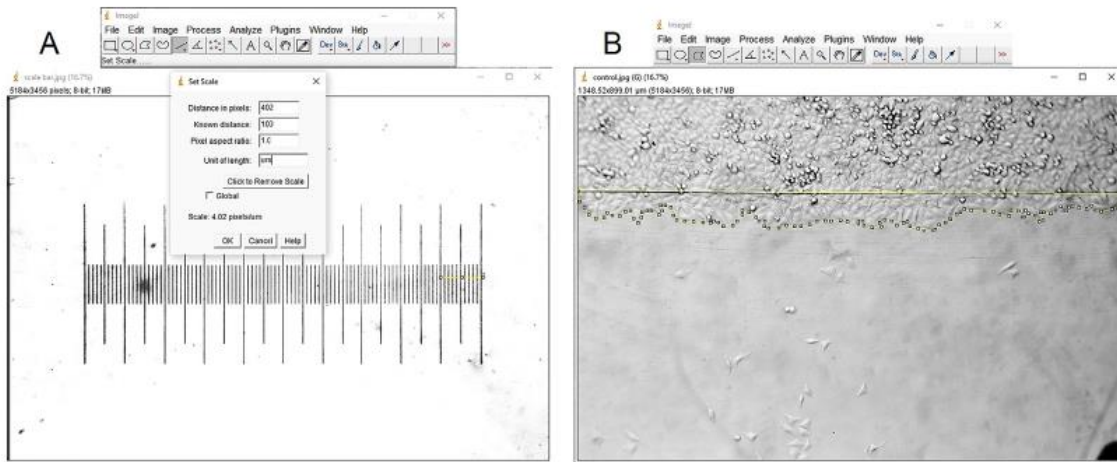
**Fig. 1.** Cell migration assay, Razor scrape variation. (A) Plastic culture dish. (B) Razor blade and plastic culture dish. (C) Culture dish with cells monolayer and cell free area created by the razor blade. (D) Initial picture with the starting line and the cell free area (10X).

- (9) Put the culture plate in an incubator with the appropriate temperature and CO<sub>2</sub> concentration (generally 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>).
- (10) Every certain period, remove the culture plate from the incubator, place it in the inverted microscope and take a photograph in the previously chosen and marked areas. In the Fig. 3 A, B and C we show an example of the MCF-7 cell migration analysis in different period of hours, only supplemented medium was used, without any different stimulus.

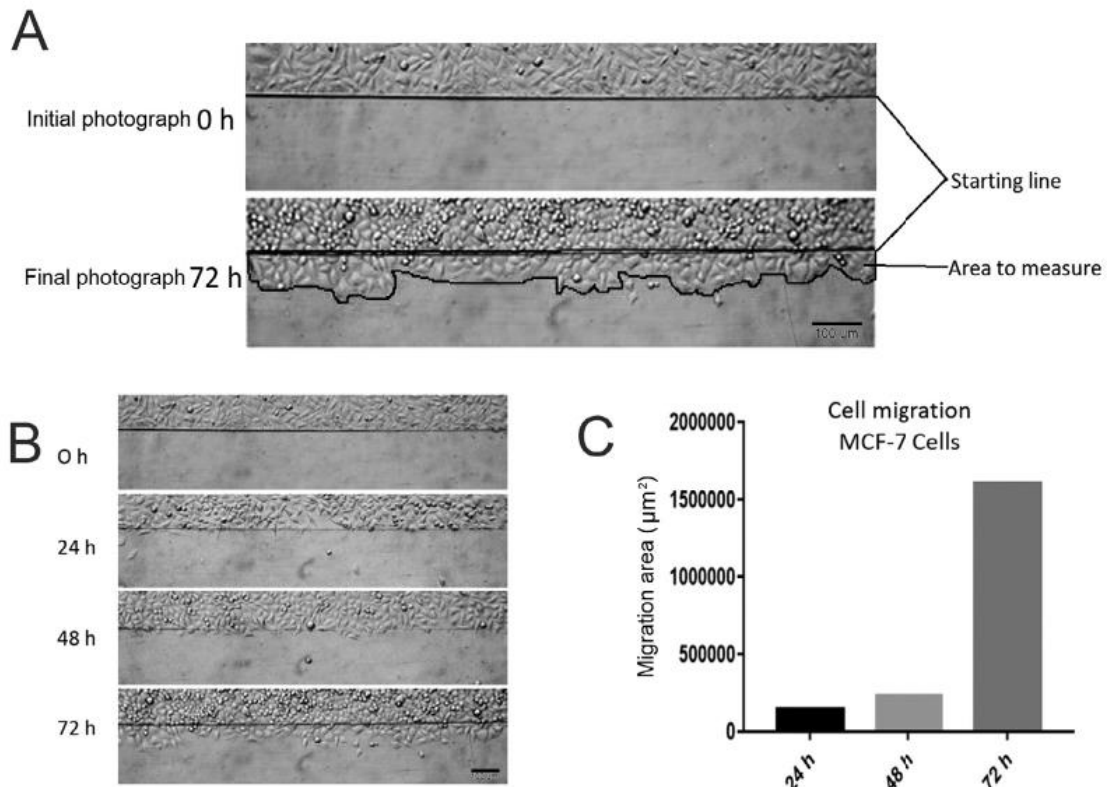
### Image analyses

To analyze the results in the captured images, the area covered by the cells will be measured taking the starting line as a reference (Fig. 1 D). The measurement in this case was carried out with the ImageJ program [8]. A picture of a scale bar is required to use as reference.

- (A) Open the image file of the scale bar in ImageJ by selecting File → Open → select the image.
- (B) Once the image is opened, it must be converted to 8 bits by selecting Image → Type → 8-bit.
- (C) To assign the known distance from the scale bar using the Straight tool and selecting the known distance, in the present case 100 μm, then select Analyze → Set scale → introduce the known distance and units → OK (Fig. 2 A).
- (D) Without closing the scale bar image, open the image file of the cells (the same procedure described in step (A)) and convert the image to 8 bits (step (B)).
- (E) Select the area occupied by the cell after the starting line using the Polygon selections tool, and then select Analyze → Measure, a new window will open with the results of the measurement, in this case the unit will be μm<sup>2</sup>(Fig. 2 B).



**Fig. 2.** (A) Scale bar. (B) Selection of area to be measured.



**Fig. 3.** (A) Measurement of the migration. (B) and (C) Comparison between different periods of time. (B) the migration area at 24, 48 and 72 h and (C) the graphic representation of the migration area in  $\mu\text{m}^2$  are observed.

In this article we show a simple, and low-cost method, that allows to measure the total cell migration area. Choosing a wound and healing assay, as well as the appropriate method of analyzing the data, can be challenging the first time that cell migration research is approached. A good start would be to know what equipment is available. The wound and healing assay is a method that can be carried out under standard culture conditions and without equipment other than that in common use.

The adaptation of the assay described here was developed due to the difficulties encountered in measuring migration areas, it is simple to implement, does not require different material and equipment, and avoids the disadvantage of variation in width and shape of the wound, since by marking only one starting line, this constitutes a reference point from which measurements can be carried out in a simpler and more practical way. Likewise, the acquisition of images is relatively simple and only requires an inverted microscope that has an image capture system or allows the adaptation of a photographic camera. To analyze the data, the only thing needed is a program that allows the measurements to be made, such as the freely available ImageJ software. Therefore, it constitutes a simple, cheap option and multiple advantages over the traditional method.

### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Acknowledgments

Supported by a research grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), with research grant number 467819.

### References

- [1] C.R. Justus, N. Leffler, M. Ruiz-Echevarria, V. Yang L, In vitro cell migration and invasion assays, *J. Vis. Exp.* (2014) 1–8.
- [2] H. Chen, J. Nalbantoglu, Ring cell migration assay identifies distinct effects of extracellular matrix proteins on cancer cell migration, *BMC Res Notes* 7 (2014).
- [3] T. Han, D. Kang, D. Ji, X. Wang, W. Zhan, M. Fu, et al., How does cancer cell metabolism affect tumor migration and invasion? *Cell Adhes. Migr.* 7 (2013) 395–403.
- [4] A. Stamm, K. Reimers, S. Strauß, P. Vogt, T. Scheper, I. Pepelanova, In vitro wound healing assays – state of the art, *BioNanoMaterials* 17 (2016) 79–87.
- [5] Y. Kam, C. Guess, L. Estrada, B. Weidow, V. Quaranta, A novel circular invasion assay mimics in vivo invasive behavior of cancer cell lines and distinguishes single-cell motility in vitro, *BMC Cancer* 8 (2008) 1–12.
- [6] T. Simoncini, C. Scorticati, P. Mannella, A. Fadiel, M.S. Giretti, X.-D. Fu, et al., Estrogen receptor  $\alpha$  interacts with  $G\alpha_{13}$  to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho Kinase/Moesin Pathway, *Mol. Endocrinol.* 20 (2006) 1756–1771.
- [7] P.L. da Silva, V.C. do Amaral, V. Gabrielli, M.M. Montt, P. Mannella, E.C. Baracat, et al., Prolactin promotes breast cancer cell migration through actin cytoskeleton remodeling, *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 6 (2015) 1–8.
- [8] M.D. Abramoff, P.J. Magalhães, S.J. Ram, Image processing with imageJ, *Biophoton. Int.* 11 (2004) 36–41.



Artículo de Revisión

## MicroRNAs and autism spectrum disorder: small tools for a complex disorder

MicroRNAs y trastorno del espectro autista: pequeñas herramientas para un desorden complejo

Jesús Antonio Lara-Reyes<sup>1</sup>; Alejandra Llanes-Durán<sup>1</sup>; Gonzalo Emiliano Aranda-Abreu<sup>2</sup>; María Elena Hernández-Aguilar<sup>2</sup>; Fausto Rojas-Durán<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Doctorado en Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, campus Xalapa. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. México.

Recibido: 09 de julio de 2020

Aceptado: 20 de diciembre de 2020

Puedes encontrar este artículo en: [www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2020/28/28.html](http://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2020/28/28.html)

### Abstract

The autism spectrum disorder (ASD) includes a complex group of neural development disorders that are characterized by deficiencies in social interaction, communication, and motor skills of individuals. ASD has an impact on public health, so it would be very useful to have biomarkers that allow early identification of the disorder. In this sense, microRNAs (miRNAs), which are regulators of a wide variety of cellular functions and whose alterations in their expression have been observed in individuals with ASD, are beginning to be considered as potential targets for the development of diagnostic and therapeutic strategies for these disorders. This review focuses on some studies about the participation of miRNAs in ASD in animal models, as well as in humans, and makes an approach to their possible use as biomarkers.

**Keywords:** MicroRNAs, autism spectrum disorder, biomarker.

### Resumen

El trastorno del espectro autista (TEA) abarca un grupo complejo de trastornos del desarrollo neural que se caracterizan por presentar deficiencias en la interacción social, la comunicación y motricidad del individuo. El TEA tiene un impacto en la salud pública, por lo que sería de gran utilidad contar con biomarcadores que permitan la identificación temprana del trastorno. En este sentido, los microRNAs (miRNAs), que son reguladores de una gran variedad de funciones celulares y cuyas alteraciones en su expresión han sido observadas en individuos con TEA, se comienzan a considerar como blancos potenciales para el desarrollo de estrategias de diagnóstico y terapéuticas para estos trastornos. Esta revisión se enfoca en algunos estudios sobre la participación de miRNAs en el TEA, en modelos animales y humanos, y hace una aproximación a su posible uso como biomarcadores.

**Palabras clave:** MicroRNAs, trastorno del espectro autista, biomarcadores.

\*Correspondencia: Fausto Rojas Durán, Instituto de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. México. Avenida Dr. Luis Castelazo Ayala S/N, colonia Industrial Ánimas, C.P. 91190. Tel.: (228) 8418900 Ext. 13051. Correo: [frojas@uv.mx](mailto:frojas@uv.mx)

Este es un artículo de libre acceso distribuido bajo los términos de la licencia de Creative Commons, (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en algún medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.



Comunicación Breve

**La prolactina promueve migración en las células de cáncer de próstata LNCaP**

Prolactin promotes migration in LNCaP prostate cancer cells

Rojas-Durán Fausto<sup>1\*</sup>, Herrera-Ortega Leobardo<sup>2</sup>, Aranda-Abreu Gonzalo E<sup>1</sup>, Herrera-Covarrubias Deissy<sup>1</sup>, Suárez-Medellín Jorge M<sup>1</sup>, Lara-Reyes Jesús A<sup>3</sup>, Jiménez-Buendía Mariana G<sup>3</sup>, Manzo-Denes Jorge<sup>1</sup>, Hernández-Aguilar María E<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. México. <sup>2</sup>Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. México. <sup>3</sup>Doctorado en Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. México.

Recibido: 05 de septiembre de 2017  
2017

Aceptado: 20 de diciembre de

Puedes encontrar este artículo en: [www.uv.mx/eneurobiología/vols/2017/19/19.html](http://www.uv.mx/eneurobiología/vols/2017/19/19.html)

**Resumen**

**Introducción:** La prolactina (PRL) es una hormona que participa en el desarrollo normal de la próstata, pero también en el desarrollo de patologías como el cáncer. El principal problema del cáncer de próstata es su capacidad de producir metástasis. Durante la metástasis las células anormales exhiben mayor migración celular comparado con las células normales; por lo tanto, el aumento de la migración celular es el principal mecanismo para que las células cancerígenas hagan metástasis durante el desarrollo del cáncer. Existe poca información acerca de la participación de la PRL en la migración celular, en especial en el cáncer de próstata. Por lo anterior, se evaluó el efecto de la PRL en la migración celular utilizando como modelo de estudio a las células LNCaP. **Objetivo:** Evaluar si la PRL induce migración en las células LNCaP. **Materiales y Métodos:** Utilizamos la técnica de "raspado y cicatrización de herida" para evaluar la migración celular. Se cultivaron células LNCaP en placas de 12 pozos hasta confluencia total, se hizo un rasguño a lo largo del eje de cada pozo y posteriormente fueron estimuladas con 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 nM de PRL. La migración de las células dentro del rasguño fue fotografiada a las 48 h. **Resultados:** La PRL indujo migración en las células LNCaP. **Conclusiones:** La PRL indujo migración en las células LNCaP, por lo que esta hormona podría tener alguna participación en la metástasis.

**Palabras clave:** PRL, Cáncer de próstata, Migración celular, Metástasis.

**Abstract**

**Introduction:** Prolactin (PRL) is a hormone that participates in the normal development of the prostate but also in the development of pathologies such as cancer. The main problem with prostate cancer is its ability to produce metastasis. During metastasis, abnormal cells exhibit increased cell migration compared to normal cells; therefore, increased cell migration is the main mechanism for cancer cells to become metastasized during cancer development. There is little information about the involvement of PRL in cell migration, especially in prostate cancer. Therefore, the effect of PRL on cell migration was evaluated using LNCaP cells as the study model. **Objective:** To evaluate whether PRL induce migration in LNCaP cells. **Materials and methods:** We used the "scratch/wound healing" technique to evaluate cell migration. LNCaP cells were grown in 12-well plates to full confluence, a scratch was made along the axis of each well and were subsequently stimulated with 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 and 200 nM PRL. Migration of the cells within the scratch was photographed at 48 h. **Results:** PRL induced migration in LNCaP cells. **Conclusions:** PRL induced migration in LNCaP cells, so this hormone could have some involvement in metastasis.

**Keywords:** PRL, Prostate cancer, Cell migration, Metastasis.

\*Correspondencia: Dr. Fausto Rojas Durán, Centro de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. México. Avenida Dr. Luis Castelazo Ayala S/N, colonia Industrial Ánimas, CP. 91190. Tel.: (228) 8418900 Ext. 16311. Correo: [frojas@uv.mx](mailto:frojas@uv.mx)

## Anexo 7. Presentaciones en congresos

### SFN 2018, San Diego, CA. Estados Unidos.

#### Poster

#### 774. Neuroendocrine Processes: Neuroendocrinology, Anatomy, and Physiology

**Location:** SDCC Halls B-H

**Time:** Wednesday, November 7, 2018, 1:00 PM - 5:00 PM

**Program #/Poster #:** 774.22/ZZ14

**Topic:** F.03. Neuroendocrine Processes

**Support:** Conacyt

**Title:** Effect of prolactin and estradiol in cell migration in MCF-7 cells

**Authors:** \*J. LARA REYES<sup>1</sup>, M. G. JIMENEZ BUENDIA<sup>2</sup>, M. HERNÁNDEZ AGUILAR<sup>4</sup>, G. E. ARANDA-ABREU<sup>4</sup>, J. MANZO DENES<sup>5</sup>, D. HERRERA COVARRUBIAS<sup>4</sup>, J. SUAREZ MEDELLIN<sup>4</sup>, C. A. PEREZ-ESTUDILLO<sup>4</sup>, C. SAMPIERI RAMIREZ<sup>6</sup>, A. AQUINO GÁLVEZ<sup>7</sup>, F. ROJAS-DURÁN<sup>3</sup>;

<sup>1</sup>Doctorado en Investigaciones Cerebrales, Xalapa, Mexico; <sup>2</sup>Doctorado en Investigaciones Cerebrales, <sup>3</sup>Univ. Veracruzana/Centro De Investigaciones Cerebrales, Univ. Veracruzana, Xalapa, Mexico; <sup>4</sup>Univ. Veracruzana/Centro De Investigaciones Cerebrales, Xalapa, Mexico; <sup>5</sup>Univ. Veracruzana/Centro De Investigaciones Cerebrales, Xalapa, Ver. Mexico, Mexico; <sup>6</sup>Inst. de Salud Publica, Xalapa, Mexico; <sup>7</sup>Inst. Nacional de Enfermedades Respiratorias y Pulmonares, Ciudad de Mexico, Mexico

**Abstract:** Prolactin (PRL) is a polypeptide hormone synthesized and secreted mainly by specialized cells of the pituitary gland. Estradiol (E<sub>2</sub>) is a sexual steroid hormone of the estrogen group and it is the most potent natural estrogen in humans. The release of both hormones is controlled by neural stimuli and their levels are regulated by the hypothalamic-pituitary axis. PRL participates in the development of the mammary gland and in the production of milk proteins in pregnancy and lactation. It exerts diverse biological effects through its interaction with specific membrane receptors that are widely distributed in the organism. E<sub>2</sub> has effects on the growth, development and differentiation of tissues, although its main action is observed in reproductive organs. In addition to both their physiological functions, it has been shown that they also participate in the development of pathologies such as breast cancer, however, it is not clear whether these hormones have any involvement in cell migration, a crucial step in the development of metastasis, even less known are the mechanisms through which these hormones may be regulating cell migration processes. Therefore, we evaluated the effect of stimulation with PRL and E<sub>2</sub> in cell migration in MCF-7 cells. The results showed that PRL (2 nM) increased cell migration in MCF-7 cells and E<sub>2</sub> seems to have no effect. The data suggest that PRL, might be involved in metastasis through inducing cell migration.

**Disclosures:** J. Lara reyes: None. M.G. Jimenez buendia: None. M. Hernandez: None. G.E. Aranda-Abreu: None. J. Manzo Denes: None. D. Herrera-Covarrubias: None. J. Suarez Medellin: None. C.L. Sampieri: None. A. Aquino Gálvez: None. F. Rojas Duran: None.



## SFN 2019 Chicago, IL. Estados Unidos.

### Poster

#### 673. Hormone Modulation of Behavior and Physiology IV

**Location:** Hall A

**Time:** Wednesday, October 23, 2019, 8:00 AM - 12:00 PM

**Program #/Poster #:** 673.20/O4

**Topic:** F.03. Neuroendocrine Processes

**Support:** CONACYT/622677

**Title:** Effect of prolactin and estradiol in MMP2 activity in conditioned medium from MCF-7 cells

**Authors:** \*J. LARA REYES<sup>1</sup>, M. G. JIMENEZ BUENDIA<sup>2</sup>, M. HERNÁNDEZ AGUILAR<sup>4</sup>, G. E. ARANDA-ABREU<sup>4</sup>, J. MANZO DENES<sup>5</sup>, D. HERRERA COVARRUBIAS<sup>4</sup>, J. SUAREZ MEDELLIN<sup>4</sup>, C. A. PEREZ-ESTUDILLO<sup>4</sup>, C. SAMPIERI RAMIREZ<sup>6</sup>, A. AQUINO GÁLVEZ<sup>7</sup>, F. ROJAS-DURÁN<sup>3</sup>;

<sup>1</sup>Doctorado en Investigaciones Cerebrales, Xalapa, Mexico; <sup>2</sup>Doctorado en Investigaciones Cerebrales, <sup>3</sup>Univ. Veracruzana/Centro De Investigaciones Cerebrales, Univ. Veracruzana, Xalapa, Mexico; <sup>4</sup>Univ. Veracruzana/Centro De Investigaciones Cerebrales, Xalapa, Mexico; <sup>5</sup>Univ. Veracruzana/Centro De Investigaciones Cerebrales, Xalapa, Ver. Mexico, Mexico; <sup>6</sup>Inst. de Salud Publica, Xalapa, Mexico; <sup>7</sup>Inst. Nacional de Enfermedades Respiratorias y Pulmonares, Ciudad de Mexico, Mexico

**Abstract:** Prolactin (PRL) is a polypeptide hormone synthesized and secreted mainly by specialized cells of the pituitary gland. Estradiol (E<sub>2</sub>) is a sexual steroid hormone of the estrogen group and it is the most potent natural estrogen in humans. The release of both hormones is controlled by neural stimuli and their levels are regulated by the hypothalamic-pituitary axis. PRL participates in the development of the mammary gland and in the production of milk proteins in pregnancy and lactation. It exerts diverse biological effects through its interaction with specific membrane receptors that are widely distributed in the organism. E<sub>2</sub> has effects on the growth, development and differentiation of tissues, although its main action is observed in reproductive organs. In addition to both their physiological functions, it has been shown that they also participate in the development of pathologies such as breast cancer, however, it is not clear whether these hormones have any involvement in cell migration, a crucial step in the development of metastasis, and in the regulation of the activity of matrix metalloprotease 2 (MMP-2), that is related to the cell migration process. We found that PRL (2 nM) increased cell migration in MCF-7 cells and E<sub>2</sub> seems to have no effect and we evaluated the effect of stimulation with PRL and E<sub>2</sub> in MMP-2 activity in the conditioned medium from MCF-7 cells.

**Disclosures:** J. Lara Reyes: None. M.G. Jimenez Buendia: None. M. Hernández Aguilar: None. G.E. Aranda-Abreu: None. J. Manzo Denes: None. D. Herrera Covarrubias: None. J. Suarez Medellin: None. C.A. Perez-Estudillo: None. C. Sampieri Ramirez: None. A. Aquino Gálvez: None. F. Rojas-Durán: None.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., Brannigan, B. W., Kapur, R., Stott, S. L., Shioda, T., Ramaswamy, S., Ting, D. T., Lin, C. P., Toner, M., Haber, D. A., y Maheswaran, S. (2014). Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.013>
- Ahmad, N., Chen, S., Wang, W., y Kapila, S. (2018). 17 $\beta$ -estradiol Induces MMP-9 and MMP-13 in TMJ Fibrochondrocytes via Estrogen Receptor  $\alpha$ . *Journal of Dental Research*, 97(9), 1023–1030. <https://doi.org/10.1177/0022034518767108>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, Ma., Roberts, K., y Walter, P. (2002). *Biología molecular de la célula* (5a ed.). Editorial Omega.
- Amar, S., Smith, L., y Fields, G. B. (2017). Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(11), 1940–1951. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.04.015>
- Arévalo, F., y Morales, E. M. D. (2007). *E-cadherina : expresión molecular en carcinomas de estómago de tipo difuso y tipo intestinal . Estudio realizado en Lima , Perú.* 99, 325–329.
- Arvelo, F., y Cotte, C. (2006). Metaloproteasas en la progresión tumoral. Revisión . *Invest Clin*, 47(2), 185–205.
- Arvelo, Francisco, y Poupon, M. (2001). Aspectos moleculares y celulares de la metastasis cancerosa. *Acta Científica Venezolana*, 52, 304–312.
- Ascenzo, J., Tejada, A., Ascenzo, Ja., y Ascenzo, A. (1988). Prolactina y Reproduccion. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 33(5), 39–52.
- Azios, N. G., y Dharmawardhane, S. F. (2005). Resveratrol and Estradiol Exert Disparate Effects on Cell Migration, Cell Surface Actin Structures, and Focal Adhesion Assembly in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells. *Neoplasia*, 7(2), 128–140. <https://doi.org/10.1593/neo.04346>
- Banerjee, K., y Resat, H. (2016). Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A



- review. *International Journal of Cancer*, 138(11), 2570–2578.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.29923>
- Bartsch, J. E., Staren, E. D., y Appert, H. E. (2003). Matrix metalloproteinase expression in breast cancer. *Journal of Surgical Research*, 110(2), 383–392.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-4804\(03\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S0022-4804(03)00007-6)
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C. R., y LaPensee, E. W. (1979). What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine Reviews*, 29(1), 1–41.  
<https://doi.org/10.1210/er.2007-0017>
- Benedetti, I., y Reyes, N. (2015). Transición epitelial-mesenquimal en la progresión del adenocarcinoma prostático. *Iatreia*, 28, 420–433. <https://doi.org/10.17533/udea>
- Benson, C. S., Babu, S. D., Radhakrishna, S., Selvamurugan, N., y Sankar, B. R. (2013). Expression of matrix metalloproteinases in human breast cancer tissues. *Disease Markers*, 34(6), 395–405. <https://doi.org/10.3233/DMA-130986>
- Berridge, M. J. (2012). *Cell Signalling Pathways*. 1–130.  
<https://doi.org/10.1042/csb0001002>
- Binart, N., Bachelot, A., y Bouilly, J. (2010). Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(6), 362–368.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.01.008>
- Bjornstrom, L., y Sjoberg, M. (2005). Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling : Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Molecular Endocrinology*, 19(4), 833–842. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0486>
- Bjornstrom, A., y Sjoberg, M. (2002). Signal Transducers and Activators of Transcription as Downstream Targets of Nongenomic Estrogen. *Molecular Endocrinology*, 16(October), 2202–2214. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0072>
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., y Kelly, P. (1998). Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews*, 19(3), 225–268.
- Bonkhoff, H., y Berges, R. (2009). The Evolving Role of Oestrogens and Their Receptors in the Development and Progression of Prostate Cancer. *European Urology*, 55(3),

533–542. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.10.035>

Bonnans, C., Chou, J., y Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(12), 786–801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904.Remodelling>

Boutros, T., Chevet, E., y Metrakos, P. (2008). *Mitogen-Activated Protein ( MAP ) Kinase / MAP Kinase Phosphatase Regulation : Roles in Cell Growth , Death , and Cancer*. 60(3), 261–310. <https://doi.org/10.1124/pr.107.00106.261>

*Breast Anatomy | SEER Training*. (n.d.). Retrieved May 14, 2021, from <https://training.seer.cancer.gov/breast/anatomy/>

*Breast Cancer | CDC*. (n.d.). Retrieved May 7, 2021, from <https://www.cdc.gov/cancer/breast/index.htm>

Cai, Y., Zhang, M., Qiu, X., Wang, B., Fu, Y., Zeng, J., Bai, J., y Yang, G. (2017). Upregulation of FBXW7 Suppresses Renal Cancer Metastasis and Epithelial Mesenchymal Transition. *Disease Markers*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/8276939>

Chen, H., y Nalbantoglu, J. (2014). Ring cell migration assay identifies distinct effects of extracellular matrix proteins on cancer cell migration. *BMC Research Notes*, 7(183).

Chen, P., y Parks, W. C. (2009). Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108(6), 1233–1243. <https://doi.org/10.1002/jcb.22363>

Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M. H., Raf, B., Raf, B., y Raf, A. (2001). *MAP Kinases*. 214.

Cheung, K. J., Gabrielson, E., Werb, Z., y Ewald, A. J. (2013). Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell*, 155(7), 1639–1651. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.029>

Colomer, R., Montero, S., Lluch, A., Ojeda, B., Barnadas, A., Casado, A., Massutí, B., Cortés-Funes, H., y Lloveras, B. (2000). Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 6(6), 2356–2362.

- Coronato, S., Laguens, G., y Di Girolamo, V. (2012). Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patologia tumoral. *Medicina (Argentina)*, 72(6), 495–502.  
<https://doi.org/ISSN: 0025-7680>
- Da Silva, P. L., Do Amaral, V. C., Gabrielli, V., Montt, M. M., Mannella, P., Baracat, E. C., Soares, J. M., y Simoncini, T. (2015). Prolactin promotes breast cancer cell migration through actin cytoskeleton remodeling. *Frontiers in Endocrinology*, 6(DEC), 1–8.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00186>
- do Amaral, V. C., da Silva, P. L., y Simoncini, T. (2015). Prolactin promotes T47D cell motility through actin cytoskeleton. *Maturitas*, 81(1), 192.  
<https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.02.270>
- Dongre, A., y Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(February). <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- Doyle, A. D., Petrie, R. J., Kutys, M. L., y Yamada, K. M. (2013). Dimensions in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(5), 642–649.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.06.004>
- Doyle, A. D., Wang, F. W., Matsumoto, K., y Yamada, K. M. (2009). One-dimensional topography underlies three-dimensional fi brillar cell migration. *Journal of Cell Biology*, 184(4), 481–490. <https://doi.org/10.1083/jcb.200810041>
- Dziennis, S., Jia, T., Rønnekleiv, O. K., Hurn, P. D., y Alkayed, N. J. (2007). Role of Signal Transducer and Activator of Transcription-3 in Estradiol-Mediated Neuroprotection. *The Journal of Neuroscience*, 27(27), 7268–7274.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1558-07.2007>
- Eiseler, T., Döppler, H., Yan, I. K., Goodison, S., y Storz, P. (2009). Protein kinase D1 regulates matrix metalloproteinase expression and inhibits breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Research*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/bcr2232>
- Ewertz, M., Duffy, S. W., Adami, H. -O, Kvåle, G., Lund, E., Meirik, O., Møller, A., Soini, I., y Tulinus, H. (1990). Age at first birth, parity and risk of breast cancer: A meta-analysis of 8 studies from the nordic countries. *International Journal of Cancer*, 46(4), 597–603. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910460408>

- Flores-Delgado, G., Anderson, K. D., y Warburton, D. (2003). Nongenomic estrogen action regulates tyrosine phosphatase activity and tuberin stability. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 199(1–2), 143–151. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00288-5](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00288-5)
- Foidart, J. M., Colin, C., Denoo, X., Desreux, J., Béliard, A., Fournier, S., y De Lignières, B. (1998). Estradiol and progesterone regulate the proliferation of human breast epithelial cells. *Fertility and Sterility*, 69(5), 963–969. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00042-9)
- Fregozo, C. S., y Vega, M. I. P. (2012). Participación de las proteínas de unión a la actina y vías de señalización asociadas a la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas. *Neurología*, 27(7), 421–431. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.10.005>
- Freije, J. M. P., Díez-Itza, I., Balbín, M., Sánchez, L. M., Blasco, R., Tolivia, J., y López-Otín, C. (1994). Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *Journal of Biological Chemistry*, 269(24), 16766–16773.
- Friedl, P., y Wolf, K. (2009). Plasticity of cell migration : a multiscale tuning model. *Journal of Cell Biology*, 188(1), 11–19. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909003>
- Fujimoto, S., Hayashi, R., Hara, S., Sasamoto, Y., Harrington, J., Tsujikawa, M., y Nishida, K. (2019). KLF4 prevents epithelial to mesenchymal transition in human corneal epithelial cells via endogenous TGF- $\beta$ 2 suppression. *Regenerative Therapy*, 11, 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.08.003>
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., y Yamada, K. M. (2001). Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(11), 793–805. <https://doi.org/10.1038/35099066>
- Gest, C., Joimel, U., Huang, L., Pritchard, L. L., Petit, A., Dulong, C., Buquet, C., Hu, C. Q., Mirshahi, P., Laurent, M., Fauvel-Lafève, F., Cazin, L., Vannier, J. P., Lu, H., Soria, J., Li, H., Varin, R., y Soria, C. (2013). Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: Differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer*, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-63>
- Goto, T., Endo, T., Henmi, H., Kitajima, Y., Kiya, T., Nishikawa, A., Manase, K., Sato, H., y Kudo, R. (1999). Gonadotropin-releasing hormone agonist has the ability to induce

increased matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane type 1-MMP expression in corpora lutea, and structural luteolysis in rats. *Journal of Endocrinology*, 161(3), 393–402. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1610393>

Gumbiner, B. M. (2005). *REGULATION OF CADHERIN-MEDIATED ADHESION IN MORPHOGENESIS*. 6(August), 622–634. <https://doi.org/10.1038/nrm1699>

Gunson, M. J., y Arnett, G. W. (2010). Condylar Resorption, Matrix Metalloproteinases, and Tetracyclines. *RWISO Journal*, September, 37–44. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59499-0.00025-8>

Hammer, A., y Diakonova, M. (2016). Prolactin-induced PAK1 tyrosyl phosphorylation promotes FAK dephosphorylation, breast cancer cell motility, invasion and metastasis. *BMC Cell Biology*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0109-5>

Hammer, A., Rider, L., Oladimeji, P., Cook, L., Li, Q., Mattingly, R. R., y Diakonova, M. (2013). Tyrosyl phosphorylated PAK1 regulates breast cancer cell motility in response to prolactin through filamin A. *Molecular Endocrinology*, 27(3), 455–465. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1291>

Hanna, S., y El-sibai, M. (2013). Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cellular Signalling*, 25(10), 1955–1961. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.04.009>

Harris, H. A. (2007). Estrogen receptor- $\beta$ : Recent lessons from in vivo studies. *Molecular Endocrinology*, 21(1), 1–13. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0459>

Hassiotou, F., y Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical Anatomy*, 26(1), 29–48. <https://doi.org/10.1002/ca.22165>

Hattori, N., Mochizuki, S., Kishi, K., Nakajima, T., Takaishi, H., D'Armiento, J., y Okada, Y. (2009). MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis, and contraction in mouse skin wound healing. *American Journal of Pathology*, 175(2), 533–546. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.081080>

Hernández, D. E. (2016). BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA. *Revista Venezolana de Oncología*, 28(3), 188–200.

Huang, C., Jacobson, K., y Schaller, M. D. (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell*

*Sci*, 117(20), 4619–4628. <https://doi.org/10.1242/jcs.01481>

Hughes, K., y Watson, C. J. (2018). The multifaceted role of STAT3 in mammary gland involution and breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms19061695>

Hynes, R. O., y Naba, A. (2012). Overview of the matrisome-An inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>

Inés Benedetti, y Niradiz Reyes. (2015). Transición epitelial-mesenquimal en la progresión del adenocarcinoma prostático. *Iatreia*, 28(4), 420–433. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v28n4a07.420>

Insua-Rodríguez, J., y Oskarsson, T. (2016). The extracellular matrix in breast cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.017>

Jacenic, D., y Krajewska, W. M. (2020). Significance of G Protein-Coupled Estrogen Receptor in the Pathophysiology of Irritable Bowel Syndrome, Inflammatory Bowel Diseases and Colorectal Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 11(June), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00390>

Jia, M., Dahlman-Wright, K., y Gustafsson, J. Å. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 29(4), 557–568. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.008>

Jordan, V. (1986). *Strogen/Antiestrogen Action and Breast Cancer Therapy*. University of Wisconsin Press.

Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., y Yang, L. V. (2014). In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *Journal of Visualized Experiments*, 88, 1–8. <https://doi.org/10.3791/51046>

Kelly, M. J., Levin, E. R., Kelly, M. J., y Levin, E. R. (2001). Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *TRENDS in Endocrinology y Metabolism*, 12(4), 152–156.

Key, T. J., Verkasalo, P. K., y Banks, E. (2017). Epidemiology of breast cancer. *The*

*Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*, 44(0), 207-218.e4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35955-9.00015-5>

Klampfer, L. (2006). Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs): Novel Targets of Chemopreventive and Chemotherapeutic Drugs. *Current Cancer Drug Targets*, 6(2), 107–121. <https://doi.org/10.2174/156800906776056491>

Knowlton, A. A. y L. A. R. (2017). Estrogen and the Cardiovascular System HHS Public Access. *Physiology y Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.007>. Estrogen

Koehler, K. F., Helguero, L. A., Haldosén, L. A., Warner, M., y Gustafsson, J. Å. (2005). Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrine Reviews*, 26(3), 465–478. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0027>

Kwon, O., Kang, E. S., Kim, I., Shin, S., Kim, M., Kwon, S., Oh, S. R., Ahn, Y. S., y Kim, C. H. (2014). GPR30 mediates anorectic estrogen-induced STAT3 signaling in the hypothalamus. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 63(11), 1455–1461. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.07.015>

Lamouille, S., Xu, J., y Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>. Molecular

Lara-reyes, J. A., Jimenez-buendia, M. G., Aranda-abreu, G. E., Herrera-covarrubias, D., Luz, C., Aquino-galvez, A., Manzo-denes, J., Hernández-aguilar, M. E., y Rojas-durán, F. (2020). Razor scrape assay , an alternative variation to wound and healing assays. *MethodsX*, 7(November). <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101135>

Lauffenburger, D. A., y Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell*, 84(3), 359–369. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81280-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81280-5)

Layde, P. M., Webster, L. A., Baughman, A. L., Wingo, P. A., Rubin, G. L., y Ory, H. W. (1989). The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer. *Journal of Clinical Epidemiology*, 42(10), 963–973. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(89\)90161-3](https://doi.org/10.1016/0895-4356(89)90161-3)

- Leeman, M. F., Curran, S., y Murray, G. I. (2002). *The Structure , Regulation , and Function of Human Matrix Metalloproteinase-13*. 37(3), 149–166.
- Lei, H., Leong, D., Smith, L. R., y Barton, E. R. (2013). Matrix metalloproteinase 13 is a new contributor to skeletal muscle regeneration and critical for myoblast migration. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 305(5), 529–538.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00051.2013>
- Levy, D. E., y Jr, J. E. D. (2002). *STATS : TRANSCRIPTIONAL CONTROL AND BIOLOGICAL IMPACT*. 3(September). <https://doi.org/10.1038/nrm909>
- Li, ie J., y Johnson, A. R. (2011). Selective MMP13 Inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 31(6), 863–894. <https://doi.org/10.1002/med>
- Madariaga, T. D., Herrero, A. S., Molina, C. V., Ramirez, M. R., Troncoso, D., Madariaga, I., Aldana, S., Chaparro, V., Rey, L., Ramírez, A., Montoya, C., Valderrama, A., y Cañas, A. (2017). Transición epitelio mesénquima : de lo molecular a lo fisiológico. *Universitas Médica*, 58(4), 1–10.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.umed58-4.temm> Transición
- Manavathi, B., y Kumar, R. (2006). Steering Estrogen Signals From the Plasma Membrane to the Nucleus: Two Sides of the Coin. *Journal Cellular Physiology*, 207, 594–604. <https://doi.org/10.1002/JCP>
- Maroni, P. D., Koul, S., Meacham, R. B., y Koul, H. K. (2004). *Cell Communication and Signaling Mitogen Activated Protein kinase signal transduction pathways in the prostate*. 13, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-2-5>
- Martin, M., Herrero, A., y Echavarría, I. (2015). Cáncer de mama. *Arbor*, 773, 0–4.
- Mathey, L. I. P., Manzo Denes, J., Goffi, V., Kessal, K., Aranda-Abreu, G. E., Estudillo, C. A., y Aguilar, M. H. (2009). Prolactina: mecanismos intracelulares involucrados en la función prostática. *Revista Médica de La Universidad Veracruzana*, 9(228), 36–40.  
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2014.04.007>
- Mattila, P. K., y Lappalainen, P. (2008). Filopodia: Molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(6), 446–454.  
<https://doi.org/10.1038/nrm2406>



- Maus, M. V., Reilly, S. C., y Clevenger, C. V. (1999). Prolactin as a chemoattractant for human breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 140(11), 5447–5450.
- Méndez, I. C., Cariño, C., y Díaz, L. (2005). Prolactin in the immunological system: Synthesis and biological effects. In *Revista de Investigacion Clinica* (Vol. 57, Issue 3, pp. 447–456).
- Mendiola, A. V., y Cruz, I. S. (2005). *Vía JAK-STAT: Una visión general*. 8, 14–25.
- Mendonsa, A., Na, T.-Y., y Gumbiner, B. (2018). E-cadherin in Contact Inhibition and Cancer. *Oncogene*, 37(35).
- Moreno-Jaime, B., Esparza-López, J., Castro-Sánchez, A., Escobar-Arriaga, E., Medina-Franco, H., León-Rodríguez, E., y De Jesus Ibarra-Sanchez, M. (2016). El factor de crecimiento epidérmico induce transición epitelio-mesénquima en cultivos primarios de cáncer de mama. *Gaceta Mexicana de Oncología*.  
<https://doi.org/10.1016/j.gamo.2016.02.003>
- Morrison, D. K. (2012). *MAP Kinase Pathways*. 1–6.
- Nagafuchi, H., Suzuki, N., Kaneko, A., Asai, T., y Sakane, T. (1999). Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, 26(9), 1890–1900.
- Nantajit, D., Lin, D., y Li, J. J. (2015). The network of epithelial–mesenchymal transition: potential new targets for tumor resistance. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(10), 1697–1713. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1840-y>
- Naranjo, T. Á., Noguera-Salvá, R., y Guerrero, F. F. (2009). La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I). *Revista Espanola de Patología*, 42(4), 249–261. [https://doi.org/10.1016/S1699-8855\(09\)70192-8](https://doi.org/10.1016/S1699-8855(09)70192-8)
- Nilsson, S., Ma, S., Ma, S., Treuter, E., Tujague, M., y Thomsen, J. (2001). Mechanisms of Estrogen Action. *Physiological Reviews*, 81(4), 1535–1565.
- Nunes, C., Silva, C., Correia-Branco, A., y Martel, F. (2017). Lack of effect of the procarcinogenic 17 $\beta$ -estradiol on nutrient uptake by the MCF-7 breast cancer cell line. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 90, 287–294.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.069>

Osako, Y., Seki, N., Kita, Y., Yonemori, K., Koshizuka, K., Kurozumi, A., Omoto, I., Sasaki, K., Uchikado, Y., Kurahara, H., Maemura, K., y Natsugoe, S. (2016). Regulation of MMP13 by antitumor microRNA-375 markedly inhibits cancer cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology*, 49(6), 2255–2264. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3745>

Park, S. J., Kim, J. G., Kim, N. D., Yang, K., Shim, J. W., y Heo, K. (2016). Estradiol, TGF- $\beta$ 1 and hypoxia promote breast cancer stemness and EMT-mediated breast cancer migration. *Oncology Letters*, 11(3), 1895–1902. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4115>

Peng, J., Zuo, Y., Huang, L., Okada, T., Liu, S., Zuo, G., Zhang, G., Tang, J., Xia, Y., y Zhang, J. H. (2019). Activation of GPR30 with G1 attenuates neuronal apoptosis via src/EGFR/stat3 signaling pathway after subarachnoid hemorrhage in male rats. *Experimental Neurology*, 320(March), 113008. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113008>

Pérez-requena, J., Palomo-gonzález, M. J., Baena-cañada, J. M., Córdoba-doña, J. A., Alonso-redondo, E., y Escolar-pujolar, A. (2002). Valor pronóstico de la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en el cáncer de mama. *Rev Esp Patol*, 35(3), 315–324.

Pharoah, P. D. P., Day, N. E., Duffy, S., Easton, D. F., y Ponder, B. A. J. (1997). Family history and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 71(5), 800–809. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970529\)71:5<800::AID-IJC18>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970529)71:5<800::AID-IJC18>3.0.CO;2-B)

Priceman, S. J., Kujawski, M., Shen, S., Cherryholmes, G. A., Lee, H., Zhang, C., Kruper, L., Mortimer, J., Jove, R., Riggs, A. D., y Yu, H. (2013). Regulation of adipose tissue T cell subsets by Stat3 is crucial for diet-induced obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(32), 13079–13084. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311557110>

Qi, M., y Elion, E. A. (2005). *MAP kinase pathways MAP Kinase Pathways*. 2005. <https://doi.org/10.1242/jcs.02470>

Reddy, K. B., Nabha, S. M., y Atanaskova, N. (2003). *Role of MAP kinase in tumor*

*progression and invasion*. 395–403.

- Rojas-Durán, F., Herrera-Ortega, L., Aranda-Abreu, G. E., Herrera-Covarrubias, D., Suárez-Medellin, J. M., Lara-Reyes, J., Jiménez-Buendía, M. G., Manzo-Denes, J., y Hernández-Aguilar, M. E. (2017). La prolactina promueve migración en las células de cáncer de próstata LNCaP. *ENeurobiología*, 8(19), 1–9.
- Saiganesh, S., Saathvika, R., Udhaya, V., Arumugam, B., Vishal, M., y Selvamurugan, N. (2018). Matrix metalloproteinase-13: A special focus on its regulation by signaling cascades and microRNAs in bone. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 338–349. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.091>
- Sakaguchi, M., Oka, M., Iwasaki, T., Fukami, Y., y Nishigori, C. (2012). Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(7), 1877–1885. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.45>
- Sánchez, L., Hernandez, V., y López, R. (2005). PAPEL DE LAS CADHERINAS EN LA METÁSTASIS. *REB*, 24, 97–103.
- Schaks, M., Giannone, G., y Rottner, K. (2019). Actin dynamics in cell migration. *Essays In Biochemistry*, 0(August), EBC20190015. <https://doi.org/10.1042/ebc20190015>
- Segatto, I., Baldassarre, G., y Belletti, B. (2018). STAT3 in breast cancer onset and progression: A matter of time and context. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 1–9. <https://doi.org/10.3390/ijms19092818>
- Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., y K.K.Sharma. (2010). Various tipos and management of breast cancer: an overview. *The Lancet Neurology*, 9(6), 571. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70128-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70128-9)
- Shemanko, C. S. (2016). Prolactin receptor in breast cancer: Marker for metastatic risk. *Journal of Molecular Endocrinology*, 57(4), R153–R165. <https://doi.org/10.1530/JME-16-0150>
- Stefanoska, I., Jovanović Krivokuća, M., Vasilijić, S., Čujić, D., y Vićovac, L. (2013). Prolactin stimulates cell migration and invasion by human trophoblast in vitro. *Placenta*, 34(9), 775–783. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.06.305>

- Sternlicht, M. D., y Bergers, G. (2000). Matrix metalloproteinases as emerging targets in anticancer therapy: Status and prospects. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 4(5), 609–633. <https://doi.org/10.1517/14728222.4.5.609>
- Su, B., y Karin, M. (1996). Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Current Opinion in Immunology*, 8(3), 402–411. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(96\)80131-2](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(96)80131-2)
- Takeda-Matsubara, Y., Nakagami, H., Iwai, M., Cui, T., Shiuchi, T., Akishita, M., Nahmias, C., Ito, M., y Horiuchi, M. (2002). Growth-Promoting Effect of Angiotensin II. *Hypertension*, 39, 41–45.
- Tan, D., Chen, K. H. E., Khoo, T., y Walker, A. M. (2011). Prolactin increases survival and migration of ovarian cancer cells: Importance of prolactin receptor type and therapeutic potential of S179D and G129R receptor antagonists. *Cancer Letters*, 310(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.06.014>
- Teng, Y., Ross, J. L., Cowel, J. K., y L. (2014). The involvement of JAK-STAT3 in cell motility, invasion, and metastasis. *Landes Bioscience*.
- Thiery, J. P., y Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), 131–142. <https://doi.org/10.1038/nrm1835>
- Tong, J., Zhang, H., Wu, Y., Wang, Y., Li, Q., y Liu, Y. (2016). Oestrogens and prolactin regulate mammary gland epithelial cell growth by modulation of the WNT signal pathway. *Slovenian Veterinary Research*, 53(3), 141–149.
- Tsai, J. H., y Yang, J. (2013). Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes and Development*, 27(20), 2192–2206. <https://doi.org/10.1101/gad.225334.113>
- Uría, J. A., Stahle-Bäckdahl, M., Seiki, M., Fueyo, A., y López-Otín, C. (1997). Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer Research*, 57(21), 4882–4888.
- Valdespino-gómez, V. M., Margarita, P., y Valdespino-castillo, V. E. (2015). CIRUGÍA y CIRUJANOS Interacción de las vías de señalización intracelulares participantes en

la proliferación celular : potencial blanco de intervencionismo terapéutico. *Cirugía y Cirujanos*, 83(2), 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.circir.2015.04.015>

VanderVorst, K., Dreyer, C. A., Konopelski, S. E., Lee, H., Ho, H. Y. H., y Carraway, K. L. (2019). Wnt/PCP signaling contribution to carcinoma collective cell migration and metastasis. *Cancer Research*, 79(8), 1719–1729. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2757>

Verret, B., Cortes, J., Bachelot, T., Andre, F., y Arnedos, M. (2019). Efficacy of PI3K inhibitors in advanced breast cancer. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(10), x12–x20. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz381>

Visvader, J. E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *GENES y DEVELOPMENT*, 23, 2563–2577. <https://doi.org/10.1101/gad.1849509.Freely>

Walsh, T., y King, M. C. (2007). Ten Genes for Inherited Breast Cancer. *Cancer Cell*, 11(2), 103–105. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.010>

Wang, J. R., Li, X. H., Gao, X. J., An, S. C., Liu, H., Liang, J., Zhang, K., Liu, Z., Wang, J., Chen, Z., y Sun, W. (2013). Expression of MMP-13 is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17(4), 427–435.

Wang, W., Wang, L., Xu, Z., Yin, Y., Su, J., Niu, X., y Cao, X. (2016). Effects of estradiol on reduction of osteoarthritis in rabbits through effect on matrix metalloproteinase proteins. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(3), 310–315. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2016.6650>

Wawrzak, Z., Duax, W. L., Strong, P. D., y Weisz, J. (1988). Steroid structure and function. Molecular conformation of 4-hydroxyestradiol and its relation to other catechol estrogens. *Journal of Steroid Biochemistry*, 29(4), 387–392. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(88\)90247-6](https://doi.org/10.1016/0022-4731(88)90247-6)

World Cancer Research Fund, I. (2018). The Cancer Process. *The Prevention of Cancer*, 110–117. <https://doi.org/10.4324/9781315134178-7>

- Wu, D., Ding, J., WANG, L., Pan, H., ZHOU, Z., Zhou, J., U, P., 1Department, y Qu, P. (2013). MicroRNA-125b inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in bladder cancer. *Oncology Letters*, 5(3), 829–834. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1123>
- Yang, Sheau-fang, Hou, M., Chen, F., Ou-yang, F., y Wu, Y. (2016). Prognostic value of protein inhibitor of activated STAT3 in breast cancer patients receiving hormone therapy. *BMC Cancer*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2063-1>
- Yang, Shuhui, Cao, Z., Zhu, J., Zhang, Z., Zhao, H., Zhao, L., Sun, X., y Wang, X. (2019). In Vitro Monolayer Culture of Dispersed Neural Stem Cells on the E-Cadherin-Based Substrate with Long-Term Stemness Maintenance. *ACS Omega*, 4(19), 18136–18146. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02053>
- Yeh, Y. T., Ou-Yang, F., Chen, I. F., Yang, S. F., Wang, Y. Y., Chuang, H. Y., Su, J. H., Hou, M. F., y Yuan, S. S. F. (2006). STAT3 ser727 phosphorylation and its association with negative estrogen receptor status in breast infiltrating ductal carcinoma. *International Journal of Cancer*, 118(12), 2943–2947. <https://doi.org/10.1002/ijc.21771>
- Yi, R. D., Chung, J., Pang, P., y Simpkins, J. W. (2005). Role of protein phosphatases in estrogen-mediated neuroprotection. *Journal of Neuroscience*, 25(31), 7191–7198. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1328-05.2005>
- Yi, Y., Cheng, J. C., Klausen, C., y Leung, P. C. K. (2019). Activin A promotes ovarian cancer cell migration by suppressing E-cadherin expression. *Experimental Cell Research*, 382(2), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.06.016>
- Yoshida, G. J., y Saya, H. (2014). Inversed relationship between CD44 variant and c-Myc due to oxidative stress-induced canonical Wnt activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(2), 622–627. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.016>
- You, Y., Shan, Y., Chen, J., Yue, H., You, B., Shi, S., Li, X., y Cao, X. (2015). Matrix metalloproteinase 13-containing exosomes promote nasopharyngeal carcinoma metastasis. *106(12)*. <https://doi.org/10.1111/cas.12818>
- Yu, T., Wu, Y., Helman, J. I., Wen, Y., Wang, C., y Li, L. (2011). CXCR4 promotes oral

squamous cell carcinoma migration and invasion through inducing expression of MMP-9 and MMP-13 via the ERK signaling pathway. *Molecular Cancer Research*, 9(2), 161–172. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0386>

Zambrano, a, Lope, E., Gonza, J. J. A., González, L., Zambrano, a, Lazaro-Trueba, I., Lopéz, E., González, J. J. a, Martín-Pérez, J., y Aranda, a. (2009). Activation of the unliganded estrogen receptor by prolactin in breast cancer cells. *Oncogene*, 28, 1298–1308. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.473>

Zhao, P., Guo, S., Tu, Z., Di, L., Zha, X., Zhou, H., y Zhang, X. (2015). Grh13 induces human epithelial tumor cell migration and invasion via downregulation of E-cadherin. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 48(3), 266–274. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw001>

Zheng, S., Huang, J., Zhou, K., Zhang, C., Xiang, Q., Tan, Z., Wang, T., y Fu, X. (2011). 17 $\beta$ -Estradiol enhances breast cancer cell motility and invasion via Extra-Nuclear activation of Actin-Binding protein ezrin. *PLoS ONE*, 6(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022439>

Zielniok, K., Gajewska, M., y Motyl, T. (2014). Molecular actions of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone and their relationship with cellular signaling pathways. *Postepy Hig Med Dosw*, 68, 777–792.