



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Centro Multidisciplinario de Estudios en

Biotecnología

“El GPR30 está involucrado en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal MCF-7”

TESIS

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias Biológicas

Opción Biotecnología Molecular

Presenta:

M.C. Ana Carolina Tirado Garibay

Director:

Dr. Joel Edmundo López Meza

Co-directora:

Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa

Sinodales:

Dra. Carmen Aceves Velasco Dra.

Zoraya Palomera Sánchez

Dr. Jesús Campos García

Morelia, Michoacán. MAYO 2025

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás, bajo la dirección del Dr. Joel Edmundo López Meza y la co-dirección de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa. Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de Investigación Científica de la UMSNH (14.5), el Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán (ICTI-PICIR-2023-064) y la beca escolar otorgada por CONAHCyT (316003).

Contenido

	Página
Índice de contenido	iii
Índice de figuras	v
I. Resumen	1
II. Abstract	2
III. Introducción	3
III.1 Cáncer	3
III.2 Cáncer de mama	4
III.3 Terapias contra el cáncer	6
III.4 Transición epitelio-mesénquima y metástasis	7
III.5 Microambiente tumoral	9
III.6 Participación de la IL-6 en el desarrollo canceroso	9
III.7 Receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPR30)	11
IV. Antecedentes	14
V. Justificación	16
VI. Hipótesis	17
VII. Objetivos	17
VII.1 Objetivo general	17
VII.2 Objetivos específicos	17
VIII. Resultados	18
VIII.1 Capítulo I: El receptor GPR30 está involucrado en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal MCF-7	19
VIII.2 Capítulo II: Participación de las MAPK en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal MCF-7	38

VIII.3 Capítulo III: GPER: Un receptor de estrógenos clave en la metástasis y el microambiente tumoral	64
VIII.4 Capítulo IV: Cáncer: La nueva ave fénix	82
IX. Discusión general	89
X. Perspectivas y recomendaciones	92
XI. Bibliografía complementaria	93

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Incidencia de cáncer a nivel mundial.	4
Figura 2. Clasificación molecular del cáncer de mama.	5
Figura 3. Transición epitelio-mesénquima.	8
Figura 4. Señalización de la IL-6.	11
Figura 5. Señalización del GPR30.	12
Figura 6. G15, el antagonista del GPR30, inhibe la proliferación de células de cáncer de mama inducida por E2 e IL-6.	27
Figura 7. La IL-6 regula la expresión del patrón de proteínas mesenquimales en las células MCF-7 y R-TMX.	29
Figura 8. El GPR30 regula la migración inducida por IL-6 en células de cáncer de mama.	30
Figura 9. El GPR30 regula la invasión inducida por IL-6 en células de cáncer de mama.	31
Figura 10. El GPR30 regula la resistencia a TMX inducida por el fármaco e IL-6 en células de cáncer de mama.	32
Figura 11. La IL-6 incrementa los niveles del receptor GPR30 intracelular en células de cáncer de mama.	33
Figura 12. Expresión de ER α en células de cáncer de mama con fenotipo metastásico.	48
Figura 13. La IL-6 promueve la fosforilación de SHP2	49
Figura 14. Participación de las MAPK en la proliferación de células de cáncer de mama tratadas con E2 e IL-6.	51
Figura 15. Participación de las MAPK en la migración de células de cáncer mama estimuladas con IL-6.	52
Figura 16. Participación de las MAPK en la invasión de células de cáncer mama estimuladas con IL-6.	53
Figura 17. Señalización de GPER.	67

Figura 18. Relación de GPER con la TEM en el cáncer. **71**

Figura 19. Desarrollo de resistencia a quimioterapia y reincidencia cancerosa. **85**

I. RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia de mayor incidencia a nivel mundial. El subtipo luminal es el más prevalente y se caracteriza por un fenotipo epitelial, mientras que el subtipo triple negativo es el de menor frecuencia y su mayor agresividad se atribuye a su fenotipo mesenquimal. La IL-6 presente en el microambiente tumoral induce la transición epitelio-mesénquima (TEM) de células cancerosas luminales promoviendo la metástasis (principal complicación del cáncer) y la resistencia a tamoxifeno (TMX). Por otro lado, las células de ambos tipos de cáncer cuentan con el receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPR30), el cual se ha implicado en la resistencia a TMX y la progresión cancerosa. La participación del GPR30 y la IL-6 en la metástasis se han establecido individualmente; sin embargo, su interacción sigue sin explorarse. El objetivo de este estudio fue analizar el papel del GPR30 en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal MCF-7 y su comparación con las triple negativo MDA-MB-231. Los resultados indican que el GPR30 regula la proliferación de las células de cáncer de mama inducida por E2 e IL-6, así como el incremento de los niveles de vimentina en las células MCF-7 estimuladas con IL-6. Así mismo, el GPR30 regula la migración e invasión basal y la estimulada por IL-6 en células luminales y triple negativo, ya que G15 (un antagonista de este receptor) y la toxina PTX (inhibidor de GPCRi) disminuyen estos efectos. Además, la migración e invasión inducidas por E2 e IL-6 en las células cancerosas es dependiente de las MAPKs, ya que la inhibición farmacológica de ERK, p38 y JNK disminuyó ambas propiedades. Finalmente, la IL-6 promovió un incremento en los niveles de fosforilación de la proteína tirosina fosfatasa 2 que contiene homología a Src 2 (SHP2). Estos resultados sugieren que el GPR30 participa en la TEM inducida por IL-6 en células de cáncer de mama luminal mediante la regulación de SHP2/MAPK por lo que esta ruta es un blanco potencial para el desarrollo de nuevas terapias anti cancerosas.

II. ABSTRACT

Breast cancer is the neoplasm with the highest incidence worldwide. The luminal subtype has the highest incidence and is characterized by an epithelial phenotype, while the triple-negative subtype is the least common, and its greatest aggressiveness is attributed to its mesenchymal phenotype. IL-6 from the tumor microenvironment induces the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of luminal cancer cells, promoting metastasis (the main complication of cancer) and tamoxifen (TMX) resistance. On the other hand, the cells of both types of cancer have the G protein-coupled estrogen receptor (GPR30), which has been implicated in cancerous progression and TMX resistance. The involvement of GPR30 and IL-6 in metastasis has been established individually; however, their interaction remains unexplored. This study aimed to elucidate the role of GPR30 in IL-6-induced metastatic properties in MCF-7 luminal breast cancer cells. The results showed that GPR30 is involved in E2 and IL-6-induced proliferation in breast cancer cells. In addition, GPR30 regulates increased vimentin levels in IL-6-stimulated MCF-7 cells. Likewise, GPR30 regulates basal and IL-6-stimulated migration and invasion in luminal and triple-negative cells since the antagonist G15 and the toxin PTX (GPCRi inhibitor) decrease these effects. In addition, E2 and IL-6-induced migration and invasion into cancer cells depend on MAPKs, as pharmacological inhibition of ERK, p38, and JNK decreased both properties. Finally, the IL-6 increased phosphorylation levels of protein tyrosine phosphatase 2 containing homology to Src 2 (SHP2). These results suggest that GPR30 participates in IL-6-induced TMS in luminal breast cancer cells by regulating SHP2/MAPK therefore, this pathway is a potential target for new anticancer therapies development.

Palabras Clave: Carcinoma||Propiedades metastáticas||Luminal||Citocina IL-6||Receptor GPR30

III. INTRODUCCIÓN

III.1 CÁNCER

El cáncer es una patología multifactorial que se caracteriza por una proliferación sostenida y la diseminación de las células afectadas mediante el proceso de metástasis **(1)**. Las principales causas asociadas al desarrollo de cáncer son: las mutaciones genéticas y la regulación epigenética de genes relacionados con progresión del ciclo celular, regulación de la apoptosis y reparación de errores (oncogenes); así mismo las infecciones virales y bacterianas pueden ocasionar respuestas inflamatorias e inserciones de material genético externo, lo que modifica al ADN del paciente pudiendo favorecer el desarrollo del cáncer **(2-4)**. En el primer caso, las mutaciones pueden modificar la secuencia génica de algunos supresores de tumores alterando su funcionalidad, además pueden provocar la sobre expresión de genes que se relacionan con la supervivencia celular y la proliferación sostenida **(2)**. La regulación epigenética consiste en modificaciones post traduccionales, la acetilación y metilación del ADN e histonas, y la expresión de secuencias de ARN no codificante (miRNAs), entre otras. Estos mecanismos regulan la expresión genética y la traducción de proteínas sin afectar la secuencia del ADN. Este proceso se ve influenciado por el ambiente en que se desarrolla el paciente, por lo que la alimentación, la calidad del aire, la actividad física y las condiciones climáticas impactan directamente en el riesgo de desarrollar cáncer **(3)**. Finalmente, las infecciones virales pueden modificar el genoma del hospedero debido a que los virus no cuentan con la maquinaria necesaria para reproducirse y por consecuencia insertan su material genético en las células del hospedero. Si bien, la presencia de intrones puede amortiguar los daños de este fenómeno, en otras ocasiones el material viral es insertado en secuencias codificantes, modificando genes necesarios para una correcta función celular **(4)**. Por otro lado, las infecciones bacterianas favorecen procesos inflamatorios y por consecuencia la producción de radicales libres. Estos últimos pueden generar daño en el material genético del hospedero favoreciendo la generación de células cancerosas, sin embargo, también promueven la producción de citocinas inflamatorias que estimulan la vasodilatación y con ello la supervivencia y

dispersión de las células afectadas (4). El paciente puede estar en contacto con estos factores de riesgo; sin embargo, es importante considerar que es un organismo pluricelular donde cada unidad puede presentar diferente grado de exposición o respuesta por lo que se generan poblaciones heterogéneas de células cancerosas o asociadas a la patología dificultando el desarrollo y la selección del tratamiento (5).

Existen múltiples tipos de cáncer los cuales son nombrados con base en el tejido de origen (6), siendo el cáncer de glándula mamaria el de mayor incidencia a nivel mundial y en México (Fig. 1) (7).

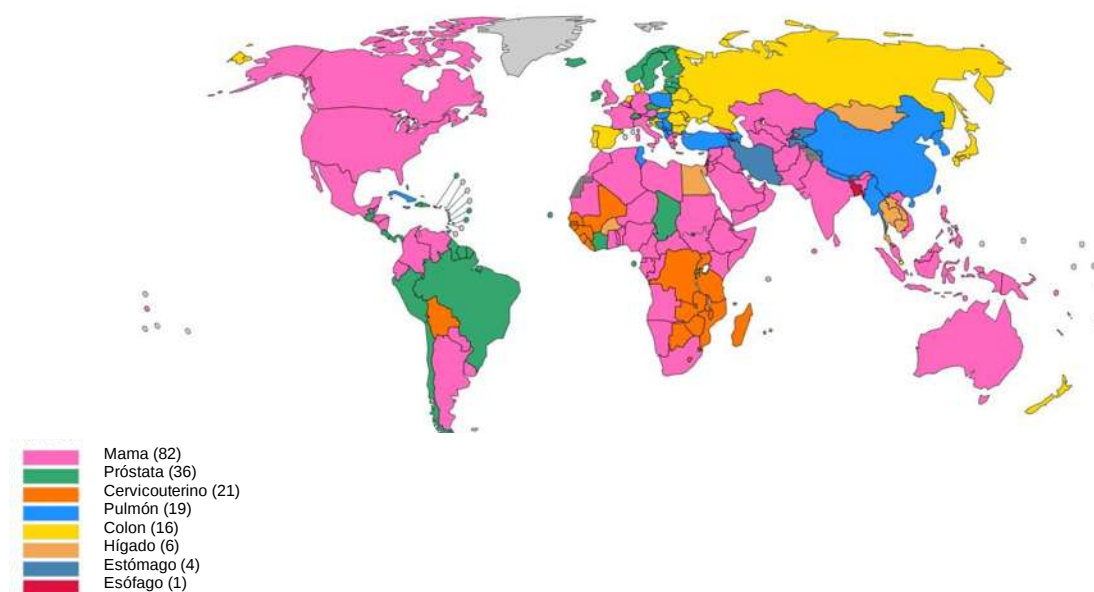


Figura 1. Incidencia de cáncer a nivel mundial. Representación gráfica de los cánceres más predominantes en cada país en el 2022. Tomado de Globocan, 2024.

III.2 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama puede desarrollarse esporádicamente; sin embargo, existen factores de riesgo que favorecen su aparición, tales como: El sexo, la edad, la predisposición genética, una menarca precoz y menopausia tardía, el uso de anticonceptivos o la terapia de reemplazo hormonal y el sobrepeso (8,9). Estos factores se relacionan directamente

con la producción y exposición a estrógenos debido a que estas hormonas, principalmente el estradiol, promueven el desarrollo de la glándula mamaria y la generación de metabolitos oxidantes y radicales libres con potencial oncogénico (10). El cáncer de mama puede clasificarse molecularmente con base en la sobre expresión de receptores en los siguientes grupos (Fig. 2): **Grupo 1 (luminal A):** Las células tumorales son positivas para el receptor de estrógeno ($ER\alpha$) y de progesterona (PR), pero negativas para el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2). **Grupo 2 (luminal B):** En este tipo de tumor las células son $ER\alpha$ positivas, PR negativas y HER2 positivas. **Grupo 3 (HER2 positivo):** Este tipo incluye a células de tumores que son $ER\alpha$ y PR negativas, pero HER2 positivas. **Grupo 4 (basal):** Este grupo se denomina también como cáncer de mama triple negativo, incluye tumores que son $ER\alpha$, PR y HER2 negativos. **Grupo 5 (triple positivo):** Este grupo cuenta con la sobreexpresión de los tres receptores mencionados previamente (2). El cáncer de mama tipo luminal es el de mayor incidencia en el continente americano de ahí que sea relevante su estudio para encontrar tratamientos más exitosos (7).

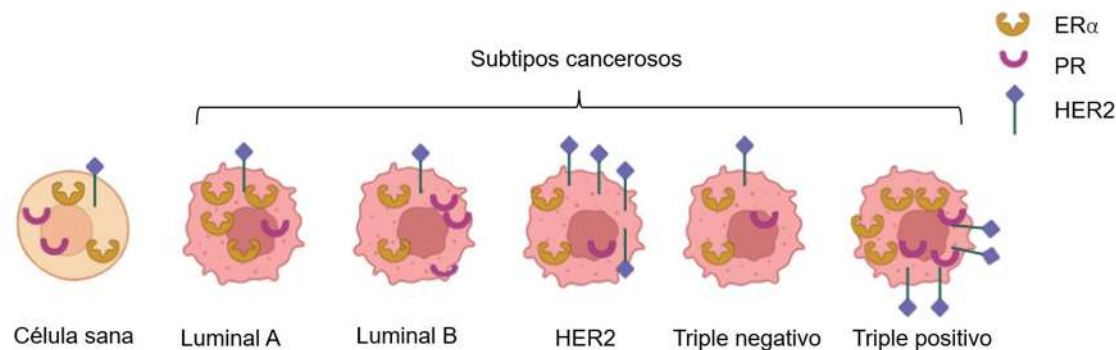


Figura 2. Clasificación molecular del cáncer de mama con base en la sobre expresión de receptores. Arceo-Martínez *et al.*, 2021.

En 2022 se reportaron 2.3 millones de nuevos casos de cáncer de mama a nivel mundial, representando el 11.5% de la incidencia y un 6.8% de la mortalidad provocadas por todos los tipos de cáncer (7). Sin embargo, el problema sanitario en México se encuentra más agudizado, ya que en el 2023 las muertes por cáncer de mama representaron el 9% de las defunciones por cáncer, superando la media a nivel mundial (11). La incidencia de

cáncer de mama en la población mexicana en el 2017 fue de un 65% de tipo luminal A, 12% de luminal B, 9% de HER2 positivo, 14% de triple negativo y 10.9% de triple positivo (2).

Actualmente se implementan estrategias para un diagnóstico temprano y un tamizaje adecuado de la enfermedad; sin embargo, estos programas de diagnóstico y concientización han visto limitado su alcance por cuestiones geográficas, económicas y sociales (12). Se reportó que para el 2021 sólo el 65% de la población femenina mexicana se realizaba autoexploración mamaria y el 50% acudían a control con mastografía (11). Por lo que el diagnóstico oportuno y el tratamiento adecuado del cáncer de mama representa un reto para la población mexicana que debe ser atendido.

III.3 TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER

El uso de terapias radica en el tipo y estadio de evolución del cáncer, ya que existen terapias dirigidas a la eliminación de las células en proliferación constante como la quimioterapia (13), tratamientos inmuno moduladores con el objetivo de estimular la respuesta inmunológica del paciente (14), y medicamentos dirigidos a proteínas específicas necesarias para el desarrollo de las células cancerosas (15). El estudio establecido para la detección de cáncer de mama es la mastografía, se recomienda que este análisis se realice una vez al año en mujeres mayores de 40 años de edad. Sin embargo, cuando la densidad de la mama no permite una correcta visualización del tejido por mastografía o la paciente tiene menor edad a la recomendada, pero cuenta con antecedentes directos de la patología, se recomienda complementar el método de diagnóstico con ultrasonido (16).

El cáncer de mama luminal cuenta con la sobre expresión del $ER\alpha$, por lo que se suele tratar con inhibidores hormonales que disminuyen la producción de estradiol y por ende la activación del receptor. Estos fármacos pueden inhibir directamente al $ER\alpha$, como el tamoxifeno (TMX) y el fulvestrant, o pueden inhibir la enzima aromatasa y con esto la conversión de andrógenos a estrógenos, como es el caso del anastrozol (17-19). El $ER\alpha$ cuenta con dos dominios activadores: AF1 y AF2. El último es inhibido por el tamoxifeno el cual funge como modulador específico (SERM), mientras que el fulvestrat es un degradador específico (SERD) que bloquea la actividad de ambos dominios inhibiendo

la actividad del ER α por completo (17,19). A pesar de que estos tratamientos son funcionales, aproximadamente el 30% de las pacientes expuestas a este esquema desarrollan resistencia a los fármacos y la patología aumenta su agresividad (20). Además, se ha reportado que la citocina IL-6 promueve la resistencia a TMX y que las células afectadas presentan un aumento en los niveles del receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPR30) (21).

III.4 TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA Y METÁSTASIS

El desarrollo de metástasis es una de las principales características del cáncer, esta consiste en la diseminación de las células cancerosas a tejidos periféricos y la colonización de los mismos (1). Para esto, las células diferenciadas que conforman al tumor primario deben perder sus uniones celulares, migrar a través del torrente sanguíneo o linfático, y posteriormente volver a adquirir un fenotipo estacionario para formar un nuevo tumor en un tejido distal. Este fenómeno se debe a una reprogramación epigenética que permite la disminución de características epiteliales o diferenciadas y la adquisición de propiedades mesenquimales, evento conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM) (Fig. 3) (22).

Este proceso puede ser estimulado por el microambiente tumoral, el cual está conformado por células, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que activan cascadas de señalización que inducen la TEM (23) provocando la disminución de proteínas epiteliales como la E-cadherina y citoqueratinas, responsables de las uniones estrechas y desmosomas, respectivamente; así como el aumento de vimentina, N-cadherina y metaloproteasas, actuando como promotoras de la migración celular (24).

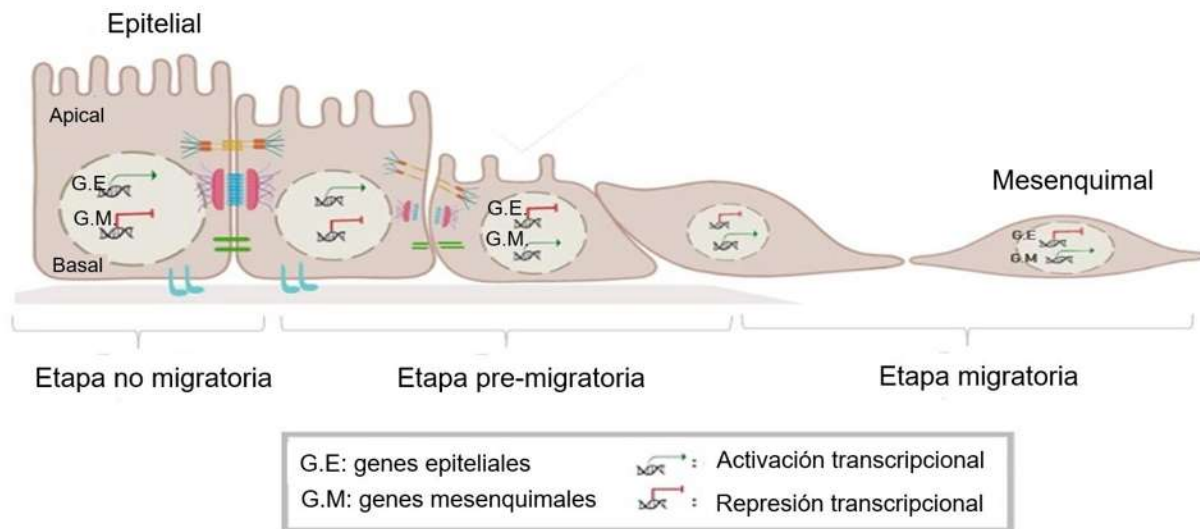


Figura 3. Transición epitelio-mesénquima. Proceso de cambio fenotípico de células epiteliales a mesenquimales. Las células polarizadas cambian su morfología, se inhibe la expresión de genes epiteliales (G.E.) disminuyendo las uniones celulares. Por otro lado, se incrementa la expresión de genes mesenquimales (G.M.) que favorecen la migración celular. Modificado de Bernal-Forigua *et al.*, 2020.

El primer paso de la TEM es la inducción de la expresión del factor de transcripción Snail, el cual interactúa directamente con el promotor de E-cadherina y recluta enzimas histona desacetilasas (HDACs) que inhiben la expresión de este marcador epitelial (26). Por otro lado, Snail promueve la expresión de citocinas involucradas en el desarrollo tumoral, como la IL-6 (27). Posteriormente se induce la expresión de los factores de transcripción Slug y Twist, relacionados con la expresión de las metaloproteasas 1 y 3 (MMP-1, MMP-3), así como la remodelación del citoesqueleto (28). En el caso particular del cáncer de mama, los filamentos intermedios de citoqueratina 18 disminuyen y son reemplazados por filamentos de vimentina (25,29). Los primeros forman parte de uniones celulares como los desmosomas y hemidesmosomas, mientras que los segundos participan en el proceso mecánico de la migración dirigida mediante la polarización celular transitoria al interactuar con los filamentos de actina y los microtúbulos (30). Este cambio estructural favorece las propiedades de migración, invasión y angiogénesis requeridas para el desarrollo del cáncer, y su presencia en un paciente implica un estadio avanzado de la enfermedad y un reto para la selección del tratamiento (31).

III.5 MICROAMBIENTE TUMORAL

El microambiente tumoral es definido como el conjunto de células, factores secretados y matriz extracelular en el que se desarrolla la neoplasia, y que se encuentra vascularizado y rodeado de células no malignas (32). Las células participantes incluyen células sanas, cancerosas proliferativas, progenitoras cancerosas, epiteliales, fibroblastos, inmunológicas y residentes de tejido (33). Este ambiente es proinflamatorio y provoca una inmunosupresión y la formación de vasos sanguíneos, favoreciendo el desarrollo tumoral (34). La inflamación crónica promueve que los fibroblastos circundantes se vean comprometidos y adquieran un fenotipo asociado al tumor (CAFs). Estas células generan un recubrimiento en la neoplasia y reclutan células inmunosupresoras como los macrófagos subtipo M2a, al mismo tiempo que secretan citocinas que favorecen la supervivencia y migración de las células cancerosas (35,36). Las células endoteliales asociadas al tumor (TECs) promueven la angiogénesis, formando vasos sanguíneos más delgados que los no patológicos, pero que permiten la comunicación entre el tumor y el ambiente externo. Además, secretan biglicanos y factores de adhesión promoviendo que células endoteliales vasculares recubran al tumor y los CAFs formando otra barrera de protección para la neoplasia (37).

El cáncer de mama luminal es de tipo epitelial y requiere estímulos externos para poder llevar a cabo la TEM (38). Esta puede ser inducida mediante citocinas exógenas como la interleucina 6 (IL-6), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), siendo la primera la que induce efectos más notorios (39,40). La diversidad de tipos celulares presentes en el ambiente tumoral y los estímulos que lo favorecen son blancos terapéuticos potenciales para la inhibición de la TEM, pudiendo limitar con ello la diseminación celular y de esta manera aplicar tratamientos dirigidos con mayor eficacia (41).

III.6 PARTICIPACIÓN DE LA IL-6 EN EL DESARROLLO CANCEROSO

La IL-6 es una citocina pleiotrópica de 21-28 kDa que puede ser secretada tanto por células inmunes como estructurales, su actividad pro y antiinflamatoria depende de la

localización de su receptor (42). Las mismas células cancerosas secretan IL-6 pudiendo estimularse de forma autocrina, y la cantidad de citocina producida y liberada es directamente proporcional a la agresividad del cáncer (43). Los cánceres de mejor pronóstico cuentan con una producción de IL-6 menor en comparación con los cánceres de estadio avanzado, por lo que su desarrollo canceroso depende prácticamente de la estimulación ejercida por el microambiente tumoral.

La ruta de señalización de la IL-6 comprende la activación de su receptor (conformado por una proteína de unión a IL-6 de 80 kDa o cadena α y un transductor de señales de 130 kDa conocido como glicoproteína 130 (GP130) o cadena β), y la activación de las cascadas JAK/STAT y SHP2/ERK1/2 (Fig. 4), las cuales han sido relacionadas con el desarrollo de la TEM (44). La activación de GP130 provoca un cambio conformacional que permite el reclutamiento de las proteínas STAT1/3 y JAK2 para su posterior fosforilación. Una vez activada la unidad STAT3 forma un homodímero y se transloca al núcleo para fungir como un factor de transcripción de genes (42,45). La ruta IL-6/JAK/STAT se encuentra sobre activada en cánceres de pulmón, mama, colon entre otros, y se ha observado que su inhibición reduce la proliferación de las células cancerosas y disminuye la formación de tumores (42).

La fosforilación de la tirosina 759 de GP130 es necesaria para la activación de SHP2 (46). Esta última es una enzima involucrada en la señalización de la IL-6 y se ha demostrado que su presencia es crítica para el desarrollo metastásico tanto en células de cáncer de mama luminal inducidas con IL-6 (47,48), como en células de cáncer triple negativo (49,50), por lo que es un blanco terapéutico potencial. Su expresión se ve incrementada en pacientes con cáncer de mama metastásico (51) y sus efectos cancerosos se han atribuido a la ruta PI3K/AKT/GSK3 β (52). Esta proteína es codificada por el gen *ptpn11* y se ha observado que su expresión está regulada por el ER α , y a su vez, la proteína interactúa físicamente con el ER α favoreciendo su actividad (53). Sin embargo, la IL-6 promueve la degradación del ER α en células de cáncer de mama luminal; no obstante, se sigue llevando a cabo la TEM (54). La activación de SHP2 permite el reclutamiento de las proteínas adaptadoras GAB1/2 y con ello la activación de la cascada de señalización de las MAPK, al reclutar y fosforilar RAS, RAF, MEK y finalmente ERK1/2 (46, 55).

III.7 RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ACOPLADO A PROTEÍNAS G (GPR30)

El GPR30 es un receptor alternativo al ER α localizado en los organelos membranosos de prácticamente todos los tipos celulares (56). Este receptor cuenta con una actividad tejido específica: en tejidos sanos se asocia con el desarrollo y la comunicación neuronal, la homeostasis, así como la vascularización y proliferación de la glándula mamaria; mientras que, en células cancerosas puede desempeñar un papel pro o antitumorigénico dependiendo del tipo de cáncer (56-59). El GPR30 promueve el desarrollo tumoral del cáncer de pulmón, hueso y mama, mientras que tiene efectos antitumorales en cáncer cervicouterino, gástrico y hepático (56,58-60). Este receptor puede ser activado por el E2, TMX o agonistas sintéticos como el G1 (61), provocando la separación del trímero de las proteínas G en dos unidades (Fig. 5): 1) La G α y 2) la G $\beta\gamma$. El GPR30 puede estar asociado a proteínas G α activadoras (G α_q) o inhibidoras (G α_i) y dependiendo de esto será su efecto en la regulación de los canales de calcio a través de la adenilato ciclasa y la activación de la cascada de señalización de las MAPK (62,63).

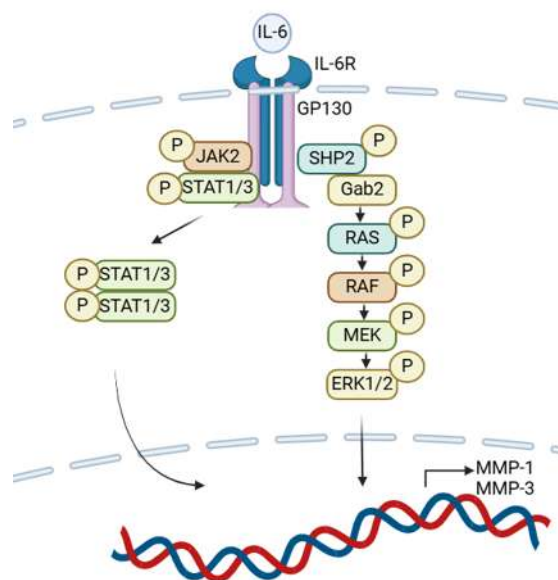


Figura 4. Ruta de señalización de la IL-6. La activación del receptor de IL-6 permite que se lleven a cabo las cascadas IL-6/JAK/STAT e IL-6/SHP2/ERK1/2. Estas están relacionadas con la expresión de las metaloproteasas 1 (MMP-1) y 3 (MMP-3), relacionadas con la degradación de la matriz extracelular durante el proceso de migración de las células cancerosas. Hecho en Biorender, 2024 a partir de Narazaki, & Kishimoto, 2018.

Por otro lado, la subunidad G β γ puede transactivar al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y con ello promover la actividad de la vía ERK1/2 permitiendo la expresión de metaloproteasas (MMPs) (64), así como la activación de proteínas antiapoptóticas como el agonista de la muerte celular asociado a BCL2 (BAD) (65). El GPR30 se localiza principalmente en el retículo endoplásmico en las células de cáncer de mama; sin embargo, se ha reportado que este predomina en la membrana plasmática en células de cáncer de mama resistentes a TMX (21). Así mismo, se ha reportado que este receptor promueve la TEM en células de carcinoma mamario al favorecer la expresión de proteínas relacionadas con la migración e invasión celular (MMP2/7/9), además de disminuir la expresión de RNAs de silenciamiento (miRNAs) relacionados con la regulación negativa del fenotipo metastásico, como el miR-124 (64, 66).

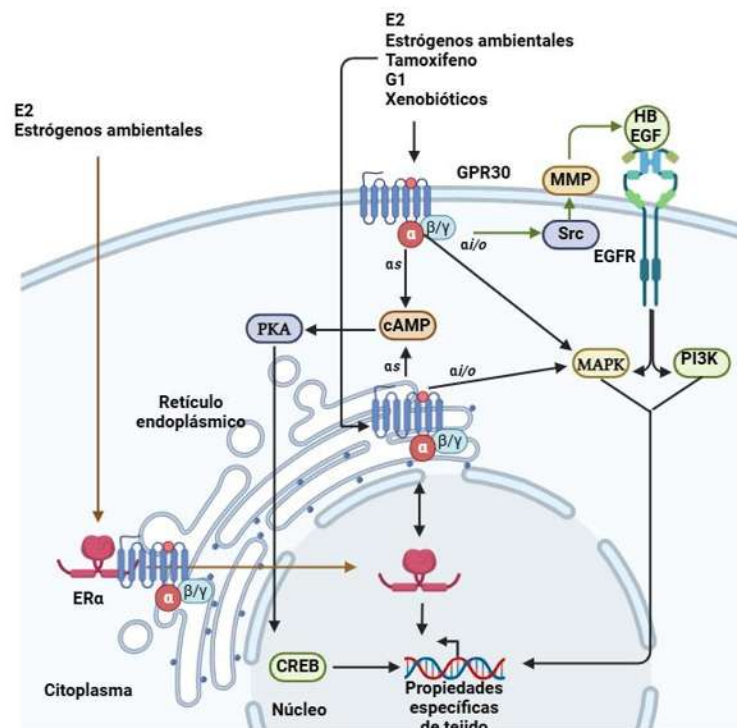


Figura 5. Ruta de señalización del receptor GPR30. El E2 puede activar tanto al ER α como al GPR30, los cuales interactúan físicamente promoviendo la expresión de genes tumorales. Por otro lado, estrógenos ambientales, fármacos y agonistas sintéticos pueden activar selectivamente al GPR30 promoviendo la regulación de calcio intracelular y la activación de las MAPK directa o indirectamente a través de la transactivación del EGFR. Hecho en Biorender, 2025 a partir de Xu *et al.*, 2019.

Por otro lado, se ha reportado un aumento del GPR30 en la membrana plasmática de las

células de cáncer de mama resistentes a TMX (21), lo cual es coherente debido a que este fármaco es un ligando del receptor, por lo que la exposición a esta terapia antihormonal promovería la activación del GPR30 favoreciendo que la patología adquiriera un comportamiento más agresivo. Así mismo, este receptor se ha relacionado con la polarización de macrófagos M2 y la angiogénesis, promoviendo el desarrollo del microambiente tumoral (67). Existen múltiples fármacos sintéticos contra este receptor como el G15 y G36, los cuales funcionan como antagonistas al tener afinidad por el sitio de unión al ligando (68). Por otro lado, algunas proteínas naturales, como la toxina *Pertussis* (PTX), inhiben a las proteínas $G\alpha i$ regulando negativamente la señalización del GPR30 (63). A pesar del estudio de este receptor en la progresión tumoral, no se ha determinado su participación en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal.

IV. ANTECEDENTES

El cáncer de mama luminal es un subtipo de cáncer dependiente de estrógenos que responde al estímulo hormonal del 17β -estradiol (E2), lo que promueve su desarrollo y progresión (2). Este tipo de cáncer presenta un fenotipo epitelial; sin embargo, se ha demostrado que las citocinas del microambiente tumoral, como la interleucina-6 (IL-6), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), pueden inducir una transición de este fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal en células de cáncer de mama luminal, como las líneas celulares MCF-7 y T47D (40), así como en células de cáncer de pulmón (69) y hepatocarcinoma (70). En particular, la IL-6 ha sido identificada como una de las citocinas más eficaces en la promoción de esta transición epitelio-mesénquima (TEM), lo que se refleja en un aumento de los niveles de vimentina y en la migración e invasión de las células cancerosas (40, 43).

Por otro lado, la IL-6 induce una disminución en los niveles del receptor de estrógenos alfa (ER α) en células de cáncer de mama luminal (54), lo que está relacionado con el desarrollo de resistencia al tamoxifeno (TMX) en células MCF-7 (20) y en pacientes con carcinoma mamario (21). De hecho, en biopsias de pacientes con cáncer de mama avanzado se ha observado una sobreexpresión del receptor para la IL-6 (71). Además, se ha observado que esta citocina promueve la migración e invasión de las células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, las cuales carecen del ER α (72). Tanto las células de cáncer luminal como las de cáncer triple negativo presentan el receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPR30) (68), el cual promueve la señalización citoplasmática del E2. Se ha reportado una sobreexpresión de este receptor en tumores metastásicos de cáncer de mama luminal, en comparación con los tumores primarios de estos pacientes (60, 61). Asimismo, se ha observado una sobreexpresión del GPR30 en células y tejidos de carcinoma mamario resistente a TMX (21). El bloqueo de este con el antagonista específico G15 disminuyó la resistencia al fármaco y la progresión tumoral en modelos experimentales (21).

Aunque se han investigado los roles individuales de la IL-6 y el GPR30 en las propiedades metastásicas del cáncer de mama, la relación entre estos dos factores en el contexto de la metástasis aún no está completamente definida. Diversas investigaciones sugieren que

tanto la IL-6 como el GPR30 activan la proteína tirosina fosfatasa 2 homóloga a Src 2 (SHP2), la cual es crucial para el desarrollo de la metástasis (**53,62,69**). Asimismo, se ha reportado que la inhibición de SHP2 mediante un RNA de interferencia (siRNA) bloquea las propiedades metastásicas, como la migración e invasión, en las células MCF-7 (**53, 62**). A nivel molecular, se ha demostrado que tanto la IL-6 como el GPR30 pueden activar rutas de señalización compartidas a través de las MAPKs JNK, ERK1/2 y p38, involucradas en la regulación de la metástasis (**46, 55, 66**).

V. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mamá es el carcinoma de mayor incidencia a nivel mundial, siendo el subtipo luminal el de la mayor prevalencia. Esta patología se caracteriza por tener un fenotipo epitelial y responder al estímulo con 17- β -estradiol (E2), por lo que la mayoría de las terapias contra este tipo de cáncer son dirigidas a evitar la señalización mediada por E2 a través del receptor de estrógenos alfa (ER α). Sin embargo, el 30% de las pacientes tratadas con fármacos dirigidos contra el ER α , como el tamoxifeno (TMX), desarrollan resistencia. Esta adquisición se relaciona con una evolución del cáncer a un estadio metastásico, el cual es desarrollado aproximadamente por el 2-20% de las pacientes con cáncer de mama y es la principal complicación en su tratamiento. La TEM es necesaria para el desarrollo de la metástasis, y se ha observado que esta transición y la resistencia a TMX son estimuladas por la IL-6 secretada por los fibroblastos asociados a cáncer, que se encuentran en el microambiente tumoral. Además, se ha determinado que la proteína tirosina fosfatasa 2 que contiene homología a Src 2 (SHP2) es crítica para el desarrollo de propiedades metastásicas, como la migración e invasión, ya que su silenciamiento evita que estas características se manifiesten. Por otro lado, se ha reportado que el receptor GPR30 regula la progresión tumoral y la resistencia a fármacos, por lo que se encuentra sobre expresado en células de cáncer de mama epitelial metastásico. A pesar de que se ha determinado la participación del receptor GPR30 y la IL-6 en el desarrollo metastásico de forma individual, no se ha establecido una relación entre ellos. Por lo anterior, entender esta señalización es crucial para poder desarrollar una terapia adecuada a pacientes con cáncer de mama que han desarrollado resistencia a la terapéutica inicial.

VI. HIPÓTESIS

La IL-6 induce propiedades metastásicas en células de cáncer de mama luminal MCF-7 mediante el receptor GPR30.

VII. OBJETIVOS

VII.1 Objetivo general

Determinar si el GPR30 participa en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal MCF-7.

VII.2 Objetivos específicos

VII.2.1 Evaluar la transición epitelio-mesénquima inducida por IL-6 en células de cáncer de mama luminal.

VII.2.2 Analizar las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal.

VII.2.3 Determinar la participación del GPR30 en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal en comparación con las triple negativo MDA-MB-231.

VII.2.4 Determinar la ruta de señalización involucrada en la inducción de las propiedades metastásicas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 CAPÍTULO I

El receptor GPR30 está involucrado en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal MCF-7

VIII.1.1 RESUMEN

El cáncer de mama luminal es el más prevalente a nivel mundial y constituye una amenaza significativa para la salud pública. Este tipo de cáncer se caracteriza por la sobreexpresión del receptor de estrógenos alfa (ER α), cuya activación por el 17 β -estradiol (E2) promueve la proliferación de las células cancerosas. Aunque el cáncer de mama luminal cuenta con un fenotipo epitelial, la citocina IL-6 secretada por las células del microambiente tumoral favorece la transición epitelio-mesénquima (TEM) promoviendo la metástasis. Además, la IL-6 reduce los niveles del ER α , lo que contribuye al desarrollo de la resistencia a tamoxifeno (TMX). No obstante, los genes regulados por E2 continúan siendo expresados, incluso en ausencia del receptor, lo que sugiere la participación de una ruta alternativa. El receptor GPR30, que actúa como una vía alternativa de señalización del E2, está presente en las células de cáncer de mama tanto luminal como triple negativo (metastásico), y se ha asociado con la resistencia a TMX y la progresión tumoral. Si bien las funciones de GPR30 e IL-6 en la metástasis se han establecido de manera individual, su interacción sigue sin determinarse. El objetivo de este estudio fue esclarecer el papel de GPR30 en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal MCF-7 y en comparación con las triple negativo MDA-MB-231. Los resultados obtenidos demostraron que el GPR30 regula la proliferación de las células MCF-7 inducida por E2, dado que su inhibición mediante el antagonista G15 y la toxina *Pertussis* (PTX) la disminuyó. Además, el GPR30 regula la TEM inducida por IL-6 en células MCF-7 y resistentes a TMX (R-TMX), debido a que se observó un aumento en los niveles de vimentina y la reducción de la citoqueratina 18 al tratar las células con la citocina, pero el bloqueo del GPR30 con G15 y PTX inhibió estos cambios proteicos. Además, el GPR30 también reguló la migración, invasión y resistencia a TMX inducidas por IL-6, puesto que el uso de G15 y PTX inhibieron estas propiedades metastásicas. En las células triple negativo MDA-MB-231 se observó que las propiedades metastásicas, tanto basales como inducidas por IL-6, se correlacionan con la actividad del receptor GPR30, mientras que las células de glándula mamaria sana no presentaron cambios en su fenotipo ni comportamiento celular al ser tratadas con la citocina o los inhibidores del GPR30. Estos resultados sugieren que GPR30 regula la TEM inducida por IL-6 en las células de cáncer de mama.

VIII.1.2. ABSTRACT

Luminal breast cancer is the most prevalent worldwide and constitutes a significant public health threat. This type of cancer is characterized by the overexpression of the alpha estrogen receptor (ER α), whose activation by 17 β -estradiol (E2) promotes the proliferation of cancer cells. Although luminal breast cancer has an epithelial phenotype, the cytokine IL-6 secreted by the tumor microenvironment cells favors the epithelial-mesenchymal transition (EMT), promoting metastasis. Furthermore, IL-6 reduces ER α levels, contributing to developing resistance to tamoxifen (TMX). However, genes regulated by E2 continue to be expressed even in the absence of the receptor, suggesting the involvement of an alternative pathway. The GPR30 receptor, which acts as an alternative signaling pathway for E2, is present in both luminal and triple-negative (metastatic) breast cancer cells and has been associated with resistance to TMX and tumor progression. While the roles of GPR30 and IL-6 in metastasis have been established individually, their interaction remains undetermined. This study aimed to clarify the role of GPR30 in IL-6-induced metastatic properties in luminal breast cancer MCF-7 cells. The results demonstrated that GPR30 regulates the E2-induced proliferation of MCF-7 cells, as its inhibition with the G15 antagonist and Pertussis toxin (PTX) decreased it. Furthermore, GPR30 regulates IL-6-induced EMT in MCF-7 cells and TMX-resistant (R-TMX) cells, as increased vimentin levels and reduced E-cadherin were observed when the cells were treated with the cytokine, but blocking GPR30 with G15 and PTX inhibited these protein changes. Additionally, GPR30 regulated migration, invasion, and resistance to TMX induced by IL-6, as G15 and PTX inhibited these metastatic properties. In the triple-negative MDA-MB-231 cells, both basal and IL-6-induced metastatic properties correlated with GPR30 receptor activity, while normal mammary gland cells showed no changes in phenotype or cellular behavior when treated with the cytokine or GPR30 inhibitors. These results suggest that GPR30 regulates IL-6-induced EMT in breast cancer cells

VIII.1.3. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el carcinoma más común a nivel mundial, el cual se origina en la glándula mamaria. Este tipo de cáncer se clasifica según la sobreexpresión de tres receptores principales: el receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$), el receptor de progesterona (PR) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (1). El subtipo luminal A se distingue por la sobreexpresión de $ER\alpha$, lo que permite que las células respondan al 17β -estradiol (E2), favoreciendo su proliferación (1, 2). Este subtipo tiene una alta incidencia, pero cuenta con una baja agresividad debido a su fenotipo epitelial. Por otro lado, el subtipo triple negativo carece de la sobreexpresión de estos receptores, lo que lo hace más agresivo y difícil de tratar por la falta de blancos terapéuticos, además cuenta con un fenotipo mesenquimal que favorece la migración e invasión celular (1). A pesar de las terapias dirigidas contra el $ER\alpha$, como el tamoxifeno (TMX), el 40% de las pacientes bajo este esquema desarrollan resistencia a este fármaco, y con ello, la aparición de metástasis (3).

El microambiente tumoral tiene un impacto significativo en la agresividad del cáncer de mama luminal, ya que factores como las citocinas, entre ellas la IL-6, inducen la transición epitelio-mesénquima (TEM) (4). Este proceso implica el cambio de fenotipo de las células disminuyendo las proteínas de adhesión como la citoqueratina 18 y E-cadherina, sino que también conlleva un re arreglo del citoesqueleto al aumentar los niveles de vimentina, filamento intermedio que organiza la migración dirigida y posiciona los organelos celulares en células mesenquimales (4). La TEM, además, está asociada con la resistencia al TMX (5), así como con la heterogeneidad de las células cancerosas (6). En este contexto, el receptor GPR30/GPER, que también es un receptor alternativo de E2, regula la expresión de los genes bajo la regulación del $ER\alpha$ y se encuentra presente tanto en células de cáncer de mama luminal como en las de cáncer triple negativo (7). Este receptor ha sido vinculado con la resistencia al TMX y con la progresión del cáncer, como lo es el desarrollo de metástasis (8).

La metástasis es el principal reto en el tratamiento contra el cáncer dado que las células

cancerosas se dispersan y presentan una gran heterogeneidad, lo que dificulta su erradicación. Por lo tanto, entender los mecanismos mediante los cuales las células de cáncer de mama luminal adquieren propiedades metastásicas es esencial para encontrar nuevos enfoques y tratamientos que permitan controlar y eventualmente erradicar la enfermedad. Este estudio tiene como propósito investigar el papel del receptor GPR30 en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal MCF-7.

VIII.1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Las células MCF-7 (ATCC) y MCF-12 (donación de la Dra. Carmen Aceves Velasco del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Juriquilla, Qro.) fueron cultivadas en medio F12 con rojo fenol suplementado con suero fetal bovino (5%) (Biowest, S1820-500), suero de ternera (5%) (Biowest, S0400-500), penicilina/estreptomicina (1%) (Gibco, 15140122) y anfotericina B (0.05%) (Sigma Aldrich, A2942). Mientras que en las células R-TMX se adicionó tamoxifeno (TMX) a una concentración final de 1 μ M. Las células R-TMX fueron obtenidas mediante una exposición continua de las células MCF-7 a tamoxifeno (TMX, 1 μ M) por 60 días. Las células MDA-MB-231 (donación de la Dra. Carmen Aceves Velasco del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Juriquilla, Qro.) se cultivaron con medio DMEM suplementado con la composición mencionada inicialmente, adicionando L-glutamina (0.05%) (Gibco, 20530-081). Los cuatro tipos celulares fueron cultivados a 37 °C y 5% de CO₂.

Tratamientos

Las líneas celulares fueron expuestas al vehículo DMSO (Sigma Aldrich, D1436) al 0.005% y etanol (J.T. Baker, 9000-02) al 0.05% como controles. Los tratamientos consistieron en una exposición individual o combinada a E2 10 nM (Sigma Aldrich, E2758), IL-6 50 ng/mL (Peprotech, Cranbury, 200-06), G15 0.625 μ M (Peprotech,

1160560), MG132 0.3 μM (Sigma Aldrich, C2211) y toxina *Pertusis* (PTX) 100 ng/mL (Sigma Aldrich, P2980).

Línea resistente a tamoxifeno (R-TMX)

Se cultivaron 10,000 células MCF-7 por pozo en una placa de 96 pozos y se expusieron a 1 μM de TMX en un medio F12 suplementado en un volumen final de 100 μL (9,10). Las células fueron subcultivadas cada tres días, colocando la misma cantidad inicial de células y exponiéndolas al mismo medio de cultivo durante 16 generaciones. Durante este periodo, se evaluó cada dos semanas la toxicidad del TMX en las células MCF-7 mediante exclusión de azul de tripano, determinando finalmente un IC_{50} superior a 20 μM , lo que permitió considerar que las células habían adquirido resistencia al fármaco. Estas células fueron mantenidas en medio F12 suplementado con FBS (5%), ST (5%), penicilina/estreptomicina (1%), anfotericina B (0.05%) y TMX (1 μM) a 37 °C y 5% CO_2 .

Evaluación de la proliferación celular y citotoxicidad del TMX

Se cultivaron 10,000 células MCF-12, MCF-7 y R-TMX, y 20,000 células MDA-MB-231/pozo en placas de cultivo de 96 pozos (NEST, 701001) en un medio suplementado (100 μL /pozo) durante 24 h, después de lo cual fueron sincronizadas con medio F12 sin suplementar durante 18 h. Posteriormente, se añadieron los tratamientos durante 24 h para los primeros tres tipos de células y 48 h para las células triple negativo, y las células se recuperaron con 50 μL de tripsina (0.04%); cuando las células estaban en suspensión, se añadieron 50 μL del medio suplementado. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano en un contador celular automático Bio-Rad (Modelo TC20), usando la suspensión celular y el azul de tripano en proporción 1:1. Para evaluar la citotoxicidad del TMX, las células MCF-7 y R-TMX fueron cultivadas siguiendo la metodología previamente descrita, con una exposición de 48 h a los siguientes tratamientos: TMX (1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 20 μM), IL-6 (50 ng/mL) y G15 (0.625 μM), individualmente y en combinación.

Evaluación de la transición epitelio-mesénquima

Se cultivaron 80,000 células MCF-7 y R-TMX en placas de 24 pozos, se sincronizaron durante 18 h y luego se estimularon durante 48 h con E2 (10 nM), IL-6 (50 ng/mL), MG132 (0.3 μ M) y G15 (0.625 μ M), individualmente y en combinación. Después de este tiempo, se recuperaron con tripsina (0.04%), se centrifugaron a 1,500 rpm durante 15 min a 4 °C y se lavaron con PBS, posteriormente se fijaron con metanol absoluto durante 15 min y se permeabilizaron con Tween 20 (0.5%) durante 20 min. Las células fueron incubadas con los siguientes anticuerpos: 1:500 anti-vimentina (SC-6260), anti-citoqueratina 18 (SC-32329) y 1:1000 anti-GPR30 (ab39742) durante 18 h a 4 °C. Luego, las células fueron centrifugadas como se describió anteriormente e incubadas con los anticuerpos anti-ratón IgG Fab2 Alexa Fluor 488 (4408S) o anti-conejo IgG Fab2 PE (8885S) 1:500 durante 2 h a 4 °C en la oscuridad. Posteriormente fueron analizadas en un citómetro BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) configurado para 10,000 eventos por ensayo. Los datos fueron analizados en el software FlowJo v10 y normalizados con respecto al vehículo.

Participación del GPR30 en la migración celular inducida por IL-6: Ensayo de cierre de herida

La migración celular fue evaluada mediante el ensayo de cierre de herida. Se cultivaron 80,000 células por pozo en placas de 24 pozos (NEST, 702001) durante 24 h y se sincronizaron durante 18 h, además se inhibió la proliferación celular adicionando mitomicina C (4 μ g/mL, Sigma Aldrich, M0503) durante 2 h. Luego, se realizaron heridas en forma de cruz con una punta de 200 μ L y un portaobjetos estéril. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS y los tratamientos con E2 (10 nM), IL-6 (50 ng/mL), MG132 (0.3 μ M) y G15 (0.625 μ M), individualmente y en combinación, se colocaron en un volumen final de 400 μ L por pozo. Las imágenes de las heridas se capturaron a tiempos de 0, 24 y 48 h a 4X utilizando un microscopio invertido (Zeiss Primovert). Las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ v1.8.0; el área de la herida fue medida con la herramienta *wound healing tool*, utilizando los parámetros de varianza 3, umbral 250 y radio 0. Se analizaron cuatro fotografías por tratamiento por cada punto

temporal en cada ensayo, y esto se realizó tres veces.

Participación del GPR30 en la invasión celular inducida por IL-6: Ensayo de cámara Transwell

Se realizaron cultivos celulares de células MCF-7, MCF-12, R-TMX y MDA-MB-231 en placas de 50 mm de diámetro hasta alcanzar 90% de confluencia; posteriormente, fueron sincronizados por durante 18 h con medio F12 sin rojo fenol y sin suplementar. Simultáneamente, se colocaron 100 μ L de matrigel (Sigma Aldrich, E1270, 1.25 mg/mL) en los insertos de placas Transwell de 8 μ m (Corning incorporated-Costar®, 3422) e incubados a 37 °C durante 24 h. Después de este tiempo, las células fueron recuperadas con tripsina (0.04%) y se colocaron 25,000 células en un volumen de 20 μ L sobre el matrigel polimerizado. Los tratamientos con E2 (10 nM), IL-6 (50 ng/mL), MG132 (0.3 μ M) y G15 (0.625 μ M), individualmente y en combinación, fueron colocados en la placa de 24 pozos en un volumen de 400 μ L por pozo y los insertos Transwell fueron depositados encima de ellos. Posteriormente, se incubaron las placas a 37 °C y 5% CO₂ durante 24 h. Luego, el matrigel fue removido, y el inserto se lavó dos veces con PBS, lo que se repitió después de cada proceso posterior. Las células fueron fijadas con para formaldehído (4%), permeabilizadas con metanol (J. Baker, 9070-03) y finalmente teñidas con cristal violeta (Sigma Aldrich, C0775, 0.04%). Las imágenes fueron capturadas en el microscopio invertido (Zeiss Primovert) con los objetivos de 4X y 10X y analizadas con el software ImageJ v1.8.0.

Análisis estadístico

Se realizaron tres ensayos independientes por experimento por duplicado. Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism v8. Los resultados del ensayo de migración se evaluaron mediante un ANOVA de dos vías con la prueba post hoc de Tukey ($\alpha \leq 0.05$), mientras que los datos de citometría, proliferación e invasión fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Los datos de citotoxicidad de TMX fueron analizados mediante *t*-student ($\alpha \leq 0.05$).

VIII.1.5. RESULTADOS

La proliferación sostenida es una de las principales características del cáncer, e implica que las células afectadas se acumulen en cuerpos llamados neoplasias o tumores (**11**). En este estudio, se evaluó el efecto de E2 y la IL-6 sobre la proliferación de células de cáncer de mama utilizando el ensayo de exclusión de azul de tripano y mitomicina C (Mit C) como control antiproliferativo. La proliferación de las células MCF-12, provenientes de glándulas mamarias sanas, no fue alterada por el E2 ni por la IL-6 (**Fig. 6a**). Por otro lado, las células MCF-7 aumentaron su proliferación en presencia de E2, efecto que fue inhibido por la IL-6. Sin embargo, este efecto se revertió al utilizar el inhibidor proteosomal MG132, permitiendo que el E2 promoviera la duplicación celular a pesar de la presencia de la citocina (**Fig. 6b**). Además, la proliferación de las células MCF-7 resistentes al tamoxifeno (R-TMX) así como las células triple negativo MDA-MB-231 solo fue inducida por IL-6, de manera independiente de E2 (**Fig. 6 c,d**). El antagonista de GPR30 (G15) o la toxina PTX, que inhibe la proteína G (α i), bloquearon todos los efectos proliferativos, sugiriendo la participación de GPR30 en la proliferación estimulada por E2 e IL-6 en las células de cáncer de mama (**Fig. 6 e-h**).

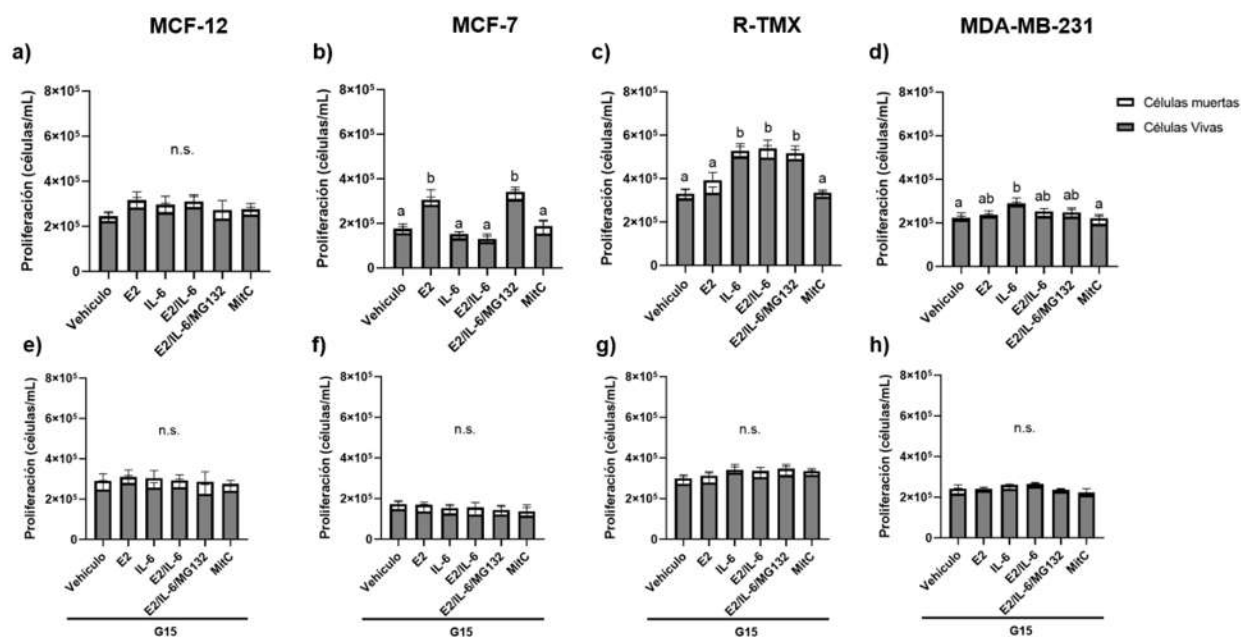


Figura 6. G15, el antagonista del GPR30, inhibe la proliferación de células de cáncer de mama inducida por E2 e IL-6. La proliferación de las células (a,e) MCF-12, (b,f) MCF-7, y (c,g) R-TMX se evaluó a las 24 h. La proliferación celular de las células MDA-MB-231 (d,h) se evaluó a las 48 h. Los datos se obtuvieron mediante el ensayo de exclusión de azul tripano en presencia de E2 (10 nM), IL-6 (50 ng/mL), MG132 (0.03 μ M) y G15 (0.625 μ M). Cada barra muestra la media de triplicados $\pm$ SE de tres experimentos independientes. Las letras denotan diferencias significativas dentro de los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p \leq 0.05$). n.s. = no significativo.

Posteriormente se evaluó el efecto de la IL-6 en los procesos metastásicos de las células de cáncer de mama luminal, para lo cual se analizó la transición epitelio-mesénquima (TEM), proceso antecesor de la metástasis. La TEM implica la pérdida de uniones celulares lo que resulta en una disminución de las proteínas adherentes (citoqueratina 18) y un aumento de las características de motilidad (vimentina) (4). En este estudio se evaluaron los niveles de citoqueratina 18 y vimentina en las células MCF-7 y R-TMX. Los resultados mostraron una ligera disminución en los niveles de citoqueratina 18 en las células MCF-7 estimuladas con IL-6, lo cual fue revertido cuando las células fueron tratadas con el antagonista del GPR30 G15 o con PTX (**Fig. 7a**). Por el contrario, los niveles de vimentina aumentaron significativamente (~2 veces) en MCF-7 (**Fig. 7b**) y más intensamente (~3 veces) en las células R-TMX (**Fig. 7d**), sugiriendo que la IL-6 promueve la expresión de proteínas asociadas a la TEM a través de GPR30. Estos incrementos fueron revertidos con G15 o PTX, aunque los niveles de citoqueratina 18 fueron similares en ambos tipos celulares.

El aumento en los niveles de vimentina está relacionado con una migración dirigida de las células cancerosas mediante del desprendimiento y la movilización celular a través de los vasos linfáticos y sanguíneos (4, 12). Para evaluar la capacidad migratoria de las células de cáncer de mama se realizó una prueba de cierre de herida. La migración de las células MCF-12 no se afectó por E2 ni por IL-6 (**Fig. 8a**). En las células MCF-7, la migración no mostró cambios significativos en respuesta a E2 (20%), pero IL-6 duplicó su capacidad migratoria a las 48 h (**Fig. 8b**), efecto que fue inhibido por el antagonista GPR30 G15 (**Fig. 8c**) y PTX (datos no mostrados).

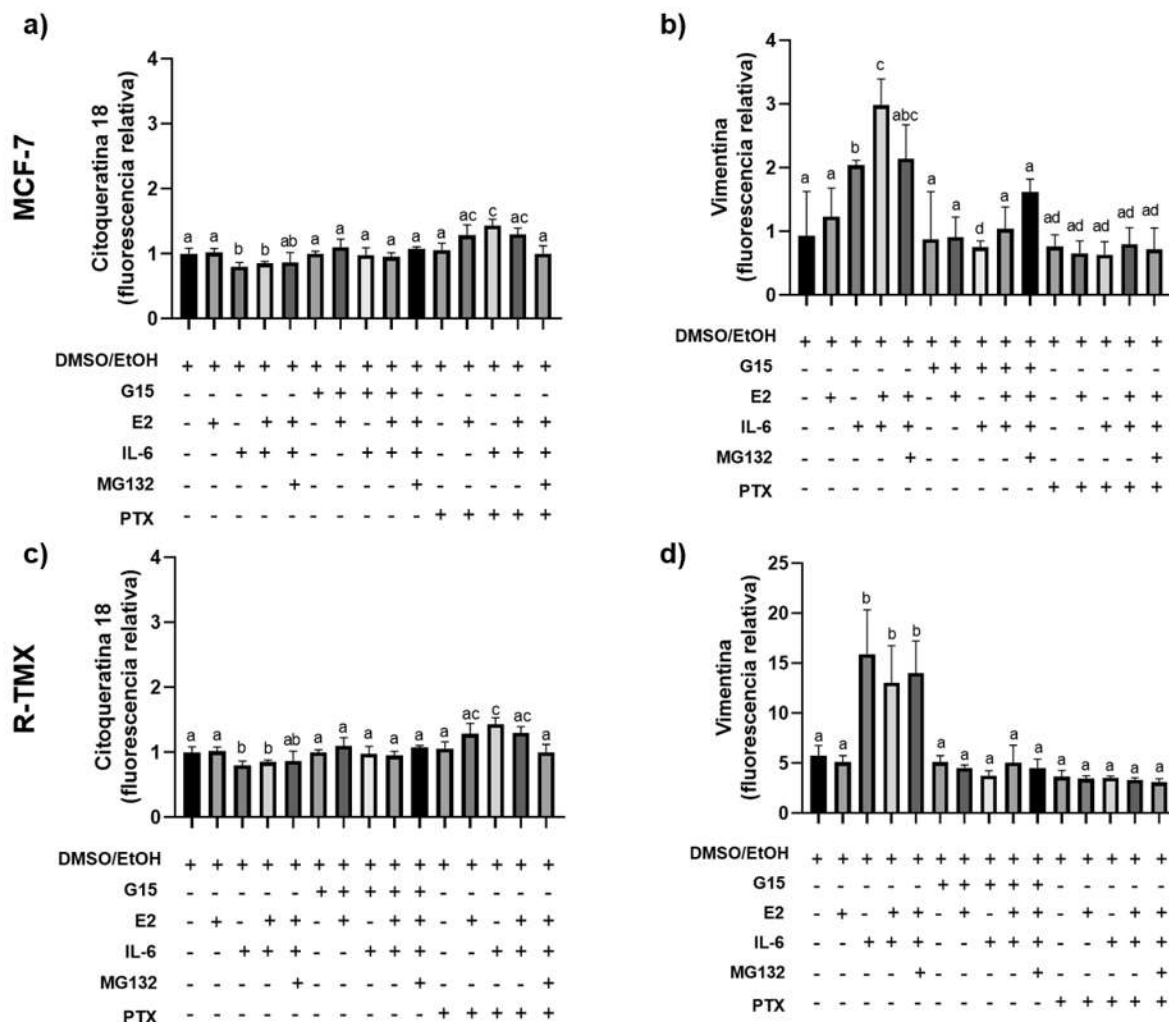


Figura 7. La IL-6 regula la expresión del patrón de proteínas mesenquimales en las células MCF-7 y R-TMX. Se evaluó la expresión de (a,c) citoqueratina 18 y (b,d) vimentina en las células MCF-7 y R-TMX a las 48 h en presencia de E2 (10 nM), IL-6 (50 ng/mL), MG132 (0.03 μ M), G15 (0.625 μ M) y PTX (100 ng/mL) mediante citometría de flujo. Cada barra muestra la media de triplicados $\pm$ SE de tres experimentos independientes. Diferentes letras denotan diferencias significativas dentro de los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p \leq 0.05$).

Un comportamiento similar se observó en las células R-TMX (**Fig. 8 c,g**). Por otro lado, la línea celular MDA-MB-231 mostró una migración basal del 35%, la cual se duplicó a las 48 h con IL-6 (60%) (**Fig. 8d**), pero G15 inhibió tanto la migración basal como la inducida por IL-6 (**Fig. 8h**). Estos resultados sugieren que GPR30 participa en la migración de las células de cáncer de mama.

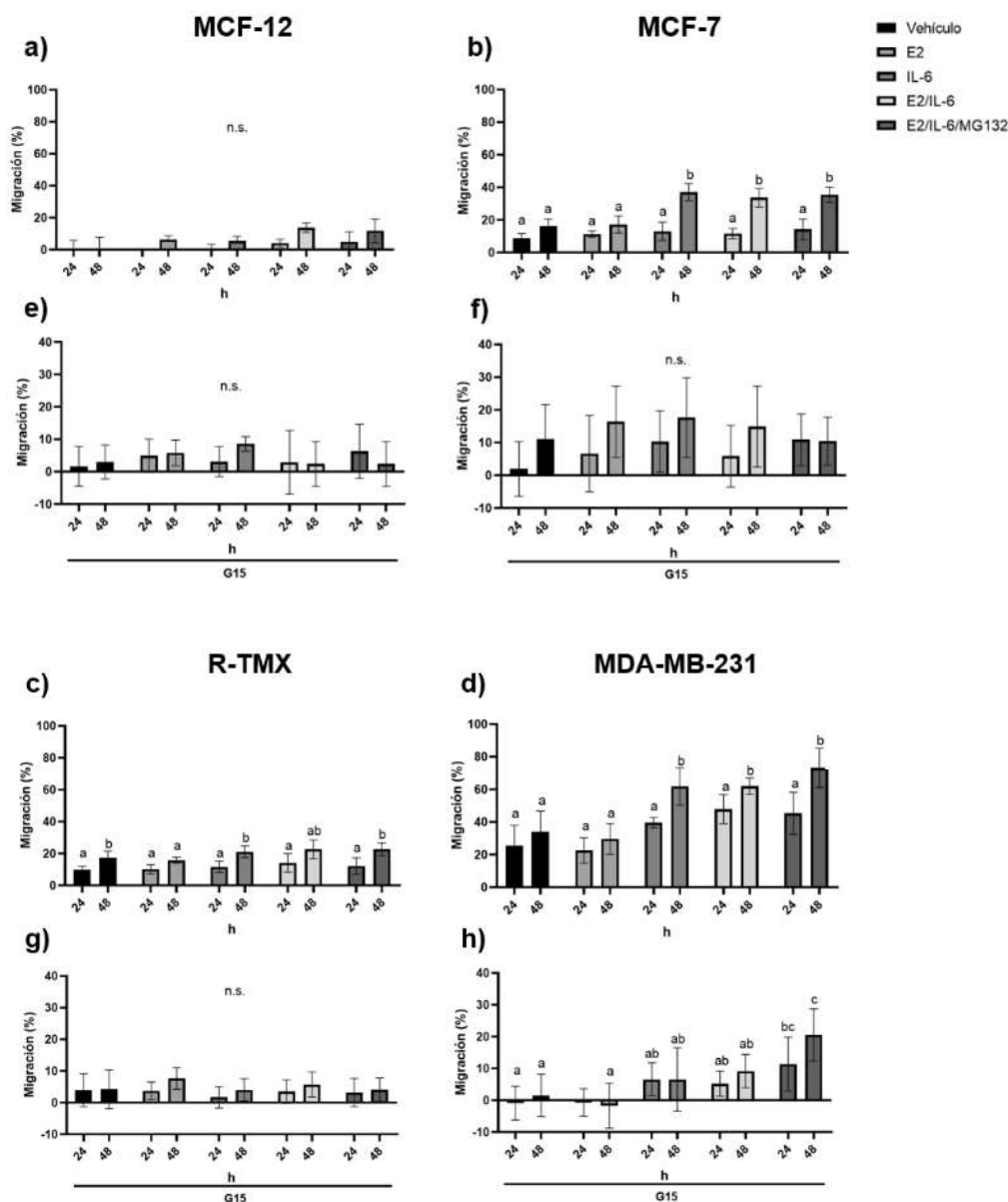


Figura 8. El GPR30 regula la migración inducida por IL-6 en células de cáncer de mama. La migración celular se evaluó mediante el ensayo de cierre de herida en presencia de E2 (10 nM), IL-6 (50 ng/mL), MG132 (0.03 μ M) y G15 (0.625 μ M), en células (a) MCF-12, (b) MCF-7, (c) R-TMX y (d) MDA-MB-231. Cada barra muestra la media de triplicados $\pm$ SE de tres experimentos independientes. Diferentes letras denotan diferencias significativas dentro de los tratamientos (ANOVA de dos vías y comparación de Tukey, $p \leq 0.05$).

Una vez que las células malignas llegan a órganos secundarios, invaden estos tejidos para desarrollar tumores metastásicos. Este proceso involucra la degradación de la

matriz extracelular que permite una migración dirigida hacia el estímulo u órgano blanco. Para evaluar la invasión inducida por IL-6 en células de cáncer de mama, se utilizó el ensayo de cámara Transwell. Las células MCF-12 no mostraron invasión, incluso cuando fueron estimuladas con E2 o IL-6 (**Fig. 9a**). Por otro lado, las células MCF-7 no modificaron su capacidad de invasión con E2, pero esta fue inducida por IL-6 (~25 veces) (**Fig. 9b**), efecto que fue revertido por el antagonista G15 (**Fig. 9f**) o PTX (datos no mostrados). Resultados similares se observaron en las células R-TMX, aunque la inducción por IL-6 fue menor (~2 veces respecto al vehículo) (**Fig. 9c**). Además, la invasión de las células MDA-MB-231 se incrementó con IL-6 (~3 veces respecto al vehículo) (**Fig. 9d**), y tanto la invasión basal como la inducida fueron inhibidas por G15, sugiriendo la participación de GPR30 en la invasión celular de las células de cáncer de mama (**Fig. 9 e-h**).

Uno de los principales problemas de las terapias actuales contra el cáncer es el desarrollo de resistencia a los fármacos, siendo la resistencia al tamoxifeno (TMX) la más común en el cáncer de mama. Se evaluó si la IL-6 inducía resistencia a TMX en células MCF-7. Las células tratadas con IL-6 mostraron un aumento dependiente del tiempo en la resistencia a TMX (**Fig. 10**). Cabe destacar que el antagonista G15 redujo los valores de la IC₅₀ de TMX en células tratadas con IL-6, lo que sugiere una re-sensibilización a TMX, además, este antagonista disminuyó significativamente la IC₅₀ de TMX en células R-TMX.

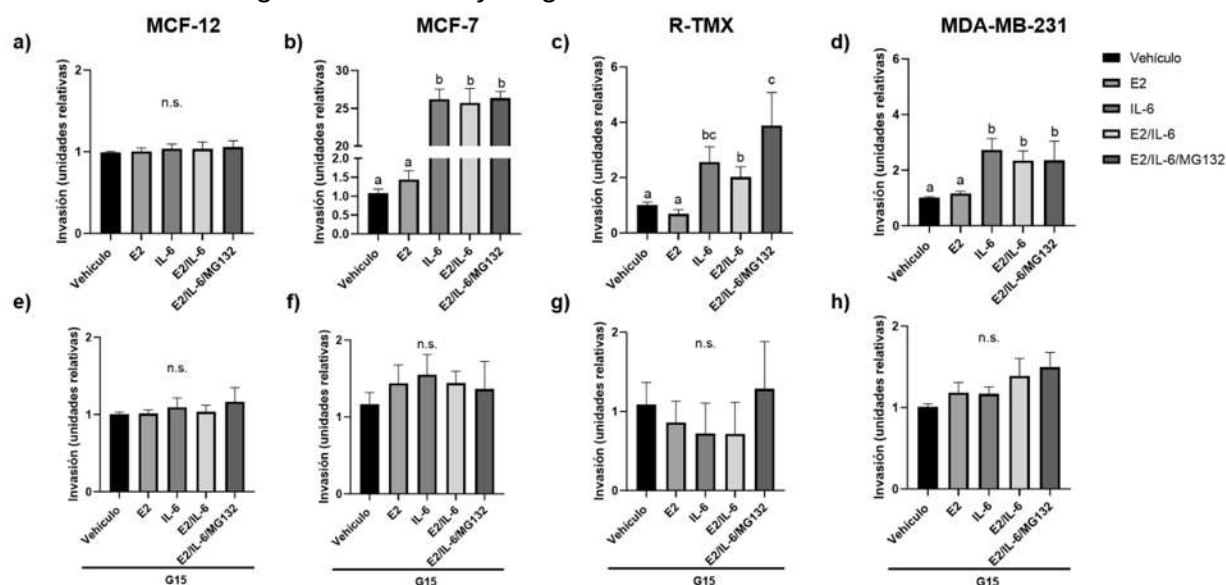


Figura 9. El GPR30 regula la invasión inducida por IL-6 en células de cáncer de

mama. La invasión células fue evaluada por ensayo de cámara Transwell en presencia de E2 (10 nM), IL-6 (50 ng/mL), MG132 (0.03 μ M) y G15 (0.625 μ M) por 24 h, en las células (a) MCF-12, (b) MCF-7, (c) R-TMX y (d) MDA-MB-231. M+ = células cultivadas en medio F-12 suplementado con FBS al 10%. Cada barra muestra la media de triplicados $\pm$ SE de tres experimentos independientes. Diferentes letras denotan diferencias significativas dentro de los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p \leq 0.05$). n.s. = no significativo.

La resistencia al tamoxifeno (TMX) y el desarrollo de metástasis han sido relacionados con el aumento de los niveles de GPR30, un receptor que se encuentra en organelos membranosos y puede movilizarse en el cáncer (13). Se evaluaron los niveles intracelulares de GPR30 por citometría de flujo y se observó que la IL-6 aumentó los niveles de GPR30 (3 veces) en células MCF-7, sin verse afectado por E2 (Fig. 11a), además los antagonistas G15 o PTX revertieron la inducción de IL-6. Por otro lado, las células R-TMX mostraron niveles elevados de GPR30 en comparación con las células MCF-7, pero los tratamientos no modificaron estos niveles (Fig. 11b).

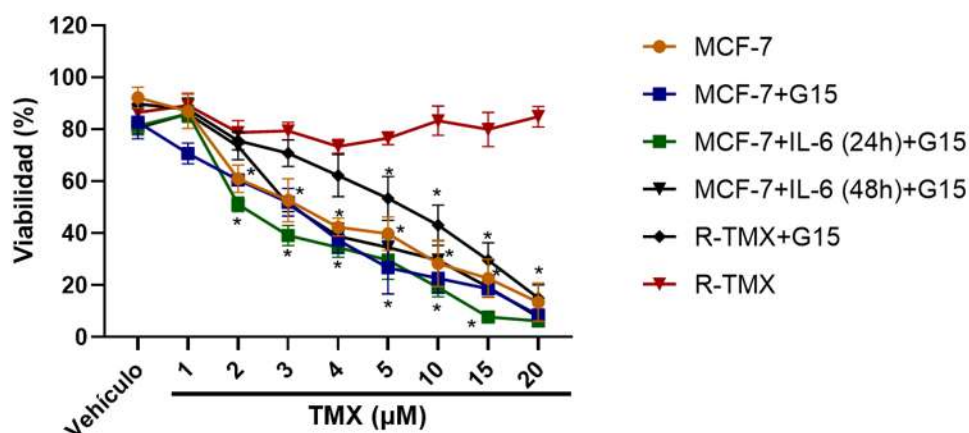


Figura 10. El GPR30 regula la resistencia a TMX inducida por el fármaco e IL-6 en células de cáncer de mama luminal. La viabilidad de células MCF-7 y R-TMX expuestas a TMX (1-20 μ M) fue evaluada mediante ensayo de exclusión por azul tripano. Las células de cáncer luminal fueron tratadas con IL-6 (50 ng/mL) y G15 (0.625 μ M) de manera individual y en conjunto por 24 y 48 h. Los asteriscos representan significancia estadística respecto al vehículo. (t -student, ($\alpha \leq 0.05$).

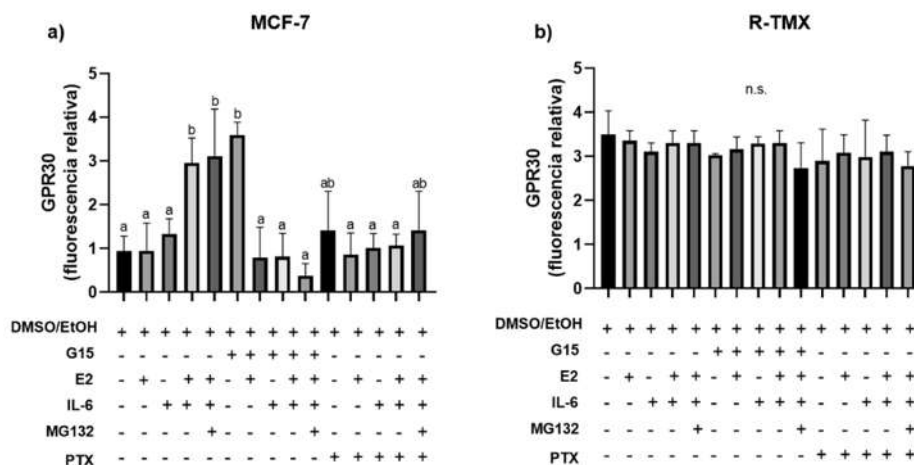


Figura 11. La IL-6 incrementa los niveles del receptor GPR30 intracelular en células de cáncer de mama. Niveles de GPR30 en células . (a) MCF-7 y (b) niveles de GPR30 en células R-TMX a las 48 h en presencia de E2 (10 nM), IL-6 (50 ng/mL), MG132 (0.03 μ M), G15 (0.625 μ M) y PTX (100 ng/mL). Los niveles de proteínas se evaluaron por citometría de flujo como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada barra muestra la media de triplicados $\pm$ SE de tres experimentos independientes. Diferentes letras denotan diferencias significativas dentro de los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p \leq 0.05$). n.s. = no significativo.

VIII.1.6. DISCUSIÓN

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la proliferación y la capacidad metastásica de las células tumorales, influenciadas por el microambiente tumoral **(11)**. Este estudio evaluó el efecto de la citocina IL-6 sobre la proliferación, migración, invasión y resistencia a TMX en células de cáncer de mama, procesos relacionados con la TEM. Se demostró que el receptor GPR30, un receptor alternativo no canónico de E2, regula la TEM inducida por IL-6 en células MCF-7.

El cáncer de mama luminal es epitelial **(1)**, lo que requiere de estimulación externa para adquirir propiedades metastásicas **(4)**. Las células MCF-7, al ser estimuladas con E2 aumentaron su tasa proliferativa; sin embargo, la IL-6 inhibió este efecto de forma dependiente del proteosoma, ya que el inhibidor MG132 bloqueó la acción de la citocina permitiendo que el E2 ejerciera su efecto proliferativo **(Fig. 6)**. En este trabajo también se observó que en las variantes resistentes al tamoxifeno (R-TMX) y en las células triple negativas (MDA-MB-231), el E2 no tuvo efecto en la proliferación de dichas células **(Fig. 6)**, lo cual puede ser atribuido a la baja cantidad de ER α respecto a las células luminales MCF-7 **(1)**. Además, se observó que la IL-6 promovió la proliferación de las células R-TMX y MDA-MB-31, lo que podría ser regulado a través de la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un receptor que se activa en células resistentes a estrógenos y se relaciona con la promoción del ciclo celular **(14)**. La inhibición del efecto de la IL-6 por el antagonista G15 o la toxina PTX sugiere que el GPR30 juega un papel crucial en la regulación de la proliferación celular **(Fig. 6)**.

La TEM puede detectarse por la disminución de citoqueratina 18 (CTK 18) y el aumento de vimentina (Vim). Los resultados confirmaron que la IL-6 induce este patrón en las células MCF-7 y R-TMX **(Fig. 7)**. Así mismo, esta citocina induce la resistencia a TMX, así como la migración e invasión de las células de cáncer de mama **(Fig. 8,9,10)**, las cuales son propiedades metastásicas. Por otro lado, el tratamiento con G15 o PTX disminuyó la resistencia a TMX e inhibió la migración e invasión celular inducidas por IL-6, sugiriendo que el GPR30 está involucrado en la TEM **(Fig. 8,9,10)**. Además, se observó un aumento en los niveles intracelulares de GPR30 en las células MCF-7 tratadas con IL-6 **(Fig. 11)**, lo que coincide con la literatura que sugiere que la localización de GPR30 en

la membrana está asociada con la resistencia al tamoxifeno **(13)**.

En resumen, GPR30 tiene un rol importante en las propiedades metastásicas de las células de cáncer de mama reguladas por IL-6, lo que lo convierte en un posible objetivo para el desarrollo de nuevos tratamientos.

VIII.1.7. CONCLUSIÓN

El receptor GPR30 regula las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer luminal MCF-7.

VIII.1.8. REFERENCIAS

1. Arceo-Martínez, M. T., López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., & Palomera-Sánchez, Z. 2021. **Estado actual del cáncer de mama en México: principales tipos y factores de riesgo.** *GAMO*. 20(3):101:110. doi: 10.24875/j.gamo.21000134.
2. Koch, C., Kuske, A., Joosse, S. A., Yigit, G., Sflomos, G., Thaler, S., Smit, D. J., Werner, S., Borgmann, K., Gärtner, S., Mossahebi Mohammadi, P., Battista, L., Cayrefourcq, L., Altmüller, J., Salinas-Riester, G., Raithatha, K., Zibat, A., Goy, Y., Ott, L., Bartkowiak, K., Tan, T. Z., Zhou, Q., Speicher, M. R., Müller, V., Gorges, T. M., Jücker, M., Thiery, J. P., Briskin, C., Riethdorf, S., Alix-Panabières, C., & Pantel, K. 2020. **Characterization of circulating breast cancer cells with tumorigenic and metastatic capacity.** *EMBO*, 12(9), e11908. doi: 10.15252/emmm.201911908.
3. Mishra, A., Srivastava, A., Pateriya, A., Tomar, M. S., Mishra, A. K., & Shrivastava, A. 2021. **Metabolic reprogramming confers tamoxifen resistance in breast cancer.** *Chem Biol Interac*, 347, 109602. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109602.
4. Zhou, X., Zhang, J., Lv, W., Zhao, C., Xia, Y., Wu, Y., & Zhang, Q. 2022. **The pleiotropic roles of adipocyte secretome in remodeling breast cancer.** *J Expe Clin Cancer Res*, 41(1), 203. doi: 10.1186/s13046-022-02408-z.
5. Abaurrea, A., Araujo, A. M., & Caffarel, M. M. 2021. **The role of the IL-6 cytokine family in epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression.** *Int J Mol Sci*, 22(15), 8334. doi: 10.3390/ijms22158334.
6. Muhammad, A., Forcados, G. E., Yusuf, A. P., Abubakar, M. B., Sadiq, I. Z., Elhussin, I., Siddique, M. A. T., Aminu, S., Suleiman, R. B., Abubakar, Y. S., Katsayal, B. S., Yates, C. C., & Mahavadi, S. 2022. **Comparative G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) systems in diabetic and cancer conditions: A review.** *Molecules*, 27(24), 8943. doi: 10.3390/molecules27248943
7. Tsoi, H., Man, E. P. S., Chau, K. M., & Khoo, U. S. 2021. **Targeting the IL-6/STAT3 signalling cascade to reverse tamoxifen resistance in estrogen receptor positive breast cancer.** *Cancers (Basel)*, 13(7), 1511. doi:

1.

- 10.3390/cancers13071511.
8. Xu, T., Ma, D., Chen, S., Tang, R., Yang, J., Meng, C., Feng, Y., Liu, L., Wang, J., Luo, H., & Yu, K. 2022. **High GPER expression in triple-negative breast cancer is linked to pro-metastatic pathways and predicts poor patient outcomes.** *NPJ Breast Cancer*, 8(1), 100. doi: 10.1038/s41523-022-00472-4.
 9. Molina, L., Bustamante, F., Ortloff, A., Ramos, I., Ehrenfeld, P., & Figueroa, C. D. 2020. **Continuous exposure of breast cancer cells to tamoxifen upregulates GPER-1 and increases cell proliferation.** *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 563165. doi: 10.3389/fendo.2020.563165.
 10. Singh, M., Zhou, X., Chen, X., Santos, G. S., Peugeot, S., Cheng, Q., Rihani, A., Amér, E. S. J., Hartman, J., & Selivanova, G. 2020. **Identification and targeting of selective vulnerability rendered by tamoxifen resistance.** *Breast Cancer Res.*, 22(1), 80. doi: 10.1186/s13058-020-01315-5.
 11. Hanahan, D. 2022. **Hallmarks of cancer: New dimensions.** *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
 12. Battaglia, R. A., Delic, S., Herrmann, H., & Snider, N. T. 2018. **Vimentin on the move: new developments in cell migration.** *F1000Res*, 7, F1000,1796. doi: 10.12688/f1000research.15967.1.
 13. Mo, Z., Liu, M., Yang, F., Luo, H., Li, Z., Tu, G., & Yang, G. 2013. **GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer.** *BCR*, 15(6), R114. doi: 10.1186/bcr3581. PMID: 24289103.
 14. Chen, J., Wei, Y., Yang, W., Huang, Q., Chen, Y., Zeng, K., & Chen, J. 2022. **IL-6: The link between inflammation, immunity and breast cancer.** *Front Oncol*, 12, 903800. doi: 10.3389/fonc.2022.903800.

VIII.2. CAPÍTULO II

Participación de la ruta de MAPKs en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal MCF-7

VIII.2.1. RESUMEN

El cáncer de mama luminal es el carcinoma mamario de mayor incidencia a nivel mundial y se caracteriza por la sobre expresión del receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$). El tratamiento de esta patología se dificulta por el desarrollo de metástasis a través de estímulos del microambiente tumoral, como la IL-6. Se ha reportado que esta citocina promueve características metastásicas en células de cáncer de mama luminal a través del receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPR30); sin embargo, se desconoce el mecanismo involucrado. La cascada de señalización activada por IL-6 se entrecruza con la ruta del GPR30 a nivel de la proteína tirosina fosfatasa 2 que contiene homología Src 2 (SHP2), la cual es crítica para el desarrollo metastásico. Además, esta ruta conjunta involucra la participación de las MAPK, como ERK, p38 y JNK, lo que permite la expresión de genes involucrados en la progresión tumoral. Por lo anterior, se evaluó la participación de SPH2 y la ruta de MAPKs en la inducción de las propiedades metastásicas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal. Los resultados indican que la IL-6 induce la fosforilación de SHP2. Por otro lado, la ruta de las MAPKs regula la proliferación promovida por el 17β -estradiol (E2) en células de cáncer de mama luminal MCF-7, así como la proliferación inducida por IL-6 en células MDA-MB-231, debido a que el uso de inhibidores de ERK, p38 y JNK disminuyó el efecto proliferativo del E2 y la IL-6 en las células cancerosas. La migración e invasión celular inducidas por IL-6 disminuyeron al inhibir las MAPK ERK, p38 y JNK, indicando que estos procesos son regulados por más de una ruta de señalización. Estos resultados indican que la IL-6 induce propiedades metastásicas en células de cáncer de mama luminal a través de la ruta SHP2/MAPKs.

VIII.2.2. ABSTRACT

Luminal breast cancer is the breast carcinoma with the highest incidence worldwide and is characterized by overexpression of the estrogen receptor alpha (ER α). The treatment of this pathology is difficult because of metastasis development through stimuli from the tumor microenvironment, such as IL-6. This cytokine has been reported to promote metastatic characteristics in luminal breast cancer cells through the G protein-coupled estrogen receptor (GPR30); however, the mechanism involved is unknown. The cytokine signaling cascade intersects with the GPR30 pathway at the level of Src homology-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2), which is critical for metastatic development. Furthermore, these pathways involve the participation of MAPKs, such as ERK, which would allow the expression of genes involved in tumor progression. Therefore, this study determined how IL-6 induces metastatic properties in luminal breast cancer cells. The results indicate that prolonged exposure to IL-6 decreased ER α in MCF-7 cells and increased SHP2 phosphorylation. On the other hand, the MAPKs pathway regulates the proliferation promoted by 17 β -estradiol (E2) in MCF-7 luminal breast cancer cells, as well as the proliferation induced by IL-6 in MDA-MB-231 cells, because the use of ERK, p38, and JNK inhibitors decreased the proliferative effect of E2 and IL-6 in cancer cells. Migration and invasion induced by IL-6 were reduced by inhibiting the MAPKs ERK, p38, and JNK, indicating that multiple signaling pathways regulate these processes. These results suggest that IL-6 induces metastatic properties in luminal breast cancer cells through the SHP2/MAPK pathway.

VIII.2.3 INTRODUCCIÓN

El carcinoma mamario es el de mayor incidencia a nivel mundial, y se caracteriza por neoplasias primarias en los ductos o lobulillos de la glándula mamaria (1). Este tipo de cáncer se clasifica molecularmente de acuerdo con la sobre expresión de receptores hormonales como el receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) y el de progesterona (PR), así como el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2) (2). El cáncer de mama luminal es el más frecuente y responde al estímulo con 17β -estradiol (E2) debido a la sobre expresión del $ER\alpha$ (2,3). Este último es un receptor nuclear que permite la expresión de genes con elementos de respuesta a estrógenos (ERE) que participan en la progresión tumoral, como los correspondientes a las subunidades de AP-1 y la ciclina D1 (4). Además de las acciones genéticas directas del $ER\alpha$, este también regula cascadas de señalización como la de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK) (5). Por otro lado, el cáncer de mama triple negativo (CMTN) carece de la sobre expresión de los receptores antes mencionados, pero es el de mayor agresividad debido a que cuentan con un fenotipo mesenquimal, lo que favorece las propiedades migratorias e invasivas de las células cancerosas (6). Este fenotipo puede ser adquirido por las células de cáncer luminal al ser estimuladas por citocinas del microambiente tumoral, lo que conlleva a la modificación de las rutas de señalización celular (7).

La proliferación sostenida es una de las principales características del cáncer y es debida a una desregulación del ciclo celular (8). Este último está compuesto por un periodo de crecimiento conocido como fase G1, posteriormente el material genético se duplica en la fase de síntesis o S, y a continuación se inicia la fase G2 donde se duplican los organelos celulares para finalmente producir dos células hijas mediante el proceso de mitosis o fase M (9). La transición de estas fases está regulada por serina/treonina cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las cuales se activan al unirse a sus ciclinas afines (10, 11). La actividad de las CDKs se ve alterada en el cáncer debido a un aumento de las ciclinas activadoras, promoviendo la immortalización de las células cancerosas y la formación de tumores (12).

Por otro lado, la metástasis es otra característica cancerosa y su desarrollo está directamente relacionada con el retroceso en la diferenciación celular. El desarrollo

metastásico implica la transición epitelio-mesénquima (TEM), que consiste en una reprogramación epigenética que permite la expresión de genes presentes en la embriogénesis favoreciendo la migración celular (13). Si bien, las células de CMTN cuentan con un fenotipo mesenquimal por sí mismas, las células de cáncer de mama luminal requieren de estímulos externos para llevar a cabo la TEM. Las citocinas del microambiente tumoral, como la IL-6, pueden inducir esta reprogramación caracterizada por una remodelación del citoesqueleto donde aumentan, por ejemplo, los niveles de vimentina y disminuyen los de citoqueratina 18 (13,14). Lo anterior puede atribuirse a que la IL-6 orquesta una cascada de señalización que permite la expresión y activación del factor de transcripción Snail, el cual es clave para la expresión de metaloproteasas (MMPs) implicadas en la diseminación de las células cancerosas (15). Otros factores de transcripción que participan en la regulación de la diferenciación celular principalmente son la región Y determinante del sexo relacionada con la caja HMG (Sox), la proteína con cabeza de horquilla (Fox), Twist y Slug (16,17). Estos inhiben la transcripción de genes epiteliales mediante el reclutamiento de enzimas desacetilasas y metilasas al promotor del gen en cuestión, así mismo promueven la expresión de genes mesenquimales relacionados con las propiedades metastásicas (16,17).

Las MAPK participan en una compleja red de señalización que cuenta con varios entrecruzamientos y cuya alteración puede promover el desarrollo tumoral y la resistencia a fármacos (18). Existen tres principales MAPK con varias isoformas: ERK (ERK1/2), JNK (JNK1/2/3) y p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) (18). Estas cascadas de señalización regulan el ciclo celular mediante la expresión de genes y la fosforilación de proteínas. Por ejemplo, p38 inhibe la división celular al promover la fosforilación de las ciclinas D y por ende su degradación, así como impedir la progresión a la fase de mitosis al inhibir la activación de la CDK1 (19). Sin embargo, ERK promueve la división celular al permitir la expresión de la ciclina D1 mediante la señalización CREB/c-fos y por consecuencia la activación de las CDK4/6 (20). Las cascadas de señalización de las MAPK están involucradas en la expresión de oncogenes como *myc* (21), *c-fos* (22), *ciclina D1* (10), entre otros, lo que explica su participación en la generación de neoplasias y la progresión tumoral.

Por otro lado, las MAPK se encuentran involucradas en procesos metastásicos como la

TEM. Se ha reportado que Sox4 promueve la expresión de ERK2 (23), y que al igual que Sox9, favorecen el desarrollo de la TEM en células de cáncer pancreático y de mama (24). Por otro lado, se ha observado que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) puede activar la ruta de ERK y JNK de forma dependiente de Snail, promoviendo el desarrollo metastásico en cáncer de páncreas (25); además, p38 funge como estabilizador de Snail (26) y de Fox (27) mediante su fosforilación, promoviendo la TEM en células de cáncer de ovario y mama, respectivamente. Por otro lado, la inhibición de p38 impide la TEM en respuesta a Twist y Snail, mientras que su sobre expresión favorece el desarrollo de células madre cancerosas en modelos *in vitro* de carcinoma mamario (27). Recientemente se reportó que la IL-6 promueve propiedades metastásicas en células de cáncer de mama a través del receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPR30) (14); sin embargo, no se ha establecido la cascada de señalización involucrada. No obstante, se sabe que ambas rutas convergen a nivel de SHP2 y MAPK. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó si la ruta SHP2/MAPK está involucrada en la proliferación, migración e invasión celular inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal.

VIII.2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Las células MCF-7 (ATCC) fueron cultivadas en medio F12 con rojo fenol suplementado con suero fetal bovino (5%) (Biowest, S1820-500), suero de ternera (5%) (Biowest S0400-500), penicilina/estreptomicina (1%) (Gibco, 15140122) y anfotericina B (0.05%) (Sigma Aldrich, A2942). Mientras que en las células R-TMX se adicionó tamoxifeno (TMX) a una concentración final de 1 μ M. Las células R-TMX fueron obtenidas mediante una exposición continua de las células MCF-7 a TMX (1 μ M) por 60 días. Las células MDA-MB-231 (donación de la Dra. Carmen Aceves Velasco del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Juriquilla, Qro.) se cultivaron con medio DMEM suplementado con la composición mencionada inicialmente, adicionando L-glutamina (0.05%) (Gibco, 20530-081). Los tres tipos celulares fueron cultivados a 37 °C y 5% de CO₂.

Tratamientos

Las líneas celulares fueron tratadas con los vehículos DMSO (0.05%) y etanol (0.005%), y utilizadas como controles. Los tratamientos consistieron en una exposición individual o conjunta con E2 10 nM (Sigma Aldrich, E2758), IL-6 50 ng/mL (Peprotech, 200-06), o los inhibidores de MAPK 10 μ M (Cell signaling technology) U0-126 (ERK), SB203500 (p38) y SP600125 (JNK).

Determinación de los niveles de ER α y p-SHP2 por Western Blot

Se cultivaron 500,000 células MCF-7 por pozo en placas de 6 pozos por 24 h. Pasado el tiempo se sincronizaron con medio F12 sin rojo fenol y sin suplementar durante 18 h. Para la evaluación de los niveles basales de ER α se extrajeron las proteínas después de la sincronización, mientras que los niveles de SHP2 y p-SHP2 fueron evaluados en células tratadas por 24 h con E2 (10 nM) e IL-6 (50 ng/mL) de forma individual y en conjunto. Pasado el tiempo, se extrajeron las proteínas con buffer RIPA y se cuantificaron por el método de Bradford (Sigma Aldrich, B6916). Se realizó una electroforesis SDS-PAGE con 20 μ g de proteína a 80 v y 400 mA por 2 h, seguida de una transferencia húmeda a 20 v y 90 mA por 12 h a una membrana de nitrocelulosa (Biosciences). Después, se bloqueó la membrana con leche descremada (5%) en TBS-Tween (0.5%) por 12 h, y posteriormente se incubó con los siguientes anticuerpos: anti-ER α (sc-8002, 1:1500), anti SHP2 (PRS3901 1:2000), anti-p-SHP2 (CST-3751, 1:2000) o anti- β -actina (sc-8432, 1:1500) por 12 h. Después se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween y la membrana se incubó con un anticuerpo anti-ratón (Cell signaling 7076S, 1:3000) o anti-conejo (Cell signaling 7074P2, 1:3000), acoplados a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), por 4 h. Al terminar se realizó el mismo esquema de lavados y la detección se realizó con el substrato quimioluminiscente HRP (Sigma Aldrich, WBKLS0500). Luego las membranas fueron expuestas a una placa de rayos X (FujiFilm 47410) y se reveló con las soluciones de revelado (Carestream). Las membranas fueron escaneadas y analizadas mediante densitometría en el software ImageJ v1.8.0.

Evaluación de la proliferación celular (ensayos de exclusión por azul tripano)

Se cultivaron 10,000 células MCF-7 por pozo en placas de 96 por 24 h. Pasado el tiempo fueron sincronizadas con medio F12 sin rojo fenol y sin suplementar durante 18 h.

Posteriormente se adicionaron los tratamientos antes mencionados de forma individual y en conjunto, se dejaron actuar 24 h y posteriormente se recuperaron las células con tripsina (0.04%). Se realizó una dilución 1:1 de la suspensión celular con azul tripano al 0.4% y se cuantificaron las células totales, vivas y el porcentaje de viabilidad en un contador celular automático Bio-Rad (TC20).

Participación de las MAPKs en la migración celular: Ensayo de cierre de herida

Se cultivaron 80,000 células MCF-7 y MDA-MB-231 por pozo, en placas de 24 pozos por 24 h. Pasado el tiempo se sincronizaron con medio F12 sin rojo fenol y sin suplementar durante 16 h. Posteriormente se adicionó mitomicina C (4 µg/mL) (Sigma Aldrich, M0503) por 2 h. Luego, sin retirar el medio, se realizaron las heridas con una punta de 200 µL y se colocó el vehículo (DMSO 0.05%), la IL-6 y los inhibidores de las MAPK de forma individual y en conjunto. Se capturaron imágenes de las heridas a diferentes tiempos (0, 24 y 48 h) mediante un microscopio invertido (Zeiss) a 4X. Posteriormente se analizaron las imágenes en el software ImageJ v1.8.0, donde se midió el área de la herida con la herramienta *wound healing tool* utilizando los parámetros de varianza 3, umbral 250 y radio 0.

Participación de las MAPKs en la invasión celular: Cámara de Transwell

Se colocaron 100 µL de matrigel (Corning, E1270) a una concentración final de 1.25 mg/mL en los insertos de las placas Transwell de 8 µm (Corning incorporated-Costar, 3422) y se incubaron a 37°C por 24 h. Pasado el tiempo se recuperaron las células MCF-7 y MDA-MB-231 con tripsina (0.04%) y se colocaron 25,000 células en un volumen de 20 µL sobre la matrigel (Sigma Aldrich, E1270) polimerizada. Se colocaron IL-6 y los inhibidores de las MAPKs de forma individual y en conjunto en la placa de 24 pozos, y sobre los pozos se posicionaron los insertos Transwell. Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 h. Luego, el matrigel fue removido y el inserto se lavó dos veces con PBS, lo que se repitió después de cada proceso posterior. Las células fueron fijadas con para formaldehído (4%), permeabilizadas con metanol (J. Baker, 9070-03) y finalmente teñidas con cristal violeta (Sigma Aldrich, C0775, 0.04%). Las imágenes fueron capturadas en el microscopio invertido (Zeiss Primovert) con los objetivos de 4X y 10X y

analizadas con el software ImageJ v1.8.0.

Análisis estadístico

Se realizaron tres ensayos independientes por experimento por duplicado. Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism v8. Los resultados del ensayo de migración se evaluaron mediante un ANOVA de dos vías con la prueba post hoc de Tukey ($\alpha \leq 0.05$), mientras que los datos de Western blot, proliferación e invasión fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

VIII.2.5. RESULTADOS

La sobre expresión del ER α es una característica de las células de cáncer de mama luminal, y este receptor regula su proliferación mediada por E2 (2). Sin embargo, previamente se reportó que la IL-6 inhibe este efecto proliferativo promoviendo las propiedades metastásicas de migración e invasión de las células MCF-7; además, la exposición de estas células a la citocina por 24 y 48 h induce el desarrollo de resistencia a TMX (14). Por ello, se evaluaron los niveles del ER α en las células luminales (MCF-7), las resistentes a TMX (R-TMX) y las triples negativas (MDA-MB-231) para determinar si existe una relación entre el receptor y la agresividad de las células cancerosas. Se observó que la exposición a IL-6 por 24 h promovió la disminución del ER α , respaldando la resistencia adquirida al TMX por las células MCF-7, ya que las células resistentes presentaron una menor cantidad de ER α en comparación con las células luminales (Fig. 12). De igual forma, las células MDA-MB-231 presentaron una menor cantidad de ER α que las células MCF-7.

Por otro lado, se ha reportado que la migración e invasión celular son inducidas por la IL-6 a través del GPR30. Se conoce que estas dos vías convergen a nivel de SHP2, proteína crítica para el desarrollo de metástasis. Por lo anterior se analizó si IL-6 regula la activación de SHP2 en las células MCF-7. El E2 en forma individual y en conjunto con la IL-6 promovió un aumento en los niveles de SHP2 (Fig. 13a), lo que se sugiere que la expresión de esta proteína está regulada por estrógenos. Sin embargo, la IL-6 de forma individual no modificó los niveles de SHP2 en comparación con el vehículo. Por otro lado, el E2 y la IL-6 de forma individual y en conjunto indujeron la fosforilación de SHP2, siendo que la IL-6 provocó niveles similares de fosforilación a los que indujo la hormona (Fig. 13b).

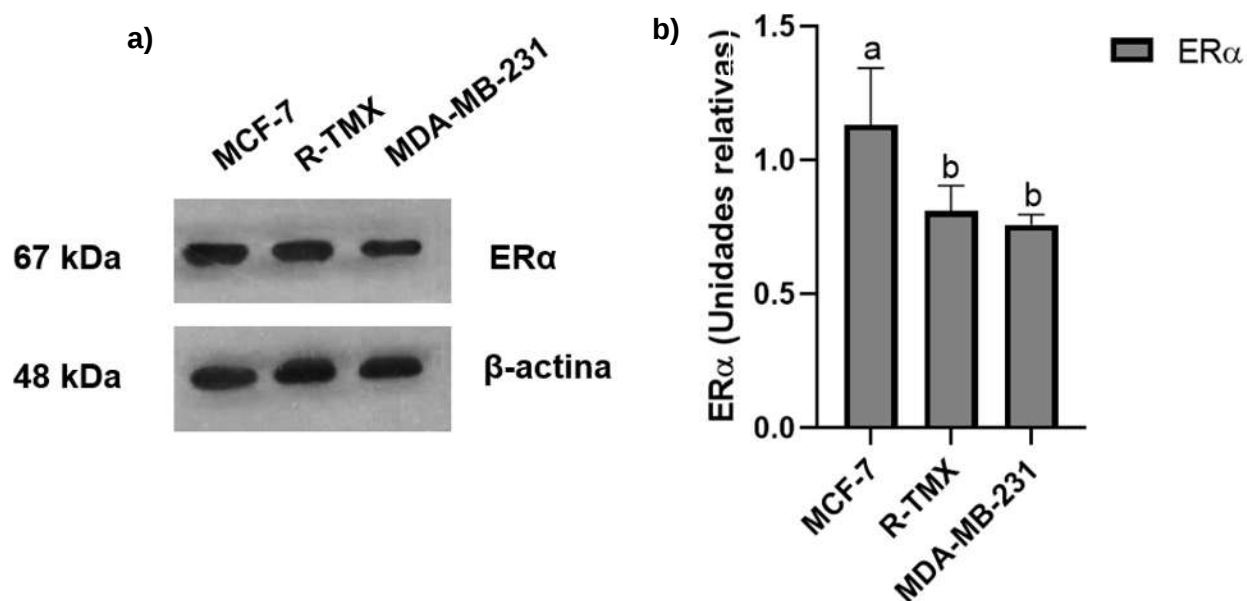


Figura 12. Expresión de ERα en células de cáncer de mama con fenotipo metastásico. (a) Los niveles basales de ERα en las células de cáncer de mama luminal (MCF-7), resistentes a tamoxifeno (R-TMX) y triple negativo (MDA-MB-231) se determinaron por Western Blot. Se empleó β-actina como control de carga. (b) Niveles de expresión de ERα. Cada barra muestra la media de triplicados ± SE de tres experimentos independientes. * representa una diferencia estadísticamente significativa en comparación con las células MCF-7 (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p \leq 0.05$).

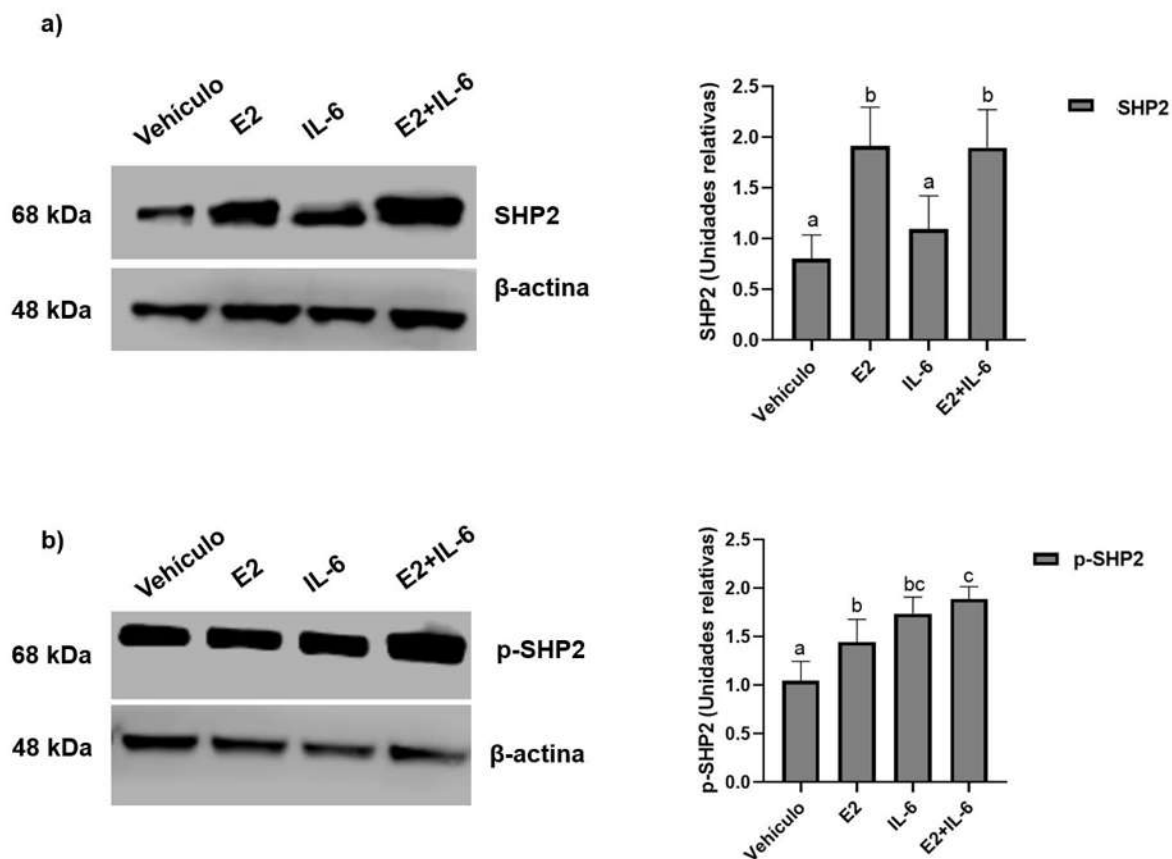


Figura 13. La IL-6 promueve la fosforilación de SHP2. (a) Los niveles de SHP2 y (b) p-SHP2 en células de cáncer de mama luminal (MCF-7) expuestas al vehículo (DMSO 0.05% y EtOH 0.005%), E2 (10 nM) o IL-6 (50 ng/mL) por 24 h, se determinaron por Western Blot. Se empleó β -actina como control de carga. Cada barra muestra la media de triplicados $\pm$ SE de tres experimentos independientes. * representa una diferencia estadísticamente significativa en comparación al vehículo (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p \leq 0.05$).

A continuación, se evaluó la participación de las MAPK en la proliferación de las células MCF-7 expuestas a E2 e IL-6. Se observó que E2 promueve la duplicación celular, y que este efecto se inhibió por la citocina (**Fig. 14a**). Los inhibidores de las MAPK p38 (SB203500), JNK (SP600125) y ERK (U-0126) no afectaron la tasa proliferativa de las células luminales; sin embargo, disminuyeron el efecto inductor de E2 (**Fig. 14a**). Por otro lado, los inhibidores de las MAPK no afectaron la proliferación de las células MCF-7 al colocarse junto a la IL-6; sin embargo, el inhibidor de p38 sí afectó la tasa proliferativa de las células MCF-7 cuando se adicionó en conjunto con la hormona y la citocina. El inhibidor SB203500 disminuyó el efecto inhibitorio de la IL-6 sobre la proliferación

inducida por E2, promoviendo una duplicación celular semejante a la provocada por la hormona en conjunto con los inhibidores, mientras que los inhibidores U-126 y SP600125 no modificaron el efecto antiproliferativo (**Fig. 14a**). Por otro lado, las células triple negativo MDA-MB-231 no responden al E2 y esto se evidenció ya que su tasa proliferativa no se vio afectada por la hormona (**Fig. 14b**), en este mismo sentido los inhibidores de las MAPKs tampoco modificaron esta característica (**Fig. 14b**). Sin embargo, la IL-6 sí indujo un aumento en la proliferación de esta línea celular de forma individual y en conjunto con el E2, efecto que fue bloqueado al adicionar los inhibidores de las MAPKs (**Fig. 14b**).

Es conocido que la IL-6 promueve la migración e invasión de células MCF-7, por lo que se evaluó si en esto participan las MAPK. Para ello se utilizaron los inhibidores farmacológicos de las MAPK descritos. Se observó una migración basal del 5% de las células MCF-7, mientras que la estimulación con la citocina la incrementó al 40%. Los inhibidores de MAPK por sí solos no provocaron cambios en la tasa de migración; sin embargo, disminuyeron el efecto de la citocina permitiendo una migración del 20% de las células MCF-7 (**Fig. 15a**). Por otro lado, las células MDA-MB-231 migran de forma basal un 40%, y esta propiedad se vio incrementada por la IL-6 a un 55% de migración. Los inhibidores de las MAPKs no afectaron la migración basal, pero sí disminuyeron parcialmente la migración inducida por la citocina, excepto U-0126 el cual bloqueó por completo el efecto de la IL-6 en esta propiedad (**Fig. 15b**).

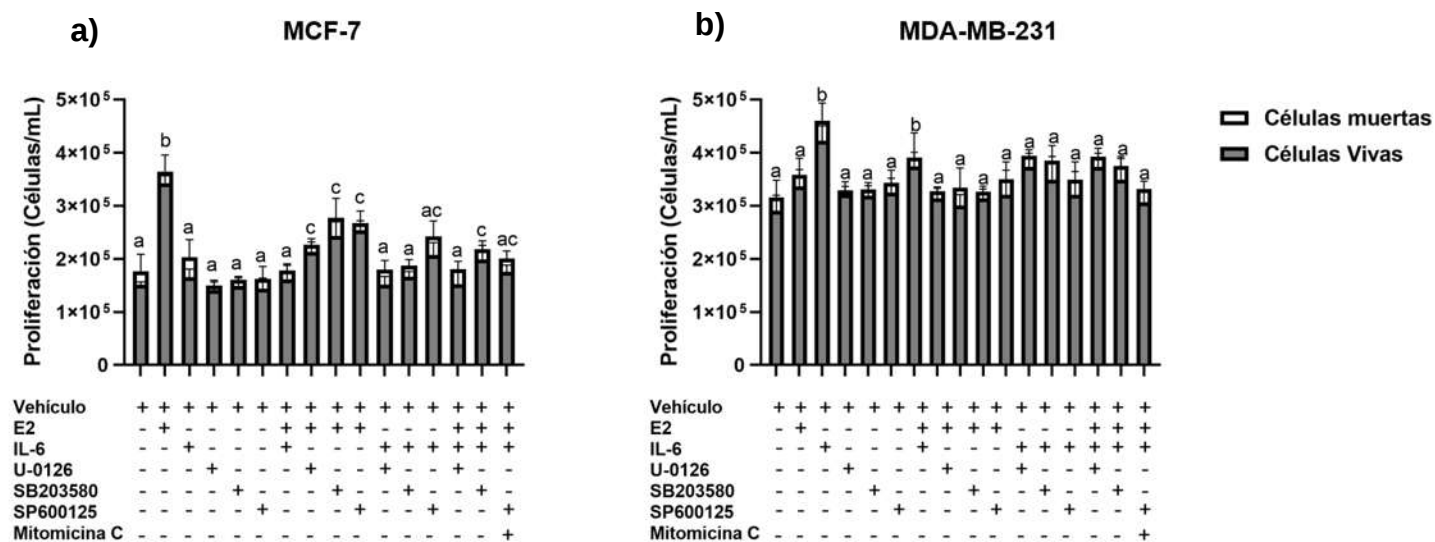


Figura 14. Participación de las MAPK en la proliferación de células de cáncer de mama tratadas con E2 e IL-6. Se evaluó la proliferación de las células (a) MCF-7 a las 24 h y de (b) las células MDA-MB-231 a las 48 h de exposición al vehículo (DMSO 0.05% y EtOH 0.005%), E2 (10 nM), IL-6 (50 ng/mL), U-0126 (10 μ M), SB203580 (10 μ M) y SP600125 (10 μ M). Los datos fueron obtenidos mediante ensayos de exclusión por azul tripiano. Cada barra muestra la media de triplicados $\pm$ SE de tres experimentos independientes. Letras diferentes denotan diferencias significativas dentro de los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p \leq 0.05$).

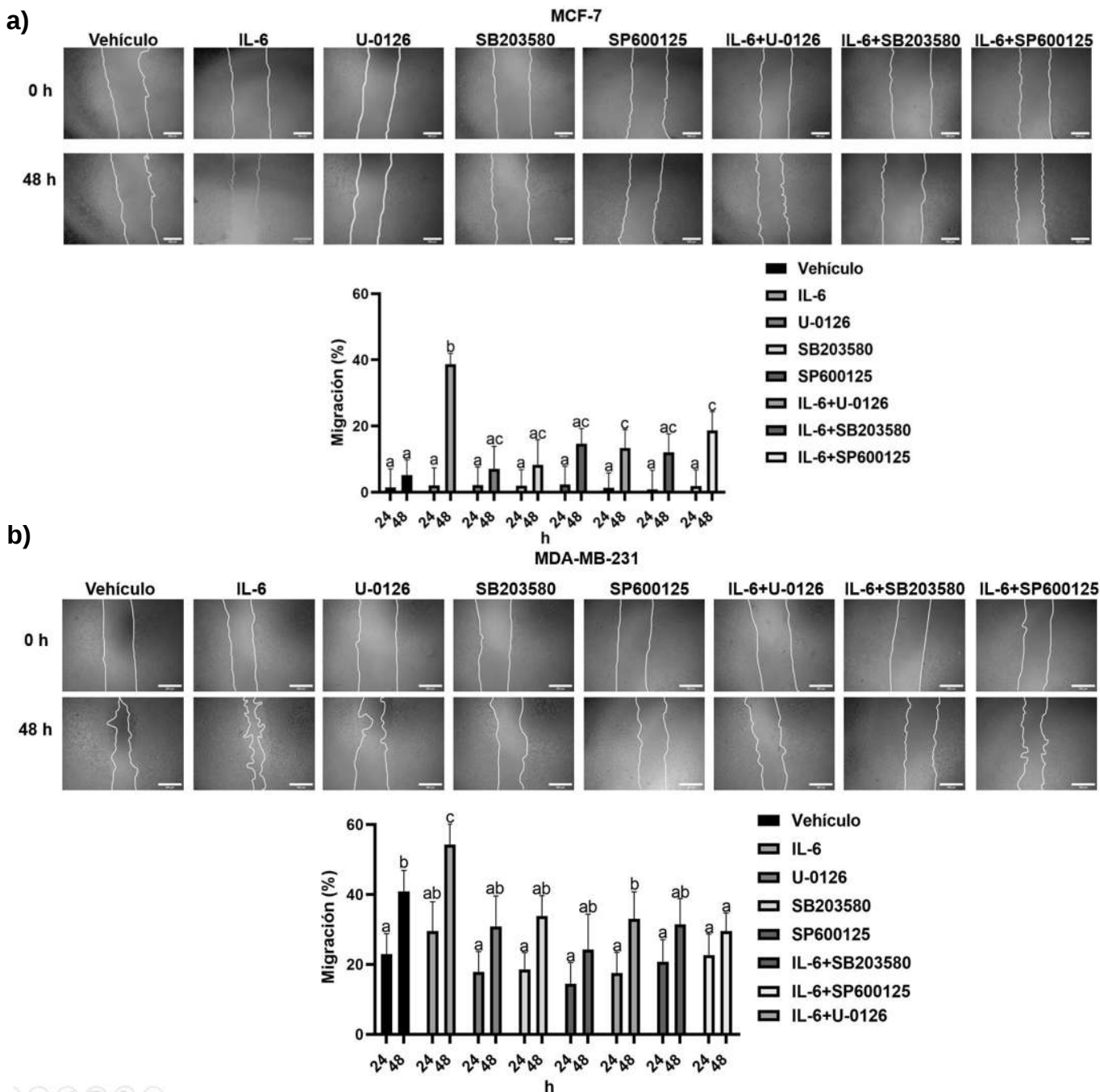


Figura 15. Participación de las MAPK en la migración de células de cáncer de mama estimuladas con IL-6. La migración de las células (a) MCF-7 y (b) MDA-MB-321 se evaluó mediante un ensayo de cierre de herida a las 24 y 48 h en la presencia del vehículo (DMSO 0.05% y EtOH 0.005%), E2 (10 nM), IL-6 (50 ng/mL), U-0126 (10 μ M), SB203500 (10 μ M) y SP600125 (10 μ M). Fotografías representativas 4X. La barra de escala representa 500 μ m. En las gráficas, cada barra muestra la media de triplicados $\pm$ SE de tres experimentos independientes. Letras diferentes denotan diferencias significativas dentro de los tratamientos (ANOVA de dos vías y comparación de Tukey, $p \leq 0.05$).

Por otro lado, las células luminales no cuentan con la capacidad de invadir por sí mismas pero la IL-6 incrementó esta característica 23 veces (**Fig. 16**). Los inhibidores de MAPK no alteraron esta propiedad, pero al colocarse junto con la IL-6 se bloqueó aproximadamente el 80% de la invasión promovida por la citocina (**Fig. 16a**). El inhibidor SB203500 fue el que tuvo mayor efecto al disminuir la invasión inducida por IL-6 un 85%, mientras que los inhibidores SP600125 y U-0126 tuvieron una disminución significativa respecto a las células estimuladas con la citocina, 72% y 81% de inhibición respectivamente, pero la tasa de invasión aún fue significativamente mayor que las células no tratadas (**Fig. 16a**). Por otro lado, las células MDA-MB-231 son capaces de invadir sin necesidad de estimulación externa, y esta característica se incrementó 2.5 veces por la IL-6. Los inhibidores U-0126 y SP600125 no afectaron la invasión basal, pero el inhibidor SB203580 sí redujo esta propiedad un 20% respecto al vehículo. Los inhibidores SB203580 y SP600125 inhibieron totalmente el efecto invasivo de la IL-6 sobre las células MDA-MB-231, mientras que el inhibidor U-0126 lo bloqueó un 66% (**Fig. 10b**).

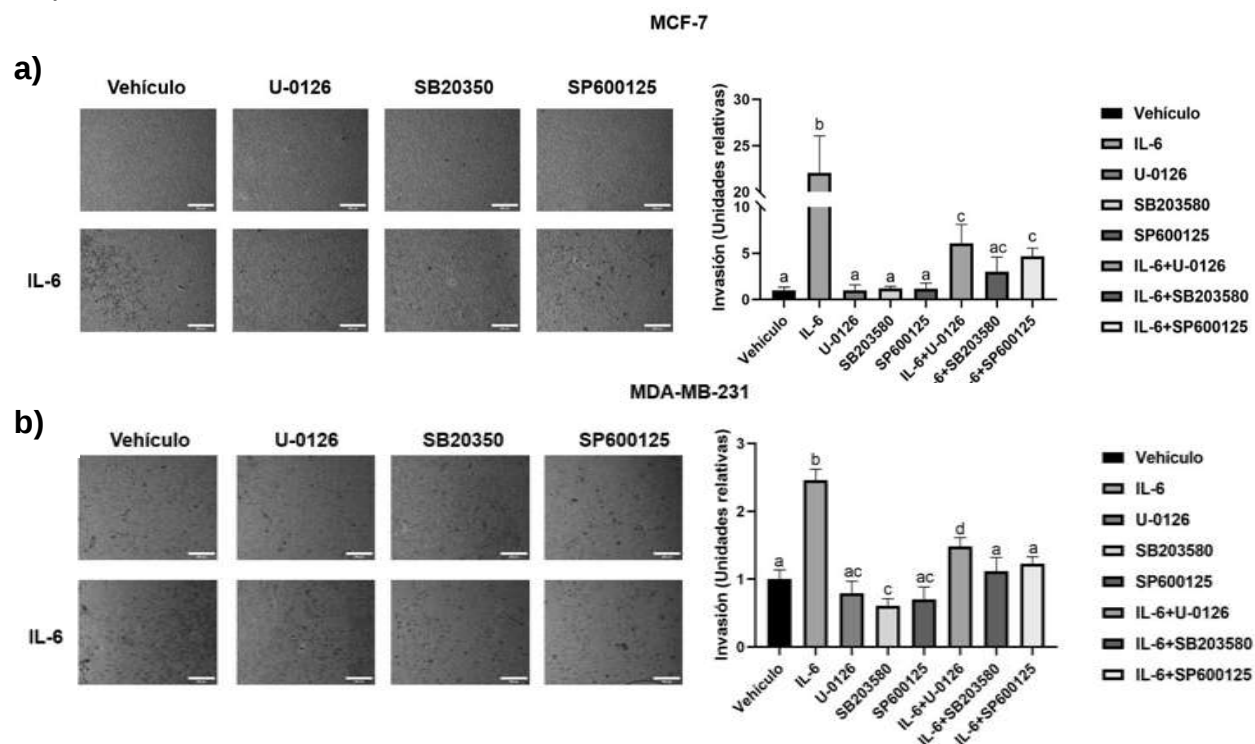


Figura 16. Participación de las MAPK en la invasión de células de cáncer mama estimuladas con IL-6. La invasión de las células (a) MCF-7 y (b) MDA-MB-321 se evaluó mediante un ensayo de cámara Transwell a las 24 h en presencia del vehículo (DMSO

0.05% y EtOH 0.005%), E2 (10 nM), IL-6 (50 ng/mL), U-0126 (10 μ M), SB203500 (10 μ M) y SP600125 (10 μ M). Fotografías representativas 10X. La barra de escala representa 250 μ m. En las gráficas cada barra muestra la media de triplicados $\pm$ SE de tres experimentos independientes. Letras diferentes denotan diferencias significativas dentro de los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p \leq 0,05$).

VIII.2.6. DISCUSIÓN

El cáncer de mama luminal es el carcinoma más frecuente en mujeres mayores de 25 años. A pesar de que sus características epiteliales se relacionan con un pronóstico favorable (2), estas pueden verse modificadas por la IL-6, citocina presente en el microambiente tumoral (7). Anteriormente se ha reportado que la IL-6 induce propiedades metastásicas en células de cáncer de mama luminal MC-7 a través del receptor GPR30 (14); sin embargo, no se ha establecido la ruta de señalización involucrada. La IL-6 puede activar dos cascadas de señalización, la JAK/STAT3 y la SHP2/MAPK (28). Ambas rutas se han relacionado con la progresión cancerosa (29,30); sin embargo, se ha reportado que SHP2 es crítica para el desarrollo de la metástasis debido a que su inhibición bloquea la TEM en células de cáncer de mama luminal y con ello la migración e invasión de las mismas (31). Además, esta proteína también es activada en la ruta de señalización del GPR30 (32), receptor involucrado en diversas propiedades metastásicas como la resistencia a TMX (33), la migración y la invasión (34). Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el nivel proteico y la activación de SHP2 en células MCF-7 tratadas con IL-6 (Fig. 13). Se utilizó a E2 como un control de expresión y fosforilación de SHP2 ya que la expresión y actividad de dicha proteína está regulada por estrógenos. Se observó que el E2 indujo un aumento en los niveles de SHP2, lo cual concuerda con el hecho de que esta hormona activa al ER α , el cual al activarse como un factor transcripcional promueve la expresión de genes con elementos de respuesta a estrógenos (ERE) como *ptpn11*, el gen codificante de SHP2 (32). Por otro lado, la IL-6 no modificó los niveles basales de SHP2, y la combinación con el E2 no afectó la inducción provocada por esta hormona, a pesar de que se ha reportado que la IL-6 inhibe el efecto proliferativo del E2 en células MCF-7 (14), sugiriendo que la IL-6 no afecta la actividad transcripcional de E2 en células MCF-7. Esta aparente contradicción se puede explicar debido a que se ha reportado que el E2 a la concentración empleada (10 nM) puede activar además al factor de crecimiento regulado por estrógenos 1 (GREB1), el cual promueve la expresión de genes con ERE (35). El GREB1 se ha relacionado con la expresión genética regulada por estrógenos, pero no con la duplicación celular (35), por lo que la IL-6 podría estar inhibiendo los efectos del E2 sobre el ER α en la regulación de la proliferación, pero no afectar la

actividad transcripcional dirigida por GREB1; sin embargo, es necesario realizar más estudios para comprobar esta hipótesis.

La IL-6 promovió un aumento en la fosforilación de SHP2 (**Fig. 13b**), se relaciona con la actividad de esta ruta de señalización en las propiedades metastásicas inducidas por la citocina (**31**), por otro lado, el aumento en la fosforilación observado en las células tratadas con E2 se relaciona con una mayor disponibilidad de proteína inactiva (**Fig. 13**). Estos resultados sugieren que la IL-6 promueve la actividad de SHP2, pero no afecta los niveles proteicos de la misma (**Fig. 13**). La fosforilación de SHP2 permite la activación de ERK1/2, p38 y JNK (**36**), por lo que se utilizaron inhibidores de estas MAPK para determinar a través de qué ruta de señalización es que la IL-6 regula las propiedades cancerosas. El E2 promovió un aumento en la proliferación de las células MCF-7 pero no en las células triple negativo MDA-MB-231 (**Fig. 14**). Lo anterior es soportado por el hecho de que las células luminales cuentan con una sobre expresión del ER α y su activación por E2 induce la proliferación celular (**2,37**). Por otro lado, las células MDA-MB-231 carecen de la sobre expresión de dicho receptor y no responden al estímulo con la hormona (**Fig. 12**) (**2**). Sin embargo, las células triple negativo mostraron un aumento en su tasa proliferativa al ser estimuladas con IL-6, caso contrario a las células luminales (**Fig. 14b**). Lo anterior puede atribuirse a que la IL-6 promueve la proliferación celular a través de la anexina A1 (AnxA1) (**37,39**), proteína que se encuentra expresada en mayor cantidad en las células MDA-MB-231 en comparación con las células MCF-7 (**40**). Por otro lado, los inhibidores de las MAPK disminuyeron parcialmente el efecto proliferativo del E2 en las células MCF-7, lo que sugiere que en estas células la proliferación inducida por E2 se regula a través de varias rutas de señalización. Por otro lado, el inhibidor de ERK1/2 abolió la proliferación inducida por IL-6 en las células triple negativo, lo cual se relaciona con el hecho de que ERK1/2 promueve el ciclo celular al permitir la expresión de la ciclina D1 (**20**). El hecho de que este inhibidor no bloqueara por completo la proliferación de las células MCF-7 estimuladas con E2 puede atribuirse a que el gen de la ciclina D1 cuenta con un ERE y por ende la presencia de la hormona pudo promover la expresión de la misma. En las células triple negativo los inhibidores de p38 y JNK bloquearon parcialmente la proliferación promovida por la citocina, siendo que p38 se relaciona con efectos anti proliferativos y su inhibición se vincula con la activación de

ERK1/2 permitiendo que las células continúen proliferando (41), mientras que la segunda promueve la proliferación celular y regula la señalización de ERK1/2 (42).

Respecto a las propiedades metastásicas de migración e invasión, el E2 no produjo cambios en ninguna de las líneas celulares, mientras que la IL-6 promovió un aumento de ambas características tanto en MCF-7 como en MDA-MB-231 (Fig. 15,16). Estos resultados sugieren que el E2 se relaciona con propiedades neoplásicas, mientras que la citocina se ve implicada en la migración e invasión celular. El uso de los inhibidores de las MAPK disminuyó totalmente los efectos metastásicos inducidos por la IL-6 en ambos tipos celulares, pero no afectó la migración e invasión basal de las células cancerosas. Esto se podría atribuir a la relación de las MAPK con factores de transcripción metastásicos clave como Snail y Sox4. Estas proteínas orquestan la transcripción de genes codificantes para proteínas mesenquimales, y se ha reportado que son los elementos iniciales de la TEM y el desarrollo de la metástasis (43). Se ha reportado que ERK1/2 y JNK, pero no p38 (44), promueven la expresión de Snail, y que este a su vez favorece la activación de ERK1/2 y JNK, así como la expresión de otros factores mesenquimales como Slug en células de cáncer de próstata. Así mismo, la IL-6 favorece la expresión de Snail al promover la activación de ERK1/2 y de esta forma se estimula la progresión cancerosa en células de cáncer de mama luminal MCF-7 (45). Por lo que se sugiere que la inhibición de ERK1/2 y JNK estarían disminuyendo los niveles de Snail promovidos por la IL-6, bloqueando así, el efecto inductor de la citocina sobre la migración e invasión celular. Se ha reportado que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (46) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (47) promueven el desarrollo de la metástasis en carcinoma mamario a través de p38, ya que esta MAPK fosforila la serina 367 de Sox4, estabilizándolo y permitiendo la expresión de genes antineoplásicos, el desarrollo de la angiogénesis, la reorganización del citoesqueleto y la expresión de metaloproteasas, que se relacionan con la migración celular a través de vasos sanguíneos y la invasión de nuevos tejidos (27,48). Lo anterior explica por qué la inhibición de esta MAPK bloquea los efectos metastásicos inducidos por la IL-6 en las células cancerosas. Finalmente, los resultados antes mencionados sugieren que la IL-6 promueve la proliferación celular de las células MDA-MB-231 a través de la ruta SHP2/ERK1/2, mientras que favorece el desarrollo de las propiedades metastásicas en

las células MCF-7 de cáncer de mama luminal y MDA-MB-231 mediante la vía ERK1/2, p38 y JNK.

VIII.2.7. CONCLUSIÓN

La IL-6 promueve el desarrollo neoplásico de células de cáncer de mama luminal a través de SHP2/ERK1/2 mientras que favorece el desarrollo de las propiedades metastásicas en células de cáncer de mama luminal y triple negativo mediante ERK1/2, p38 y JNK.

VIII.2.8. REFERENCIAS

1. American Cancer Society. 2021. **What is breast cancer?** *Breast cancer*. Recuperado el 10 de enero de 2025 de <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>
2. Arceo-Martínez, M. T., López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., & Palomera-Sánchez, Z. 2021. **Estado actual del cáncer de mama en México: principales tipos y factores de riesgo.** *GAMO*. 20(3):101:110. doi: 10.24875/j.gamo.21000134.
3. Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. 2021. **Breast cancer-epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies-an updated review.** *Cancers (Basel)*. 13(17):4287. doi: 10.3390/cancers13174287.
4. Cascio, S., Bartella, V., Garofalo, C., Russo, A., Giordano, A., & Surmacz, E. 2007. **Insulin-like growth factor 1 differentially regulates estrogen receptor-dependent transcription at estrogen response element and AP-1 sites in breast cancer cells.** *J. Biol. Chem.* 282(6):3498-506. doi: 10.1074/jbc.M606244200.
5. Clusan, L., Ferrière, F., Flouriot, G., & Pakdel, F. 2023. **A basic review on estrogen receptor signaling pathways in breast cancer.** *Int. J. Mol. Sci.* 24(7):6834. doi: 10.3390/ijms24076834.
6. Aysola, K., Desai, A., Welch, C., Xu, J., Qin, Y., Reddy, V., Matthews, R., Owens, C., Okoli, J., Beech, D. J., Piyathilake, C. J., Reddy, S. P., & Rao, V. N. 2013. **Triple negative breast cancer - an overview.** *J. Hered.* 2(001). doi: 10.4172/2161-1041.S2-001.
7. Zhang, J., Hu, Z., Horta, C. A., & Yang, J. 2023. **Regulation of epithelial-mesenchymal transition by tumor microenvironmental signals and its implication in cancer therapeutics.** *Semin. Cancer Biol.* 88:46-66. doi: 10.1016/j.semcancer.2022.12.002.
8. Hanahan, D. 2022. **Hallmarks of cancer: New dimensions.** *Cancer Discov.* 12: 31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059

- metabolic diseases.** *Genome Integr.* 15:e20230003. doi:
9. Wang, Z. 2022. **Cell cycle progression and synchronization: an overview**
metabolic diseases. *Genome Integr.* 15:e20230003. doi: 10.14293/genint.14.1.004.
18. Braicu, C., Buse, M., Busuioc, C., Drula, R., Gulei, D., Raduly, L., Rusu, A., Irimie, A., Atanasov, A. G., Slaby, O., Ionescu, C., & Berindan-Neagoe, I. 2019. **A comprehensive review on MAPK: A promising therapeutic target in cancer.** *Cancers (Basel).* 11(10):1618. doi: 10.3390/cancers11101618.
19. Whitaker, R. H., & Cook, J. G. 2021. **Stress relief techniques: p38 MAPK determines the balance of cell cycle and apoptosis pathways.** *Biomolecules.* 11(10):1444. doi: 10.3390/biom11101444.
20. Wee, P., Wang, Z. 2017. **Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways.** *Cancers (Basel).* 9(5):52. doi: 10.3390/cancers9050052.
21. Ahmadi, S.E., Rahimi, S., Zarandi, B. Chegeni, T., & Safa, M. 2021. **MYC: a multipurpose oncogene with prognostic and therapeutic implications in blood malignancies.** *J. Hematol. Oncol.* 14(121). doi:10.1186/s13045-021-01111-4
22. Chun, S. Y., Kim, S., Nam, K. S., & Lee, K. S. 2018. **Anti-metastatic potential of a proton beam is regulated by p38 MAPK/c-Fos signaling pathway in TPA-treated HepG2 human hepatocellular carcinoma.** *Biomed. Pharmacother.* 99:904-912. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.134
23. Song, C., Wang, G., Liu, M., Han, S., Dong, M., Peng, M., Wang, W., Wang, Y., Xu, Y., & Liu, L. 2024. **Deciphering the SOX4/MAPK1 regulatory axis: a phosphoproteomic insight into IQGAP1 phosphorylation and pancreatic cancer progression.** *J. Trans. Med.* 22(602). doi:10.1186/s12967-024-05377-3
24. Jana, S., Madhu-Krishna, B., Singhal, J., Home, D., Awasthi, S., & Salgia, R., Singhal, S. S. 2020. **SOX9: The master regulator of cell fate in breast cancer.** *Biochem. Pharmacol.* 174:113789. doi: 10.1016/j.bcp.2019.113789.
25. Motizuki, M., Yokoyama, T., Saitoh, M., & Miyazawa, K. 2024. **The Snail signaling branch downstream of the TGF- β /Smad3 pathway mediates Rho activation and subsequent stress fiber formation.** *J. Biol. Chem.* 300(1):105580. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105580.
26. Ryu, K. J., Park, S. M., Park, S. H., Kim, I. K., Han, H., Kim, H. J., Kim, S. H., Hong,

- K. S., Kim, H., Kim, M., Yoon, S. J., Asaithambi, K., Lee, K. H., Park, J. Y., Hah, Y. S., Cho, H. J., Yook, J. I., Yang, J. W., Ko, G. H., Lee, G., Kang, Y. J., Hwangbo, C., Kim, K. D., Park, Y. J., & Yoo, J. 2019. **p38 stabilizes snail by suppressing DYRK2-mediated phosphorylation that is required for GSK3 β - β TrCP-induced snail degradation.** *Cancer Res.* 79(16):4135-4148. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0049.
27. Kudaravalli, S., den Hollander, P. & Mani, S. A. 2022. **Role of p38 MAP kinase in cancer stem cells and metastasis.** *Oncogene.* 41, 3177–3185. doi: 10.1038/s41388-022-02329-3
 28. Narazaki, M., & Kishimoto, T. 2018. **The two-faced cytokine IL-6 in host defense and diseases.** *Int. J. Mol. Sci.* 19: 3528. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms19113528>
 29. Huang, B., Lang, X., & Li, X. 2022. **The role of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in cancers.** *Front Oncol.* 12:1023177. doi: 10.3389/fonc.2022.1023177.
 30. Chen, H., Libring, S., Ruddraraju, K. V., Miao, J., Solorio, L., Zhang, Z. Y., & Wendt, M. K. 2020. **SHP2 is a multifunctional therapeutic target in drug resistant metastatic breast cancer.** *Oncology.* 39: 7166–7180. doi: 10.1038/s41388-020-01488-5
 31. Sun, X., Zhang, J., Wang, Z., Ji, W., Tian, R., Zhang, F., & Niu, R. 2017. **Shp2 plays a critical role in IL-6-induced EMT in breast cancer cells.** *Int. J. Mol. Sci.* 18: 395. doi: 10.3390/ijms18020395
 32. Li, J., Kang, Y., Wei, L., Liu, W., Tian, Y., Chen, B., Lin, X., Li, Y., Feng, G. S., & Lu, Z. 2014. **Tyrosine phosphatase Shp2 mediates the estrogen biological action in breast cancer via interaction with the estrogen extranuclear receptor.** *PLoS One.* 9(7):e102847. doi: 10.1371/journal.pone.0102847.
 33. Mo, Z., Liu, M., Yang, F., Luo, H., Li, Z., Tu, G., & Yang, G. 2013. **GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer.** *Breast Cancer Res.* 15: 1-15. doi: 10.1186/bcr3581
 34. Yang, H., Wang, C., Liao, H., & Wang, Q. 2021. **Activation of GPER by E2 promotes proliferation, invasion and migration of breast cancer cells by**

- regulating the miR-124/CD151 pathway.** *Oncology Letters*. 21(6):432. doi: 10.3892/ol.2021.12693.
35. Haines, C. N., Braunreiter, K. M., Mo, X. M., & Burd, C. J. 2018. **GREB1 isoforms regulate proliferation independent of ER α co-regulator activities in breast cancer.** *Endocr. Relat. Cancer*. 25(7):735-746. doi: 10.1530/ERC-17-0496.
36. Meng, S., Gui, Q., Xu, Q., Lu, K., Jiao, X., Fan, J., Ge, B., Ke, Y., Zhang, S., Wu, J., & Wang, C. 2010. **Association of Shp2 with phosphorylated IL-22R1 is required for interleukin-22-induced MAP kinase activation.** *J. Mol. Cell Biol.* 2(4):223-30. doi: 10.1093/jmcb/mjq017.
37. Clusan, L., Ferrière, F., Flouriot, G., & Pakdel, F. 2023. **A basic review on estrogen receptor signaling pathways in breast cancer.** *Int. J. Mol. Sci.* 24(7), 6834. doi: 10.3390/ijms24076834.
38. Zhao, X., Ma, W., Li, X., Li, H., Li, J., Li, H., & He, F. 2021. **ANXA1 enhances tumor proliferation and migration by regulating epithelial-mesenchymal transition and IL-6/JAK2/STAT3 pathway in papillary thyroid carcinoma.** *J. Cancer*. 12(5):1295-1306. doi: 10.7150/jca.52171.
39. Araújo, T. G., Mota, S. T. S., Ferreira, H. S. V., Ribeiro, M. A., Goulart, L. R., & Vecchi, L. 2021. **Annexin A1 as a regulator of immune response in cancer.** *Cells*. 10(9), 2245. doi: 10.3390/cells10092245.
40. Vecchi, L., Mota, S. T. S., Zóia, M. A. P., Martins, I. C., de Souza, J. B., Santos, T. G., Beserra, A. O., de Andrade, V. P., Goulart, L. R., & Araújo, T. G. 2022. **Interleukin-6 signaling in triple negative breast cancer cells elicits the annexin A1/formyl peptide receptor 1 axis and affects the tumor microenvironment.** *Cells*. 11(10):1705. doi: 10.3390/cells11101705.
41. Muranen, T., Selfors, L. M., Hwang, J., Gallegos, L. L., Coloff, J. L., Thoreen, C. C., Kang, S. A., Sabatini, D. M., Mills, G. B., & Brugge, J. S. 2016. **ERK and p38 MAPK activities determine sensitivity to PI3K/mTOR inhibition via regulation of MYC and YAP.** *Cancer Res.* 76(24):7168-7180. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0155.
42. Kitanaka, T., Nakano, R., Kitanaka, N., Kimura, T., Okabayashi, K., Narita, T., &

- Sugiya, H. 2017. **JNK activation is essential for activation of MEK/ERK signaling in IL-1 β -induced COX-2 expression in synovial fibroblasts.** *Sci Rep.* 7:39914. doi: 10.1038/srep39914.
43. Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., & Zhou, B. P. 2013. **The role of snail in EMT and tumorigenesis.** *Curr. Cancer Drug Targets.* 13(9):963-972. doi: 10.2174/15680096113136660102.
44. Martínez-Martínez, D., Toledo Lobo, M.-V., Baquero, P., Ropero, S., Angulo, J. C., Chiloeches, A., & Lasa, M. 2021. **Downregulation of Snail by DUSP1 impairs cell migration and invasion through the inactivation of JNK and ERK and is useful as a predictive factor in the prognosis of prostate cancer.** *Cancers.* 13(5), 1158. doi: 10.3390/cancers13051158.
45. Yadav, A., Kumar, B., Datta, J., Teknos, T. N., & Kumar, P. 2011. **IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway.** *Mol. Cancer Res.* 9(12):1658-67. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0271.
46. Shu, D., Mao, B. P., & Lovicu, F. J. 2019. **Non-canonical TGF β -signaling pathways in lens EMT: interplay between EGFR and p38 MAPK.** *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60(9):6445.
47. Hong, O. Y., Jang, H. Y., Lee, Y. R. Jung, S. H., & Kim, J. 2022. **Inhibition of cell invasion and migration by targeting matrix metalloproteinase-9 expression via sirtuin 6 silencing in human breast cancer cells.** *Sci. Rep.* 12, 12125. doi: 10.1038/s41598-022-16405-x.
48. Roukens, M. G., Frederiks, C. L., Seinstra, D., Braccioli, L., Khalil, A. A., Pals, C., De Neck, S., Bornes, L., Beerling, E., Mokry, M., de Bruin, A., Westendorp, B., van Rheenen, J., & Coffey, P. J. 2021. **Regulation of a progenitor gene program by SOX4 is essential for mammary tumor proliferation.** *Oncogene.* 40(45):6343-6353. doi: 10.1038/s41388-021-02004-z.

VIII.3. CAPÍTULO III

GPER: Un receptor de estrógenos clave en la metástasis y el microambiente tumoral

VIII.3.1. RESUMEN

El papel de los estrógenos en el cáncer ha sido ampliamente estudiado, y los diversos tipos de cáncer se clasifican en función de su respuesta a estos. En los últimos años, se ha identificado un receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) que ha demostrado tener una relevancia significativa en el contexto del cáncer. GPER es un receptor pleiotrópico que presenta una actividad dependiente del tejido en el que se expresa; en los tejidos sanos, su activación está vinculada al desarrollo normal y a la homeostasis celular. Sin embargo, en las células cancerosas, su activación puede tener efectos tanto pro- como antitumorigénicos, dependiendo de las circunstancias. Además, se ha observado que el GPER puede compensar la falta de respuesta a estrógenos en líneas celulares de cáncer que carecen del receptor de estrógeno alfa (ER α), lo que sugiere su importancia en aquellos casos en los que este receptor está ausente. Uno de los aspectos más destacados de la función del GPER es su implicación en la transición epitelio-mesénquima (TEM), un proceso biológico crucial para el desarrollo de la metástasis. Esta transición juega un papel fundamental en la capacidad de las células tumorales para diseminarse y formar nuevos nichos en sitios distantes del cuerpo. Además, la presencia del GPER en las células del microambiente tumoral favorece la plasticidad fenotípica necesaria para la propagación y el mantenimiento de los tumores, lo que subraya su potencial como un factor relevante en el comportamiento maligno de las neoplasias. Estas características sugieren que el GPER podría representar un objetivo terapéutico altamente prometedor para la regulación del desarrollo y la progresión del cáncer. Este artículo se enfoca en la descripción detallada del rol de GPER en la TEM, particularmente en el contexto de las células tumorales y aquellas asociadas, y analiza su relación con los principales rasgos característicos del cáncer, así como las posibles estrategias terapéuticas que podrían aprovechar este receptor para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

VIII.3.2. ABSTRACT

The role of estrogens in cancer has been extensively studied, and various types of cancer are classified based on their response to these hormones. In recent years, an estrogen receptor coupled to G proteins (GPER) has been identified, and it has proven to have significant relevance in the context of cancer. GPER is a pleiotropic receptor that exhibits tissue-dependent activity; in healthy tissues, its activation is linked to proper development and cellular homeostasis. However, this activation can have pro- and anti-tumorigenic effects in cancer cells, depending on the circumstances. Moreover, GPER has been observed to compensate for the lack of response to estrogens in cancer cell lines that lack estrogen receptor alpha (ER α), suggesting its importance in cases where this receptor is absent. One of the most notable aspects of GPER's function is its involvement in epithelial-mesenchymal transition (EMT), a biological process crucial for metastasis development. This transition plays a key role in the ability of tumor cells to spread and form new niches in distant sites within the body. Additionally, the presence of GPER in tumor microenvironment cells supports the phenotypic plasticity necessary for tumor propagation and maintenance, highlighting its potential as a relevant factor in the malignant behavior of neoplasms. These characteristics suggest that GPER could be a promising therapeutic target for regulating cancer development and progression. This article focuses on the detailed description of GPER's role in EMT, particularly in the context of tumor cells and associated cells, and examines its relationship with the main hallmark traits of cancer, as well as potential therapeutic strategies that could exploit this receptor for the treatment of various types of cancer.

VIII.3.3. REVISIÓN SOBRE EL RECEPTOR GPER

GENERALIDADES EL RECEPTOR GPER

El GPER, también conocido como GPR30, es un receptor alternativo para ER α que fue identificado en la década de 1990 (1). Inicialmente este receptor fue denominado GPCR-Br y mostró homología con los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (1); posteriormente se demostró que promueve la señalización citoplasmática de los estrógenos y en 1997 adoptó su nombre actual (2). El gen humano de GPER se encuentra en el cromosoma 7 y codifica una proteína de 375 aminoácidos (3). GPER

puede activarse por estrógenos (E2), tamoxifeno, fulvestrant y otros ligandos, y está involucrado en la señalización tisular específica (**Fig.17**) (4). Este receptor juega un papel importante en los tratamientos contra el cáncer dependiente de estrógenos, como el cáncer de mama luminal, aunque su activación también podría explicar la recurrencia o agresividad del cáncer tras el tratamiento. Al activarse, el GPER regula diversas rutas de señalización, incluyendo la movilización de calcio intracelular y la producción de óxido nítrico, lo que tiene efectos en la vasodilatación y el desarrollo neuronal (5,6). Este receptor puede estar asociado con la subunidad alfa Gai/o, que activa otras rutas como las de PI3K y MAPK, involucradas en la proliferación celular (**Fig.17**) (7,8).

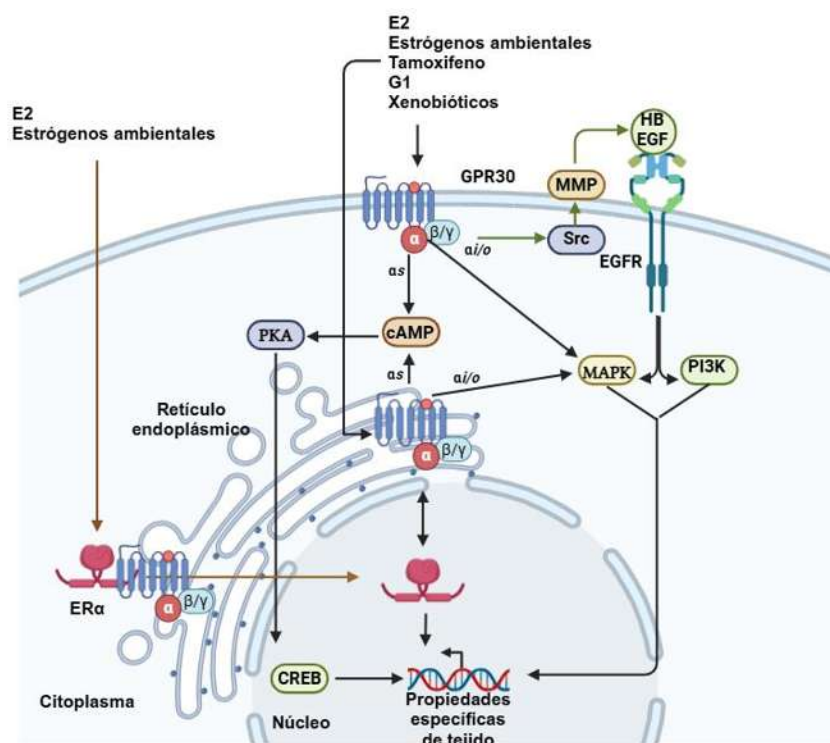


Figura 17. Señalización de GPER. Diferentes ligandos pueden activar GPER; algunos son ligandos del ERα. Una vez que GPER se activa, el trómero de la proteína G se separa en dos subunidades, el Gα está relacionado con la regulación de cAMP y calcio, y el Gβγ puede transactivar el EGFR y su señalización. Sin embargo, existe una relación entre ERα y GPER, favoreciendo la expresión de genes relacionados con el desarrollo del cáncer (5-9).

Aunque la afinidad del E2 para GPER es menor que para el receptor ERα, se ha

observado una interacción física entre ambos receptores y la regulación cooperativa para la proliferación dependiente de estrógenos (9). Este proceso se relaciona con el desarrollo de neoplasias, lo que sugiere que GPER podría jugar un papel clave en el cáncer.

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR GPER EN EL DESARROLLO CANCEROSO

GPER muestra una actividad específica del tejido que puede ser pro- o anti-tumoral, dependiendo del tipo de cáncer. En algunos casos, como en cáncer gástrico, ovárico y hepático, su activación o sobreexpresión se asocia con una disminución de las propiedades cancerosas, sugiriendo un efecto anti-tumoral (10-12). Por ejemplo, la activación de GPER inhibe el crecimiento celular en modelos de hepatocarcinoma a través de la señalización GPER/ERK (13). También se ha observado que GPER tiene efectos anti-cancerosos en cáncer de próstata y ovario, y en modelos de xenoinjertos mediante la regulación epigenética (11,14).

Sin embargo, en otros tipos de cáncer, GPER desempeña un papel pro-tumorigénico. Su expresión elevada en cánceres como el de pulmón, próstata, cuello uterino, glioblastoma y mama se ha relacionado con peores pronósticos y con características de células madre cancerosas (15-18). En estos casos, GPER contribuye a la proliferación, migración, invasión y evasión de la apoptosis. Además, GPER se ha asociado con la regulación de proteínas relacionadas con la carcinogénesis como la ciclina D1 y la proteína Bcl-2 (19). En resumen, la actividad de GPER depende del tipo de cáncer, mostrando tanto efectos anti-cancerosos como pro-cancerosos, lo que sugiere que GPER podría ser un regulador clave en el desarrollo del cáncer. Un ejemplo adicional de la actividad dual de GPER ocurre en el cáncer colorrectal, que depende del género. En un estudio con pacientes, los hombres con niveles más altos de GPER tuvieron un mejor pronóstico, mientras que en las mujeres ocurrió el efecto opuesto (20). Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que la activación de GPER está relacionada con la promoción del cáncer colorrectal, favoreciendo la proliferación y migración celular (21).

Por otro lado, la expresión génica inducida por GPER y la expresión del mismo receptor pueden ser reguladas epigenéticamente (22-24). Se ha reportado una relación negativa entre los microARNs miR-338-3p/miR-124 y GPER. El miR-338 inhibe la traducción de c-

fos, mientras que miR-124 reduce la proliferación en hepatocarcinoma y cáncer de mama, respectivamente. Sin embargo, la activación de GPER por E2 disminuye la expresión de miR-338-3p/miR-124 (22). También se ha encontrado una relación negativa entre miR-148a y GPER, donde la activación del receptor aumenta la proliferación celular e inhibe la apoptosis. Antagonistas de GPER, como G15, aumentan los niveles de miR-148a y promueven la muerte celular en la endometriosis ovárica y el cáncer de mama (23). Además, se ha descrito una regulación epigenética de la expresión de GPER en el carcinoma endometrial, ya que miR-424 regula la actividad de GPER, inhibiendo la proliferación inducida por E2 (24).

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR GPER EN LA ADQUISIÓN DE METÁSTASIS

La metástasis es la diseminación de células tumorales a otros órganos, lo que permite que las células cancerosas los invadan e inicien un nuevo tumor secundario. Este proceso requiere plasticidad fenotípica para que las células maduras se desdiferencien y regresen a estados progenitores, mediante la pérdida de proteínas de unión y la ganancia de un fenotipo migratorio, fenómeno conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM) (25). El GPER desempeña un papel importante en la TEM al promover la expresión de metaloproteasas (MMP) a través de la vía p38/JNK, favoreciendo la degradación de proteínas adherentes como la E-cadherina y adquiriendo un fenotipo migratorio en varios tipos de cáncer, como el de mama, pulmón y colon (**Fig.18**) (12).

Los niveles de GPER están directamente relacionados con el estado del carcinoma pulmonar y renal. Los niveles más altos se asocian con la TEM a través de la expresión de MMP como la 2/9 mediante la vía IGF-I/IGF-IR por las vías ERK, p38 y AKT, mejorando la adquisición de un fenotipo metastásico (26,27). Sin embargo, como se mencionó, los niveles de GPER pueden regularse a través de microARNs, y el miR-195 tiene como objetivo el ARNm del receptor, inhibiendo la expresión de MMP-2/9 inducida por PI3K/AKT en el carcinoma endometrial, evitando así la TEM (**Fig.18**) (28). Además, la activación de GPER por E2 se relaciona con la regulación a la baja de miR-124, permitiendo la progresión de la metástasis en el cáncer de mama (29). Sin embargo, aunque este carcinoma tiene un bajo nivel del receptor, la activación de GPER se asocia

con la expresión de MMP-9 y el desarrollo de la metástasis en el cáncer de ovario (30).

Además, la activación de GPER se relaciona con la activación de FAK en el cáncer de mama triple negativo (TNBC) y desencadena la señalización ERK1/2/AKT, promoviendo características metastásicas, como la migración e invasión (**Fig.17**) (31). De hecho, los antagonistas de GPER, como G15, han demostrado inhibir la TEM en TNBC mediante la sensibilización a la doxorrubicina, la regulación al alza de la E-cadherina y una regulación a la baja de la vimentina (32). Estos cambios en la expresión pueden estar asociados con una red entre Notch1, HIF-1 α y GPER que mejora la TEM mediante el aumento de la captación del factor HIF-1 α al promotor del factor de transcripción Snail a través de GPER nuclear (33). Por otro lado, se ha reportado que la activación del GPER inhibe la migración y la invasión, estimula la expresión de miR-199a-3p y la regulación a la baja de CD151, inhibiendo la TEM en TNBC (34). Estos informes muestran datos contrastantes sobre el papel de GPER en el cáncer de mama. Por lo tanto, se requieren más estudios para dilucidar el papel de GPER en estos eventos.

La TEM es un proceso clave en el cáncer, donde las células tumorales adquieren capacidad migratoria para desarrollar la metástasis (25). El microambiente tumoral, compuesto por células tumorales, estromales, inmunológicas y factores solubles, juega un papel fundamental en este proceso (35). Los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), que son fibroblastos normales activados por factores de crecimiento, producen moléculas que favorecen la TEM y la progresión tumoral (35). Estos fibroblastos expresan GPER, cuya activación aumenta la producción de citocinas y proteínas mesenquimales, promoviendo la reprogramación de las células tumorales hacia un fenotipo más invasivo (36). Además, la activación de GPER en CAFs está asociada con la resistencia a tratamientos como el tamoxifeno (TMX) y el fulvestrant (FLV), lo que contribuye a la

agresividad del cáncer (37). Aunque las células inmunológicas deben identificar y eliminar células tumorales, también pueden contribuir al desarrollo del cáncer. Un estado inflamatorio crónico favorece la aparición de tumores, ya que las citocinas proinflamatorias y las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden dañar el ADN y los tejidos (35). Además, las células inmunológicas antiinflamatorias, como los macrófagos tipo M2, en el microambiente tumoral ocultan el tumor del sistema inmunológico, lo que permite la progresión tumoral y la TEM (38).

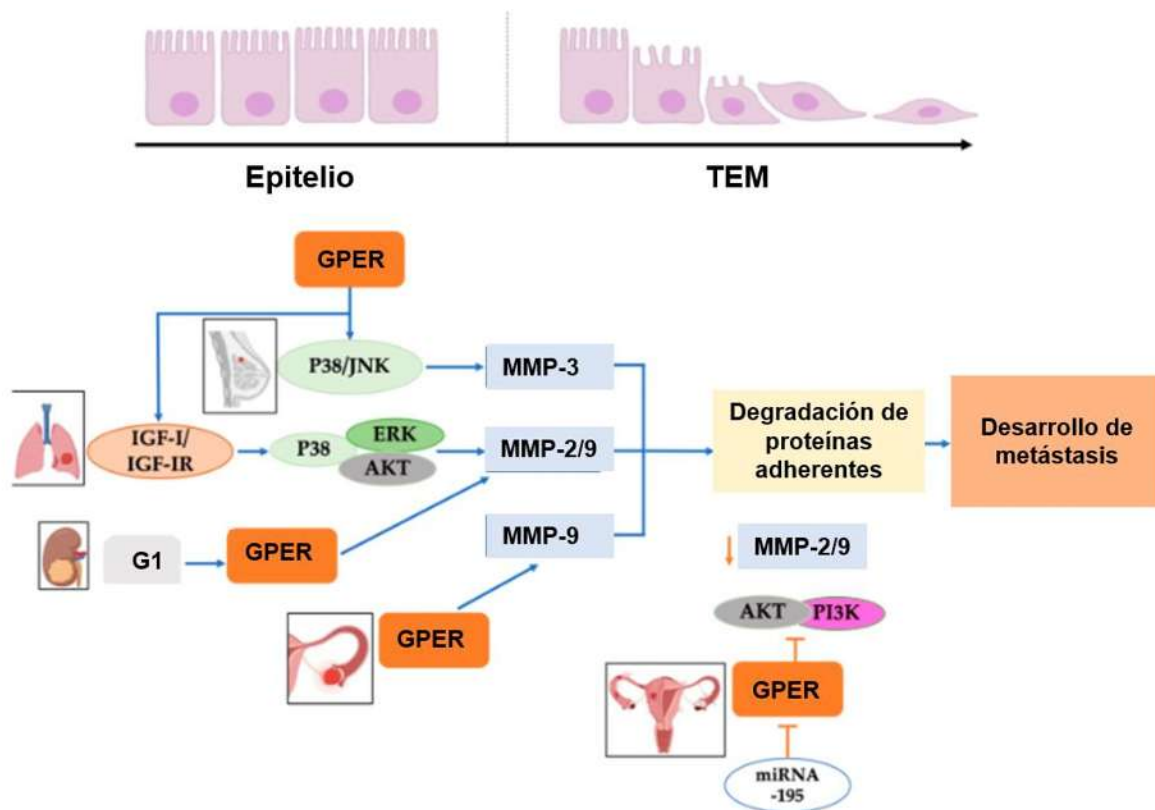


Figura 18. Relación de GPER con la TEM en el cáncer. La sobreexpresión de GPER en células de cáncer de mama, pulmón, riñón y ovario genera una vía de activación de quinasas que estimula la activación de MMP-3, MMP-2/9 y MMP-9, las cuales degradan las proteínas adhesivas, favoreciendo la promoción de la metástasis. Además, ciertos miARN, como el miRNA195, bloquean la activación de GPER en células de cáncer de ovario; en consecuencia, la activación de MMP-2/9 a través de AKT/PI3K se reduce, previniendo la degradación de proteínas adhesivas e interrumpiendo la promoción de la metástasis. Modificado de las referencias (26-30).

Se ha encontrado que GPER se expresa en células monocíticas, como los monocitos CD14+ y macrófagos (38). Su activación está relacionada con la expansión de células T

reguladoras y la secreción de la citocina antiinflamatoria IL-10 por las células M2. Los exosomas de macrófagos pueden activar la vía PI3K-AKT en células de cáncer gástrico, promoviendo la TEM (39). Además, algunos compuestos como el dietilestilbestrol, bisfenoles y estrógenos sintéticos activan al GPER, lo que aumenta la producción de citocinas proinflamatorias y favorecen la polarización M2, creando un ciclo positivo que estimula la progresión tumoral como la vascularización del tumor (40).

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR GPER EN LA ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis es el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos, lo que permite la diseminación de células tumorales a otros tejidos. Las células endoteliales son esenciales para la progresión tumoral, ya que la formación de vasos sanguíneos favorece la diseminación y el mantenimiento del cáncer (25). Los estrógenos están relacionados con la protección vascular a través de los receptores ER α , ER β y GPER, y tienen un efecto protector en enfermedades cardiovasculares, especialmente en mujeres premenopáusicas, al reducir la inflamación y la producción de óxido nítrico (NO) en las células endoteliales (41).

Aunque se sabe que los estrógenos están asociados con la angiogénesis, la información sobre la actividad protectora de GPER en el endotelio es limitada. GPER media la activación de vías de transducción que favorecen procesos tumorales como la angiogénesis, estimulando la proliferación de las células endoteliales y el crecimiento tumoral (42). Algunos estudios han mostrado que la activación de GPER mediante G1 inhibe la proliferación de células endoteliales y detiene su ciclo celular (41). Además, la activación de GPER por E2 y G1 incrementa la formación de vasos sanguíneos a través de la regulación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e HIF1 α (43). Por estas razones, GPER se ha propuesto como un objetivo terapéutico potencial para controlar el crecimiento de tumores como el cáncer de mama.

EL RECEPTOR GPER COMO BLANCO TERAPEÚTICO

Dado el papel pro-tumoral de GPER, se ha propuesto como un blanco terapéutico. Existen diversos antagonistas de GPER, como G15, G36, CIMBA, MIBE, PBX1, PBX2,

C4PY y CPT, que han sido probados en cáncer de mama y fibroblastos asociados a carcinoma (CAF) en modelos *in vitro* e *in vivo*, resultando en la inhibición de la señalización dependiente de GPER (G1/E2) (44-46). Además, se han desarrollado quimeras a partir de ligandos de ligasas de ubiquitina E3, como los PROTACs, que degradan el objetivo; en particular, el E2-PROTAC actúa contra GPER (47).

Sin embargo, la expresión simultánea de GPER y ER α en algunos cánceres sensibles a estrógenos requiere reconsiderar el uso de compuestos anti-estrogénicos, ya que fármacos como el TMX y FVS actúan como ligandos de GPER (4). Los CAFs también favorecen la inducción de la TEM, y aunque se están desarrollando terapias contra ellos, su uso está asociado a efectos secundarios graves como la pérdida de masa muscular e incluso la muerte (46). En contraste, el triptólido es un fármaco que ha mostrado inhibir la inducción de TEM mediada por los CAFs en células cancerosas (48). También se están explorando terapias contra vías de señalización relacionadas con el desarrollo de propiedades cancerígenas, como el AG490, un fármaco contra la vía JAK/STAT que puede ser activada por GPER. Estos hallazgos sugieren que GPER podría ser un objetivo terapéutico prometedor que actúa en diversos niveles, regulando tanto las células cancerosas como los componentes circundantes.

VIII.3.4. PERSPECTIVAS

El rol del receptor GPER en los procesos celulares está comenzando a comprenderse, revelando tanto su función fisiológica en procesos como la angiogénesis (42), el desarrollo cerebral y la homeostasis (5), como su implicación en procesos patológicos como la carcinogénesis y el desarrollo de metástasis (12,14). Aunque el GPER contribuye al desarrollo adecuado de tejidos neuronales, epiteliales y conectivos, su alteración en la expresión puede desregular la homeostasis e inducir el desarrollo maligno (12). Los niveles de expresión de GPER varían según el tipo de cáncer, lo que podría servir como marcador pronóstico del estado de la enfermedad y su respuesta terapéutica (15-18,20).

Dado su rol pro-tumorigénico, GPER se ha propuesto como un objetivo terapéutico potencial. Su implicación en la metástasis, proceso clave en la diseminación del cáncer, se vincula a la TEM que permite a las células tumorales invadir otros tejidos (25,36). La activación de GPER favorece cambios en las células tumorales y en el entorno inmunológico, promoviendo la expresión de proteínas mesenquimales y un entorno tumorigénico (36). Además, GPER está involucrado en la activación de monocitos y la producción de citocinas proinflamatorias, lo que podría ofrecer una estrategia para mejorar la respuesta inmune (38). Sin embargo, la existencia de múltiples ligandos de GPER, incluidos fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer y xenobióticos, puede representar tanto una ventaja para el desarrollo tumoral como un desafío para los tratamientos médicos (4).

El patrón de metástasis varía según el tipo de cáncer, y se puede predecir en función de la cercanía a ciertos órganos o tejidos. Por ejemplo, el cáncer de mama tiende a diseminarse hacia los pulmones, mientras que el cáncer de próstata afecta los ganglios (56,58-60). El hecho de que los tipos de cáncer con actividad específica de GPER desarrollen metástasis en órganos donde el receptor tiene el mismo efecto sugiere que, si un cáncer es pro-tumorigénico debido a GPER, la dispersión afectará a órganos con actividad similar, lo que abriría la posibilidad de terapias focalizadas contra este receptor para controlar tanto tumores primarios como metastásicos.

A pesar de la considerable investigación sobre GPER, aún existen datos contradictorios que abren la puerta a nuevas investigaciones para aclarar la actividad dependiente de

ligando y específica de tejido en modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (20,21,31-34). Además, es necesario evaluar la señalización independiente del ligando de GPER en tipos de cáncer donde este receptor es pro-tumorigénico, y determinar si los antagonistas del receptor son suficientes para inhibir la actividad cancerosa o si la activación alostérica compensa la falta de funciones.

VIII.3.5. CONCLUSIÓN

El GPER es un receptor hormonal clave en el desarrollo tumoral que puede ser empleado como marcador de progresión, así como blanco terapéutico, dependiendo del tipo de cáncer.

VIII.3.6. REFERENCIAS

1. Owman, C., Blay, P., Nilsson, C., & Lolait, S. J. 1996. **Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues: Communication both in CNS and in peripheral tissues.** *Biochem. Biophys Res Commun.* 228(1): 285-292.
2. Carmeci, C., Thompson, D. A., Ring, H. Z., Francke, U., & Weigel, R. J. 1997. **Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer.** *Genomics.* 45(3): 607-617. doi: 10.1006/geno.1997.4972.
3. O'Dowd, B. F., Nguyen, T., Marchese, A., Cheng, R., Lynch, K. R., Heng, H. H., Kolakowski, L. F. Jr, & George, S. R. 1998. **Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes.** *Genomics.* 47(2): 310-313. doi: 10.1006/geno.1998.5095.
4. Pepermans, R. A., Sharma, G., & Prossnitz, E. R. 2021. **G protein-Coupled estrogen receptor in cancer and stromal cells: Functions and novel therapeutic perspectives.** *Cells.* 10(3): 672. doi: 10.3390/cells10030672.
5. Tran, Q. K. 2020. **Reciprocity between estrogen biology and calcium**

- signaling in the cardiovascular system.** *Front Endocrinol. (Lausanne)*. 11: 568203. doi: 10.3389/fendo.2020.568203.
6. Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J., & Dong, J. 2005. **Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells.** *Endocrinology*. 146(2): 624-632. doi: 10.1210/en.2004-1064.
7. Tutzauer, J., Gonzalez de Valdivia, E., Swärd, K., Alexandrakakis Eilard, I., Broselid, S., Kahn, R., Olde, B., & Leeb-Lundberg, L. M. F. 2021. **Ligand-independent G protein-coupled estrogen receptor/G protein-coupled receptor 30 activity: Lack of receptor-dependent effects of G-1 and 17 β -estradiol.** *Mol. Pharmacol.* 100(3): 271-282. doi: 10.1124/molpharm.121.000259.
8. Wyckoff, M. H., Chambliss, K. L., Mineo, C., Yuhanna, I. S., Mendelsohn, M. E., Mumby, S. M., & Shaul, P. W. 2001. **Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i).** *J. Biol. Chem.* 276(29): 27071–27076. doi: 10.1074/jbc.M100312200.
9. Yang, H., Wang, H., Liao, Q., & Wang, Q. 2021. **Activation of GPER by E2 promotes proliferation, invasion and migration of breast cancer cells by regulating the miR-124/CD151 pathway.** *Oncol. Lett.* 21:432. doi: 10.3892/ol.2021.12693.
10. Han, N., Heublein, S., Jeschke, U., Kuhn, C., Hester, A., Czogalla, B., Mahner, S., Rottmann, M., Mayr, D., Schmoeckel, E., & Trillsch, F. 2021. **The G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) regulates trimethylation of histone H3 at lysine 4 and represses migration and proliferation of ovarian cancer cells *in vitro*.** *Cells* 10(3):619. doi: 10.3390/cells10030619.
11. Tian, S., Zhan, N., Li, R., & Dong, W. 2019. **Downregulation of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) is associated with reduced prognosis in patients with gastric cancer.** *Med. Sci. Monit.* 25:3115-3126. doi: 10.12659/MSM.913634.
12. Deng, Y., Miki, Y., & Nakanishi, A. 2020. **Estradiol/GPER affects the integrity of mammary duct-like structures *in vitro*.** *Sci. Rep.* 10(1):1386. doi: 10.1038/s41598-020-57819-9.

13. Qiu, Y.A., Xiong, J., Fu, Q., Dong, Y., Liu, M., Peng, M., Jin, W., Zhou, L., Xu, X., Huang, X., Fu, A., Xu, G., Tu, G., & Yu, T. 2021. **GPER-induced ERK signaling decreases cell viability of hepatocellular carcinoma.** *Front. Oncol.* 11:638171. doi: 10.3389/fonc.2021.638171.
14. Chan, Q.K., Lam, H.M., Ng, C.F., Lee, A.Y., Chan, E.S., Ng, H.K., Ho, S.M., & Lau, K.M. 2010. **Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G(2) cell-cycle arrest.** *Cell Death Differ.* 17(9):1511-1523. doi: 10.1038/cdd.2010.20.
15. Xu, T., Ma, D., Chen, S., Tang, R., Yang, J., Meng, C., Feng, Y., Liu, L., Wang, J., Luo, H., & Yu, K. 2022. **High GPER expression in triple-negative breast cancer is linked to pro-metastatic pathways and predicts poor patient outcomes.** *NPJ Breast Cancer.* 8(1):100. doi: 10.1038/s41523-022-00472-4.
16. Yang, Y., Sheng, J., Hu, S., Cui, Y., Xiao, J., Yu, W., Peng, J., Han, W., He, Q., Fan, Y., Niu, Y., Lin, J., Tian, Y., Chang, C., Yeh, S., & Jin, J. 2022. **Estrogen and G protein-coupled estrogen receptor accelerate the progression of benign prostatic hyperplasia by inducing prostatic fibrosis.** *Cell Death Dis.* 13(6):533. doi: 10.1038/s41419-022-04979-3.
17. Akimoto, T., Takasawa, A., Takasawa, K., Aoyama, T., Murata, M., Osanai, M., Saito, T., & Sawada, N. 2018. **Estrogen/GPR30 signaling contributes to the malignant potentials of ER-negative cervical adenocarcinoma via regulation of claudin-1 expression.** *Neoplasia.* 20(10):1083-1093. doi: 10.1016/j.neo.2018.08.010.
18. Jala, V.R., Radde, B.N., Haribabu, B., & Klinge, C.M. 2012. **Enhanced expression of G-protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in lung cancer.** *BMC Cancer* 12:624. doi: 10.1186/1471-2407-12-624.
19. Chan, Y.T., Lai, A.C., Lin, R.J., Wang, Y.H., Wang, Y.T., Chang, W.W., Wu, H.Y., Lin, Y.J., Chang, W.Y., Wu, J.C., Yu, J.C., Chen, Y.J., & Yu, A.L. 2020. **GPER-induced signaling is essential for the survival of breast cancer stem cells.** *Int. J. Cancer* 146(6):1674-1685. doi: 10.1002/ijc.32588.

20. Acenik, D., & Krajewska, W.M. 2020. **Significance of G protein-coupled estrogen receptor in the pathophysiology of irritable bowel syndrome, inflammatory bowel diseases and colorectal cancer.** *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 11:390. doi: 10.3389/fendo.2020.00390.
21. Jacenik, D., Beswick, E.J., Krajewska, W.M., & Prossnitz, E.R. 2019. **G protein-coupled estrogen receptor in colon function, immune regulation and carcinogenesis.** *World J. Gastroenterol.* 25(30):4092-4104. doi: 10.3748/wjg.v25.i30.4092.
22. Vivacqua, A., Sebastiani, A., Miglietta, A.M., Rigracciolo, D.C., Cirillo, F., Galli, G.R., Talia, M., Santolla, M.F., Lappano, R., Giordano, F., Panno, M.L., & Maggiolini, M. 2018. **miR-338-3p is regulated by estrogens through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs).** *Cells* 7(11):203. doi: 10.3390/cells7110203.
23. He, S.Z., Li, J., Bao, H.C., Wang, M.M., Wang, X.R., Huang, X., Li, F.H., Zhang, W., Xu, A.L., & Fang, H.C. 2018. **G protein-coupled estrogen receptor/miR-148a/human leukocyte antigen-G signaling pathway mediates cell apoptosis of ovarian endometriosis.** *Mol. Med. Rep.* 18, 1141–1148.
24. Zhang, H., Wang, X., Chen, Z., & Wang, W. 2015. **MicroRNA-424 suppresses estradiol-induced cell proliferation via targeting GPER in endometrial cancer cells.** *Cell Mol. Biol.* 61(7):96-101. PMID: 26638889.
25. Hanahan, D. 2022. **Hallmarks of cancer: new dimensions.** *Cancer Discov.* 12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
26. Guan, B. Z., Yan, R., L., Huang, J. W., Li, F. L., Zhong, Y. X., Chen, Y., Liu, F. N., Hu, B., Huang, S. B., & Yin, .LH. 2018. **Activation of G protein coupled estrogen receptor (GPER) promotes the migration of renal cell carcinoma via the PI3K/AKT/MMP-9 signals.** *Cell Adh. Migr.* 12(2):109-117. doi: 10.4161/19336918.2014.990781.
27. Maitra, R., Malik, P., & Mukherjee, T. K. 2021. **Targeting estrogens and various estrogen-related receptors against non-small cell lung cancers: a perspective.** *Cancers (Basel)* 14(1):80. doi: 10.3390/cancers14010080.

28. Deng, J., Wang, W., Yu, G., & Ma, X. 2019. **MicroRNA-195 inhibits epithelial-mesenchymal transition by targeting G protein-coupled estrogen receptor 1 in endometrial carcinoma.** *Mol. Med. Rep.* 20(5):4023-4032. doi: 10.3892/mmr.2019.10652.
29. Yang, H., Wang, C., Liao, H., & Wang, Q. 2021. **Activation of GPER by E2 promotes proliferation, invasion and migration of breast cancer cells by regulating the miR-124/CD151 pathway.** *Oncol. Lett.* 21(6):432. doi: 10.3892/ol.2021.12693.
30. Masi, M., Racchi, M., Travelli, C., Corsini, E., & Buoso, E. 2021. **Molecular characterization of membrane steroid receptors in hormone-sensitive cancers.** *Cells.* 10(11):2999. doi: 10.3390/cells10112999.
31. Riguracciolo, D.C., Santolla, M.F., Lappano, R., Vivacqua, A., Cirillo, F., Galli, G.R., Talia, M., Muglia, L., Pellegrino, M., Nohata, N., Di Martino, M.T., & Maggiolini, M. 2019. **Focal adhesion kinase (FAK) activation by estrogens involves GPER in triple-negative breast cancer cells.** *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38(1):58. doi: 10.1186/s13046-019-1056-8.
32. Liu, Y., Du, F.Y., Chen, W., Fu, P.F., Yao, M.Y., & Zheng, S.S. 2015. **G15 sensitizes epithelial breast cancer cells to doxorubicin by preventing epithelial-mesenchymal transition through inhibition of GPR30.** *Am. J. Trans. Res.* 7(5):967-975. PMID: 26175858.
33. De Francesco, E.M., Maggiolini, M., & Musti, A.M. 2018. **Crosstalk between Notch, HIF-1 α and GPER in breast cancer EMT.** *Int. J. Mol. Sci.* 19(7):2011. doi: 10.3390/ijms19072011.
34. Huang, R., Li, J., Pan, F., Zhang, B., & Yao, Y. 2020. **The activation of GPER inhibits cells proliferation, invasion and EMT of triple-negative breast cancer via CD151/miR-199a-3p bio-axis.** *Am. J. Trans. Res.* 12(1):32-44. PMID: 32051735.
35. Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T., & Zare, P. 2020. **Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance.** *Cell*

- Commun. Signal.* 18(1):59. doi: 10.1186/s12964-020-0530-4.
36. Ping, Q., Yan, R., Cheng, X., Wang, W., Zhong, Y., Hou, Z., Shi, Y., Wang, C., & Li, R. 2021. **Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions.** *Cancer Gene Ther.* 28(9):984-999. doi: 10.1038/s41417-021-00318-4.
 37. Xu, S., Yu, S., Dong, D., & Lee, L.T.O. 2019. **G protein-coupled estrogen receptor: a potential therapeutic target in cancer.** *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 10:725. doi: 10.3389/fendo.2019.00725.
 38. Cortés, M., Sanchez-Moral, L., de Barrios, O., Fernández-Aceñero, M.J., Martínez-Campanario, M.C., Esteve-Codina, A., Darling, D.S., & Györfy, B., Lawrence, T., Dean, D.C., Postigo, A. 2017. **Tumor-associated macrophages (TAMs) depend on ZEB1 for their cancer-promoting roles.** *EMBO Journal.* 36(22):3336-3355. doi: 10.15252/embj.201797345.
 39. Zhou, J., Tang, Z., Gao, S., Li, C., Feng, Y., & Zhou, X. 2020. **Tumor-associated macrophages: Recent insights and therapies.** *Front. Oncol.* 10:188. doi: 10.3389/fonc.2020.00188.
 40. Buoso, E., Masi, M., Racchi, M., & Corsini, E. 2020. **Endocrine-disrupting chemicals' (EDCs) effects on tumour microenvironment and cancer progression: Emerging contribution of RACK1.** *Int. J. Mol. Sci.* 21(23):9229. doi: 10.3390/ijms21239229.
 41. Chen, Z., Yuhanna, I.S., Galcheva-Gargova, Z., & Karas, R.H., Mendelsohn, M.E., Shaul, P.W. 1999. **Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen.** *J. Clin. Invest.* 103(3):401-406. doi: 10.1172/JCI5347.
 42. Holm, A., Baldetorp, B., Olde, B., Leeb-Lundberg, L.M., & Nilsson, B.O. 2011. **The GPER1 agonist G-1 attenuates endothelial cell proliferation by inhibiting DNA synthesis and accumulating cells in the S and G2 phases of the cell cycle.** *J. Vas. Res.* 48(4):327-335. doi: 10.1159/000322578.
 43. De Francesco, E.M., Pellegrino, M., Santolla, M.F., Lappano, R., Ricchio, E., Abonante, S., & Maggiolini, M. 2014. **GPER mediates activation of HIF1 α /VEGF**

- signaling by estrogens.** *Cancer Res.* 74(15):4053-4064. doi: 10.1158/0008-5472.
44. O'Dea, A., Sondergard, C., Sweeney, P., & Arnatt, C.K. 2018. **A series of indole-thiazole derivatives act as GPER agonists and inhibit breast cancer cell growth.** *ACS Med. Chem. Lett.* 9(9):901-906. doi: 10.1021/acsmmedchemlett.8b00212.
45. Rouhimoghadam, M., Lu, A.S., Salem, A.K., & Filardo, E.J. 2020. **Therapeutic perspectives on the modulation of G-protein coupled estrogen receptor, GPER, function.** *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 11:591217. doi: 10.3389/fendo.2020.591217.
46. Geng, X., Chen, H., Zhao, L., Hu, J., Yang, W., Li, G., Cheng, C., Zhao, Z., Zhang, T., Li, L., & Sun, B. 2021. **Cancer-associated fibroblast (CAF) heterogeneity and targeting therapy of CAFs in pancreatic cancer.** *Front. Cell Develop. Biol.* 9:655152. doi: 10.3389/fcell.2021.655152.
47. Arterburn, J.B., & Prossnitz, E.R. 2023. **G protein-coupled estrogen receptor GPER: Molecular pharmacology and therapeutic applications.** *Rev. Pharmacol. Toxicol.* 63:295-320. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-031122-121944.
48. Rihawi, K., Ricci, A. D., Rizzo, A., Brocchi, S., Marasco, G., Pastore, L. V., Llimpe, F. L. R., Golfieri, R., & Renzulli, M. (2021). **Tumor-associated macrophages and inflammatory microenvironment in gastric cancer: novel translational implications.** *Int. J. Mol. Sci.* 22(8), 3805. doi: 10.3390/ijms22083805

VIII.4. CAPÍTULO IV

Cáncer: La nueva ave fénix

VIII.4.1. RESUMEN

Los tumores cancerosos son estructuras biológicas complejas y heterogéneas, compuestas por una población diversa de células cancerosas que exhiben variadas características moleculares y fenotípicas. El microambiente tumoral, en particular, está conformado por una mezcla de células sanas, células cancerosas de rápida duplicación, células madre cancerosas (CMC), células inmunológicas y epiteliales, las cuales interactúan de manera dinámica para favorecer la progresión tumoral. Entre estas, las células madre cancerosas se distinguen por su capacidad para autorrenovarse y generar una diversidad de células tumorales hijas, lo que las convierte en un factor esencial en la persistencia del cáncer. A pesar de su baja tasa de proliferación, las CMC presentan una notable resistencia a los tratamientos convencionales, como la quimioterapia, que generalmente se dirigen a las células con alta tasa de duplicación. Esta resistencia permite que las CMC sobrevivan a los tratamientos y contribuyan al retorno del tumor, lo que explica la alta tasa de reincidencia observada en diversos tipos de cáncer. De hecho, se estima que entre el 30-50% de los pacientes con cáncer experimentan recurrencia tumoral, particularmente en los casos más agresivos o avanzados. El reconocimiento de las células madre cancerosas como un componente crucial en la progresión y la reincidencia del cáncer ha impulsado el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En la actualidad, se están investigando tratamientos dirigidos a múltiples blancos terapéuticos simultáneamente, con el objetivo de identificar y erradicar específicamente a las CMC. Estos enfoques buscan no solo eliminar las células tumorales proliferativas, sino también atacar las células madre cancerosas, responsables de la recurrencia tumoral, lo que podría mejorar considerablemente las perspectivas de remisión a largo plazo y reducir significativamente el riesgo de reincidencia.

VIII.4.2. ABSTRACT

Cancerous tumors are complex and heterogeneous biological structures composed of diverse cancer cells with various molecular and phenotypic characteristics. The tumor microenvironment, in particular, consists of a mix of healthy cells, rapidly proliferating cancer cells, cancer stem cells (CSCs), immune cells, and epithelial cells, which interact dynamically to promote tumor progression. Among these, cancer stem cells are distinguished by their ability to self-renew and generate diverse daughter tumor cells, making them an essential factor in cancer persistence. Despite their low proliferation rate, CSCs exhibit remarkable resistance to conventional treatments, such as chemotherapy, which typically target fast-dividing cells. This resistance allows CSCs to survive treatments and contribute to tumor recurrence, which explains the high relapse rates observed in various types of cancer. It is estimated that between 30% and 50% of cancer patients experience tumor recurrence, particularly in more aggressive or advanced cases. The recognition of cancer stem cells as a crucial component in cancer progression and recurrence has driven the development of new therapeutic strategies. Currently, treatments targeting multiple therapeutic targets simultaneously are being investigated to identify and eradicate CSCs. These approaches aim not only to eliminate proliferative tumor cells but also to target cancer stem cells responsible for tumor recurrence, potentially improving long-term remission prospects and significantly reducing the risk of relapse.

VIII.4.3. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por una proliferación anómala de células que invaden otros tejidos (1). Este proceso está influenciado tanto por factores genéticos como epigenéticos, ya que las mutaciones en los genes pueden favorecer la supervivencia y diseminación de las células afectadas, pero su expresión depende del entorno en el que se desarrollan (2). A nivel mundial, el cáncer es un grave problema de salud pública, con un aumento en la incidencia debido a factores como el aumento de la esperanza de vida y una dieta industrializada que favorece la exposición a factores mutagénicos (3).

Existen diversas terapias para tratar el cáncer, como la cirugía, la quimioterapia y la administración de inhibidores de receptores. Sin embargo, estos tratamientos no siempre logran erradicar la enfermedad, ya que pueden producirse recaídas debido a la resistencia de las células tumorales (Fig.19) (4). En muchos casos, la quimioterapia afecta tanto a células cancerosas como a células sanas con alta tasa de proliferación, lo que genera efectos secundarios (4,5). Por ello, se están desarrollando tratamientos más específicos, como los basados en anticuerpos, para mejorar la eliminación de las células tumorales y reducir los efectos adversos (6).

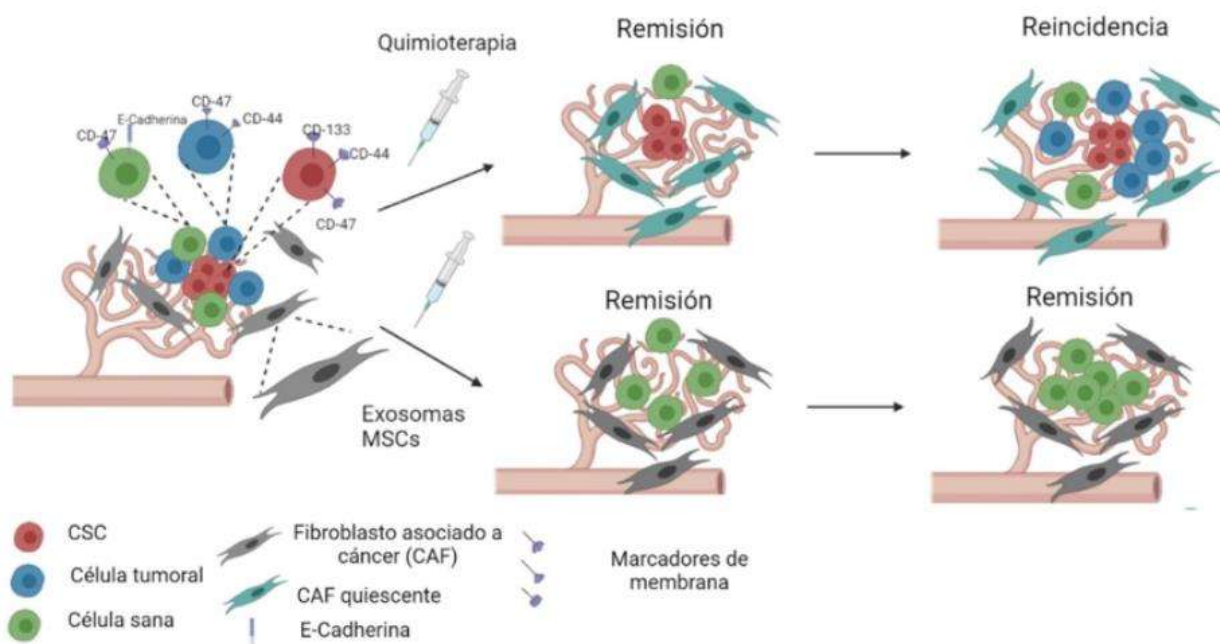


Figura 19. Desarrollo de resistencia a quimioterapia y reincidencia cancerosa. Se muestra un ambiente heterogéneo canceroso típico y la administración de medicamentos de quimioterapia tradicional, así como terapia dirigida a células madre cancerosas (CSC).

Las células madre, tanto en su forma normal como en su variante cancerosa (CSC), juegan un papel crucial en el desarrollo y la persistencia del cáncer. Las células madre cancerosas tienen una tasa de división más baja que las células tumorales comunes y están en un estado de reposo reversible llamado quiescencia. Esto las protege de los tratamientos antiproliferativos, lo que puede llevar a una mejoría temporal en los pacientes, pero con recurrencia de la enfermedad cuando las células madre se reactivan (7).

El desafío radica en identificar y eliminar estas células madre cancerosas, ya que requieren un enfoque específico, dada su capacidad de regenerarse. Para ello, se están explorando terapias con anticuerpos y otros tratamientos que puedan reconocer y destruir las células madre cancerosas de manera más eficiente (6). Aunque no existen terapias 100% efectivas, la combinación de tratamientos personalizados, basados en las características específicas de cada paciente y su tipo de cáncer, ofrece un mejor pronóstico a largo plazo (6,8).

VIII.4.4. PERSPECTIVAS

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se ha estudiado a profundidad en los últimos años. A pesar de la descripción de sus características y el microambiente tumoral en que se desarrolla, aún quedan retos por afrontar en cuanto a su tratamiento. Si bien, los tumores son ambientes heterogéneos conformados por células cancerosas, sanas, inmunológicas y conectivas, la presencia de las células madre cancerosas implica la búsqueda de nuevas terapias. Esto, debido a que las CSC cuentan con una baja tasa de duplicación, volviéndolas inmunes a la quimioterapia. Además, que se encuentran protegidas en la parte central del tumor, por lo que alcanzarlas resulta complicado y por consecuencia son las responsables de las recaídas. El desarrollo de terapias dirigidas hacia este tipo de células se ha vuelto crucial para una erradicación de la patología, y el uso de marcadores membranales para ser la clave para la eliminación de las CSC. Los anticuerpos quiméricos dirigidos a más de un marcador membranal representan una alternativa para la eliminación de las CSC, debido a que la especificidad de sus interacciones permite discernir entre células madre sanas y cancerosas. Sin embargo, aún hacen falta más estudios para desarrollar y aplicar una terapéutica completa y con menores efectos secundarios.

VIII.4.5. CONCLUSIÓN

La heterogeneidad del cáncer representa un reto para el tratamiento de la patología, y la búsqueda de terapias dirigidas contra el reservorio de células madre cancerosas parece ser un tratamiento complementario rentable y efectivo.

VIII.4.6. REFERENCIAS

1. Hanahan, D. 2022. **Hallmarks of cancer: new dimensions**. *Cancer Discover*. 12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
2. Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T., & Zare, P. 2020. **Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance**. *Cell*

- Commun. Signal.* 18(1):59. doi: 10.1186/s12964-020-0530-4.
3. NIH. 2021. **¿Qué es el cáncer?**. Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado el 14 de junio de 2024, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
 4. Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. T. 2018. **Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies**. *Rev. Clin. Oncol.* 15: 81-94. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.166
 5. Arvelo, F., Cotte, C., & Sojo, F. 2014. **Células madre y cáncer**. *Invest. Clin.* 55(4), 371-391. Recuperado el 12 de marzo de 2025, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332014000400008&lng=es&tlng=es.
 6. Rangel-Sosa, M. M., Aguilar-Córdova, E., Rojas-Martínez, A. 2017. **Immunotherapy and gene therapy as novel treatments for cancer**. *Colombia Medica (Cali)*, 48(3):138-147. doi: 10.25100/cm. v48i3.2997.
 7. Hayat, H., Hayat, H., Dwan, B. F., Gudi, M., Bishop, J. O., & Wang, P. 2021. **A concise review: The role of stem cells in cancer progression and therapy**. *OncoTargets Ther.* 14, 2761-2772. doi: 10.2147/OTT.S260391.
 8. Eguiara, A., Elorriaga, K., Rezola, R., & García-Martín, Á. (2012). **Células madre tumorales: una diana terapéutica en el cáncer de mama**. *Revista de Senología y Patología Mamaria.* 25(3), 107-115. doi: 10.1016/S0214-1582(12)70024-5

IX. DISCUSIÓN GENERAL

El cáncer de mama luminal es el de mayor incidencia y mejor pronóstico a nivel mundial, mientras que el subtipo triple negativo es el más agresivo (8). A pesar de que el cáncer de mama luminal presenta características epiteliales que se asocian con un estado diferenciado y localizado, estas pueden modificarse por las citocinas del microambiente tumoral, como la IL-6, provocando que se adquiera un fenotipo mesenquimal semejante al del cáncer triple negativo (43). Este cambio de estadio se conoce como transición epitelio-mesénquima (TEM) y es el preámbulo para el desarrollo de la metástasis, la principal complicación en el tratamiento contra el cáncer (1). En el presente trabajo se evaluó el mecanismo mediante el cual la IL-6 promueve propiedades metastásicas en células de cáncer de mama luminal MCF-7.

Este trabajo corroboró que el E2 promueve la proliferación de las células de cáncer de mama luminal (MCF-7), pero no la de las células de carcinoma triple negativo (MDA-MB-231), ni la variante resistente a TMX (R-TMX) (Fig. 6), lo cual concuerda con el hecho de que la primera cuenta con una sobre expresión del ER α , lo que les permite responder al estímulo con E2 (2), caso contrario a los dos últimos modelos (Fig. 6). Por otro lado, se mostró que la IL-6 no promovió la proliferación de las células luminales, pero sí la de las células MDA-MB-231 y R-TMX (Fig. 6). Se determinó que el receptor GPR30 regula la proliferación inducida por E2 e IL-6 en los modelos antes mencionados, ya que el bloqueo del mismo con el antagonista G15 y la toxina *pertussis* (PTX) inhibió el efecto proliferativo de los tratamientos (Fig. 6). El fenómeno presentado en las células luminales se puede atribuir a que el ER α y el GPR30 interactúan físicamente (34,66), y se ha reportado que la inhibición de cualquiera de ellos afecta la proliferación de las células hormono dependientes (34). Por otro lado, se ha reportado la participación del GPR30 en la proliferación basal de las células triple negativo y resistentes a TMX (21,68); sin embargo, no se había establecido una relación entre el receptor y la citocina en la proliferación de las células cancerosas. Además, se ha reportado que la IL-6 promueve la proliferación celular a través de la anexina A1 (ANXA1), la cual se encuentra sobre expresada tanto en células triple negativo como resistentes a TMX (74,75), lo que explicaría el efecto de la citocina en estos modelos, pero no en las células MCF-7.

Además, se determinó que el E2 promueve la proliferación de las células luminales a

través de las MAPK ERK1/2, JNK y p38, mientras que la IL-6 ejerce su efecto en las células triple negativo principalmente mediante ERK1/2 (**Fig. 14**). Lo anterior debido a que el uso de inhibidores de estas MAPK bloqueó los efectos proliferativos de la hormona y la citocina. Por otro lado, se observó que la IL-6 promueve la TEM en las células MCF-7 al provocar una disminución de los niveles de citoqueratina 18, un marcador epitelial, y un aumento en el marcador mesenquimal vimentina (**Fig. 7**), lo cual concuerda con reportes previos (**40**). En este trabajo se estableció que la TEM inducida por la IL-6 se efectúa de forma dependiente del GPR30, ya que tanto el G15 como la PTX bloquearon el efecto de la citocina en los marcadores mencionados (**Fig. 7**). Además, se observó que la citocina indujo un aumento en los niveles intracelulares del GPR30 en las células MCF-7, mientras que las células R-TMX no presentaron cambios. Sin embargo, se resalta que los niveles del receptor fueron cuatro veces más elevados en las células resistentes en comparación con las luminales (**Fig. 11**). Esto se podría atribuir a que el GPR30 se moviliza al retículo endoplásmico cuando aumenta la progresión cancerosa de células luminales mientras que se ha reportado su presencia en la membrana plasmática de células resistentes a TMX (**21**). Además, se ha determinado que el GPR30 es esencial para el desarrollo de resistencia a TMX (**21**), y que la IL-6 es uno de los principales inductores de la misma (**76**), pero no se había establecido una relación entre ambos elementos.

En el presente trabajo también se observó que la IL-6 promueve la resistencia a TMX en células MCF-7 de forma tiempo-dependiente y que el bloqueo del GPR30 inhibe parcialmente este efecto (**Fig. 10**), lo cual puede atribuirse a que tanto la IL-6 como el GPR30 promueven un fenotipo metastásico relacionado con una disminución del ER α y soportando la resistencia al fármaco. Finalmente se observó que la IL-6 promueve la migración e invasión celular de los tres modelos antes mencionados de forma dependiente del GPR30, y que este último además regula la tasa basal de dichas propiedades ya que G15 y PTX inhibieron los efectos de la citocina y disminuyeron los niveles basales de la migración e invasión en las células MDA-MB-231 y R-TMX (**Fig. 8,9**). Además, se determinó que la IL-6 promueve estas propiedades metastásicas a través de ERK1/2, JNK y p38 debido a que su inhibición bloqueó los efectos de la citocina sobre las características metastásicas (**Fig.15,16**). Lo anterior concuerda con reportes

que han establecido una relación entre la IL-6 y la expresión de SNAIL a través de ERK1/2, el factor de transcripción maestro en la TEM (77). Por otro lado, se ha reportado que SNAIL promueve la actividad de JNK en procesos metastásicos (77), además, la MAPK p38 participa en la TEM inducida por TGF β (78) y el EGF (79) mediante la estabilización de Sox4 permitiendo el rearrreglo del citoesqueleto para permitir la migración dirigida (80,81). Estos hechos sostienen el por qué al inhibir estas MAPK se bloquea la migración e invasión de las células luminales estimuladas con IL-6. Las tres MAPK antes mencionadas pueden ser activadas por la vía de señalización IL-6/SHP2 (82) y se ha reportado que el GPR30 también puede activar esta proteína (83). En el presente estudio se observó que la citocina no afecta los niveles proteicos de esta fosfatasa, pero sí su fosforilación, lo cual coincide con lo reportado por **Sun et al., (48)** Además, se ha reportado que la IL-6 no afecta la transcripción dependiente de estrógenos, por lo que podría estar actuando a nivel del ER α el cual se relaciona con una transcripción dependiente de E2 y con la proliferación celular. Sin embargo, puede que no afecte al factor de crecimiento regulado por estrógenos 1 (GREB1), el cual promueve la expresión de genes con ERE pero no se relaciona con la proliferación celular (84), lo que soportaría el hecho de que la IL-6 inhiba el efecto proliferativo del E2 pero no la expresión de genes regulados por el mismo. Por lo anterior se sugiere que la IL-6 promueve las propiedades metastásicas en células de cáncer de mama luminal a través de la vía SHP2/MAPK de forma dependiente del GPR30.

X. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

- a. Evaluar los niveles de expresión de CDK1/4/6 involucradas en la regulación del ciclo celular de células de cáncer de mama luminal tratadas con IL-6 y agonistas del GPR30.
- b. Determinar la ruta de señalización involucrada en las propiedades metastásicas de células MCF-7 resistentes a TMX obtenidas a partir de células MCF-7 con exposición constante a IL-6.
- c. Inhibir la traducción del GPR30 y evaluar el efecto de la IL-6 en las células de cáncer de mama luminal.
- d. Determinar si otras citocinas involucradas en la TEM, como TGF- β , presentan mecanismos similares al de la IL-6 en las células de cáncer de mama luminal.
- e. Evaluar los efectos de la IL-6 en esferoides de células MCF-7 y determinar si el efecto es semejante al observado en cultivos 2D.
- f. Determinar la secreción de IL-6 de células cancerosas de líneas celulares y biopsias en diferentes estadios y correlacionarla con los niveles de GPR30.
- g. Evaluar la participación del GPR30 en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 *in vivo*.

XI. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

1. Hanahan, D. 2022. **Hallmarks of cancer: New dimensions.** *Cancer Discov.* 12: 31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059
2. Arceo-Martínez, M. T., López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., & Palomera-Sánchez, Z. 2021. **Estado actual del cáncer de mama en México: principales tipos y factores de riesgo.** *GAMO.* 20(3):101-110. doi: 10.24875/j.gamo.21000134.
3. Vásquez-Moctezuma, I. 2020. **Epigenética y el cáncer de mama.** *Res. Mex. Mastol.* 10 (2): 37-38. <https://dx.doi.org/10.35366/97712>
4. Bevilacqua, G. 2022. **The viral origin of human breast cancer: From the mouse mammary tumor virus (MMTV) to the human betaretrovirus (HBRV).** *Viruses.* 14(8):1704. doi: 10.3390/v14081704.
5. Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. T. 2018. **Tumor heterogeneity and resistance to cancer therapies.** *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15: 81-94. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.166
6. NIH. 2021. **¿Qué es el cáncer?.** *INC.* Recuperado el 14 de junio de 2024, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
7. Globocan. 2024. **Cancer incidence worldwide.** *Cancer today.* Recuperado el 08 de enero de 2025, de <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-most-common-sites?mode=cancer&key=total>
8. Løfterød, T., Frydenberg, H., Flote, V., Eggen, A. E., McTiernan, A., Mortensen, E. S., & Thune, I. 2020. **Exploring the effects of lifestyle on breast cancer risk, age at diagnosis, and survival: the EBBA-Life study.** *Breast Cancer Res. Treat.* 182:215-227. doi: <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05679-2>
9. Miguel-Soca, P., Argüelles González, I., & Peña González, M. 2016. **Factores genéticos en la carcinogénesis mamaria.** *Revista Finlay.* 6: 299-316. ISSN 2221-2434
10. Majlis, S. 2008. **Hormonas femeninas y cáncer de mama: estado de la polémica y evidencias en 2008. ¿Qué responder a las pacientes?** *Res. Chil. Rad.* 14: 113-121. doi: 10.4067/S0717-93082008000300003

11. INEGI. 2024. **Estadísticas a propósito del día internacional de la lucha contra el cáncer de mama.** *Comunicado de prensa 599/24.* Recuperado el 08 de enero de 2025, de: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2024/EAP_LuchaCMama24.pdf
12. Ginsburg, O., Yip, C. H., Brooks, A., Cabanes, A., Caleffi, M., Dunstan Yataco, J. A., & Anderson, B. O. 2020. **Breast cancer early detection: A phased approach to implementation.** *Cancer.* 126:2379-2393. doi: 10.1002/cncr.32887
13. S.A.C.C. 2022. **Estadificación del cáncer.** *Tratamiento y Supervivencia.* Recuperado 14 de junio de 2022, de <https://www.cancer.org/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/estadificaciondelcancer.html>
14. Rangel-Sosa, M. M., Aguilar-Córdova, E., Rojas-Martínez, A. 2017. **Immunotherapy and gene therapy as novel treatments for cancer.** *Colombia Medica (Cali)*, 48(3):138-147. doi: 10.25100/cm.v48i3.2997.
15. Zhou, Z., & Li, M. 2022. **Targeted therapies for cancer.** *BMC Medicine.* 20(1):90. doi: 10.1186/s12916-022-02287-3.
16. Devolli-Disha, E., Manxhuka-Kërliu, S., Ymeri, H., Kutlllovci, A. 2009. **Comparative accuracy of mammography and ultrasound in women with breast symptoms according to age and breast density.** *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 9(2):131-6. doi: 10.17305/bjbms.2009.2832.
17. Nathan MR, Schmid P. 2017. **A Review of fulvestrant in breast cancer.** *Oncol. Ther.* 5(1):17-29. doi: 10.1007/s40487-017-0046-2.
18. Cuzick, J., Sestak, I., Forbes, J. F., Dowsett, M., Cawthorn, S., Mansel, R. E., Loibl, S., Bonanni, B., Evans, D. G., Howell, A., IBIS-II investigators. 2020. **Use of anastrozole for breast cancer prevention (IBIS-II): long-term results of a randomised controlled trial.** *Lancet.* 395(10218):117-122. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32955-1.
19. Farrar, M. C. & Jacobs, T. F. 2023. **Tamoxifen.** *In: StatPearls.* Recuperado el 08 de enero de 2025, de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532905/>

20. Luque-Bolivar, A., Pérez-Mora, E., Villegas, V.E. & Rondón-Lagos, M. 2020. **Resistance and overcoming resistance in breast cancer.** *Breast Cancer (dove medical press)*. 11(12), 211-229. doi: 10.2147/BCTT.S270799.
21. Mo, Z., Liu, M., Yang, F., Luo, H., Li, Z., Tu, G., & Yang, G. 2013. **GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer.** *Breast Cancer Res.* 15: 1-15. doi: 10.1186/bcr3581
22. Ribatti, D., Tamma, R., & Annese, T. 2020. **Epithelial-mesenchymal transition in cancer: A historical overview.** *Trans. Oncol.* 13: 100773. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100773
23. Fedele, M., Sgarra, R., Battista, S., Cerchia, L., & Manfioletti, G. 2022. **The epithelial-mesenchymal transition at the crossroads between metabolism and tumor progression.** *Int. J. Mol. Sci.* 23: 800. doi: 10.3390/ijms23020800
24. Debnath, P., Huire, R. S., Dutta, P., & Palchaudhuri, S. 2022. **Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors.** *Bioscience Rep.* 42: BSR20211754. doi: 10.1042/BSR20211754
25. Bernal-Forigua, C., Otálora, B. A., González, D. M., Bermúdez, L. G., Montoya, C. F., Valderrama, A., Oñate, C., Niederbacher, N., Pinzón, M. J., Camero, C., García, F. J., Grajales, D., Sánchez-Velásquez, D., Castillo, C., Cañas-Arboleda, A., Rojas-Moreno, A. P. 2020. **Control epigenético en la transición epitelio-mesénquima.** *Universitas Medica.* 61(1). doi: 10.11144/Javeriana.umed61-1.epig
26. Hu, Y., Dai, M., Zheng, Y., Wu, J., Zang, H., Kong, W., Wu, H., Yu, X. 2018. **Epigenetic suppression of E-cadherin expression by Snail2 during the metastasis of colorectal cancer.** *Clin. Epigenetics.* 10(154). doi: 10.1186/s13148-018-0592-y
27. Peng, C. Y., Liao, Y. W., Lu, M. Y., Yang, C. M., Hsieh, P. L., Yu, C. C. 2020. **Positive feedback loop of SNAIL-IL-6 mediates myofibroblastic differentiation activity in precancerous oral submucous fibrosis.** *Cancers (Basel)*. 12(6):1611. doi: 10.3390/cancers12061611.
28. Muñoz-Sáez, E., Moracho, N., Learte, A. I. R., Collignon, A., Arroyo, A. G., Noel, A., Sounni, N. E., & Sánchez-Camacho, C. 2023. **Molecular mechanisms driven**

- by **MT4-MMP in cancer progression**. *Int. J. Mol. Sci.* 24(12), 9944. doi: 10.3390/ijms24129944
29. Ruizan, Shi., Linhong, Liu., Fengge, Wang., Yifan, He., Yanan, Niu., Chang, Wang., Xuanping, Zhang., Xiuli, Zhang., Huifeng, Zhang., Min, Chen., Yan, Wang. 2020. **Downregulation of cytokeratin 18 induces cellular partial EMT and stemness through increasing EpCAM expression in breast cancer**. *Cell. signal.* 76:109810. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109810.
30. Battaglia, R. A., Delic, S., Herrmann, H., Snider, N. T. 2018. **Vimentin on the move: new developments in cell migration**. *F1000Research*, 1796. doi: 10.12688/f1000research.15967.1
31. Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A. K., Huang, R., Kalchauer, C., Kalluri, R. EMT International Association. 2020. **Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition**. *Nat. Rev. Cell Biol.* 21: 341–352. doi: 10.1038/s41580-020-0237-9
32. Anderson, N. M., Simon, M. C. 2020. **The tumor microenvironment**. *Current Biol.* 30(16):R921-R925. doi: 10.1016/j.cub.2020.06.081.
33. de Visser KE, Joyce JA. (2023). **The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth**. *Cancer cell.* 41(3):374-403. doi: 10.1016/j.ccell.2023.02.016.
34. Zhao, H., Wu, L., Yan, G., Chen, Y., Zhou, M., Wu, Y., Li, Y. 2021. **Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention**. *Signal Transduc. Target. Ther.* 6(1):263. doi: 10.1038/s41392-021-00658-5.
35. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, Kolahian S, Javaheri T, Zare P. **Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance**. *Cell Commun. Signal.* 18(1):59. doi: 10.1186/s12964-020-0530-4.
36. Gómez-Valenzuela, F., Escobar, E., Pérez-Tómas, R., Montecinos, V. P. 2021. **The inflammatory profile of the tumor microenvironment, orchestrated by cyclooxygenase-2, promotes epithelial-mesenchymal transition**. *Front.*

- 33(3), 127-148. doi: 10.1093/intimm/dxaa078
47. Chen, H., Libring, S., Ruddraraju, K. V., Miao, J., Solorio, L., Zhang, Z. Y., & Wendt, M. K. 2020. **SHP2 is a multifunctional therapeutic target in drug resistant metastatic breast cancer.** *Oncology*. 39: 7166–7180. doi: 10.1038/s41388-020-01488-5
48. Sun, X., Zhang, J., Wang, Z., Ji, W., Tian, R., Zhang, F., & Niu, R. 2017. **Shp2 plays a critical role in IL-6-induced EMT in breast cancer cells.** *Int. J. Mol. Sci.* 18: 395. doi: 10.3390/ijms18020395
49. Matalkah, F., Martin, E., Zhao, H., & Agazie, Y. M. 2016. **SHP2 acts both upstream and downstream of multiple receptor tyrosine kinases to promote basal-like and triple-negative breast cancer.** *Breast Cancer Res.* 18: 2. doi: 10.1186/s13058-015-0659-z
50. Martin, E., & Agazie, Y. M. 2021. **SHP2 potentiates the oncogenic activity of β -catenin to promote triple-negative breast cancer.** *Mol. Cancer Res.* 19: 1946–1956. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-21-0060
51. Zhang, J., Zhang, F., & Niu, R. 2015. **Functions of Shp2 in cancer.** *J. Cell Mol. Med.* 19: 2075–2083. doi: 10.1111/jcmm.12618
52. Yuan, Y., Fan, Y., Gao, Z., Sun, X., Zhang, H., Wang, Z., Cui, Y., Song, W., Wang, Z., Zhang, F., & Niu, R. 2020. **SHP2 promotes proliferation of breast cancer cells through regulating Cyclin D1 stability via the PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway.** *Cancer Biol. Med.* 17: 707–725. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0056
53. Li, J., Kang, Y., Wei, L., Liu, W., Tian, Y., Chen, B., Lin, X., Li, Y., Feng, G. S., Lu, Z. 2014. **Tyrosine phosphatase Shp2 mediates the estrogen biological action in breast cancer via interaction with the estrogen extranuclear receptor.** *PLoS One*. 9(7):e102847. doi: 10.1371/journal.pone.0102847.
54. Sun, X., Mao, Y., Wang, J., Zu, L., Hao, M., Cheng, G., & Shen, K. 2014. **IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts induces tamoxifen resistance in luminal breast cancer.** *Oncol.* 33(35). 4450. doi: 10.1038/onc.2014.158
55. Niogret, C., Birchmeier, W., Guarda, G. 2019. **SHP-2 in lymphocytes' cytokine and inhibitory receptor signaling.** *Front. Immuno.* 10:2468. doi:

10.3389/fimmu.2019.02468.

56. Prossnitz, E. R., Barton, M. 2023. **The G protein-coupled oestrogen receptor GPER in health and disease: an update.** *Nat. Rev. Endocrinol.* 19(7):407-424. doi: 10.1038/s41574-023-00822-7.
57. Tutzauer, J., Sjöström, M., Bendahl, P. O., Rydén, L., Fernö, M., Leeb-Lundberg, L. M. F., Alkner, S. 2020. **Plasma membrane expression of G protein-coupled estrogen receptor (GPER)/G protein-coupled receptor 30 (GPR30) is associated with worse outcome in metachronous contralateral breast cancer.** *PLoS One.* 15(4):e0231786. doi: 10.1371/journal.pone.0231786.
58. Luo, W., Yan, Y., Cao, Y., Zhang, Y., Zhang, Z. 2023. **The effects of GPER on age-associated memory impairment induced by decreased estrogen levels.** *Frontiers Mol. Biosci.* 10:1097018. doi: 10.3389/fmolb.2023.1097018.
59. Dong, H., Zeng, X., Xu, J., He, C., Sun, Z., Liu, L., Huang, Y., Sun, Z., Cao, Y., Peng, Z., Qiu, Y. A., Yu, T. 2024. **Advances in immune regulation of the G protein-coupled estrogen receptor.** *Int. Immunophar.* 136:112369. doi: 10.1016/j.intimp.2024.112369.
60. Tian, S., Zhan, N., Li, R., Dong, W. 2019. **Downregulation of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) is associated with reduced prognosis in patients with gastric cancer.** *Med. Sci. Monit.* 25:3115-3126. doi: 10.12659/MSM.913634.
61. Xu, S., Yu, S., Dong, D., Lee, L. T. O. 2019. **G protein-coupled estrogen receptor: a potential therapeutic target in cancer.** *Front. Endocrinol (Lausanne).* 10:725. doi: 10.3389/fendo.2019.00725.
62. Tran, Q. K. 2020. **Reciprocity between estrogen biology and calcium signaling in the cardiovascular system.** *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 11:568203. doi: 10.3389/fendo.2020.568203.
63. Lucas, T. F., Royer, C., Siu, E. R., Lazari, M. F., Porto, C. S. 2010. **Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat sertoli cells.** *Biol. Reprod.* 83(2):307-17. doi: 10.1095/biolreprod.110.084160.
64. Hernández-Silva, C. D., Villegas-Pineda, J. C., Pereira-Suárez, A. L. 2020. **Expression and role of the G protein-coupled estrogen receptor**

- (GPR30/GPER) in the development and immune response in female reproductive cancers. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 11:544. doi: 10.3389/fendo.2020.00544.
65. Chan, Y. T., Lai, A. C., Lin, R. J., Wang, Y. H., Wang, Y. T., Chang, W. W., Wu, H. Y., Lin, Y. J., Chang, W. Y., Wu, J. C., Yu, J. C., Chen, Y. J., Yu, A. L. 2020. **GPER-induced signaling is essential for the survival of breast cancer stem cells.** *Int. J. Cancer*. 146(6):1674-1685. doi: 10.1002/ijc.32588.
66. Romano, S. N., & Gorelick, D. A. 2018. **Crosstalk between nuclear and G protein-coupled estrogen receptors.** *Gen. Comp. Endocrinol.* 261:190-197. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.04.013.
67. Dennis, M. K., Field, A. S., Burai, R., Ramesh, C., Petrie, W. K., Bologna, C. G., Oprea, T. I., Yamaguchi, Y., Hayashi, S., Sklar, L. A., Hathaway, H. J., Arterburn, J. B., Prossnitz, E. R. 2011. **Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity.** *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127(3-5):358-66. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.07.002.
68. Segura-Bautista, D., Olivares, A., Casas-González, P., Bonilla, E., Salazar, Z., & Pérez-Solis, M.A. 2020. **GPR30 expression and function in breast cancer cells are induced through a cis-acting element targeted by ETS factors.** *Oncol. Rep.* 43, 1669-1682. doi: 10.3892/or.2020.7540
69. Liu, W., Wang, H., Bai, F., Ding, L., Huang, Y., Lu, C., Chen, S., Li, C., Yue, X., Liang, X., Ma, C., Xu, L., Gao, L. 2020. **IL-6 promotes metastasis of non-small-cell lung cancer by up-regulating TIM-4 via NF- κ B.** *Cell Prolif.* 53(3):e12776. doi: 10.1111/cpr.12776.
70. Lee, S., Lee, M., Kim, J. B., Jo, A., Cho, E. J., Yu, S. J., Lee, J. H., Yoon, J. H., Kim, Y. J. 2016. **17 β -estradiol exerts anticancer effects in anoikis-resistant hepatocellular carcinoma cell lines by targeting IL-6/STAT3 signaling.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473(4):1247-1254. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.049.
71. Chen, J., Wei, Y., Yang, W., Huang, Q., Chen, Y., Zeng, K., Chen, J. 2022. **IL-6: The link between inflammation, immunity and breast cancer.** *Front. Oncol.* 12:903800. doi: 10.3389/fonc.2022.903800.

-
72. Lee, H. H., Jung, J., Moon, A., Kang, H., Cho, H. **Antitumor and anti-invasive effect of apigenin on human breast carcinoma through suppression of IL-6 expression.** 2019. *Int. J. Mol. Sci.* 20(13):3143. doi: 10.3390/ijms20133143.
73. Segura-Bautista, D., Olivares, A., Casas-González, P., Bonilla, E., Salazar, Z., & Pérez-Solis, M.A. 2020. **GPR30 expression and function in breast cancer cells are induced through a cis-acting element targeted by ETS factors.** *Oncol. Rep.* 43, 1669-1682. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7540>
74. De Marchi, T., Timmermans, A. M., Smid, M., Look, M. P., Stingl, C., Opdam, M., Linn, S. C., Sweep, F. C., Span, P. N., Kliffen, M., van Deurzen, C. H., Luiders, T. M., Foekens, J. A., Martens, J. W., & Umar, A. 2016. **Annexin-A1 and caldesmon are associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor positive recurrent breast cancer.** *Oncotarget.* 7(3):3098-110. doi: 10.18632/oncotarget.6521.
75. Vecchi, L., Mota, S. T. S., Zóia, M. A. P., Martins, I. C., de Souza, J. B., Santos, T. G., Beserra, A. O., de Andrade, V. P., Goulart, L. R., & Araújo, T. G. 2022. **Interleukin-6 signaling in triple negative breast cancer cells elicits the annexin A1/formyl peptide receptor 1 axis and affects the tumor microenvironment.** *Cells.* 11(10):1705. doi: 10.3390/cells11101705.
76. Xing, J., Li, J., Fu, L., Gai, J., Guan, J., & Li, Q. 2019. **SIRT4 enhances the sensitivity of ER-positive breast cancer to tamoxifen by inhibiting the IL-6/STAT3 signal pathway.** *Cancer Med.* 8(16):7086-7097. doi: 10.1002/cam4.2557.
77. Yadav, A., Kumar, B., Datta, J., Teknos, T. N., & Kumar, P. 2011. **IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway.** *Mol. Cancer Res.* 9(12):1658-67. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0271.
78. Shu, D., Mao, B. P., & Lovicu, F. J. 2019. **Non-canonical TGF β -signaling pathways in lens EMT: interplay between EGFR and p38 MAPK.** *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60(9):6445.
79. Hong, O. Y., Jang, H. Y., Lee, Y. R. Jung, S. H., & Kim, J. 2022. **Inhibition of cell invasion and migration by targeting matrix metalloproteinase-9 expression**

- via sirtuin 6 silencing in human breast cancer cells.** *Scientific Rep.* 12, 12125. doi: 10.1038/s41598-022-16405-x.
80. Roukens, M. G., Frederiks, C. L., Seinstra, D., Braccioli, L., Khalil, A. A., Pals, C., De Neck, S., Bornes, L., Beerling, E., Mokry, M., de Bruin, A., Westendorp, B., van Rheenen, J., & Coffey, P. J. 2021. **Regulation of a progenitor gene program by SOX4 is essential for mammary tumor proliferation.** *Oncogene.* 40(45):6343-6353. doi: 10.1038/s41388-021-02004-z.
81. Kudaravalli, S., den Hollander, P. & Mani, S.A. 2022. **Role of p38 MAP kinase in cancer stem cells and metastasis.** *Oncogene.* 41, 3177–3185. doi: 10.1038/s41388-022-02329-3.
82. Meng, S., Gui, Q., Xu, Q., Lu, K., Jiao, X., Fan, J., Ge, B., Ke, Y., Zhang, S., Wu, J., & Wang, C. 2010. **Association of Shp2 with phosphorylated IL-22R1 is required for interleukin-22-induced MAP kinase activation.** *J. Mol. Cell Biol.* 2(4):223-30. doi: 10.1093/jmcb/mjq017
83. Li, J., Kang, Y., Wei, L., Liu, W., Tian, Y., Chen, B., Lin, X., Li, Y., Feng, G. S., & Lu, Z. 2014. **Tyrosine phosphatase Shp2 mediates the estrogen biological action in breast cancer via interaction with the estrogen extranuclear receptor.** *PLoS One.* 9(7):e102847. doi: 10.1371/journal.pone.0102847.
84. Haines, C. N., Braunreiter, K. M., Mo, X. M., & Burd, C. J. 2018. **GREB1 isoforms regulate proliferation independent of ER α co-regulator activities in breast cancer.** *Endocrine-related cancer.* 25(7):735-746. doi: 10.1530/ERC-17-0496.

Ana Carolina Tirado Garibay

El GPR30 está involucrado en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer de

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:458181874

Fecha de entrega

12 may 2025, 8:51 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

14 may 2025, 7:19 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

El GPR30 está involucrado en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cánc....pdf

Tamaño de archivo

2.6 MB

108 Páginas

29.793 Palabras

155.594 Caracteres

25% Overall Similarity

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

Filtered from the Report

- Bibliography

Top Sources

- 24%  Internet sources
- 12%  Publications
- 0%  Submitted works (Student Papers)

Integrity Flags

1 Integrity Flag for Review



Replaced Characters

158 suspect characters on 62 pages

Letters are swapped with similar characters from another alphabet.

Our system's algorithms look deeply at a document for any inconsistencies that would set it apart from a normal submission. If we notice something strange, we flag it for you to review.

A Flag is not necessarily an indicator of a problem. However, we'd recommend you focus your attention there for further review.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

Estudio del efecto del control de los factores de crecimiento de neochloris oleoabundans cib 57 en cultivo mixotrófico sobre el crecimiento celular y la actividad bactericida

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas	
Título del trabajo	El GPR30 está involucrado en las propiedades metastásicas inducidas por IL-6 en células de cáncer de mama luminal MCF-7	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Ana Carolina Tirado Garibay	1050629h@umich.mx
Director	Joel Edmundo López Meza	elmeza@umich.mx
Codirector	Alejandra Ochoa Zarzosa	alejandra.ochoa@umich.mx
Coordinador del programa	Omar Chassin Noria	omar.chassin@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	no	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	no	
Traducción a otra lengua	no	
Revisión y corrección de estilo	no	
Análisis de datos	no	
Búsqueda y organización de información	no	
Formateo de las referencias bibliográficas	no	
Generación de contenido multimedia	No	
Otro	No	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Ana Carolina Tirado Garibay 
Lugar y fecha	13 de mayo de 2025, Morelia, Michoacán 