



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Participación de la cinasa ERK5 en la red de señalización mediada por
progesterona en células T47D de cáncer de mama**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ERICKA KAROL PAMELA ALMEIDA AGUIRRE

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**DR. EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**DR. IGNACIO GONZÁLEZ SÁNCHEZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. NOVIEMBRE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Participación de la cinasa ERK5 en la red de señalización mediada por
progesterona en células T47D de cáncer de mama.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ERICKA KAROL PAMELA ALMEIDA AGUIRRE

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**DR. EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**DR. IGNACIO GONZÁLEZ SÁNCHEZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. NOVIEMBRE 2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OFICIO FCIE/DAIP/404/2020
ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Evolutiva, Ecología, Manejo Integral de Ecosistemas y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **22 de junio de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **ALMEIDA AGUIRRE ERICKA KAROL PAMELA** con número de cuenta **309000666** con la tesis titulada **“Participación de la cinasa ERK5 en la red de señalización mediada por progesterona en células T47D de cáncer de mama”**, realizada bajo la dirección del **DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente	DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON
Vocal:	DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
Secretario:	DR. EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ
Suplente:	DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES
Suplente:	DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 02 de octubre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Quiero agradecer al Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM por mi formación académica y el apoyo en mi desarrollo profesional.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca proporcionada para realizar el proyecto. Al programa PAEP por el apoyo financiero para la divulgación del proyecto en el 4th World Congress on Cancer Research and Radiation Oncology.

Por todo el apoyo, por enseñarme lo bonito de la ciencia y por motivarme a ser mejor cada día, quiero agradecer a mi tutor el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

Finalmente, quiero agradecer a mi comité tutorial conformado por el Dr. Ignacio González Sánchez y el Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez, por todo el tiempo dedicado al proyecto, por apoyarme y brindarme los mejores consejos.

Agradecimientos personales

Agradezco a mis padres Lety y Erick por acompañarme en todos los caminos, por todo su apoyo y comprensión, a mi abuela Judith por inyectarme fortaleza, llenar mi vida de aventuras y su apoyo incondicional, a mi abuelo Pedro por animarme tanto, apoyarme y siempre procurarme, a mi tío Christopher por cuidarme, consentirme y por apoyarme siempre, a mi hermana Yetli por todo su amor, por todas las risas y por acompañarme en muchas aventuras marinas.

Agradezco a Ismael Torres por su apoyo incondicional, por compartir tanto conmigo, por acompañarme en muchas aventuras culinarias y por su comprensión.

Agradezco a mis amigos los Drugos: Rocío (MJM), Tere, Alelí, Arturo, Karina y Valeria por apoyarme y animarme en todos los caminos.

Agradezco también a Anaiza, Natalia, Alejandra y Mariana por compartir tanto de ustedes, por su apoyo y por contagiarme su pasión por la ciencia.

Agradezco a Ariana por acompañarme y apoyarme incondicionalmente, somos un equipo.

Agradezco al Dr. Pedraza y al Dr. Ignacio Camacho por el apoyo brindado para la realización del proyecto, a Pedro por su paciencia infinita para enseñarme.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio de Endocrinología Molecular y del INPER por todo su apoyo, consejos y tiempo dedicado a mi proyecto.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Antecedentes	3
Cáncer	3
Cáncer de mama	6
Cáncer de mama y hormonas esteroideas	8
Participación de la progesterona en el cáncer de mama	10
Progesterona	13
Progesterona y MAPK	17
Cinasa ERK5	22
2. Justificación	29
3. Hipótesis	30
4. Objetivo general	31
4.1 Objetivos particulares	31
5. Método	32
5.1 Cultivo celular	32
5.2 Tratamientos	32
5.4 Ensayo de viabilidad con MTT	34
5.5 Ensayo de inmunofluorescencia	35
5.6 Ensayo de proliferación con BrdU	36
6. Resultados	38
6.1 Activación de PR a diferentes concentraciones de P4	38
6.2 La activación de ERK5 es mediada por P4	40
6.3 La activación de ERK5 mediada por P4 es bloqueada por el inhibidor de MEK5	42
6.4 El inhibidor de MEK5 no modifica la viabilidad celular	44
6.5 La localización de pERK5 es mediada por P4	45
6.6 La proliferación de células de cáncer de mama a través de ERK5 es mediada por P4	47
6.7 ERK5 favorece la expresión de ciclina D1 en células de cáncer de mama	49
Discusión	51
Conclusión	60

Perspectivas

61

Referencias

62

Resumen

La progesterona (P4) ejerce sus funciones mediante mecanismos genómicos y no genómicos, estos últimos se llevan a cabo mediante la activación rápida de vías de señalización, principalmente a través de cinasas.

Las células T47D constituyen un modelo ampliamente utilizado para estudiar los mecanismos moleculares de regulación transcripcional mediados por progesterona en cáncer de mama, esta línea celular es una herramienta importante para nuestro proyecto ya que es hormono-dependiente, sobreexpresa el receptor a progesterona (PR) y representa al subtipo luminal A, el cual es predominante en dicha patología.

El objetivo del presente proyecto consistió en establecer la participación de la vía de ERK5 en la red de señalización mediada por progesterona en las células T47D.

El presente proyecto contribuye a la elucidación de los componentes de la vía de señalización mediada por progesterona en células T47D, además de que representa una estrategia novedosa que ofrece alternativas para el diagnóstico y/o pronóstico para el cáncer de mama, así como posibles opciones terapéuticas

Abstract

Steroid hormones induce genomic and non-genomic responses involving the activation of different signaling pathways, including the MAPKs, however the role of MEK5/ERK5 pathway in the progression of clinical breast carcinoma remains poorly understood. The main objective of the present study was to establish the involvement of the ERK5 pathway in the progesterone-mediated signaling network in T47D breast cancer cells, and to identify ERK5 gene transcription activity and their protein expression.

The results indicated that P4-mediated activation of ERK5 in T47D cells occurs 5 min after the treatment with this hormone. It was also demonstrated that this kinase is translocated to the nucleus after its activation, while its activation was inhibited by the administration of BIX 02189.

In conclusion, the overall results suggest that ERK5 is an important component in the P4-mediated signaling pathway in T47D cells, and could play an important role of P4 gene activation.

Key words: Progesterone, kinase ERK5, breast cancer.

1. Antecedentes

Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una serie de desregulaciones metabólicas y genéticas que favorecen la carcinogénesis, entre las alteraciones que se han descrito se encuentran: 1) el mantenimiento de señales proliferativas, 2) la evasión a señales que detienen la proliferación, 3) la evasión a la vigilancia del sistema inmune, 4) la capacidad ilimitada para replicarse, 5) promoción de la inflamación tumoral, 6) la inestabilidad genética, que conducen a una transformación progresiva de las células normales, 7) la alteración en las vías metabólicas de las células tumorales, 8) la evasión de la apoptosis, 9) angiogénesis, 10) la migración de las células neoplásicas y 11) metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011).

Epidemiología del cáncer

El cáncer se encuentra dentro de las principales causas de muerte a nivel mundial; se reportó que en 2018 hubo 18.1 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes por cáncer (Bray *et al.*, 2018).

De todos los tipos de cáncer destaca el cáncer de mama (CM), en la figura 1 se muestra que ocupa el primer lugar, tanto en incidencia como en mortalidad, entre las mujeres a nivel mundial (Bray *et al.* 2018) y representa el 16 % de los tumores malignos diagnosticados en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018).

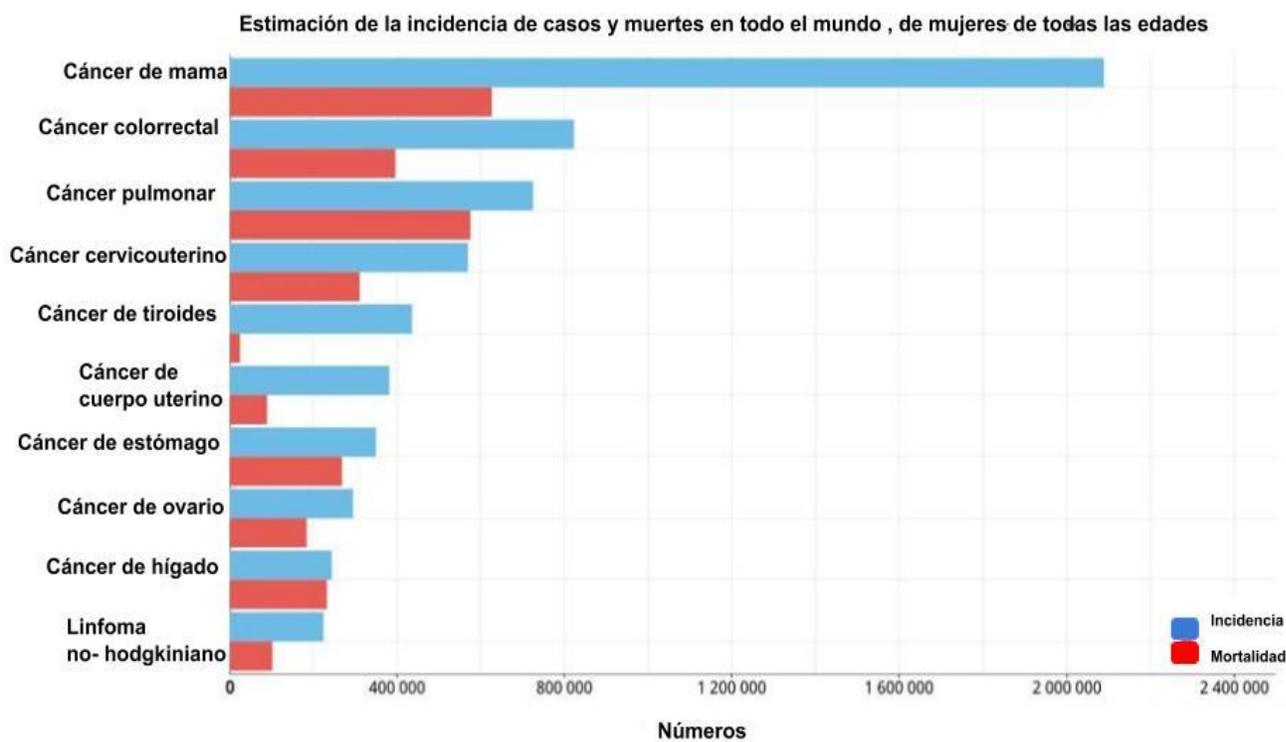


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer mama en mujeres a nivel mundial. La incidencia se representa en color azul y la mortalidad en color rojo. Modificado de Globocan IARC, 2018 Bray *et al.*, 2018.

En la figura 2 se muestra que, en México, las tasas de mortalidad para el CM aumentaron en el periodo de 2011 a 2016 (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2018).

La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (Globocan IARC) pronostica que la incidencia mundial de esta patología incrementará; en la figura 3 se muestra que podría aumentar hasta alcanzar una incidencia aproximada de 3 500 000 casos para el año 2040 (Bray *et al.* 2018).

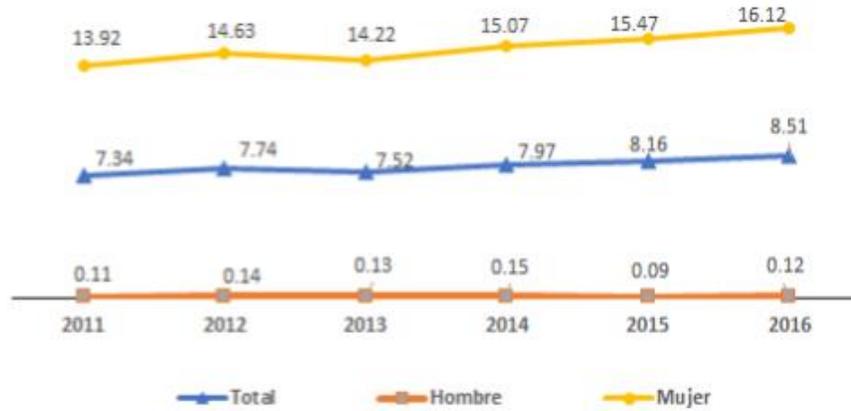


Figura 2. La tasa de mortalidad observadas por cáncer de mama en México ha incrementado, en el periodo de 2011 a 2016. Tomado de Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2018.

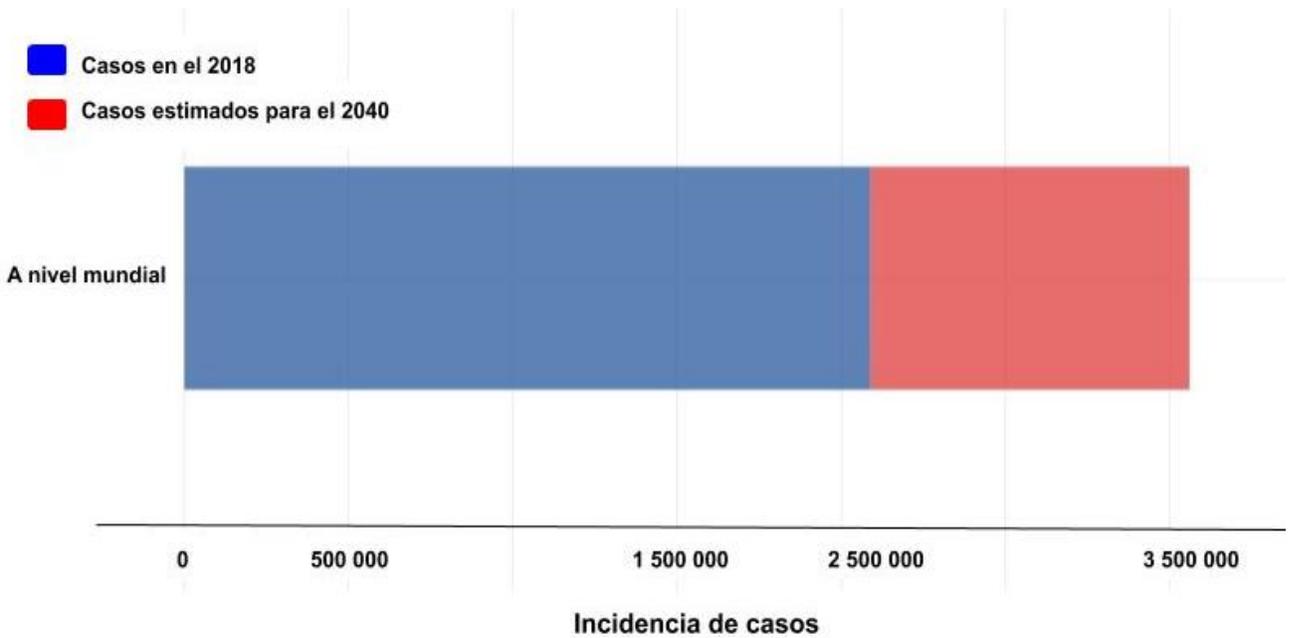


Figura 3. Pronóstico de la incidencia de cáncer mama en mujeres a nivel mundial para el año 2040, de mujeres de todas las edades. En azul se muestran los casos actuales y en rojo los casos esperados. Modificado de Globocan IARC en el año 2020 Bray *et al.*, 2018

Cáncer de mama

El CM se define como una enfermedad heterogénea, la cual muestra variación en sus características clínicas, morfológicas y moleculares (Malhotra *et al.*, 2010; Vuong *et al.*, 2014). La etiología de esta patología incluye distintos factores, entre los que se encuentran el sobrepeso, el consumo de alcohol, condiciones genéticas, la menarquía temprana, la menopausia tardía, la edad tardía al primer parto, la nuliparidad, la historia familiar y de forma muy importante el estadio hormonal (Dong y Jin, 2018; Sauter *et al.*, 2018; Vuong *et al.*, 2014; Yalcin *et al.*, 2013).

Clasificación del cáncer de mama

Por sus características histológicas, el CM se divide en cuatro tipos: el primero es el carcinoma no invasivo, el cual su vez se divide en ductal y lobular; el segundo es el de tipo invasivo, el cual a su vez se divide en ductal y en tipos especiales; el tercero es el microinvasivo, y el cuarto es conocido como la enfermedad de Paget (Tsuda y General Rule Committee of the Japanese Breast Cancer Society, 2020).

El carcinoma invasivo ductal es el tipo más frecuente, ocupando hasta un 80 % de los tipos de CM, seguido del carcinoma invasivo lobular; el carcinoma lobular invasivo tiene peor pronóstico, es de difícil diagnóstico y generalmente los tumores hacen metástasis a sitios inusuales, como el ovario y el tracto gastrointestinal. Este tipo histológico expresa en mayor proporción el receptor a estrógenos (ER) y el receptor a progesterona (PR) (Sathyamoorthy y Lange, 2020; Tsuda y General Rule Committee of the Japanese Breast Cancer Society, 2020; Weigelt *et al.*, 2010).

Clínicamente se utilizan tres biomarcadores moleculares: la expresión de ER, PR y del receptor al factor de crecimiento epidermal (HER2) (Arnedos y Andre, 2011; Vuong *et al.*, 2014).

Con base en sus características moleculares, el CM se divide en 5 tipos: luminal A, luminal B, HER2 enriquecido, *basal-like* y *claudin-low*. Estos 5 tipos son diferentes en sus características moleculares, su incidencia, factores de riesgo, pronóstico y sensibilidad a tratamientos (Gary A. Ulaner, 2018; Malhotra *et al.*, 2010; Prat *et al.*, 2015; Taherian-Fard *et al.*, 2015; Vuong *et al.*, 2014).

Los tumores de tipo luminal A y luminal B se caracterizan por ser positivos para el receptor a estrógenos (ER+) (Malhotra *et al.*, 2010; Prat *et al.*, 2015; Vuong *et al.*, 2014).

El tipo luminal A es positivo para el receptor a progesterona (PR+) y negativo para el factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2-), la expresión de Ki-67 es baja, es el más común ya que ocupa aproximadamente el 40 % de todos los tipos de CM y presenta las tasas de supervivencia más altas comparadas con cualquier otro tipo de CM (Malhotra *et al.*, 2010; Vuong *et al.*, 2014). Los tumores de tipo luminal B pueden ser PR+ o PR- y HER2+ o HER2-, se caracteriza por sobreexpresar Ki-67, presentar mutaciones en TP53, PIK3CA y la amplificación de ciclina D1, por lo que tiene altas tasas de proliferación y ocupa aproximadamente el 20 % de todos los tipos de CM (Malhotra *et al.*, 2010; Vuong *et al.*, 2014).

El grupo HER2 es ER-, se caracteriza por la amplificación de HER2 y genes relacionados, una alta tasa de mutaciones en TP53, PIK3CA, ciclina D1, alta expresión

de EGFR y APOBEC, así como gran inestabilidad genómica, y ocupa aproximadamente el 15 % de todos los tipos de CM (Malhotra *et al.*, 2010; Vuong *et al.*, 2014; Elena Provenzano *et al.*, 2018; Prat *et al.*, 2015; Taherian-Fard *et al.*, 2015).

Por otro lado, los grupos *basal-like* y *claudin-low* son triple negativos (TNBC) y se caracterizan por no expresar los tres principales marcadores moleculares; ER, PR y HER2 (Malhotra *et al.*, 2010; Vuong *et al.*, 2014), ocupan el 15 % y el 10 % de los tipos de CM, respectivamente. Se caracterizan además por ser grupos con un mal pronóstico y pocas alternativas terapéuticas (Malhotra *et al.*, 2010; Vuong *et al.*, 2014).

Es importante notar que dos de los principales biomarcadores clínicos son receptores a hormonas esteroideas (ER y PR) y más del 50 % de los tipos de CM se caracterizan por expresar dichos receptores, por lo que esta patología es considerada hormono-dependiente (Vuong *et al.*, 2014).

Cáncer de mama y hormonas esteroideas

Estudios observacionales y modelos experimentales han demostrado que algunas hormonas esteroideas, como los estrógenos y P4, son un factor de riesgo para el CM (Trabert *et al.*, 2020; Kensler *et al.*, 2019; Giovannelli *et al.*, 2019; Mørch *et al.*, 2017; Folkerd y Dowsett, 2013). Se sabe que aproximadamente el 70 % de los tipos de CM son hormonodependientes y expresan el ER y PR (Diep *et al.*, 2015; Folkerd y Dowsett, 2013; Vuong *et al.*, 2014; Yip y Rhodes, 2014).

El 17 β -estradiol (E2) es una hormona esteroidea sexual, es un potente mitógeno y se sabe que su regulación está alterada en una gran cantidad de tipos de cáncer,

incluyendo el CM; de este último tipo, hasta un 75 % expresa el ER, por lo tanto, es ER+ (Parl *et al.*, 2018; Yip y Rhodes, 2014; Zhang *et al.*, 2020).

El E2 ejerce su función a través de ER y juega un papel primordial en el desarrollo del CM favoreciendo la proliferación y supervivencia celular mediante la activación de diversas vías de señalización, la regulación de numerosos genes, la acumulación de alteraciones genéticas derivadas de la exposición prolongada a E2 y mediante modificaciones a mecanismos metabólicos fundamentales para la célula (Zhang *et al.*, 2020; Giovannelli *et al.*, 2019; Parl *et al.*, 2018).

El hecho de que terapias endócrinas, que tienen como blanco inhibir la acción del E2, como fulvestrant, tamoxifen o letrozol, contribuyan al decremento en la mortalidad por CM es otra evidencia de la importancia que el E2 tiene en el desarrollo de esta patología (Zhang *et al.*, 2020; Parl *et al.*, 2018)

Está bien establecido que el E2 juega un papel muy importante en la carcinogénesis del CM, sin embargo, el papel de la progesterona (P4) en dicha patología sigue siendo controversial.

El E2 a través de ER, específicamente el ER α , induce la expresión del PR, el cual es necesario para inducir la proliferación y supervivencia celular mediante mecanismos paracrinós y autocrinós en el tejido mamario. La expresión de PR es considerado un indicador de la actividad del ER, también actúa como una proteína asociada a ER α que modula su función, por lo tanto, el E2 estimula la activación de PR y actúan en conjunto para promover la carcinogénesis (Mohammed *et al.*, 2015; Diep *et al.*, 2015; Yip y Rhodes, 2014; Brisken, 2013). Sin embargo, estudios recientes indican que el

papel del PR en el CM es más que sólo un marcador de la actividad del ER y que no es inducido únicamente por el ER α (Trabert *et al.*, 2020; Mohammed *et al.*, 2015).

Participación de la progesterona en el cáncer de mama

Se ha demostrado que mujeres que fueron sometidas a terapia de reemplazo hormonal (TRH) con E2, y progestinas tales como acetato de medroxiprogesterona o levonogestrel, tienen mayor riesgo de padecer CM que aquellas que fueron tratadas sólo con E2, ya que el uso de progestinas se asocia con un incremento en la proliferación celular en lesiones tempranas y, por lo tanto, es un factor de riesgo para el CM (Coughlin, 2019; Dossus y Benusiglio, 2015; Samson *et al.*, 2016; Hagan y Lange, 2014).

Estudios realizados en Estados Unidos, Canadá y países europeos sobre la incidencia en el CM mostraron un decremento de hasta un 10 % en la incidencia de CM después de la reducción en el uso de THR desde el 2002 hasta el 2010 (Pelucchi *et al.*, 2010).

También se ha demostrado que el uso de anticonceptivos hormonales que contienen progestinas incrementan el riesgo de CM (Bardaweel *et al.*, 2019; Del Pup *et al.*, 2019; Marsden, 2017; Westhoff y Pike, 2018).

Se ha reportado mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*, con modelos de CM hormonodependientes, que al ser tratados con progestinas incrementan la proliferación y supervivencia celular (Diep *et al.*, 2015), esto ha sido confirmado en microestructuras aisladas de tejidos de mama humanos (Briskin, 2013).

Se ha encontrado que el PR se expresa hasta en un 50 % de los casos de CM (Yip y Rhodes, 2014), por lo que son considerados PR+; la mayoría de las células PR+ de CM expresan tanto la isoforma PR-A como la PR-B (Bonneterre *et al.*, 2016).

La relación de PR-A:PR-B se interrumpe en etapas tempranas de la carcinogénesis, en donde hay una mayor expresión de PR-A en relación con PR-B, y se ha reportado que los tumores que son del tipo luminal A tienden a expresar una mayor cantidad de PR-A, mientras que los tumores más agresivos y que son resistentes a la terapia endócrina expresan una mayor cantidad de PR-B (Rojas *et al.*, 2017; Andrea R. Daniel *et al.*, 2007;).

PR-B es una isoforma proliferativa en ausencia de PR-A, mientras que PR-A, en ausencia de PR-B, contribuye a la diferenciación celular favoreciendo fenotipos más heterogéneos, con mayor plasticidad y con mayor capacidad para migrar (Truong *et al.*, 2019 Gompel y Plu-Bureau, 2018; Hagan y Lange, 2014; Bamberger *et al.*, 2000). Este desbalance en la expresión de las isoformas se asocia con una mala respuesta a las terapias endócrinas (Trabert *et al.*, 2020; Folkard y Dowsett, 2013), lo que sugiere que las antiprogestinas podrían ser más efectivas en tumores que expresen en mayor proporción PR-A (Lanari *et al.*, 2012).

Se ha reportado, mediante ensayos *in vitro*, que células que son PR+ y ER+, al ser tratadas con P4, inducen la expresión de CD44, Cks y CK5+, conocidos como marcadores de células progenitoras y asociados a resistencia a quimioterapia, lo que contribuye a un peor pronóstico de la enfermedad (Giovannelli *et al.*, 2019; Diep *et al.*, 2015). Resultados similares han sido reportados con células T47D derivadas de CM,

las cuales expresan ambas isoformas de PR en condiciones basales, lo que sugiere un aumento de malignidad y potencial metastásico (Truong *et al.*, 2019).

Por otro lado, en modelos animales, se ha demostrado que la P4 induce el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) y Wnt4 en células ER α + y PR+, lo que induce proliferación celular mediante un mecanismo paracrino, incluso en células que no expresan PR (Trabert *et al.*, 2020; Gompel y Plu-Bureau, 2018; Stingl, 2011).

El riesgo de CM es atribuido principalmente a determinadas progestinas sintéticas, en particular el acetato de medroxiprogesterona (AMP), levonorgestrel y norethindrone, ya sea a través del uso de anticonceptivos hormonales o de la THR (Trabert *et al.*, 2020; Samson *et al.*, 2016; Mohammed *et al.*, 2015).

Dado que la P4 en su forma natural se metaboliza rápidamente, los investigadores prefieren utilizar R5020, una progestina sintética de larga duración que puede proporcionar resultados más reproducibles. R5020 es un ligando más estable de PR en relación con P4, ya que ésta se metaboliza activamente dentro de la célula y R5020 no. Algunos ensayos han establecido que el efecto de P4 es idéntico al de R5020 (Sathyamoorthy y Lange, 2020). Sin embargo, es importante notar que las progestinas usadas farmacológicamente también tienen efectos sobre el receptor a andrógenos (Trabert *et al.*, 2020) y son pocos los estudios que abordan los efectos de P4 natural y de los niveles de P4 circulante en sangre.

Progesterona

La P4 es una hormona que tiene como función básica inducir la proliferación en tejidos mamarios sanos y en tejidos tumorales, puede actuar de manera independiente al E2 y es un factor de riesgo para el CM (Sathyamoorthy y Lange, 2020; Trabert *et al.*, 2020).

La P4 es sintetizada en los ovarios y glándulas adrenales (Garg *et al.*, 2017). Durante el ciclo menstrual se sintetiza en el cuerpo lúteo a partir de la fase postovulatoria temprana, y durante el embarazo se sintetiza en la placenta. Su tasa de producción aumenta de 1 mg/día en el folículo a unos 25 mg/día en la fase luteínica (Reed y Carr, 2018). En el embarazo la producción de P4 es muy alta, puesto que en su última etapa es de hasta 300 mg/día (Trabert *et al.*, 2020).

La P4 participa en procesos fisiológicos importantes en distintos órganos, como el cerebro, los huesos, el útero, el ovario, el tracto reproductivo y la mama; es esencial para funciones reproductivas como la ovulación, la iniciación y mantenimiento del embarazo, así como el desarrollo del tejido mamario (Trabert *et al.*, 2020; Piette, 2018; Garg *et al.*, 2017).

La P4 actúa principalmente a través de PR, el cual es un receptor que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y es dependiente de hormonas esteroideas (O'Malley *et al.* 1970).

El PR tiene dos isoformas: PR-A con 94-kD, y PR-B con 116-kD, las cuales se codifican en el mismo gen pero tienen inicios de transcripción alternativos y son inducidos por distintos promotores (Bamberger *et al.*, 2000); Kraus *et al.* 1993). La isoforma PR-B

tiene 164 aminoácidos más que la isoforma PR-A, los cuales están ubicados en el extremo amino terminal de la proteína, esta diferencia le confiere diferentes funciones al PR-B. Ambas isoformas generalmente se coexpresan en los tejidos donde ejercen su función (Figura 4), el PR-A se asocia con la represión de las funciones transcripcionales del PR-B y de otros receptores nucleares (Grimm *et al.*, 2016; Richer *et al.*, 2002; Vegeto *et al.*, 1993).

El PR está conformado por dominios que comparten ambas isoformas; son idénticos en el carboxilo terminal, en el dominio de unión al ligando (LBD, por sus siglas en inglés), el cual sufre un cambio conformacional tras la unión de su ligando, en el dominio de unión al DNA (DBD, por sus siglas en inglés), en la región bisagra (h), y en la mayoría de los aminoácidos del dominio del amino terminal (NTD, por sus siglas en inglés), a excepción de los 164 aminoácidos de más que posee el PR-B (Figura 4) (Grimm *et al.*, 2016; Hill *et al.*, 2012).

El PR contiene además dos dominios o funciones de activación transcripcional (AFs, por sus siglas en inglés), que son AF1 en el NTD y AF2 en el LBD. Ambos dominios actúan dependiendo el contexto celular, pueden actuar de forma independiente o de forma sinérgica a través de la interacción entre los dominios amino y carboxilo terminal. De forma particular, PR-B tiene un dominio de activación adicional: AF3, debido a la mayor cantidad de aminoácidos que posee en el dominio NTD; AF3 actúa de forma sinérgica con AF1 y AF2 (Grimm *et al.*, 2016; Hill *et al.*, 2012).

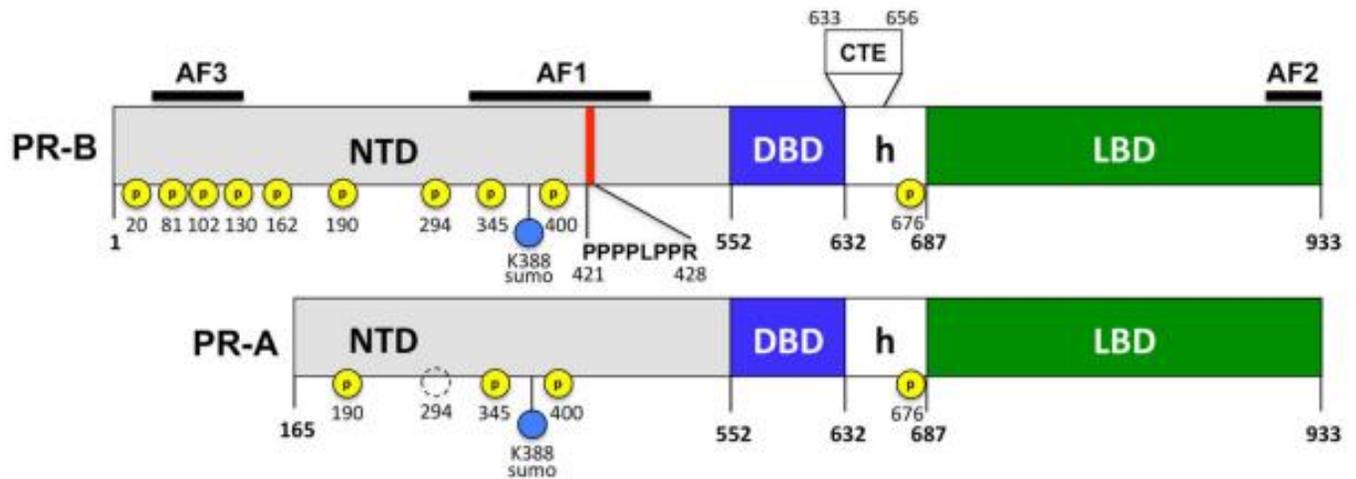


Figura 4. Dominios de las dos isoformas del PR. Los sitios de fosforilación se indican en amarillo, la región rica en prolina se indica en rojo, se muestra el dominio de unión al ligando (LBD), una región bisagra (h), el dominio de unión al ADN (DBD), el dominio del amino terminal (NTD), la extensión del carboxilo terminal (CTE) y los dominios de activación transcripcional (AF1-AF2 Y AF3) Modificado de Hill *et al.*, 2012.

El mecanismo clásico del PR inicia una vez que el ligando se une al receptor, ya que éste es activado y puede ser fosforilado. Tras la activación, el PR sufre un cambio conformacional que permite la disociación de un complejo de proteínas de choque térmico (Hsp 70/90). Después se transloca al núcleo, se dimeriza y se une a regiones reguladoras en el ADN que son llamados elementos de respuesta a progesterona (PREs, por sus siglas en inglés) e induce la transcripción de genes involucrados en el desarrollo, la diferenciación y la proliferación de los tejidos diana, así como los involucrados en procesos patológicos como el CM (Garg *et al.*, 2017; Grimm *et al.*, 2016; Hagan y Lange, 2014; Jacobsen y Horwitz, 2012).

P4 también actúa a través de un mecanismo no clásico que pueden ser dependiente o independiente de las vías transcripcionales; esta respuesta no clásica se caracteriza por ser rápida y ha sido comprobada debido a la insensibilidad a inhibidores de la transcripción o la traducción (Garg *et al.*, 2017; Boonyaratanakornkit *et al.*, 2001).

Se ha sugerido que las respuestas rápidas a la P4 pueden estar mediadas por la activación de los receptores de la membrana celular (mPRs, por sus siglas en inglés), y que a través de esta respuesta se pueden activar diversas vías de transducción de señales mediante la estimulación de calcio intracelular o la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs, por sus siglas en inglés) ya que el mPRs tiene tres sitios de unión para los dominios de homología del SRC (SH), que incluyen dos para el SH2 y uno para el SH3, los cuales son necesarios para la activación de la MAPK (Garg *et al.*, 2017; Cahill, 2007).

Por otro lado, PR también puede actuar a través de un mecanismo no clásico mediante la activación de cinasas, específicamente y de forma directa la tirosina cinasa c-Src. Una región rica en prolina presente en NTD del PR (Figura 4) se une directamente con el dominio SH3 de c-Src, lo que resulta en la activación de c-Src que es dependiente de la fosforilación para la activación de distintas vías de señalización, entre las que se incluyen PI3K/Akt, que participa en procesos de supervivencia celular, así como JAK-1/-2/Stat3 y Ras/Raf/MEK/MAPK, las cuales son principalmente proliferativas y se ha reportado que son activadas por PR-B (Truong *et al.*, 2019; Garg *et al.*, 2017; Grimm *et al.*, 2016; Hill *et al.*, 2012; Ballaré *et al.*, 2006; Boonyaratanakornkit *et al.*, 2001).

Progesterona y MAPK

Las MAPK son una familia de proteínas que se activan por factores de crecimiento o estímulos ambientales, funcionan como enzimas que catalizan la transferencia de grupos fosfato del ATP al grupo hidroxilo de residuos de tirosina/treonina o serina. La fosforilación de estas proteínas controla su actividad enzimática, la interacción con otras proteínas, su localización y estabilidad (Bigeard y Hirt, 2018). Las MAPK juegan un papel clave en la transducción intracelular, lo que regula distintos procesos celulares en diferentes tejidos, entre los que se encuentran la proliferación, diferenciación, apoptosis y respuesta a estrés (Guo *et al.*, 2020; Gaestel, 2015; Low y Zhang, 2016).

Las señales se transmiten a través de fosforilaciones secuenciales de proteínas cinasas, conocidas también como cascadas de señalización. Dichas proteínas activadas tienen una jerarquía dependiendo de su lugar en la cascada, lo cual a su vez depende del tipo celular y el estímulo recibido. En la cascada se incluyen la MAPK-cinasa-cinasa-cinasa, que se conocen como MAP4K; la MAPK-cinasa-cinasa, que se conoce como MAP3K; la MAPK-cinasa, que se conoce como MAPKK; la MAPK y la MAPK-proteína cinasa activada, que se conoce como MAPKAPK (Figura 5) (Guo *et al.*, 2020; Gaestel, 2015).

Se han identificado cuatro cascadas basadas en las proteínas que la componen: 1) ERK1/2, 2) c-Jun N-terminal kinase (JNK), 3) p38 MAPK y 4) ERK5 (Guo *et al.*, 2020)

La vía de ERK1/2, que se describe como Ras/Raf/MAPK /MEK/ERK, es la cascada de señalización más importante entre todas las vías de transducción de las MAPK. Su desregulación se asocia a la supervivencia, proliferación, angiogénesis, metástasis y

desarrollo de células tumorales en ovario, colon, pulmón y mama. En esta vía la proteína Ras actúa como una proteína activadora MAP4K, la proteína Raf actúa como MAP3K, MEK actúa como MAPKK, y ERK como MAPK (Figura 5) (Guo *et al.*, 2020; Gaestel, 2015).

ERK, un tipo de proteína cinasa de serina/treonina, es una proteína de transducción de señales que generalmente se localiza en el citoplasma. Tras su activación, se transloca al núcleo y regula la actividad de distintos factores de transcripción, entre los que se encuentra c-FOS, Elk-1, Ets1 y SP-1, lo que a su vez regula la expresión de diversos genes (Figura 5). La familia de proteínas ERK está formada por ERK 1, 2, 3, 5 y 6, siendo ERK1 Y ERK2 los miembros más estudiados de la vía MAPK/ERK (Guo *et al.*, 2020).

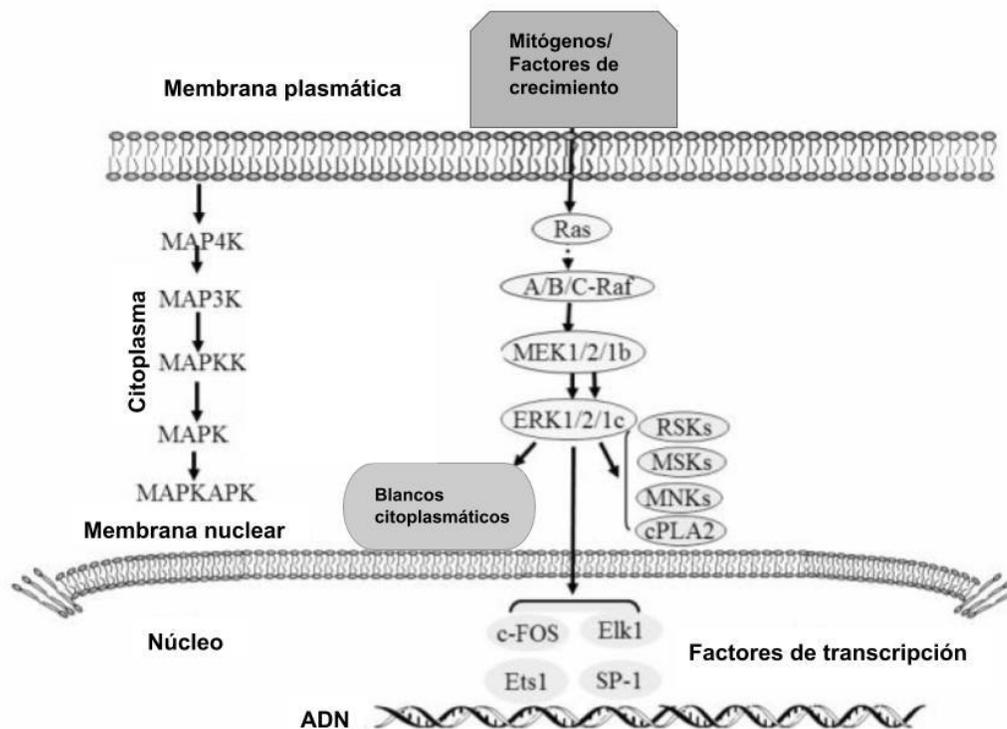


Figura 5. La vía Ras/Raf/MAPK (MEK)/ERK,. Es la cascada de señalización más importante entre todas las vías de transducción de las MAPK. Modificado de Guo *et al.*, 2020.

La activación de MAPK contribuye al efecto proliferativo en células de CM, se ha reportado que en esta patología hay una sobreexpresión de ERK1/2, lo cual es asociado con un peor pronóstico de la enfermedad (Sathyamoorthy y Lange, 2020; Jiang *et al.*, 2020; Grimm *et al.*, 2016; Davis *et al.*, 2014) . Además, algunas de las estrategias terapéuticas más recientes se centran en estas desregulaciones (Vladislav Korobeynikov, 2019), sin embargo, el papel de la P4 en la activación de las MAPKs en el CM no está bien establecido.

Se ha reportado, en modelos de CM *in vitro*, que la expresión de PR-B es sensible a la fosforilación de Ser294 en respuesta a la activación de la vía MAPK, ya que dicha fosforilación puede estar inducida por P4 o por el factor de crecimiento epidermal (EGF), el cual activa la vía de las MAPKs a través de su receptor tirosina cinasa (Sathyamoorthy y Lange, 2020), lo que se relaciona con el reporte de altos niveles de PR fosforilado en Ser294, de hasta en un 54 % de las muestras de CM de tipo luminal (Knutson *et al.*, 2017), y que la presencia de PR fosforilado en Ser294 contribuye a la expresión de genes asociados a la resistencia a terapia endocrina (A. R. Daniel *et al.*, 2015).

Se ha demostrado, mediante ensayos *in vitro* con células MCF10 y MCF12, que cuando los mPRs son activados mediante un ligando, estos son capaces de activar la vía de las MAPKs, específicamente ERK1/2 (Salazar *et al.*, 2016). La activación de las MAPK podría contribuir al desarrollo de la carcinogénesis. También se reportó, mediante un ensayo *in vitro* con células T47D de CM, que la activación de la cinasa ERK1/2 a través del PR, activado con R5020, juega un papel importante en la activación de genes relacionados con la proliferación de las células tumorales (Ballaré *et al.*, 2006).

La P4, a través de PR, puede activar la vía de señalización de MAPK, como se mencionó anteriormente, mediante la interacción de su región rica en prolina que se encuentra en NTD (Figura 4), con el dominio SH3 de la cinasa c-Src, la cual es una proteína que puede mediar la activación de las MAPK a través de la vía Src/Ras-Raf/MEK-1/MAPK (Figura 6) (Truong *et al.*, 2019; Garg *et al.*, 2017; Leonhardt *et al.*,

2003). La interacción del PR con la cinasa c-Src fue definida desde 1998 (Migliaccio *et al.*, 1998).

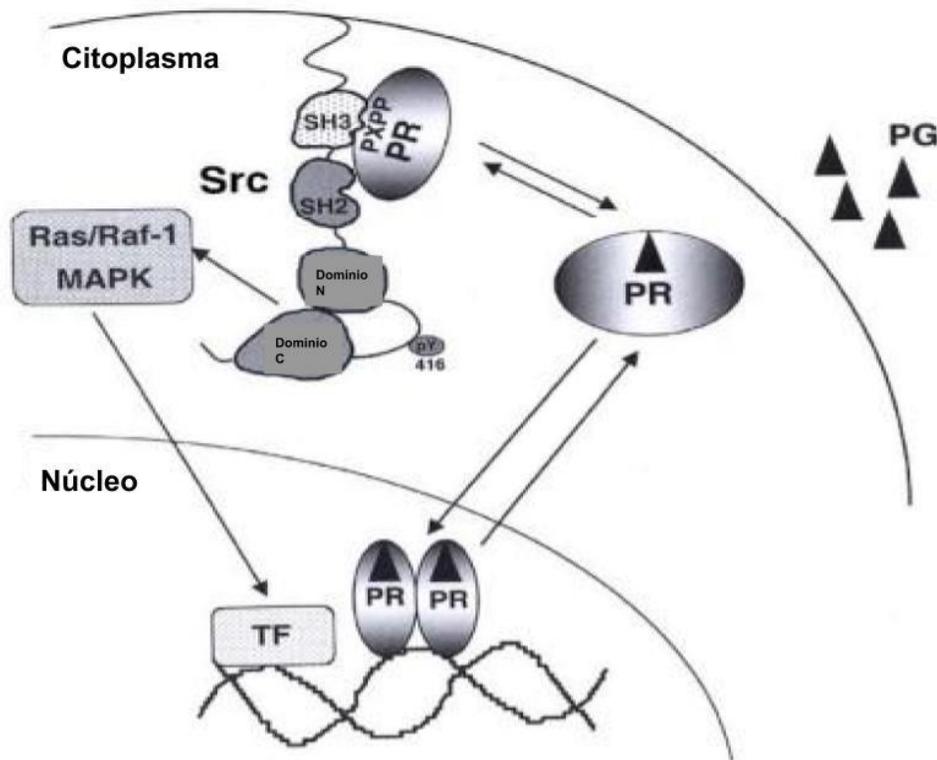


Figura 6. Activación de las MAPKs a través del PR. Se indica a la progesterona (PG), el receptor a progesterona (PR) y factores de transcripción (TF). Se propone que PR activa a las MAPKs a través del dominio SH3 de la proteína Src. Modificado de Leonhardt *et al.*, 2003.

Aunque existen múltiples reportes que señalan la participación de las MAPKs en el CM, la mayoría de ellos se centran en ERK1/2 y sólo pocos estudios han abordado específicamente la participación de ERK5, otra MAPK implicada en el desarrollo y progresión de diferentes tipos de cáncer.

Cinasa ERK5

La proteína cinasa ERK5, también llamada Big Map Kinase 1, es miembro de las MAPKs, está formada por 816 aminoácidos, con un peso de 102 kDa, está codificada en el gen llamado MAPK7, y se caracteriza por ser más grande que las otras cinasas puesto que tiene un carboxilo terminal con diferente estructura y función. Se ha reportado que ERK5 es activada por diversos factores, entre ellos: el estrés, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor neurotrófico (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y ciertas citoquinas inflamatorias, como la interleucina 6 (IL-6) (Gomez *et al.*, 2016; Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012).

Los mecanismos de activación para ERK5 no han sido completamente dilucidados; la activación típicamente sigue la siguiente vía: MEKK2/MEKK3 - MEK5 - ERK5 (figura 7) (Stecca y Rovida, 2019; Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012; Coulombe y Meloche, 2007) .

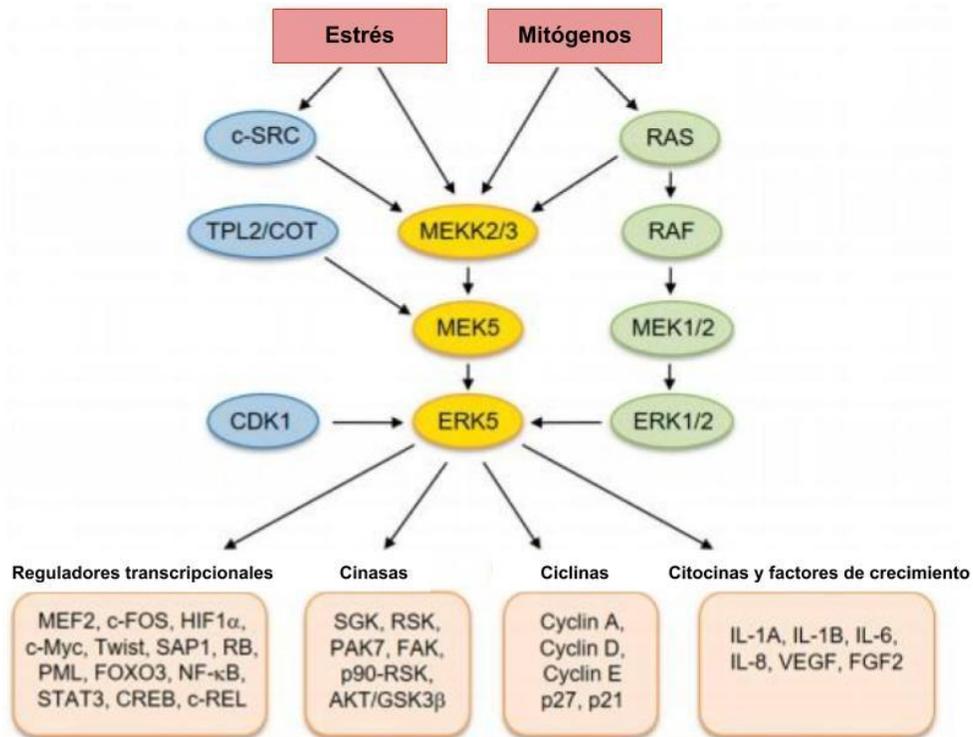


Figura 7. Vía de señalización para la activación de ERK5, así como sus efectores. Modificado de Stecca y Rovida, 2019.

El dominio catalítico de ERK5 está conservado en su mayoría y se ubica en el extremo amino terminal en los aminoácidos 1-406, éste tiene una región que contribuye a su localización citoplasmática en los aminoácidos 1-77, seguida por un dominio de cinasa en los aminoácidos 78-406, que es esencial para la interacción con la MEK5 que se da en los aminoácidos 78-139 y para la oligomerización en los aminoácidos 140-406. Este dominio comparte una secuencia del 66 % de identidad con el dominio de cinasas de ERK2. En el otro extremo está el carboxilo terminal, en donde se encuentra el dominio de señalización para la localización nuclear (NLS) en los aminoácidos 505-539, que es importante para la localización nuclear de ERK5 y su actividad

transcripcional. Se encuentran también dos regiones ricas en prolina denominadas PR1 en los aminoácidos 434-465 y PR2 en los aminoácidos 578-701, que son sitios de unión para la proteína c-Src, hay también un dominio de activación transcripcional en los aminoácidos 664-789 que puede someterse a autofosforilación, lo que le permite regular directamente la transcripción de los genes o autoinhibirse, una capacidad única de ERK5 (figura 8) (Gomez *et al.*, 2016; Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012; G. Zhou *et al.*, 1995).

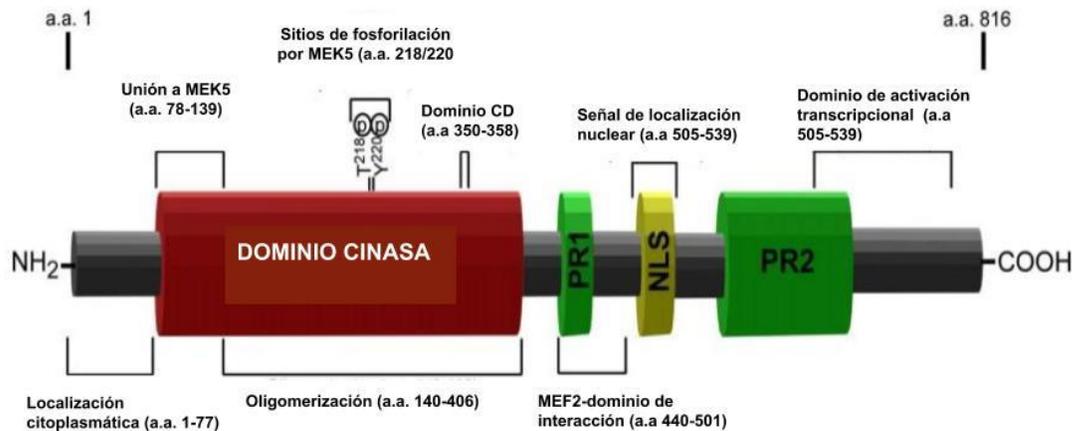


Figura 8. Estructura de ERK5 y sus dominios funcionales. De izquierda a derecha se muestra el amino terminal (NH₂) que contiene la región de localización citoplasmática, el dominio cinasa en donde se indica la región que interactúa con MEK5, se indican dos regiones ricas en prolina (PR1 y PR2), región de señalización para la localización nuclear (NLS) y el dominio de activación transcripcional. Modificado de Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012.

ERK5 puede plegarse para facilitar la interacción entre los dominios amino y carboxilo terminal, ésta interacción modifica la señal del NLS, secuestrando a ERK5 en el citoplasma; después, mediante una doble fosforilación de Thr218 y Tyr220 por MEK5, ERK5 sufre un cambio conformacional y puede translocarse al núcleo (Figura 9) (Gómez *et al.*, 2016; Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012).

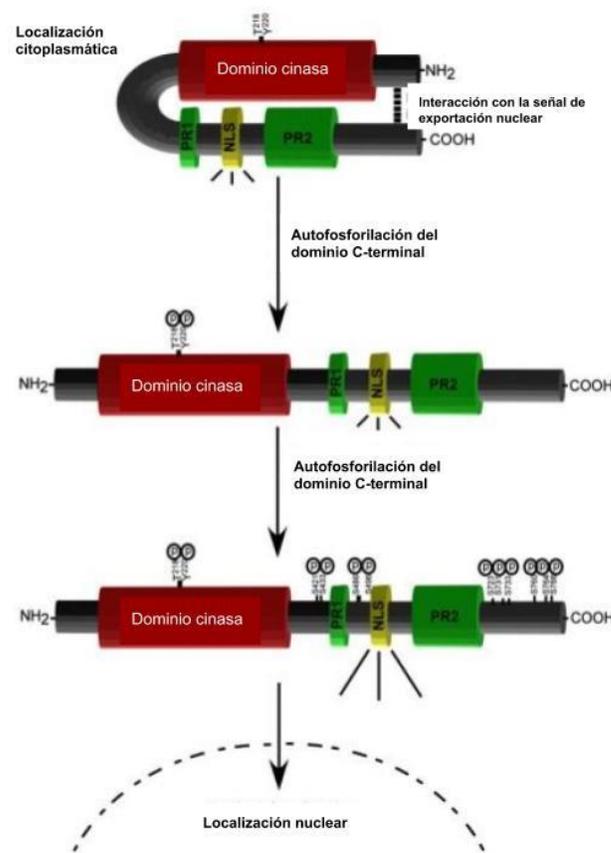


Figura 9. La localización de ERK5 es dependiente de su conformación. La fosforilación de ERK5 por MEK5 resulta en un cambio conformacional que interrumpe la señal de exportación nuclear (NES) y facilita su translocación al núcleo. Modificado de Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012.

ERK5 tiene la capacidad de regular directamente la transcripción de genes, una capacidad única entre las distintas cinasas (Gomez *et al.*, 2016; Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012; G. Zhou *et al.*, 1995). ERK5 se expresa en la mayoría de las células de los tejidos de mamíferos y se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo (Buschbeck y Ullrich, 2005). Entre los blancos de ERK5 se encuentran MEF2D, c-jun, c-fos, c-Myc, BCL-2, CD44 y CCD1, los cuales intervienen de forma directa en diversos procesos celulares, como proliferación, migración, supervivencia, diferenciación celular y angiogénesis (Figura 10) (Chen *et al.*, 2018; Gomez *et al.*, 2016; Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012; Stecca y Rovida, 2019).

Se ha demostrado, mediante varios estudios *in vitro*, que ERK5 es una molécula de señalización clave involucrada en el desarrollo de la carcinogénesis y tumorogénesis, principalmente mediante la regulación de la proliferación celular (Figura 10), por lo que es considerado un posible blanco terapéutico en distintos tipos de cáncer (Stecca y Rovida, 2019).



Figura 10. ERK5 y su relación con los principales marcadores para el desarrollo de la carcinogénesis. Modificado de Stecca y Rovida, 2019.

ERK5 se encuentra sobreexpresado en algunos casos de leucemia, cáncer de próstata, linfoma y meduloblastoma. Específicamente en el CM, ERK5 se sobreexpresa entre un 20 % y hasta un 75 % de los tumores mamarios (Antoon *et al.*, 2013; Weldon *et al.*, 2002), además se ha reportado que MEK5 también se sobreexpresa hasta en un 50 % de los tumores de CM (Hsieh *et al.*, 2005).

La sobreexpresión de MEK5/ERK5 está asociada a metástasis, resistencia a quimioterapia, a un peor pronóstico y pobre supervivencia (Miranda *et al.*, 2015; Antoon *et al.*, 2013; Montero *et al.*, 2009; Weldon *et al.*, 2002).

En ensayos *in vitro* se demostró que ERK5 se encuentra sobreexpresado en líneas celulares derivadas de carcinomas mamarios (Montero *et al.*, 2009), induce la proliferación en células BT474 de CM (Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012) y que la inhibición de ERK5 suprime la proliferación, motilidad e invasión de células de CM (L. Zhou *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2003), específicamente en células MCF-7. La inhibición de ERK5 disminuye la proliferación celular mediada por E2 (Antoon *et al.*, 2013). En células MDA-MB-231 la inhibición de la vía MEK5–ERK5–NF- κ B induce apoptosis (Li *et al.*, 2008), y en esa misma línea celular, la activación de ERK5 promueve la expresión de c-Myc (Finegan *et al.*, 2015).

Por último, se demostró que la señalización de MEK5/ERK5 es crítica para la transición epitelio mesénquima y para metástasis en el CM (Pavan *et al.*, 2018; Zhai *et al.*, 2016).

ERK5 es importante en la señalización celular del CM, sin embargo, los estímulos que activan esta proteína no han sido explorados en su totalidad, y debido a que diferentes cinasas han sido descritas en la vía de señalización mediada por P4, es importante explorar si ERK5 forma parte de la vía de señalización mediada por el eje P4/PR.

2. Justificación

Existen componentes de la vía de señalización de progesterona en CM sin identificar y su caracterización permitirá entender la compleja red de señalización mediada por esta hormona.

La elucidación de cada uno de dichos componentes contribuye a esclarecer los efectos de la progesterona, además de que permitirá establecer posibles estrategias terapéuticas en los modelos de cáncer. El modelo *in vitro* de células T47D de CM representa un modelo interesante de estudio, ya que sobreexpresa al PR y al ER, fenotipo que expresan la mayoría de los tumores de CM.

3. Hipótesis

La cinasa ERK5 es un componente de la activación de la vía de señalización del PR en células T47D de cáncer de mama.

4. Objetivo general

Establecer la participación de la vía de ERK5 en la señalización del PR y en la regulación de la expresión de genes implicados en la proliferación de células T47D tratadas con progesterona.

4.1 Objetivos particulares

Estudiar el efecto de P4 sobre la activación de ERK5

Estudiar el efecto de P4 sobre la localización de ERK5

Establecer la participación de ERK5 en el mecanismo de la proliferación celular.

5. Método

5.1 Cultivo celular

La línea celular T47D de carcinoma ductal de mama fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). La línea T47D fue cultivada en medio RPMI (Gibco®), suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF) (Gibco®). Ésta se incubó en condiciones normales: a 37 °C, con una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

La línea T47D deriva de un tumor de carcinoma ductal de mama de una mujer de 54 años. Estas células expresan receptores para distintos esteroides, entre ellos PR y ER.

5.2 Tratamientos

Para los tratamientos se utilizaron P4 (BioBioReagent®) y BIX02189 (TocrisBioscience®), que es un inhibidor específico de MEK5. P4 se utilizó en una solución de etanol y BIX02189 en una solución de DMSO.

En todos los casos se verificó que la concentración final de etanol y de DMSO no modificara la viabilidad ni la proliferación celular.

Para evaluar el efecto de la P4, 48 h previas al tratamiento, se mantuvo un ambiente libre de hormonas, para lo cual se utilizó medio RPMI sin rojo de fenol, suplementado con 10 % de SFB libre de hormonas. 17 h antes del tratamiento y durante el tratamiento se utilizó medio RPMI sin rojo de fenol y sin SFB. El inhibidor de MEK5 se añadió al medio de cultivo 2 h antes del tratamiento con P4.

Para los ensayos de Western Blot y de inmunofluorescencia se cultivaron células T47D en cajas Petri de 6cm. Se cultivaron 800 000 células por caja con medio RPMI suplementado con 10 % de SFB en condiciones normales y posteriormente se realizaron los tratamientos correspondientes.

Para los ensayos de MTT y BrdU, se cultivaron células T47D en placas de 96 pozos. Por cada pozo se cultivaron 7 000 células con medio RPMI suplementado con 10 % de SFB en condiciones normales y posteriormente se realizaron los tratamientos correspondientes.

Se realizaron tres experimentos independientes por cada tratamiento.

5.3 Extracción de proteínas y Western Blot

Para establecer la concentración de P4 a utilizar durante los experimentos, previo a la extracción de proteínas, las células fueron tratadas con distintas concentraciones de P4: 10, 20, 30, 40, 50 y 100 nM.

Para evaluar la activación de ERK5 mediado por P4, se formaron cuatro grupos: 1) grupo control, 2) grupo con P4, 3) grupo con P4 a una concentración de 10 nM + el inhibidor BIX02189 a una concentración de 10 μ M y 4) grupo con el inhibidor BIX02189 a una concentración de 10 μ M.

Para la extracción de proteínas, las células que previamente fueron tratadas se homogeneizaron en buffer de lisis (Tris 25 mM, SDS 10 %, EDTA, 1 μ M, EGTA 1 μ M,

inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche®), y se centrifugaron por 20 min a 15 000 rpm. Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Después, se separaron 40 µg de proteínas en un gel de poliacrilamida al 10 % a 90 V por 2 h. La transferencia se llevó a cabo en una membrana de nitrocelulosa utilizando una cámara húmeda a 100 V por 90 min. Posteriormente, la membrana se bloqueó durante toda la noche a 4 °C con una solución de albúmina al 5 % y Tween al 0.1 % en TBS.

Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios para detectar al PR (Santa Cruz®), pPR (Cell signaling®), β-actina (Cell signaling®), β-tubulina (Santa Cruz®) y pERK5 (Cell signaling®). Posteriormente, la membrana se incubó durante 2 h más a temperatura ambiente y en ausencia de luz con los anticuerpos secundarios anti-conejo (Li-Cor®) y anti-ratón (Li-Cor®) acoplados a Alexafluor 480; al final, se reveló con un fotodocumentador /Li-Cor®).

5.4 Ensayo de viabilidad con MTT

Para verificar la viabilidad celular tras la adición de BIX02189 se realizaron ensayos de MTT.

La prueba de MTT es un ensayo colorimétrico cuantitativo que es utilizado para medir la supervivencia y proliferación de las células (Mosmann, 1983).

Consiste en la reducción metabólica de MTT (bromuro de 3-(4,5--dimetiltiazol--2--ilo)-2,5-difeniltetrazol) a formazán. La cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células y, por la tanto, al índice de viabilidad.

Los resultados se leyeron en un espectrofotómetro de escaneo de múltiples pozos, las principales ventajas del ensayo colorimétrico son su rapidez y precisión.

El ensayo de MTT se realizó 24 h después del tratamiento con 2.5, 5, 7.5 y 10 μ M de BIX02189, añadiendo 20 μ l de MTT disuelto en DMSO a cada pozo, y se incubó durante 90 minutos a 37 °C.

Los cristales formados se disolvieron con DMSO y se midió la absorbancia de formazán en un espectrofotómetro para microplacas Epoch (Bio Tek®) a una longitud de onda de 540 nm.

5.5 Ensayo de inmunofluorescencia

Para evaluar la localización de ERK5 mediada por P4 se realizaron ensayos de inmunofluorescencia.

Las células se cultivaron en cajas de 6 cm donde previamente se colocaron cubreobjetos circulares de 18 mm. Se cultivaron 80 000 células por caja.

Se formaron cuatro grupos: 1) grupo control, 2) grupo con P4, 3) grupo con P4 a una concentración de 10 nM + el inhibidor BIX02189 a una concentración de 10 μ M y 4) grupo con el inhibidor BIX02189 a una concentración de 10 μ M.

Tras el tratamiento, las cajas fueron colocadas en una cama de hielo y se retiró el medio.

Para fijar y permeabilizar las células, a cada caja se le añadieron 2 mL de paraformaldehído al 4 %, posteriormente se añadieron 1.5 mL de una solución 1:1 de tritón y SDS.

Las células fueron bloqueadas con una solución de BSA al 3 % por una hora a temperatura ambiente. Las células se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario pERK5 (Cell signaling ®) a una concentración de 1:500, después se incubaron durante 1 h en oscuridad con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa Fluor 546 (Life Technologies®) a una concentración de 1:500. Se incubó con DAPI 1:10 000 durante 10 minutos.

Cada cubreobjetos se montó sobre un portaobjetos con 30 µL de medio para montaje *fluorescen* (Dako) y las preparaciones fueron observadas al microscopio. Las imágenes fueron procesadas en el software ImageJ (NIH®).

5.6 Ensayo de proliferación con BrdU

Para medir la proliferación celular, se cultivaron 7 000 células por pozo en placas de 96 pozos.

Se realizaron ensayos de BrdU con el kit BrdU Cell Proliferation ELISA (Abcam®)

Los tratamientos se realizaron durante 24 h, posteriormente se añadieron 20 μ l por pozo de BrdU para llegar a una concentración final de 10 M de BdrU por pozo y se reincubaron por 2 horas más en condiciones normales de cultivo.

Transcurridas 2 h se removió el medio de cultivo y se realizaron lavados.

Tras los lavados, se agregaron 200 μ l por pozo de la solución fijadora y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se retiró la solución fijadora y se hicieron lavados.

Se añadieron 100 μ l de la solución anti-BrdU por pozo y las células se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente.

Se removió la solución anti-BrdU y se hicieron lavados.

Se agregaron 100 μ l de la solución de sustrato por pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se midió la absorbancia de la solución en un espectrofotómetro para microplacas Epoch (Bio Tek®) a una longitud de onda de 450 nm.

6. Resultados

6.1 Activación de PR a diferentes concentraciones de P4

La línea celular T47D presenta las características del CM del tipo luminal A, uno de los más frecuentes. Esta línea celular se caracteriza por sobreexpresar el PR (Yu et al., 2017), lo cual permite que sea un modelo adecuado para estudiar los mecanismos mediados por la P4 en el CM.

Para corroborar la presencia del PR en las células T47D y establecer la dosis de P4 que activa al PR en esta línea, se realizó una curva dosis-respuesta de P4 durante 15 min. En este estudio observamos que, con las concentraciones de 10, 20, 30 y 40 nM se induce la fosforilación del PR, con un máximo de fosforilación a 10 nM (Figura 11), esta concentración fue empleada en los ensayos posteriores.

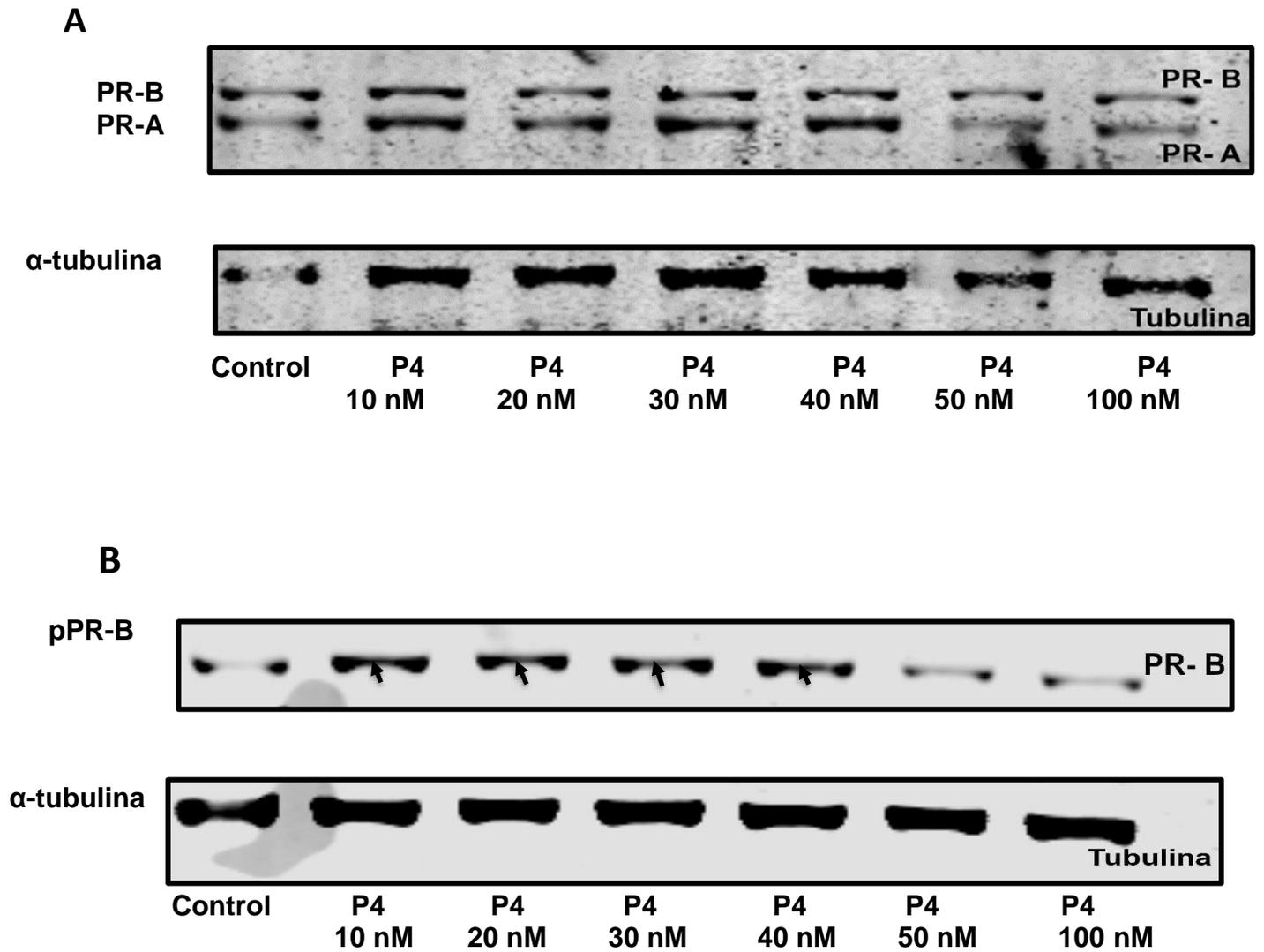


Figura 11. PR total y el PR fosforilado (pPR). A. Se muestra el PR total después del tratamiento con distintas concentraciones de P4 durante 15 minutos, ambas isoformas. B. Se muestra el PR fosforilado después del tratamiento con distintas concentraciones de P4 durante 15 minutos. Se observa (indicado con flechas) que el PR se fosforila con 10, 20, 30 y 40 nM de esta hormona.

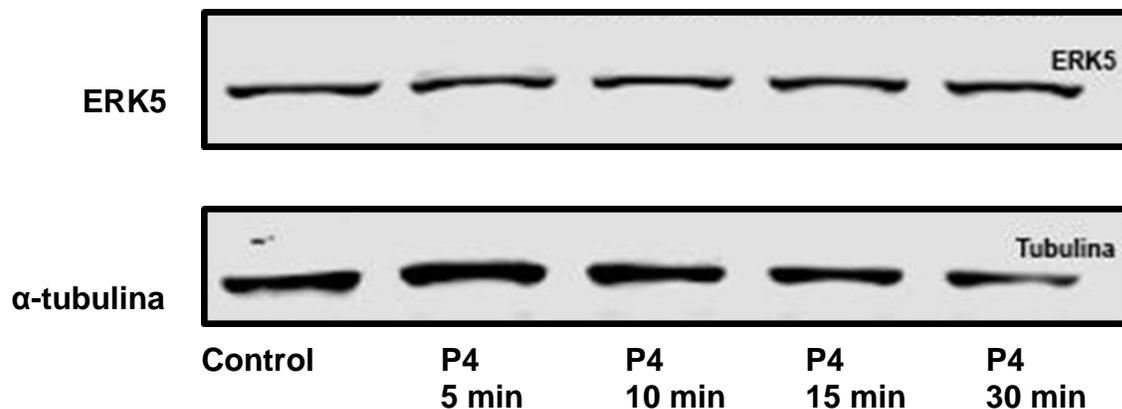
6.2 La activación de ERK5 es mediada por P4

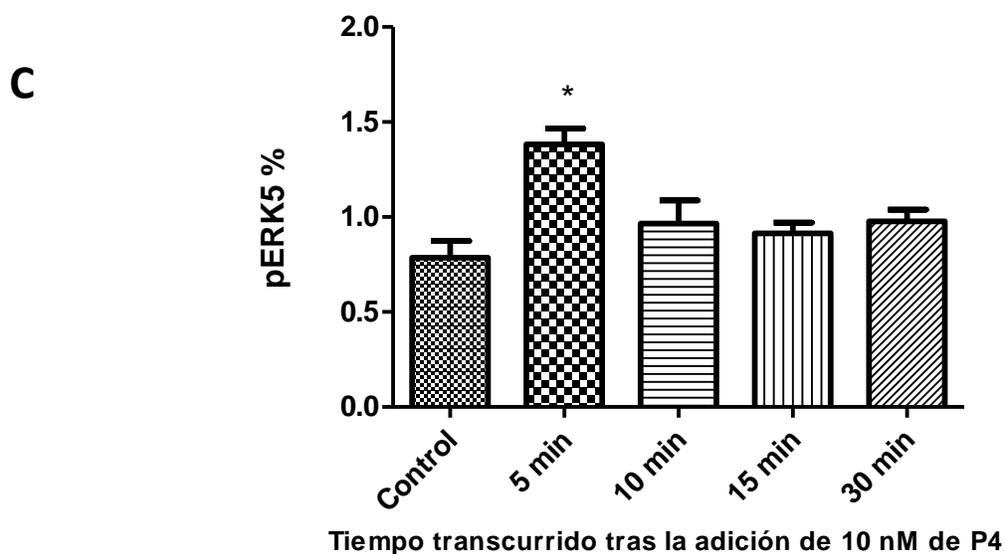
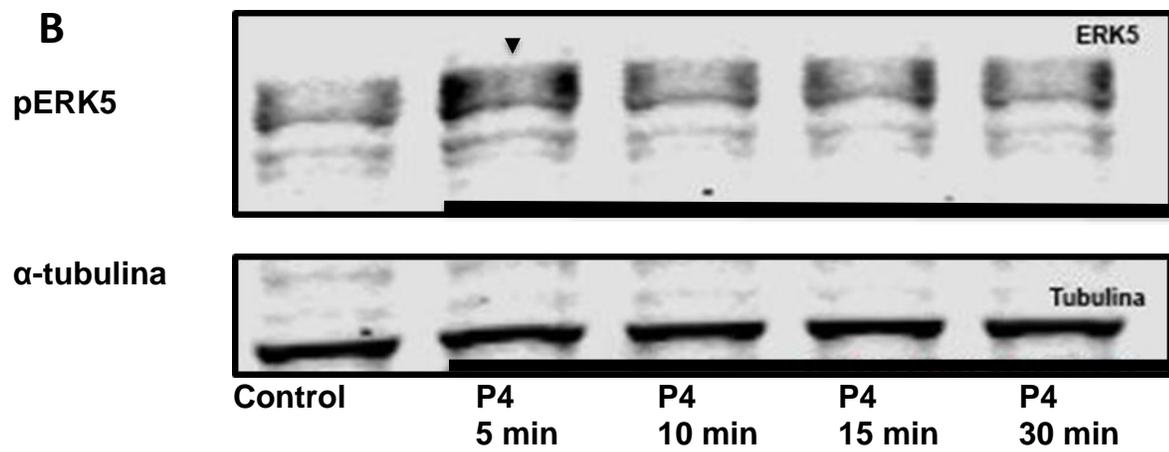
Para estudiar la participación de la cinasa ERK5 en la red de señalización mediada por P4 en células de CM, se decidió utilizar una concentración de 10 nM de P4 para la estimulación del PR en células T47D durante 5, 10, 15 y 30 min. Posteriormente se evaluó la fosforilación de ERK5 (Figura 12).

Se observó un incremento en la fosforilación de ERK5 a partir de 5 min y hasta los 30 min, siendo a los 5 minutos en donde se muestra la mayor cantidad de ERK5 fosforilada.

Este resultado sugiere que la P4 induce la activación de ERK5 a través del PR; este resultado se observa tras 5 minutos del estímulo con P4, por lo cual, se sugiere que el PR estaría actuando mediante una vía no clásica.

A





* Diferencias con respecto al control

Figura 12. Activación de ERK5 mediada por P4. A. ERK5 total después del tratamiento con P4 a una concentración de 10 nM durante 5, 10, 15 y 30 minutos B. pERK5 después del tratamiento con P4 a una concentración de 10 nM durante 5, 10, 15 y 30 min. C. Análisis densitométrico para ERK5 fosforilado. Se observa que la fosforilación es mayor después de 5 min del tratamiento con P4 (Se indica con una flecha). Los datos se normalizaron con respecto a ERK5 total, son el promedio y DS, fueron analizados con Anova de una vía, seguido de una prueba Dunns *post hoc* $p < 0.05$, $n=3^*$

6.3 La activación de ERK5 mediada por P4 es bloqueada por el inhibidor de MEK5

Debido a la participación de ERK5 en el desarrollo de la carcinogénesis, se han desarrollado inhibidores para el eje MEK5/ERK5, siendo las indolinonas-6-carboxamidas BIX02188 y BIX02189 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), los primeros inhibidores selectivos del sitio ATP de MEK5, éstos inhiben la función catalítica de MEK5. Específicamente el BIX02189 muestra una supresión más potente de la activación de ERK5 (Tatake *et al.*, 2008).

Para comprobar la función biológica de ERK5 mediada por P4 en la línea celular T47D, se utilizó BIX02189. En la literatura se ha reportado el uso de BIX02189 a una concentración de 10 μ M (Lochhead *et al.*, 2016).

Los resultados muestran que tras la adición de BIX02189 a una concentración de 10 μ M disminuye la fosforilación de ERK5 aún con el estímulo de la P4, esto comparado con el grupo tratado únicamente con P4 (Figura 13).

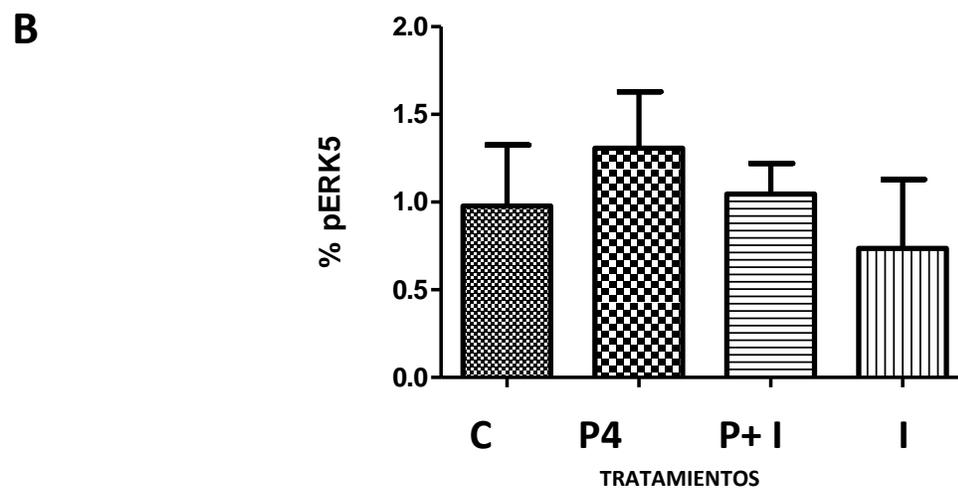
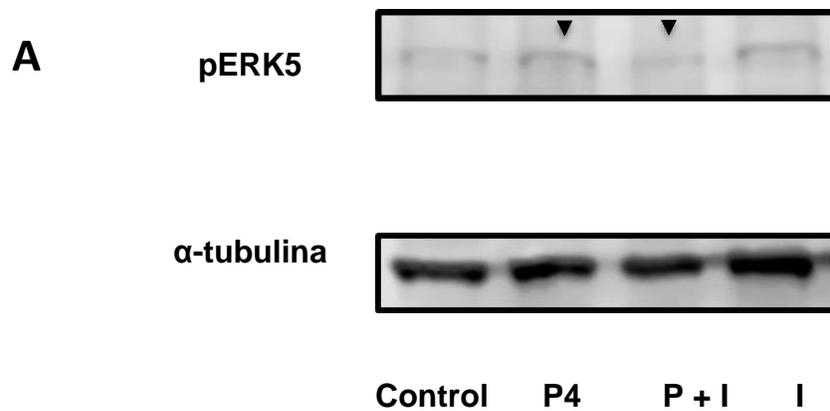


Figura 13. A. pERK5 en células control, en células después del tratamiento con P4 10 nM durante 5 min (P4), en células después del tratamiento con P4 (se indica con flecha) y el inhibidor de MEK5 (P+I) (se indica con flecha), y en células tratadas únicamente con el inhibidor de MEK5 (I). B. Análisis densitométrico para ERK5 fosforilado. Los datos son el promedio y DS, fueron analizados con una prueba de Anova de una vía. n=3 No se muestran diferencias con respecto al control.

6.4 El inhibidor de MEK5 no modifica la viabilidad celular

Para asegurar que la viabilidad celular de T47D no se vio comprometida con el uso de BIX02189 y que los efectos observados por la acción de ERK5 no dependa de la regulación de la viabilidad, se realizaron ensayos de MTT, en donde las células se trataron durante 24 h con distintas concentraciones del inhibidor (2.5, 5, 7.5 y 10 μ M).

Los resultados indican que la viabilidad celular de las células T47D no se ve afectada con ninguna de las concentraciones (Figura 14).

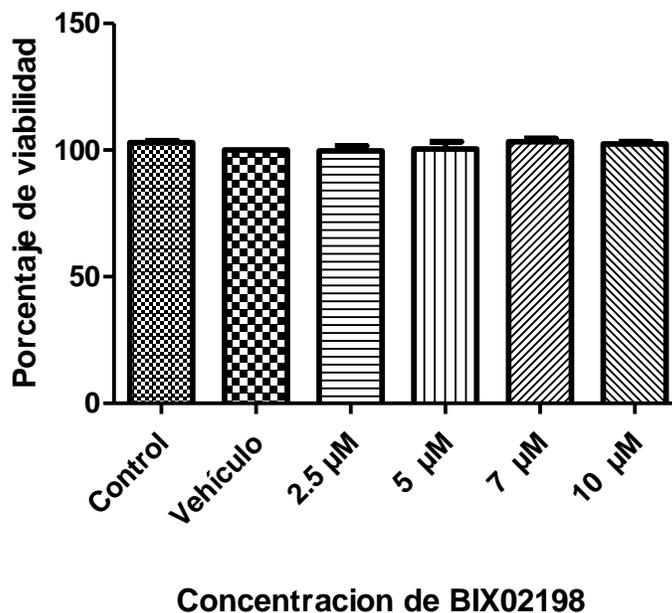


Figura 14. Porcentaje de viabilidad de células T47D a distintas concentraciones de BIX02189. En ningún grupo se observa diferencias significativas. Los datos son el promedio y DS, fueron analizados con Anova de una vía, n=3.

6.5 La localización de pERK5 es mediada por P4

La fosforilación de ERK5 por MEK5 resulta en un cambio conformacional, lo que facilita la translocación de ERK5 al núcleo, esto le da la capacidad de regular directamente la transcripción de genes, una capacidad única de ERK5 comparado con otras cinasas (Gomez *et al.*, 2016; Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012; G. Zhou *et al.*, 1995).

Para observar el efecto de la P4 sobre ERK5 en células de CM, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia.

Se formaron cuatro grupos: 1) grupo control (control), 2) grupo con P4 (P4), 3) un grupo con P4 + BIX02189 (P4+I) y 4) un grupo con BIX02189 (I).

De acuerdo con los resultados del ensayo, se sugiere que en el grupo control, pERK5 se localiza en el citoplasma. Tras la adición de P4, pERK5 se transloca al núcleo, en donde puede regular la transcripción de genes. En el grupo P4+I se observa que pERK5 se localiza en el citoplasma, confirmando que la localización y, por lo tanto, la activación de ERK5 podría estar mediada por P4. En el último grupo (I), tras la adición de BIX02189, ERK5 se localiza en el citoplasma.

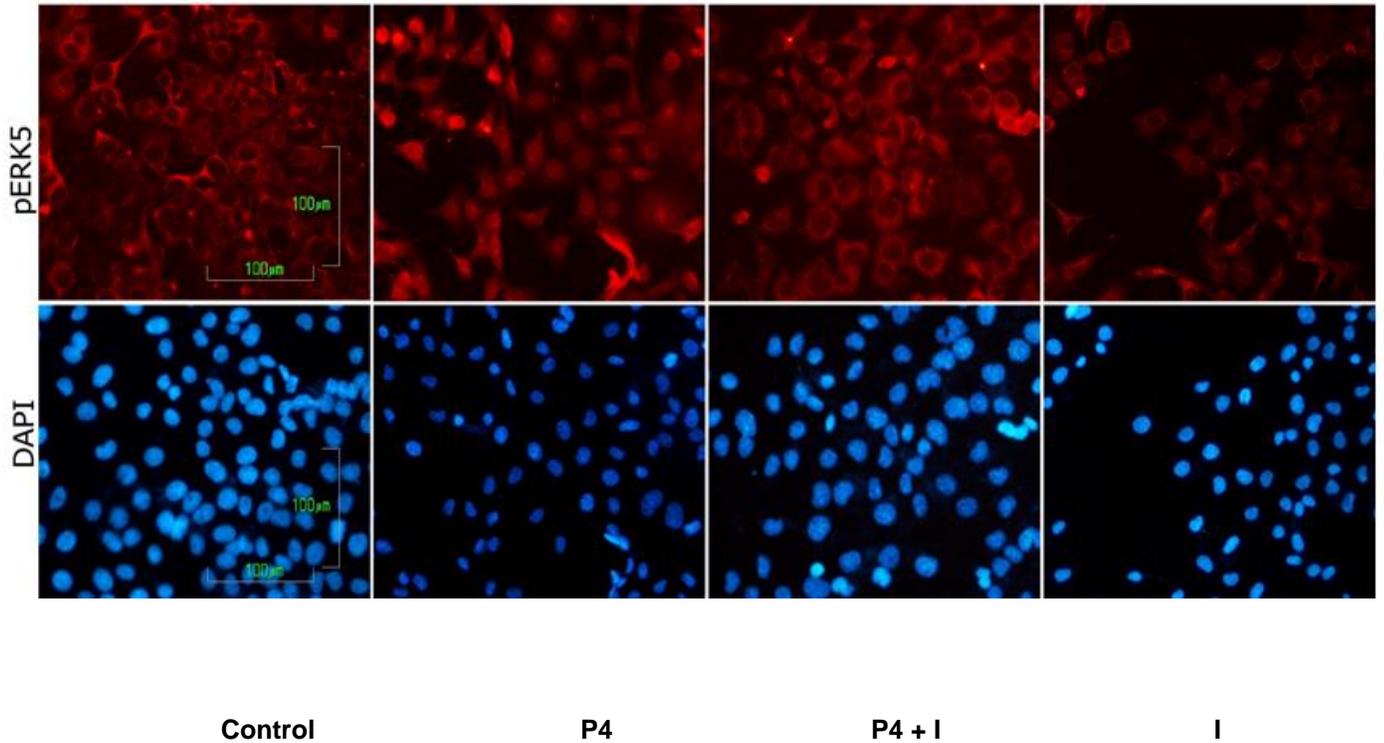


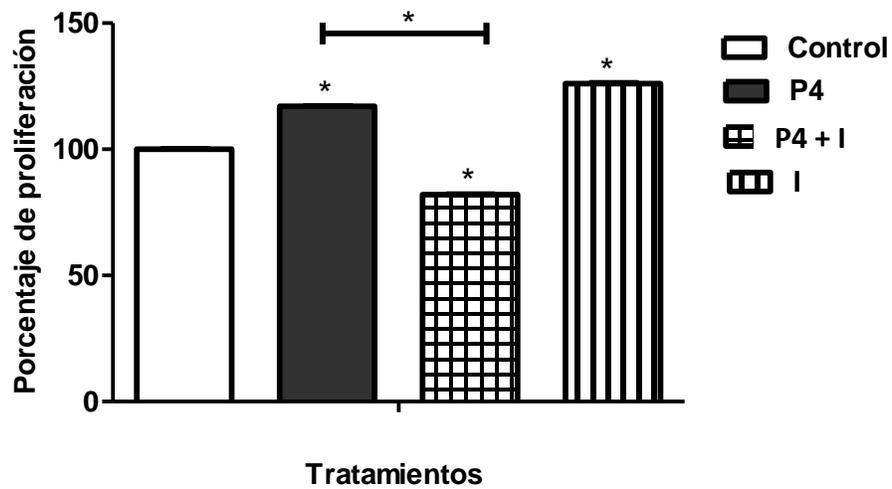
Figura 15. Localización de pERK5. Se observa la marca para pERK5 en rojo, y DAPI, que marca el núcleo en azul. Para el grupo control, se observa que la marca para pERK5 se localiza en el citoplasma (se indica con flecha). Para el grupo P4, se observa que la marca para pERK5 se localiza en el citoplasma y en el núcleo (se indica con flecha), lo que indica la translocación nuclear de pERK5 tras un estímulo de 5 min con P4, la cual se revierte tras la adición de 10 μ M de BIX 02189, como se observa en el grupo P4 + I (se indica con flecha). En el grupo I la marca para pERK5 se localiza en el citoplasma (se indica con flecha), lo cual sugiere que la localización de pERK5 es mediada por P4.

6.6 La proliferación de células de cáncer de mama a través de ERK5 es mediada por P4

Se ha reportado que ERK5 contribuye a la proliferación celular en CM, las vías por las cuales ERK5 ejerce sus funciones no han sido completamente estudiadas. Por otro lado, el efecto que la P4 tiene sobre células de CM no ha sido del todo esclarecido, por lo que para comprobar la función biológica de ERK5 mediada por P4 en la línea celular T47D se midió la proliferación celular mediante ensayos de BdrU.

Se utilizaron los mismos cuatro grupos que se describieron anteriormente: 1) Control, 2) P4, 3) P4 + I y 4) I.

Se observa que el grupo tratado con P4 muestra un porcentaje de proliferación significativamente mayor que el grupo control y que el grupo P4 + I. Por lo tanto, la P4 favorece la proliferación en células T47D, este efecto se inhibe en presencia de BIX02189, sugiriendo que ERK5 es importante para este efecto.



* Diferencia significativa con respecto al control
 * Diferencia significativa entre grupos

Figura 16. Porcentaje de proliferación de células T47D en cuatro grupos. Los tratamientos se llevaron a cabo por 24 h y se considera al grupo control con el 100 % de proliferación. Se observó que en el grupo P4 se incrementa significativamente la proliferación celular comparado con el grupo control y el grupo P4+I, lo que nos indica que la proliferación de las células T47D es resultado de la estimulación con P4 y que ésta es a través de ERK5. Los datos son el promedio y DS, fueron analizados con Anova de una vía, seguido de una prueba Dunns *post hoc* $p < 0.05$, $n=3^*$

6.7 ERK5 favorece la expresión de ciclina D1 en células de cáncer de mama

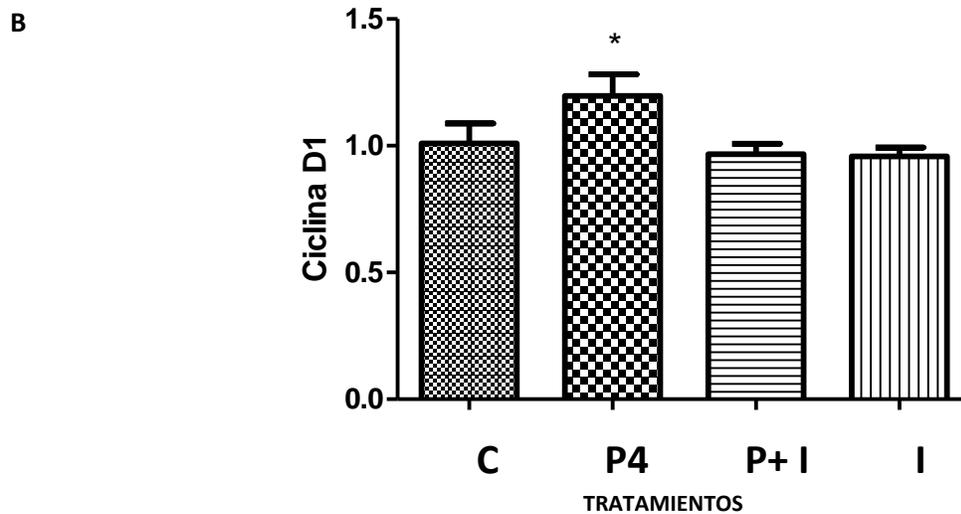
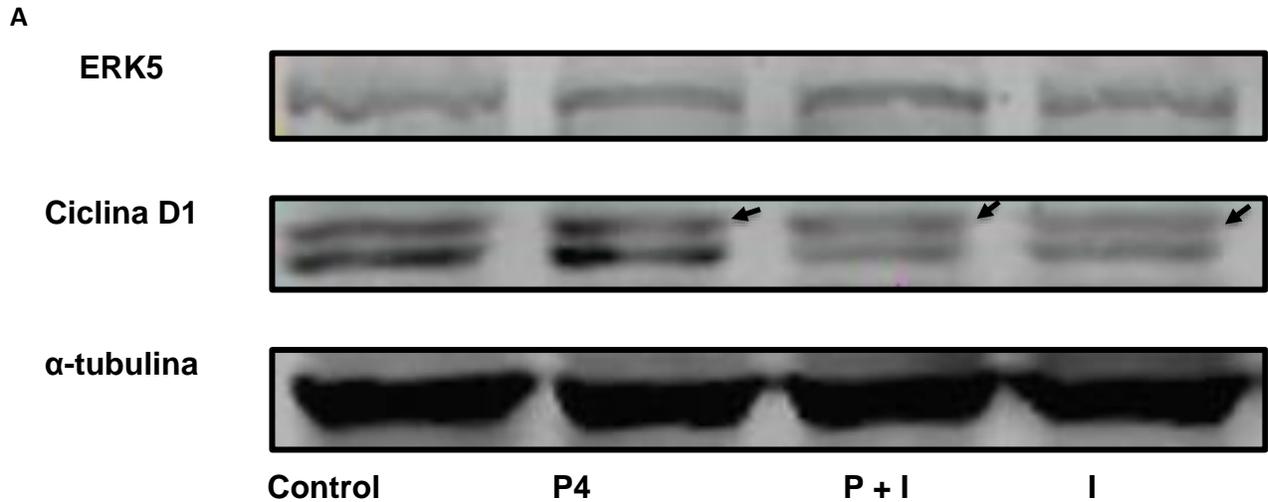
La cascada de señalización MEK5/ERK5 juega un papel importante en la proliferación celular a través de la inducción del ciclo celular mediante la regulación de la ciclina D1 (Hoang *et al.*, 2017; Gomez *et al.*, 2016).

Ciclina D1 también participa en la activación de ERK5 al favorecer, mediante las CDKs, la fosforilación del carboxilo terminal (Hoang *et al.*, 2017).

Se formaron los mismos cuatro grupos: 1) Control, 2) P4, 3) P4 + I y 4) I. Los tratamientos se administraron durante 6 h.

Se observa que en el grupo control y el grupo P4, hay una marca positiva para la presencia de ciclina D1 comparado con los grupos P4 + I e I, en donde la cantidad de ciclina D1 se ve disminuida (Figura 17).

Esto nos indica que la expresión de ciclina D1 es dependiente de la actividad de ERK5 y que éste puede ser uno de los mecanismos por los cuales la P4 contribuye a la proliferación celular en el CM.



* Diferencias con respecto al control

Figura 17. A. Expresión de ERK5 total y ciclina D1 después del tratamiento con P4 10 nM durante 6 h
 B. Análisis densitométrico para ciclina D1. Se observa que la marca para ciclina D1 aumenta en el grupo P4 (se indica con flecha) y disminuye en los tratamientos donde se agregó el inhibidor para MEK5 (se indica con flecha). Los datos son el promedio y DS, fueron analizados con Anova de una vía, seguido de una prueba Dunns *post hoc* $p < 0.05$, $n=3^*$

Discusión

Aunque el papel de la P4 en el desarrollo del CM ha sido ampliamente estudiado, uno de los mecanismos por el cual la P4 puede favorecer la carcinogénesis es mediante la activación de las MAPKs, lo cual no ha sido completamente elucidado. Se ha demostrado que ERK1/2 pueden ser activadas por la P4 a través de PR (Salazar *et al.*, 2016; Ballaré *et al.*, 2006), esto mediante la interacción de una región rica en prolina con el dominio SH3 de la cinasa c-Src (Truong *et al.*, 2019; Garg *et al.*, 2017; Leonhardt *et al.*, 2003). Estos hallazgos abren un campo de investigación sobre efectos de progesterona en cánceres hormonorregulados.

Aunque existen una gran cantidad de reportes que señalan la participación de las MAPKs en la carcinogénesis de múltiples tejidos, pocos estudios han abordado específicamente la participación de ERK5. En la actualidad existe sólo un estudio que relaciona al PR con la activación de ERK5, el cual no está relacionado con el CM, en dicho estudio se reporta que la P4 aumenta la liberación de factor neurotrófico derivado del cerebro de la glía a través de la señalización ERK5 (Su *et al.*, 2012).

El presente trabajo provee evidencia del papel que juega la P4 en la activación de ERK5 en células de CM, éste podría ser un mecanismo a través del cual se favorece el desarrollo de esta patología, ya que reportes previos han demostrado que la activación de ERK5 es capaz de promover la proliferación, migración y supervivencia de células cancerígenas en distintos tejido incluyendo; el CM (Stecca y Rovida, 2019; Chen *et al.*, 2018; Gomez *et al.*, 2016; Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012).

Para este trabajo se utilizaron las células T47D, las cuales son un excelente modelo para explorar la acción del PR, ya que éste receptor está sobreexpresado en dicha línea celular, además de provenir de un fenotipo celular en el CM de tipo luminal A, uno de los más frecuentes (Yu *et al.*, 2017).

La dosis de hormonas esteroideas en los tratamientos es muy importante y debe tomarse en cuenta, por lo que para este trabajo se realizó una curva dosis-respuesta de P4 durante 15 min con la que corroboramos que la concentración a la cual el PR, en las células T47D, se activa es 10 nM (Figura 11). Esta concentración puede ser específica para la línea celular T47D, ya que las concentraciones de P4 en condiciones fisiológicas varían según la edad y etapa del ciclo menstrual. También era necesario estudiarla ya que una característica de la hormona natural (P4) es que se metaboliza rápidamente, por lo que los investigadores prefieren usar R5020, una progestina sintética de larga duración y que es muy específica para el PR. Sin embargo, para este trabajo se utilizó la P4 natural con el fin de observar los resultados de una forma más cercana a lo que ocurriría en condiciones fisiológicas tras la unión a sus receptores y sus interacciones. La concentración que se estableció para los tratamientos fue de 10 nM. En la figura 11 se muestra una curva representativa de los análisis de dosis-respuesta.

Para conocer si ERK5 podía activarse como resultado de la acción de la P4, se realizó una curva a diferentes tiempos con una concentración de 10 nM de P4 (Figura 12), en donde observamos que la fosforilación de ERK5 fue mayor en los primeros 5 minutos después del tratamiento con P4. Esto demostró que la cinasa ERK5 puede activarse como resultado de la acción de la P4 en la línea celular T47D. La respuesta rápida

observada después de la administración de la P4 indica que el efecto mediado por esta hormona no es por una vía transcripcional, es decir, el mecanismo por el cual ERK5 puede ser activada, como parte de la señalización mediada por la P4, se explica por la acción no clásica de esta hormona, ya que la activación de la cinasa ERK5 se observó tan solo 5 min después de administrar el tratamiento con P4 y una de las características de la vía no clásica de la P4 es que se puede completar en minutos, por lo que es rápida comparada con la vía clásica, pues es independiente de la regulación genómica. De esta manera es capaz de inducir una respuesta celular mediando una gran cantidad de procesos que contribuyen de forma directa en el desarrollo del cáncer (Garg *et al.*, 2017). En la vía no clásica, la activación de vías de señalización juega un papel muy importante para los efectos rápidos que se observan.

La activación de la cinasa ERK5, que se observó en este trabajo se puede explicar debido a la existencia de una compleja red de proteínas que son capaces de interactuar con el PR.

Se ha reportado que un mecanismo a través del cual hormonas esteroideas, como la P4 y el E2, activan vías de señalización es mediante la interacción con dominios de la proteína c-Src, y que esta interacción estimula la activación de RAS, lo que a su vez puede promover la activación de las MAPKs (Ballaré *et al.*, 2003).

Por un lado se ha reportado que el PR, una vez que se une con su ligando, es capaz de interactuar con ER α (Mohammed *et al.*, 2015; Ballaré *et al.*, 2003), el cual a su vez interactúa con el dominio SH3 de la cinasa c-Src, (Hernández-Hernández *et al.*, 2010; Ballaré *et al.*, 2003;) y, por otro lado, el PR tiene un dominio rico en prolina (Figura 18), el cual permite que el PR interactúe de manera directa con el dominio SH3 de la cinasa

c-Src (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2001). El dominio SH3 forma parte de una interacción intramolecular que es capaz de mantener a la proteína cinasa inactiva. Sin embargo, si hay una interacción intermolecular a través del dominio SH3 se promueve un aumento de la actividad catalítica de la cinasa (Jean Y.J. *et al.* 2003).

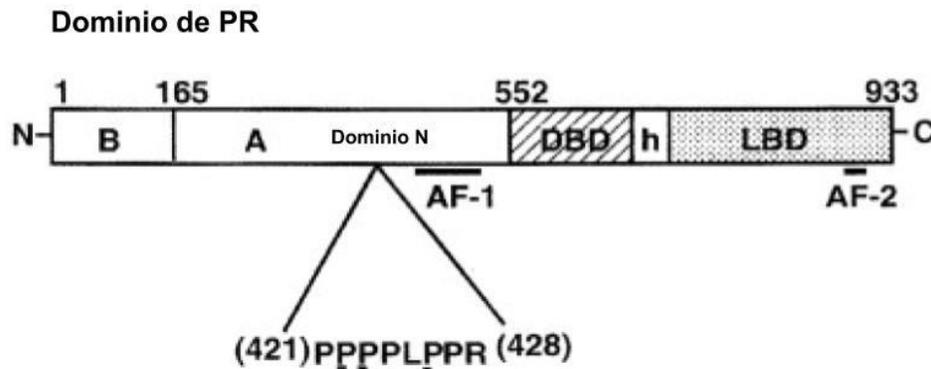


Figura 18. Representación esquemática del receptor a progesterona. Se indica la posición de la región rica en prolina, la cual abarca desde el aminoácido 421 hasta el aminoácido 428, esta región es capaz de interactuar con la cinasa c-Src. Se muestra el dominio de unión al ligando (LBD), una región bisagra (h), el dominio de unión al ADN (DBD), el dominio del amino terminal (B) y los dominios de activación transcripcional (AF1-AF2 Y AF3) Modificado de Boonyaratanakornkit *et al.*, 2001

Los activadores río arriba de MEK5/ERK5 son las MAPKKKs, MEKK2 y MEKK3, los cuales a su vez pueden activarse por RAS y c-Src (Figura 7) (Stecca y Rovida, 2019). Se ha demostrado que tras la activación de MEKK2, éste se dimeriza con una proteína de andamiaje llamada Lad, lo que permite que se forme el complejo MEKK2-Lad, el cual es necesario para la activación dependiente de c-Src de ERK5. La única MAPKK que puede activar directamente a ERK5 es MEK5, la cual es activada por MEKK2 o MEKK3 al ser fosforilada en Ser311/Thr315. Cuando MEK5 es fosforilada, puede activar a ERK5 fosforilando los residuos Thr218/Tyr220 del motivo T-E-Y presente

dentro del bucle de activación del dominio de cinasa de ERK5 (Stecca y Rovida, 2019; Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012).

Hay una gran cantidad de evidencias que sugiere que la activación de ERK5 es dependiente de la cinasa c-Src (Stecca y Rovida, 2019; Schramp *et al.*, 2008; Barros y Marshall, 2005; Scapoli *et al.*, 2004; Suzaki *et al.*, 2002; Abe *et al.*, 1997). Por lo tanto, la interacción del ER α con el dominio SH3 de c-Src, mediando por PR, y la interacción del dominio rico en prolina del PR con el dominio SH3 de la cinasa c-Src podría promover la activación de esta proteína y de la proteína RAS, lo que a su vez promueve la activación de ERK5.

Por otro lado, encontramos que en células T47D la localización celular de pERK5 también es dependiente de la activación del PR. Mediante un ensayo de inmunofluorescencia se observó que, en el grupo control, la localización de ERK5 es principalmente citoplasmática y, tras la adición de P4 durante 5 min, la cinasa ERK5 se transloca al núcleo, en donde puede regular la transcripción de genes (Figura 15). Esto es consistente con nuestros resultados; la cinasa ERK5 puede activarse como resultado de la acción de la P4 en la línea celular T47D. Se ha demostrado que cuando ERK5 no está activa, se localiza en el citoplasma y se transloca al núcleo cuando coexiste con una forma activa de MEK5. Por lo tanto, la localización nuclear de ERK5 es dependiente de su activación, la cual se da tras su fosforilación por MEK5 (Kondoh *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 1997;).

La localización nuclear de ERK5 se debe a que en el dominio carboxilo terminal de ERK5 hay un dominio proteico con una señal de localización nuclear (NLS) que abarca desde el aminoácido 505 hasta el 539 (Figura 8) (Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012)

Cuando ERK5 no está fosforilada se encuentra plegada, facilitando la interacción entre los dominios amino y carboxilo terminal, lo cual genera una señal de exportación nuclear (NES), secuestrando así a ERK5 en el citoplasma (Figura 9). Sin embargo, tras la doble fosforilación en Thr218/Tyr220 por MEK5, ERK5 sufre un cambio conformacional que interrumpe la señal de exportación nuclear (NES) favoreciendo que se exponga la señal de localización nuclear (NLS) y como consecuencia se transloca al núcleo (Figura 9) (Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012).

La desfosforilación de ERK5 favorece una conformación plegada de la proteína mostrando la señal de exportación nuclear (NES) y de esta manera reubicando a ERK5 en el citoplasma (Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012; Kondoh *et al.*, 2006).

Para corroborar todo lo anterior, utilizamos BIX02189, un inhibidor de MEK5. En el grupo que fue tratado con P4 + BIX02189, se observa que ERK5 se localiza en el citoplasma (Figura 15), sugiriendo que la localización, y por lo tanto la activación de ERK5, está mediada por la P4.

BIX02189 pertenece al grupo de las indolinonas-6-carboxamidas, el cual es un inhibidor selectivo del sitio ATP de MEK5. Éste inhibe la función catalítica del MEK5, lo cual impide que ERK5 sea fosforilado, inhibiendo su activación, favoreciendo su conformación plegada y secuestrando a ERK5 en el citoplasma (Tatake *et al.*, 2008).

En el último grupo (I) donde sólo se añadió BIX02189, ERK5 se localiza en el citoplasma (Figura 15). Este resultado se apoya con la disminución en la marca de fosforilación de pERK5 que se observa tras la adición de BIX02189 (Figura 13), sin embargo, en este último estudio se requiere la normalización con ERK5 total.

Por último, este trabajo sugiere que la activación del eje MEK5/ERK5 participa en la proliferación de células T47D de CM y que ésta está mediada por la P4. Se realizaron ensayos de proliferación a 24 h mediante la técnica de BdrU y se demostró que en el tratamiento con P4 la proliferación celular incrementa significativamente comparada con el control y con el grupo tratado con P4 + BIX02189, sugiriendo que la proliferación en células T47D de CM observada en el tratamiento con P, es tras la activación de ERK5, pues su inhibición, aún con el estímulo de la P4, implica el decremento de la proliferación.

Se ha demostrado que ERK5 es capaz de interactuar directamente con distintos factores de transcripción, incluyendo c-Myc, Sap1a, c-Fos, Fra-1, y los miembros de la familia MEF2, además de favorecer la expresión de diversas ciclinas, y como consecuencia participa en distintos procesos celulares, entre ellos la supervivencia, la migración, la diferenciación y la proliferación celular, un proceso determinante en el desarrollo de la carcinogénesis y por lo que ERK5 es considerado un posible blanco terapéutico (Stecca y Rovida, 2019; Chen *et al.*, 2018; Gomez *et al.*, 2016; ; Nithianandarajah-Jones *et al.*, 2012; Kondoh *et al.*, 2006).

En este trabajo observamos que la activación de ERK5 estimula la expresión de la ciclina D1 (Figura 17). La ciclina D1 es una proteína clave en el CM, se ha visto que es dependiente de la P4, mediada por el PR-B y que su desregulación conduce a un crecimiento proliferativo, esto ha sido demostrado en células T47D (Dressing *et al.*, 2014; Groshong *et al.*, 1997).

La estimulación de la expresión de la ciclina D1 que observamos en nuestros resultados puede ser uno de los mecanismos por los cuales la P4, a través del receptor

a PR y el eje MEK/ERK5, regula el ciclo celular y estimula la proliferación en células T47D de CM.

Se corroboró, mediante ensayos de viabilidad celular con la técnica de MTT, que la viabilidad y proliferación de las células T47D no estuviera comprometida con el uso de BIX02189 (Figura 14) lo cual resulta muy importante para asegurar que el efecto observado en la proliferación celular está mediado por los ejes P4/PR y MEK5/ERK5.

La P4 y el PR no son la única combinación de receptores y ligandos que probablemente juegue un papel en el CM, se ha reportado que ER importante para el desarrollo de la carcinogénesis del CM, que interactúa con la proteína c-Src y promueve la activación de las MAPKs (Leonhardt *et al.*, 2003). Sin embargo, nuestros resultados brindan evidencia de que P4/PR es un eje importante para el desarrollo de la carcinogénesis, ya que favorece la proliferación celular. Además, debido a los múltiples mecanismos por los cuales esta hormona puede actuar, resulta de suma importancia esclarecer las vías que contribuyen a esta patología. En este trabajo también se brinda la primera evidencia de la participación de la cinasa ERK5 como parte de la señalización mediada por P4 en el desarrollo del CM, proponiendo que la activación del PR tras la unión a su ligando natural (P4) favorece la activación del eje MEK5/ERK5 y la translocación nuclear de la cinasa, lo cual a su vez puede regular distintos genes y proteínas, como la ciclina D1, y favorecer procesos biológicos importantes en la carcinogénesis, como la proliferación (Figura 19).

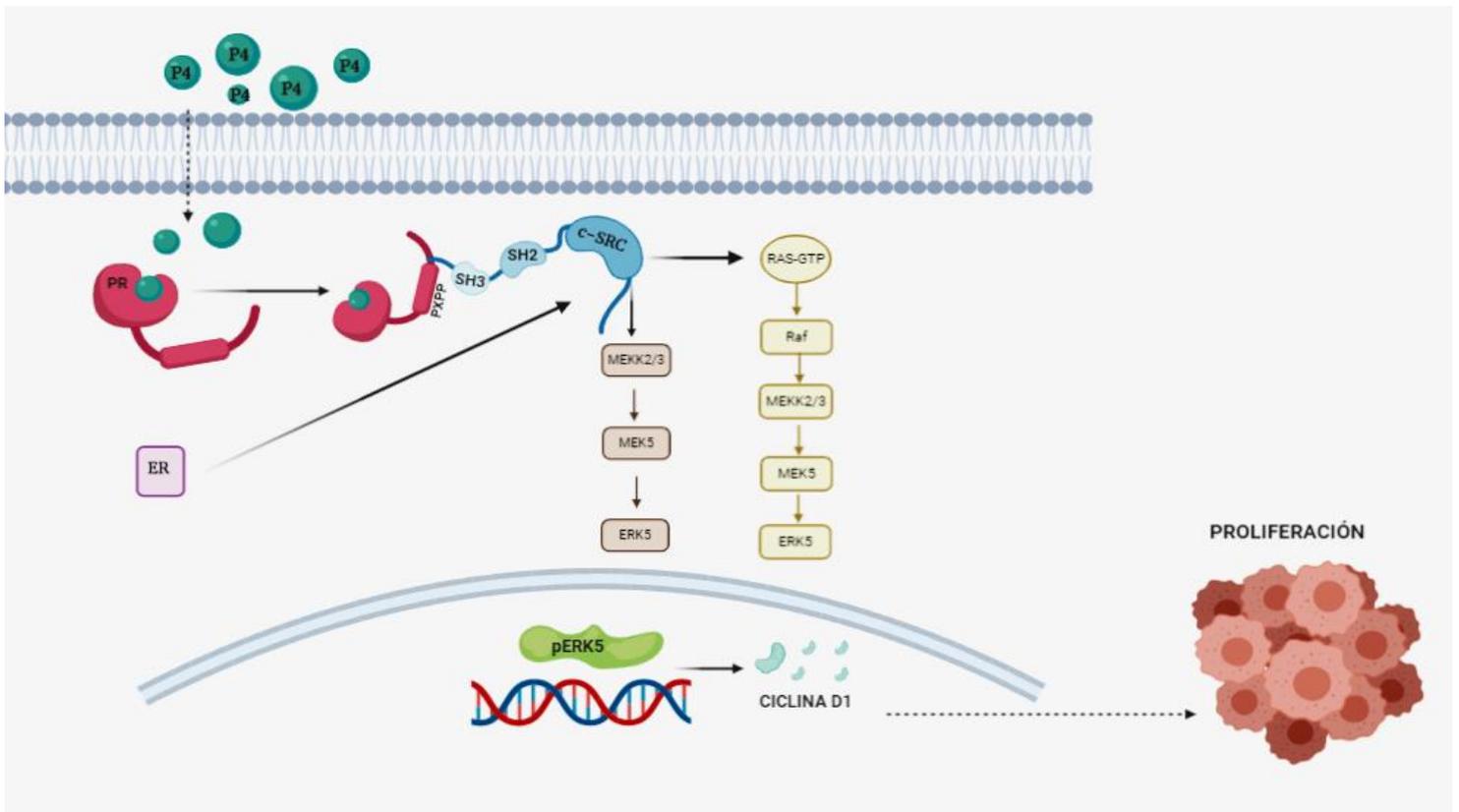


Figura 19. Esquema de la red de señalización propuesta de ERK5 mediada por la P4. La P4 se une al receptor nuclear que está ubicado en el citoplasma, éste interactúa con ER, el cual a su vez interactúa con la proteína c-Src, que es capaz de promover la activación de ERK5. Una vez que P4 se une a PR, éste interactúa directamente con la proteína c-Src promoviendo la activación de ERK5. Cuando ERK5 es activada, se transloca al núcleo y regula la transcripción de genes y proteínas, como la ciclina D1, lo que favorece la proliferación celular.

En conjunto, los resultados de este estudio sugieren que la activación de la cinasa ERK5 mediada por la P4 puede tener un papel importante en el mantenimiento de la proliferación de células de CM. Una mejor comprensión del papel de este eje en el CM y otros tipos de cáncer hormonorregulados abre nuevas perspectivas en el enfoque terapéutico del CM, ya que ERK5 podría ser un nuevo biomarcador molecular y blanco terapéutico en patologías hormonodependientes.

Conclusión

Los datos sugieren que ERK5 es un componente importante en la vía de señalización mediada por P4 en células T47D de CM.

Lo datos sugieren que en células T47D de CM, la activación de ERK5 es mediada por P4 e induce su translocación al núcleo, la cual fue inhibida por BIX02189 un inhibidor específico de MEK5.

Los resultados en general contribuyen a la elucidación de la participación de ERK5 como parte de la vía de señalización mediada por P4 en células T47D, las cuales representan un modelo de estudio interesante, ya que este tipo celular deriva de uno de los tipos más comunes de CM. Además, podría ofrecer nuevas alternativas para el diagnóstico o pronóstico para el CM, así como opciones terapéuticas.

Perspectivas

Este proyecto abre una novedosa vía de señalización regulada por la P4 en el CM, y para continuar explorándola se contempla el uso de herramientas moleculares masivas de nueva generación para la identificación de los genes y proteínas blanco de ERK5 una vez que está activada, así como el empleo de ensayos biológicos para confirmar la importancia de esta cinasa en el fenotipo de células tumorales de mama a través de distintas líneas celulares.

Referencias

- Abe, J.-I., Takahashi, M., Ishida, M., Lee, J.-D., & Berk, B. C. (1997). c-Src Is Required for Oxidative Stress-mediated Activation of Big Mitogen-activated Protein Kinase 1 (BMK1). *The Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20389–20394.
- Antoon, J. W., Martin, E. C., Lai, R., Salvo, V. A., Tang, Y., Nitzchke, A. M., Elliott, S., Nam, S. Y., Xiong, W., Rhodes, L. V., Collins-Burow, B., David, O., Wang, G., Shan, B., Beckman, B. S., Nephew, K. P., & Burow, M. E. (2013). MEK5/ERK5 signaling suppresses estrogen receptor expression and promotes hormone-independent tumorigenesis. *PloS One*, 8(8), e69291.
- Arnedos, M., & Andre, F. (2011). Tumor genotyping for breast cancer: at the front door. *Personalized Medicine*, 8(4), 383–385.
- Ballaré, C., Uhrig, M., Bechtold, T., Sancho, E., Di Domenico, M., Migliaccio, A., Auricchio, F., & Beato, M. (2003). Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 23(6), 1994–2008.
- Ballaré, C., Vallejo, G., Vicent, G. P., Saragüeta, P., & Beato, M. (2006). Progesterone signaling in breast and endometrium. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 102(1), 2–10.
- Bamberger, A. M., Milde-Langosch, K., Schulte, H. M., & Löning, T. (2000). Progesterone receptor isoforms, PR-B and PR-A, in breast cancer: correlations with clinicopathologic tumor parameters and expression of AP-1 factors. *Hormone Research*, 54(1), 32–37.

- Bardaweel, S. K., Akour, A. A., Al-Muhaissen, S., AlSalamat, H. A., & Ammar, K. (2019). Oral contraceptive and breast cancer: do benefits outweigh the risks? A case - control study from Jordan. *BMC Women's Health*, 19(1), 72.
- Barros, J. C., & Marshall, C. J. (2005). Activation of either ERK1/2 or ERK5 MAP kinase pathways can lead to disruption of the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 8), 1663–1671.
- Bigeard, J., & Hirt, H. (2018). Nuclear Signaling of Plant MAPKs. *Frontiers in Plant Science*, 9, 469.
- Bonneterre, J., Bosq, J., Jamme, P., Valent, A., Gilles, E. M., Zukiwski, A. A., Fuqua, S. A. W., Lange, C. A., & O'Shaughnessy, J. (2016). *Tumour and cellular distribution of activated forms of PR in breast cancers: a novel immunohistochemical analysis of a large clinical cohort*. *Molecular Cell*, 8(2), 269–280.
- Boonyaratanakornkit, V., Scott, M. P., Ribon, V., Sherman, L., Anderson, S. M., Maller, J. L., Miller, W. T., & Edwards, D. P. (2001). Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Molecular Cell*, 8(2), 269–280.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
- Brisken, C. (2013). Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight. *Nature Reviews. Cancer*, 13(6), 385–396.
- Buschbeck, M., & Ullrich, A. (2005). The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(4), 2659–2667.

- Cahill, M. A. (2007). Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 105(1-5), 16–36.
- Chen, C., Wu, S., Lin, X., Wu, D., Fischbach, S., & Xiao, X. (2018). ERK5 plays an essential role in gestational beta-cell proliferation. *Cell Proliferation*, 51(3), e12410.
- Coughlin, S. S. (2019). Epidemiology of Breast Cancer in Women. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1152, 9–29.
- Coulombe, P., & Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773(8), 1376–1387.
- Daniel, A. R., Faivre, E. J., & Lange, C. A. (2007). Phosphorylation-dependent antagonism of sumoylation derepresses progesterone receptor action in breast cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 21(12), 2890–2906.
- Daniel, A. R., Gaviglio, A. L., Knutson, T. P., Ostrander, J. H., D'Assoro, A. B., Ravindranathan, P., Peng, Y., Raj, G. V., Yee, D., & Lange, C. A. (2015). Progesterone receptor-B enhances estrogen responsiveness of breast cancer cells via scaffolding PELP1- and estrogen receptor-containing transcription complexes. *Oncogene*, 34(4), 506–515.
- Davis, N. M., Sokolosky, M., Stadelman, K., Abrams, S. L., Libra, M., Candido, S., Nicoletti, F., Polesel, J., Maestro, R., D'Assoro, A., Drobot, L., Rakus, D., Gizak, A., Laidler, P., Dulińska-Litewka, J., Basecke, J., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Montalto, G., ... McCubrey, J. A. (2014). Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. *Oncotarget*, 5(13), 4603–4650.

- Del Pup, L., Codacci-Pisanelli, G., & Peccatori, F. (2019). Breast cancer risk of hormonal contraception: Counselling considering new evidence. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 137, 123–130.
- Diep, C. H., Daniel, A. R., Mauro, L. J., Knutson, T. P., & Lange, C. A. (2015). Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *Journal of Molecular Endocrinology*, 54(2), R31–R53.
- Dong, X. Y., & Jin, J. (2018). Personality risk factors of occurrence of female breast cancer: a case-control study in China. *Psychology, Health & Medicine*, 23(10), 1239–1249.
- Dossus, L., & Benusiglio, P. R. (2015). Lobular breast cancer: incidence and genetic and non-genetic risk factors. *Breast Cancer Research: BCR*, 17, 37.
- Dressing, G. E., Knutson, T. P., Schiewer, M. J., Daniel, A. R., Hagan, C. R., Diep, C. H., Knudsen, K. E., & Lange, C. A. (2014). Progesterone receptor-cyclin D1 complexes induce cell cycle-dependent transcriptional programs in breast cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 28(4), 442–457.
- Elena Provenzano, MBBS, PhD, FRCPatha,b, Gary A. Ulaner. (2018). Molecular Classification of Breast Cancer. *Positron Emission Tomography*.
- Finegan, K. G., Perez-Madriral, D., Hitchin, J. R., Davies, C. C., Jordan, A. M., & Tournier, C. (2015). ERK5 is a critical mediator of inflammation-driven cancer. *Cancer Research*, 75(4), 742–753.
- Florio, A. A., Ferlay, J., Znaor, A., Ruggieri, D., Alvarez, C. S., Laversanne, M., Bray, F., McGlynn, K. A., & Petrick, J. L. (2020). Global trends in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma incidence from 1993 to 2012.
- Folkerd, E., & Dowsett, M. (2013). Sex hormones and breast cancer risk and prognosis. *Breast*, 22 Suppl 2, S38–S43.

- Gaestel, M. (2015). MAPK-Activated Protein Kinases (MKs): Novel Insights and Challenges. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3, 88.
- Garg, D., Ng, S. S. M., Baig, K. M., Driggers, P., & Segars, J. (2017). Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 28(9), 656–668.
- Giovannelli, P., Di Donato, M., Galasso, G., Di Zazzo, E., Medici, N., Bilancio, A., Migliaccio, A., & Castoria, G. (2019). Breast cancer stem cells: The role of sex steroid receptors. *World Journal of Stem Cells*, 11(9), 594–603.
- Gomez, N., Erazo, T., & Lizcano, J. M. (2016). ERK5 and Cell Proliferation: Nuclear Localization Is What Matters. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 105.
- Gompel, A., & Plu-Bureau, G. (2018). Progesterone, progestins and the breast in menopause treatment. *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society*, 21(4), 326–332.
- Grimm, S. L., Hartig, S. M., & Edwards, D. P. (2016). Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *Journal of Molecular Biology*, 428(19), 3831–3849.
- Groshong, S. D., Owen, G. I., Grimison, B., Schauer, I. E., Todd, M. C., Langan, T. A., Sclafani, R. A., Lange, C. A., & Horwitz, K. B. (1997). Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27(Kip1). *Molecular Endocrinology*, 11(11), 1593–1607.
- Guo, Y.-J., Pan, W.-W., Liu, S.-B., Shen, Z.-F., Xu, Y., & Hu, L.-L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(3), 1997–2007.

- Hagan, C. R., & Lange, C. A. (2014). Molecular determinants of context-dependent progesterone receptor action in breast cancer. *BMC Medicine*, *12*, 32.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674.
- Hernández-Hernández, O. T., Rodríguez-Dorantes, M., González-Arenas, A., & Camacho-Arroyo, I. (2010). Progesterone and estradiol effects on SRC-1 and SRC-3 expression in human astrocytoma cell lines. *Endocrine*, *37*(1), 194–200.
- Hill, K. K., Roemer, S. C., Churchill, M. E. A., & Edwards, D. P. (2012). Structural and functional analysis of domains of the progesterone receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *348*(2), 418–429.
- Hoang, V. T., Yan, T. J., Cavanaugh, J. E., Flaherty, P. T., Beckman, B. S., & Burow, M. E. (2017). Oncogenic signaling of MEK5-ERK5. *Cancer Letters*, *392*, 51–59.
- Hsieh, F.-C., Cheng, G., & Lin, J. (2005). Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *335*(2), 292–299.
- Jacobsen, B. M., & Horwitz, K. B. (2012). Progesterone Receptors, their Isoforms and Progesterone Regulated Transcription. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *357*(1-2), 18–29.
- Jiang, W., Wang, X., Zhang, C., Xue, L., & Yang, L. (2020). Expression and clinical significance of MAPK and EGFR in triple-negative breast cancer. *Oncology Letters*, *19*(3), 1842–1848.
- Kato, Y., Kravchenko, V. V., Tapping, R. I., Han, J., Ulevitch, R. J., & Lee, J. D. (1997). BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *The EMBO Journal*, *16*(23), 7054–7066.

- Kensler, K. H., Eliassen, A. H., Rosner, B. A., Hankinson, S. E., Brown, M., & Tamimi, R. M. (2019). Pre-diagnostic sex hormone levels and survival among breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment, 174*(3), 749–758.
- Knutson, T. P., Truong, T. H., Ma, S., Brady, N. J., Sullivan, M. E., Raj, G., Schwertfeger, K. L., & Lange, C. A. (2017). Posttranslationally modified progesterone receptors direct ligand-specific expression of breast cancer stem cell-associated gene programs. *Journal of Hematology & Oncology, 10*(1), 89.
- Kondoh, K., Terasawa, K., Morimoto, H., & Nishida, E. (2006). Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Molecular and Cellular Biology, 26*(5), 1679–1690.
- Lanari, C., Wargon, V., Rojas, P., & Molinolo, A. A. (2012). Antiprogestins in breast cancer treatment: are we ready? *Endocrine-Related Cancer, 19*(3), R35–R50.
- Leonhardt, S. A., Boonyaratanakornkit, V., & Edwards, D. P. (2003). Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids, 68*(10-13), 761–770.
- Liu, L., Cavanaugh, J. E., Wang, Y., Sakagami, H., Mao, Z., & Xia, Z. (2003). ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100*(14), 8532–8537.
- Li, Z., Li, J., Mo, B., Hu, C., Liu, H., Qi, H., Wang, X., & Xu, J. (2008). Genistein induces cell apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA, 22*(7), 1749–1753.

- Lochhead, P. A., Clark, J., Wang, L.-Z., Gilmour, L., Squires, M., Gilley, R., Foxton, C., Newell, D. R., Wedge, S. R., & Cook, S. J. (2016). Tumor cells with KRAS or BRAF mutations or ERK5/MAPK7 amplification are not addicted to ERK5 activity for cell proliferation. *Cell Cycle*, 15(4), 506–518.
- Low, H. B., & Zhang, Y. (2016). Regulatory Roles of MAPK Phosphatases in Cancer. *Immune Network*, 16(2), 85–98.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, 10(10), 955–960.
- Marsden, J. (2017). Hormonal contraception and breast cancer, what more do we need to know? *Post Reproductive Health*, 23(3), 116–127.
- Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M., & Auricchio, F. (1998). Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *The EMBO Journal*, 17(7), 2008–2018.
- Miranda, M., Rozali, E., Khanna, K. K., & Al-Ejeh, F. (2015). MEK5-ERK5 pathway associates with poor survival of breast cancer patients after systemic treatments. *Oncoscience*, 2(2), 99–101.
- Mohammed, H., Russell, I. A., Stark, R., Rueda, O. M., Hickey, T. E., Tarulli, G. A., Serandour, A. A., Birrell, S. N., Bruna, A., Saadi, A., Menon, S., Hadfield, J., Pugh, M., Raj, G. V., Brown, G. D., D'Santos, C., Robinson, J. L. L., Silva, G., Launchbury, R., ... Carroll, J. S. (2015). Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. *Nature*, 523(7560), 313–317.

- Montero, J. C., Ocaña, A., Abad, M., Ortiz-Ruiz, M. J., Pandiella, A., & Esparís-Ogando, A. (2009). Expression of Erk5 in early stage breast cancer and association with disease free survival identifies this kinase as a potential therapeutic target. *PLoS One*, *4*(5), e5565.
- Mørch, L. S., Skovlund, C. W., Hannaford, P. C., Iversen, L., Fielding, S., & Lidegaard, Ø. (2017). Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *377*(23), 2228–2239.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, *65*(1-2), 55–63.
- Nithianandarajah-Jones, G. N., Wilm, B., Goldring, C. E. P., Müller, J., & Cross, M. J. (2012). ERK5: structure, regulation and function. *Cellular Signalling*, *24*(11), 2187–2196.
- Parl, F. F., Crooke, P. S., Plummer, W. D., Jr, & Dupont, W. D. (2018). Genomic-Epidemiologic Evidence That Estrogens Promote Breast Cancer Development. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *27*(8), 899–907.
- Pavan, S., Meyer-Schaller, N., Diepenbruck, M., Kalathur, R. K. R., Saxena, M., & Cristofori, G. (2018). A kinome-wide high-content siRNA screen identifies MEK5-ERK5 signaling as critical for breast cancer cell EMT and metastasis. *Oncogene*, *37*(31), 4197–4213.
- Pelucchi, C., Levi, F., & La Vecchia, C. (2010). The rise and fall in menopausal hormone therapy and breast cancer incidence. *Breast*, *19*(3), 198–201.

- Piette, P. (2018). The history of natural progesterone, the never-ending story. *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society*, 21(4), 308–314.
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., & Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*, 24 Suppl 2, S26–S35.
- Reed, B. G., & Carr, B. R. (2018). The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation. In K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, L. Perreault, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, D. L. Trencze, ... D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc.
- Richer, J. K., Jacobsen, B. M., Manning, N. G., Abel, M. G., Wolf, D. M., & Horwitz, K. B. (2002). Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 5209–5218.
- Rojas, P. A., May, M., Sequeira, G. R., Elia, A., Alvarez, M., Martínez, P., Gonzalez, P., Hewitt, S., He, X., Perou, C. M., Molinolo, A., Gibbons, L., Abba, M. C., Gass, H., & Lanari, C. (2017). Progesterone Receptor Isoform Ratio: A Breast Cancer Prognostic and Predictive Factor for Antiprogestin Responsiveness. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(7).
- Salazar, M., Lerma-Ortiz, A., Hooks, G. M., Ashley, A. K., & Ashley, R. L. (2016). Progestin-mediated activation of MAPK and AKT in nuclear progesterone receptor negative breast epithelial cells: The role of membrane progesterone receptors. *Gene*, 591(1), 6–13.
- Samson, M., Porter, N., Orekoya, O., Hebert, J. R., Adams, S. A., Bennett, C. L., & Steck, S. E. (2016). Progestin and breast cancer risk: a systematic review. *Breast Cancer Research and Treatment*, 155(1), 3–12.

- Sathyamoorthy, N., & Lange, C. A. (2020). Progesterone and Breast Cancer: an NCI Workshop Report. *Hormones & Cancer*, 11(1), 1–12.
- Sauter, E. R. (2018). Breast Cancer Prevention: Current Approaches and Future Directions. *European Journal of Breast Health*, 14(2), 64–71.
- Scapoli, L., Ramos-Nino, M. E., Martinelli, M., & Mossman, B. T. (2004). Src-dependent ERK5 and Src/EGFR-dependent ERK1/2 activation is required for cell proliferation by asbestos. *Oncogene*, 23(3), 805–813.
- Schrapf, M., Ying, O., Kim, T. Y., & Martin, G. S. (2008). ERK5 promotes Src-induced podosome formation by limiting Rho activation. *The Journal of Cell Biology*, 181(7), 1195–1210.
- Stecca, B., & Rovida, E. (2019). Impact of ERK5 on the Hallmarks of Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6).
- Stingl, J. (2011). Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer. *Hormones & Cancer*, 2(2), 85–90.
- Su, C., Cunningham, R. L., Rybalchenko, N., & Singh, M. (2012). Progesterone increases the release of brain-derived neurotrophic factor from glia via progesterone receptor membrane component 1 (Pgrmc1)-dependent ERK5 signaling. *Endocrinology*, 153(9), 4389–4400.
- Suzaki, Y., Yoshizumi, M., Kagami, S., Koyama, A. H., Taketani, Y., Houchi, H., Tsuchiya, K., Takeda, E., & Tamaki, T. (2002). Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells: potential role in cell survival following oxidative insults. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(11), 9614–9621.

- Taherian-Fard, A., Srihari, S., & Ragan, M. A. (2015). Breast cancer classification: linking molecular mechanisms to disease prognosis. *Briefings in Bioinformatics*, *16*(3), 461–474.
- Tatake, R. J., O'Neill, M. M., Kennedy, C. A., Wayne, A. L., Jakes, S., Wu, D., Kugler, S. Z., Jr, Kashem, M. A., Kaplita, P., & Snow, R. J. (2008). Identification of pharmacological inhibitors of the MEK5/ERK5 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *377*(1), 120–125.
- Trabert, B., Sherman, M. E., Kannan, N., & Stanczyk, F. Z. (2020). Progesterone and Breast Cancer. *Endocrine Reviews*, *41*(2).
- Truong, T. H., Dwyer, A. R., Diep, C. H., Hu, H., Hagen, K. M., & Lange, C. A. (2019). Phosphorylated Progesterone Receptor Isoforms Mediate Opposing Stem Cell and Proliferative Breast Cancer Cell Fates. *Endocrinology*, *160*(2), 430–446.
- Tsuda, H., & General Rule Committee of the Japanese Breast Cancer Society. (2020). Histological classification of breast tumors in the General Rules for Clinical and Pathological Recording of Breast Cancer (18th edition). *Breast Cancer*.
- Vegeto, E., Shahbaz, M. M., Wen, D. X., Goldman, M. E., O'Malley, B. W., & McDonnell, D. P. (1993). Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Molecular Endocrinology*, *7*(10), 1244–1255.
- Vladislav Korobeynikov, E. al. (2019). Combined inhibition of Aurora A and p21-activated kinase 1 as a new treatment strategy in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*.

- Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C., & Lakhani, S. R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 465(1), 1–14.
- Weigelt, B., Geyer, F. C., & Reis-Filho, J. S. (2010). Histological types of breast cancer: how special are they? *Molecular Oncology*, 4(3), 192–208.
- Weldon, C. B., Scandurro, A. B., Rolfe, K. W., Clayton, J. L., Elliott, S., Butler, N. N., Melnik, L. I., Alam, J., McLachlan, J. A., Jaffe, B. M., Beckman, B. S., & Burow, M. E. (2002). Identification of mitogen-activated protein kinase kinase as a chemoresistant pathway in MCF-7 cells by using gene expression microarray. *Surgery*, 132(2), 293–301.
- Westhoff, C. L., & Pike, M. C. (2018). Hormonal contraception and breast cancer [Review of *Hormonal contraception and breast cancer*]. *Contraception*, 98(3), 171–173.
- Yalcin, B. (2013). Staging, risk assessment and screening of breast cancer. *Experimental Oncology*, 35(4), 238–245.
- Yan, C., Luo, H., Lee, J. D., Abe, J., & Berk, B. C. (2001). Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10870–10878.
- Yip, C.-H., & Rhodes, A. (2014). Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future Oncology*, 10(14), 2293–2301.
- Yu, S., Kim, T., Yoo, K. H., & Kang, K. (2017). The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(3), 752–758.

Zhai, L., Ma, C., Li, W., Yang, S., & Liu, Z. (2016). miR-143 suppresses epithelial-mesenchymal transition and inhibits tumor growth of breast cancer through down-regulation of ERK5. *Molecular Carcinogenesis*, 55(12), 1990–2000.

Zhang, J., Wang, Q., Wang, Q., Cao, J., Sun, J., & Zhu, Z. (2020). Mechanisms of resistance to estrogen receptor modulators in ER+/HER2- advanced breast cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 77(4), 559–572.

Zhou, G., Bao, Z. Q., & Dixon, J. E. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(21), 12665–12669.

Zhou, L. L., Dong, J. L., Huang, G., Sun, Z. L., & Wu, J. (2017). MicroRNA-143 inhibits cell growth by targeting ERK5 and MAP3K7 in breast cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas E Biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et Al.]*, 50(8), e5891.