



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“Estudio del efecto de la transactivación de GPR30 por factores de la subfamilia PEA3 en cáncer de mama.”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**PRESENTA**

**M en C David Segura Bautista**

**CODIRECTORES DE TESIS**

**Dr. Marco Allán Pérez Solís**

**Dr. Edmundo Bonilla González**

**Asesora: Dra. María Margarita Zayil Salazar Campos**

**Ciudad de México, Mayo 2021**

El presente trabajo fue realizado en los Laboratorios del Instituto Mexicano del Seguro Social, en la Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva del Hospital de Gineco Obstetricia No 4, "Luis Castelazo Ayala", bajo la dirección del Dr. Marco Allán Pérez Solís.

Y del Dr. Edmundo Bonilla González del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo de la Dra. María Margarita Zayil Salazar Campos.

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 265148, que comprendió del periodo de 01 de enero de 2016 al 31 de diciembre de 2019. El doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del CONACyT y además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

**M en C David Segura Bautista**

Fecha de aprobación de la tesis

**JURADO:**

---

Dr. Edmundo Bonilla González  
Presidente

---

Dr. Marco Allán Pérez Solís  
Secretario

---

Dra. Patricia Casas González  
Vocal

---

Dr. Arturo Aguilar Rojas  
Vocal

---

Dra. María Margarita Zayil Salazar Campos  
Vocal

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Marco Allan Pérez Solís por haber confiado en mí y darme la oportunidad de trabajar junto a él, por su importante y muy valioso apoyo, por su constante e incondicional participación en el desarrollo y dirección de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia durante todo momento en mis constantes desaciertos. Así también agradezco a la Dra. María Margarita Zayil Salazar Campos y al Dr. Edmundo Bonilla González por haber confiado en mi persona, por los comentarios, la asesoría y el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

A mis hijos Sofía Renée y Santiago Sebastián, con todo mi cariño y amor, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi amor incondicional.

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Abreviaturas.....	3
1. Introducción.....	7
2. Marco teórico.....	8
2.1. Relevancia Fisiológica de GPR30.....	10
2.2. Caracterización Molecular de GPR30.....	12
2.3. Ligandos de GPR30.....	13
2.4. Señalización GPR30.....	13
2.5. Regulación transcripcional de la expresión de GPR30.....	15
3. Preguntas de investigación.....	18
4. Hipótesis.....	18
5. Objetivo general.....	18
5.1. Objetivos específicos.....	18
6. Material y Métodos.....	19
6.1. Líneas celulares.....	19
6.2. Extracción de proteínas totales y nucleares.....	20
6.3. Detección de proteínas por <i>Western blot</i> .....	21
6.4. Ensayos de crecimiento celular.....	23
6.5. Ensayo de migración celular.....	24
6.6. Clonación del promotor génico de GPR30.....	24
6.7. Diseño y elaboración de construcciones génicas reporteras.....	27
6.8. Mutagénesis sitio-dirigida.....	29
6.9. Ensayos de transfección transitoria de la región promotora de GPR30.....	29
6.10. Ensayos de Inhibición de fosforilación <i>in vitro</i> .....	30
6.11. Ensayos de estimulación con ácido retinoico.....	31
6.12. Ensayos de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT)-PCR.....	32
6.13. Ensayos de crecimiento celular en células MCF-7 estimuladas con AR.....	33
6.14. Análisis estadístico.....	33
7. Resultados.....	35
7.1. La expresión de GPR30 disminuye en células de cáncer de mama.....	35
7.2. GPR30 regula el crecimiento celular en células metastásicas y no metastásicas <i>in vitro</i> .....	37
7.3. GPR30 regula la migración de células de cáncer de mama metastásico <i>in vitro</i> .....	41

7.4.	Patrón de regulación transcripcional del promotor de GPR30 en líneas celulares derivadas de glándula mamaria.....	44
7.5.	Elementos reguladores en <i>cis</i> de la región promotora del gen GPR30.....	46
7.6.	Funcionalidad de los elementos reguladores en <i>cis</i> para ETS, ERR1, NGRE y SOX .....	49
7.7.	La actividad de PKA y ERK promueven la regulación transcripcional de GPR30.....	53
7.8.	ER81 se expresa específicamente en células MCF-7.....	55
7.9.	El AR suprime la actividad transcripcional del promotor de GPR30 .....	57
7.10.	El AR suprime la expresión de GPR30 y de los factores de la subfamilia PEA3 .....	61
7.11.	El AR reduce el crecimiento de células MCF-7 .....	63
8.	Discusión .....	65
9.	Conclusión .....	74
10.	Perspectivas .....	74
11.	Referencias.....	75
12.	Anexos .....	84

# ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Mecanismos de transducción de señales de GPR30. ....	14
Tabla 1. Oligonucleótidos usados en las aplicaciones de los ensayos. ....	26
Figura 2. Representación esquemática de las construcciones génicas reporteras de la región promotora de GPR30. ....	28
Figura 3. Expresión del receptor GPR30 en células mamarias. ....	36
Figura 4. G15 restringe el crecimiento de células de cáncer de mama a través de GPR30. ....	38
Figura 5. G1 restringe el crecimiento de células de cáncer de mama a través de GPR30. ....	40
Figura 6. La estimulación de GPR30 limita la migración de células metastásicas de cáncer de mama. ....	42
Figura 7. La migración de células MCF-7 no se ve afectada por la estimulación de GPR30. ....	43
Figura 8. Actividad transcripcional del promotor GPR30 en células de glándula mamaria con diferente grado de diferenciación. ....	45
Figura 9. Secuencia nucleotídica de la región flanqueante 5' del gen GPR30. ....	47
Figura 10. Actividad transcripcional de los elementos reguladores en cis del promotor de GPR30 en células de cáncer de mama con diferente grado de diferenciación. ....	50
Figura 11. Funcionalidad del elemento ETS del promotor GPR30 en células de cáncer de mama metastásicas. ....	52
Figura 12. Los inhibidores H89 y PDE98069 suprimen la actividad transcripcional del promotor de GPR30. ....	54
Figura 13. Detección de los factores de la subfamilia PEA3 en células de tejido mamario con diferentes grados de diferenciación. ....	56
Figura 14. Supresión de la actividad transcripcional del promotor de GPR30 por AR en células de cáncer de mama MCF-7. ....	58
Figura 15. Efecto del AR en la actividad del elemento ETS localizado de -625 a -631 del promotor de GPR30 en células de cáncer de mama diferenciadas. ....	60
Figura 16. El AR reduce la expresión del ARNm de GPR30 ERM, ER81 y PEA3 en células de cáncer de mama diferenciadas. ....	62
Figura 17. Supresión en el crecimiento celular causado por el AR en células de cáncer de mama. ....	64
Figura 18. Esquema del mecanismo propuesto de la actividad de GPR30 en la proliferación y migración en células de cáncer de mama. ....	73

## Resumen

La capacidad que tienen los estrógenos y otras moléculas análogas de activar a GPR30 y desencadenar diversas vías de señalización en células de cáncer de mama carentes de receptores de estrógenos clásicos (RE $\alpha$  y RE $\beta$ ) ha generado un gran interés en su investigación. Sin embargo, la evidencia derivada de los reportes en relación al perfil de expresión de GPR30 y el papel que juega en el proceso del cáncer de la glándula mamaria no han sido concluyentes. En el presente estudio se determinó, por medio de *Western blot*, que GPR30 se expresa tanto en células de glándula mamaria normales como en las provenientes de cáncer de mama. Sin embargo, dicha expresión disminuye considerablemente durante el desarrollo del cáncer de mama. A pesar de estos bajos niveles de expresión de GPR30 en células de cáncer de mama MCF-7, este receptor de estrógenos es capaz de aumentar el crecimiento celular y en células que han adquirido capacidad metastásica (MDA-MB-231) suprimir la migración. Por otro lado, mediante ensayos de expresión transitoria de las versiones truncadas de la región promotora de *GPR30* se encontró un patrón de regulación transcripcional similar entre las células de tejido mamario sano y neoplásicas. Sin embargo, esta regulación transcripcional se vio disminuida en células de cáncer de mama en comparación con las células de glándula mamaria normales, debido a la pérdida de la identidad celular. Por otra parte, se encontró un elemento regulador funcional en *cis* para los factores de transcripción de ETS ubicado entre -625 y -635 pb del codón de inicio de la traducción en todas las células del tejido mamario. A través de ensayos de expresión transitoria en células MDA-MB-231 se encontró un mecanismo transcripcional dependiente de PKA, el cual condujo a inferir la interacción de la subfamilia PEA3 con el elemento ETS de la región promotora de *GPR30*. En células MCF-7 estimuladas con ácido retinoico se observó que la expresión de GPR30 está regulada a través del elemento regulador ETS. Por tanto, es posible inferir que independientemente del silenciamiento epigenético que pueda existir sobre la expresión de GPR30 durante el desarrollo del cáncer de mama, su actividad puede ser regulada transcripcionalmente incluso a pesar de su baja expresión en células desdiferenciadas, conllevando así a que éste receptor, sea capaz de llevar a cabo sus funciones biológicas.

**Palabras clave:** Promotor del receptor 30 acoplado a proteína G, GPR30, crecimiento celular, metástasis, transcripción, cáncer de mama.



## Abstract

The ability of estrogens and other analogous molecules to activate GPR30 and trigger various signaling pathways in breast cancer cells lacking classical estrogen receptors (RE $\alpha$  and RE $\beta$ ) has generated great interest in his research. However, evidence from the reports related to the profile expression of GPR30 and its role in process of cancer mammary gland has not been conclusive. In the present study by Western blot, it was determined that GPR30 was expressed in both, normal mammary gland cells and those from breast cancer. Although its expression decreases considerably during the development of breast cancer. Despite these low levels of GPR30 expression in MCF-7 breast cancer cells, this estrogen receptor is able to increase cell growth and in cells that have acquired metastatic capacity (MDA-MB-231) suppress migration. On the other hand, by means of transient expression assays of the truncated versions of the *GPR30* promoter region, a similar pattern of transcriptional regulation was found among healthy and neoplastic breast tissue cells. However, this transcriptional regulation was decreased in breast cancer cells compared to normal mammary gland cells, due to the loss of cell identity. On the other hand, a functional *cis* regulatory element for ETS transcription factors was found located between -625 to -635 bp of the translation start codon in all cells of breast tissue. Through transient expression assays in MDA-MB-231 cells, its was found a PKA-dependent transcriptional mechanism, that led to infer the interaction of the PEA3 subfamily with the ETS element of the *GPR30* promoter region. In MCF-7 cells stimulated with retinoic acid its was observed that expression of GPR30 is regulated through ETS regulatory element. Therefore, it is possible to infer that regardless of the epigenetic silencing that may exist on the expression of GPR30 during the development of breast cancer, its activity can be transcriptionally regulated even in spite of its low expression in dedifferentiated cells, thus leading to this receptor being able to carry out its biological functions.

**Keywords:** G-protein coupled receptor 30 promoter, GPR30, cell growth, metastasis, transcription, breast cancer.

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AFP	Alfafetoproteína
AKT	Proteína cinasa de serina/treonina
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
AP-1	Proteína activadora 1
AR	Ácido retinoico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Bcl-2	Proteína 2 de linfoma de células B
BPA	Bisfenol A
BSA	Albumina sérica bovina
BSX	Proteína <i>homeobox</i> específica del cerebro
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
c-fos	Proteína de proto-oncogén c-fos
CIT	Codón de inicio de la traducción
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CoCL <sub>2</sub>	Cloruro de cobalto
c-Src	Proteína tirosina cinasa Src

DDE	Diclorodifenildicloroetileno
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsufóxido
E2	Estradiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ER81	Proteína 81 relacionada con ets
ERK	Proteína cinasa regulada por señales extracelulares
ERM	Factor de transcripción relacionada con molécula-ets
ERR1	Receptor 1 relacionado con estrógenos
ETS	E26 de transformación específico
FOXP1	Proteína P1 de la caja de <i>Forkhead</i>
GPR30	Receptor acoplado a proteína G 30
HB-EGF	Factor de crecimiento epidérmico unido a heparina
HE4	Proteína 4 del epidídimo humano
HER1	Receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico humano
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HIF-1 $\alpha$	Factor inducible por hipoxia 1-alfa
HREs	Elementos reguladores de respuesta a hipoxia

kDa	Kilodalton
Kpb	Kilo pares de bases
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MEGM	Medio de crecimiento de células epiteliales mamarias
MMP	Metaloproteinasas de matriz
NGRE	Elemento de respuesta a los glucocorticoide negativo
ON	Óxido nítrico
p53	Proteína supresora de tumor 53
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEA3	Proteína activadora potenciadora de poliomavirus tipo 3
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RE	Receptor de estrógenos
RE $\alpha$	Receptor de estrógenos alfa
RE $\beta$	Receptor de estrógenos beta
RIPA	Amortiguador de ensayo de radioinmunoprecipitación
RP	Receptor de progesterona
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

SFB	Suero fetal bovino
SOX	Factor de transcripción SRY-box
Tamx	Tamoxifeno
TBS	Solución salina tamponada con tris
TGF- $\alpha$	Factor de crecimiento transformante alfa

## 1. Introducción

La investigación de los mecanismos subyacentes al cáncer de mama ha logrado establecer que la exposición prolongada a estrógenos (Zolfaroli et al., 2018), ciertos hábitos nocivos asociados al estilo de vida (Perez-Solis et al., 2016), así como los patrones reproductivos están entre los principales factores de alto riesgo para contraer esta enfermedad (Hsieh, 1990; Lappano et al., 2010). Aunque estos estudios a su vez han conducido a la generación de opciones terapéuticas y de detección, se ha estimado que la duplicación de una célula de cáncer de mama *in situ* puede tomar entre 60-300 días dependiendo del subtipo de tumor y que cerca de 30 eventos de duplicación deben ocurrir antes de que una neoplasia de mama pueda alcanzar el tamaño (1 cm) a partir del cual se considera un pronóstico desfavorable (Brandan, 2006). Por lo tanto, para que un tumor de cáncer de mama de crecimiento rápido, alcance esas dimensiones, deben transcurrir como mínimo 5 años. Varios autores advierten la necesidad de establecer métodos de detección alternativos que permitan el tratamiento oportuno de las pacientes, a través de estrategias de mayor sensibilidad y con la capacidad de determinar la presencia de células malignas a partir de tumores menores a los 5 mm, tamaño donde es detectable a través de mamografía (Boyd, 2007; Brandan, 2006; Knaul, 2009; Knaul and Frenk, 2005; McPherson, 2000).

Desde hace más de tres décadas, se han realizado esfuerzos por encontrar las diferencias morfológicas, metabólicas o de expresión génica existentes entre las células que conforma un epitelio sano y aquellas de fenotipo maligno, con las que se formen criterios de valoración que permitan definir entre una neoplasia maligna establecida o una en proceso (Malich, 2005; Mangasarian, 1995; Ramaswamy, 2001). Estos cambios que actualmente son referidos como biomarcadores subrogados, han sido determinados gracias a la investigación de los mecanismos moleculares subyacentes a las alteraciones que ocurren durante la carcinogénesis en los diversos procesos celulares, tales como: apoptosis, proliferación y señalización celular. En el caso particular del cáncer de mama, los biomarcadores que han ayudado como factores pronóstico y algunos incluso como blancos terapéuticos son los receptores de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RP), el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 1 (HER1) (Weigel, 2010), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), la

proteína 53 supresora de tumor (p53) y la proteína de linfoma de células B-2 (Bcl-2) (Beenken and Bland, 2002; Weigel, 2010), entre otros.

En este contexto, Carmeci *et al.* en 1997 reportaron la diferencia en la expresión de una proteína de alta homología con la familia de receptores acoplados a proteínas G en un sondeo genético diferencial realizado entre la línea celular RE $\alpha$  (+), establecida a partir de la efusión pleural de adenocarcinoma ductal invasivo, MCF-7 y la línea celular RE $\alpha$  (-), aislada de la efusión pleural de adenocarcinoma metastásico de glándula mamaria, MDA-MB-231. En este análisis preliminar se concluyó que la sobreexpresión de esta proteína, conocida como GPR30, parecía estar correlacionada con la presencia del RE $\alpha$  (Carmeci *et al.*, 1997). Sin embargo, más tarde otros estudios (Feng and Gregor, 1997; Kvingedal and Smeland, 1997; Langer *et al.*, 2010) encontraron la presencia de este receptor tanto en líneas celulares sanas como en tumorales. Así también se determinó que, aunque este receptor es expresado por el tejido mamario sano, su expresión tiende a disminuir en función del grado de malignidad de las células de cáncer de mama (Ariazi *et al.*, 2010; Kuo *et al.*, 2007; Poola *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010).

## 2. Marco teórico

Diversos procesos biológicos en los diferentes sistemas dentro del organismo son regulados por los estrógenos (Prossnitz *et al.*, 2008). Dichos procesos biológicos, son ejercidos principalmente por el receptor de estrógenos alfa (RE $\alpha$ ) y el receptor de estrógenos beta (ER $\beta$ ), los cuales se localizan principalmente en el núcleo y el citoplasma celular. La unión del estrógeno a su receptor desencadena un cambio conformacional en el receptor, que le permite liberarse de su complejo de inactivación, para translocarse al núcleo e interaccionan con sitios específicos del ADN llamados elementos de respuesta a estrógenos (ERE), desde donde regulan la actividad transcripcional de sus genes blanco. Además pueden encender vías de señalización “no genómicas” que involucran el incremento de calcio intracelular y de AMP cíclico (Barros and Gustafsson, 2011; Hua *et al.*, 2018; Saha *et al.*, 2019).

Los estrógenos también juegan un papel crucial en la formación de tumores malignos de glándula mamaria (Lappano *et al.*, 2010; Prossnitz and Barton, 2011). Estos efectos

biológicos ejercidos durante el desarrollo del cáncer de mama, aunque son mediados principalmente por los RE clásicos, también han sido asociados a GPR30, que es otro tipo receptor de estrógeno acoplado a proteína G de siete dominios transmembranales, con un mecanismo de acción distinto a de los receptores nucleares típicos, como RE $\alpha$  y  $\beta$ . Sin embargo, GPR30 juega un papel de receptor de estrógeno durante el desarrollo del cáncer y en una gran variedad de sistemas dentro del organismo, desencadenando respuestas rápidas no genómicas como el aumento de Ca<sup>2+</sup> y AMPc (Jung, 2019; Maggiolini and Picard, 2010).

Recientemente se ha visto que cerca del 20% de pacientes con cáncer de mama que aún expresa al RE $\alpha$  y que son tratados con tamoxifeno o fulvestrant (fármacos antagonistas del RE $\alpha$ ) para inhibir los efectos mitogénicos de los estrógenos, no responden al tratamiento y en la mayoría de los casos producen un efecto agonista después de algunos años de tratamiento (Herynk and Fuqua, 2007; Luo and Liu, 2020). Lo anterior se ha atribuido al receptor de estrógeno acoplado a proteína G de siete dominios transmembranales, GPR30, ya que se ha descrito que puede ser activado por el tamoxifeno como por el estrógeno e impulsar vías de señalización que promueven el crecimiento de las células del cáncer de mama causando la resistencia al tratamiento hormonal en el cáncer de mama RE $\alpha$  (+) (Ignatov et al., 2010; Ignatov et al., 2020; Mo et al., 2013; Vivacqua et al., 2006; Yu et al., 2020).

GPR30 es un receptor de estrógeno alternativo que se expresa entre el 50% al 60% de los tejidos del cáncer de mama. Este también prevalece y está involucrado en el cáncer de mama triple negativo, mostrando con frecuencia un comportamiento más agresivo y puede ser un objetivo terapéutico. Sin embargo, existen resultados contradictorios con respecto a la función de GPR30 en el cáncer de mama (Ariazi et al., 2010; Liu et al., 2017; Martin et al., 2018; Sathya et al., 2015; Wei et al., 2014b).

Por sus características funcionales y su papel inductor en la proliferación celular, GPR30, es considerado por varios grupos de investigación como una explicación a la respuesta estrogénica que presentan las células malignas RE $\alpha$  negativas (Hsu et al., 2019; Lappano et al., 2010; Luo and Liu, 2020; Molina et al., 2020; Molina et al., 2017), así como también un potencial biomarcador para el diagnóstico y tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo al carcinoma mamario (Lappano et al., 2010; Liu et al., 2009; Prossnitz and Barton, 2011).



## 2.1. Relevancia Fisiológica de GPR30

GPR30 se expresa en el sistema nervioso, reproductor, cardiovascular y óseo. Dentro del sistema reproductor, GPR30 regula la proliferación del epitelio dentro del útero (Olde and Leeb-Lundberg, 2009). Además, la expresión de GPR30 en humanos se correlaciona con una mejora en las respuestas contráctiles inducidas por la oxitocina en el miometrio, lo que sugiere un papel en la contractilidad uterina durante la labor de parto (Prossnitz and Barton, 2011). También se ha documentado que GPR30 regula las vías de proliferación y apoptosis implicados en la espermatogénesis durante el desarrollo reproductivo masculino (Maggiolini and Picard, 2010).

En el sistema nervioso central y periférico se encuentra ampliamente distribuido, donde lleva a cabo efectos sobre las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, desempeñándose como un importante regulador de la función cognitiva (Hammond and Gibbs, 2011; Hammond et al., 2011). Se ha observado que en el cerebro podría tener un papel en los desórdenes del estado de ánimo, ya que G1, un agonista sintético y específico para GPR30, presenta propiedades de antidepresivo; otra de sus funciones es la protección y regeneración neuronal en eventos de daño cerebral, isquemia o intoxicación (Luo and Liu, 2020; Prossnitz and Barton, 2011; Zhang et al., 2019). Aunque se conoce que el RE $\alpha$  puede llevar a cabo varios de estos mismos procesos en el sistema nervioso, se ha observado que la ausencia de GPR30, en ratones con el gen *GPR30* bloqueado, puede generar una disminución o anulación de los efectos generados por este receptor en respuesta al 17 $\beta$ -estradiol (Gingerich et al., 2010; Luo and Liu, 2020).

En el sistema inmune, estudios en ratones con el gen bloqueado para RE $\alpha$  y GPR30 han demostrado que la anulación en la expresión de GPR30 disminuye la función inmunoprotectora del 17 $\beta$ -estradiol (Maggiolini and Picard, 2010). En otro estudio, se reportó que el tratamiento con G1 tiene efectos inmunomoduladores indicando que GPR30 podría tener aplicaciones clínicas en las enfermedades inflamatorias crónicas (Brunsing and Prossnitz, 2011; Hernández-Silva et al., 2020). Así mismo, se ha visto que GPR30 puede participar en el sistema inmune adaptativo, particularmente en la maduración de células B y células T (Prossnitz and Barton, 2009).

En el sistema cardiovascular desempeña funciones de regulación en la contracción y vasodilatación como una respuesta cardioprotectiva en patologías que comprometen la integridad de los tejidos del sistema como la aterosclerosis, hipertensión, isquemia, inflamación e infarto al miocardio. Estos eventos estimulan la expresión de GPR30 en los cardiomiocitos; a través de dos de las principales vías de señalización de GPR30: la fosforilación de ERK1/2 y la producción de óxido nítrico (ON) (Luo and Liu, 2020; Meyer et al., 2016). Otros estudios han demostrado beneficios en el tratamiento con G1 después de un infarto de miocardio y lesiones cerebrovasculares reduciendo las lesiones en modelos animales y en humanos. En células de músculo liso vascular de humanos y ratas, la activación de GPR30 por G1 o raloxifeno resulta en la estimulación de la vía ERK1/2 inhibiendo el crecimiento (Feldman and Limbird, 2017; Prossnitz and Barton, 2011). En células endoteliales humanas, la activación de GPR30 inhibe la proliferación celular, indicando un papel antiangiogénico (Recchia et al., 2011). Por lo anterior, se considera que GPR30 posee un papel potencial en el tratamiento de patologías cardiovasculares (Feldman and Limbird, 2017; Luo and Liu, 2020; Olde and Leeb-Lundberg, 2009).

Varias investigaciones sugieren que GPR30 tiene un papel importante en el metabolismo óseo y del cartílago, expresándose en osteocitos, osteoclastos, osteoblastos y condrocitos, además de regular el crecimiento y desarrollo óseo inducido por estrógenos (Chuang et al., 2020; Olde and Leeb-Lundberg, 2009; Prossnitz and Barton, 2011). Dentro del sistema metabólico se ha reportado que en ratones hembras deficientes de GPR30 se presentan niveles elevados de glucosa en sangre, además de una reducción en el crecimiento, mientras que en los ratones machos deficientes de GPR30 no se observaron los mismos efectos (Luo and Liu, 2020; Prossnitz and Barton, 2011).

En el tejido adiposo de ratones se observó que al no expresarse GPR30 hay un incremento en obesidad entre los 10 a 11 meses de edad (Haas et al., 2009). Sin embargo, este resultado es contradictorio con otros estudios, en donde reportan poca o ninguna expresión de GPR30 en tejido adiposo de ratones de tipo silvestre, además de mostrar que la cantidad de grasa corporal es similar en líneas de ratón deficientes de GPR30 comparados con ratones de tipo silvestre (Ford et al., 2011; Luo and Liu, 2020). Por otra parte, se ha detectado la expresión de GPR30 en tejido adiposo en humanos, además de evidencia indirecta de que con el uso de raloxifeno, GPR30 podría estar implicado en la diferenciación de los adipocitos (Prossnitz and Barton, 2009; Prossnitz and Barton, 2011). Es por esta controversia entre los diferentes estudios, que se requieren estudios adicionales para

determinar si, además de las funciones ya documentadas de GPR30, verdaderamente contribuye dentro de la función metabólica (Luo and Liu, 2020; Olde and Leeb-Lundberg, 2009). Los reportes de la expresión de GPR30 en tejidos de sistemas como el inmune, digestivo y renal son temas de investigación que se encuentran aún en estudio y por tal motivo, no se cuenta con la suficiente información para definir los mecanismos responsables de los efectos que genera la activación de GPR30 en estos sistemas (Hernández-Silva et al., 2020; Isensee et al., 2009; Prossnitz and Barton, 2011).

GPR30 también se expresa en algunos tejidos de manera normal sin presentar algún papel relevante en dichos tejidos. Sin embargo, al investigar su papel en un contexto patológico se puede observar su importancia. Tal es el caso de la glándula mamaria, la cual expresa GPR30 en condiciones normales, en donde contribuye en la homeostasis y la proliferación inducida por estrógenos (Molina et al., 2018; Molina et al., 2017; Scaling et al., 2014). En cambio, cuando este tejido sufre un evento de malignización, GPR30 participa activamente en la proliferación y la metástasis. También se ha observado que durante el proceso de la oncogénesis, el nivel de expresión de GPR30 tiende a disminuir en el tejido que forma parte del tumor en comparación con el tejido normal o sano (Ariazi et al., 2010; Kuo et al., 2007; Poola et al., 2008; Wang et al., 2010).

## 2.2. Caracterización Molecular de GPR30

El receptor transmembranal GPR30 es una proteína con una extensión de 375 aminoácidos y un peso molecular de 44 kDa, codificada por el gen *GPR30*, mapeado en la banda 22.3 del brazo corto del cromosoma 7 humano. Este gen está conformado por 2 exones y 1 intrón de aproximadamente 3.0 kpb los cuales, generan cuatro diferentes transcritos por procesamiento alternativo que son traducidos en el mismo polipéptido. Su transcrito tiene una longitud de 2604 pb, con un marco de lectura de 1128 pb. Este receptor presenta una alta homología con el receptor de la angiotensina II tipo 1 y el receptor de la interleucina 8, por lo que ha sido clasificado como un miembro más de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Albanito et al., 2008; Carmeci et al., 1997; Feng and Gregor, 1997; Molina et al., 2020; Rae and Johnson, 2005).

### 2.3. Ligandos de GPR30

Si bien se desconoce el ligando natural específico para este receptor, actualmente se sabe que los estrógenos inducen fuertemente su actividad biológica y estimulan varias de las mismas vías de señalización rápidas y génicas que emplean los receptores de estrógenos nucleares clásicos para favorecer la proliferación celular (Hernández-Silva et al., 2020; Maggiolini and Picard, 2010; Prossnitz et al., 2007; Prossnitz and Barton, 2009).

Además de los estrógenos, GPR30 puede ser estimulado por fitoestrógenos (Molina et al., 2018; Ososki and Kennelly, 2003), xenoestrógenos, pesticidas (DDE, dicloro difenil dicloroetileno; DDT, dicloro difenil tricloroetano), herbicidas (atrazina) (Girgert et al., 2018; Hernández-Silva et al., 2020; Prossnitz and Barton, 2009; Prossnitz and Barton, 2011) y por fármacos que se utilizan en los tratamientos para el cáncer de mama como antagonistas del RE, como el tamoxifeno y el raloxifeno (Chan et al., 2020; Dennis et al., 2011; Prossnitz et al., 2007).

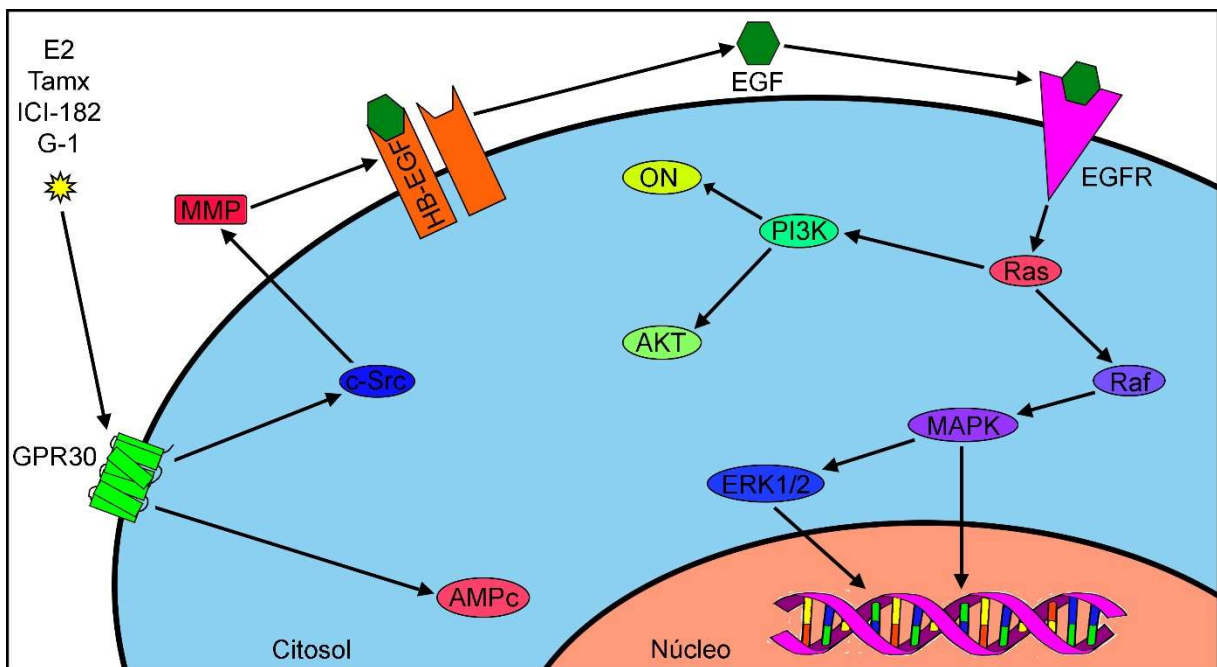
De modo que para poder estudiar la actividad de GPR30 de manera específica se han sintetizado tanto un agonista selectivo, G1 (1-[4-(6bromobenzo-[1,3]-dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro3H-cyclopenta-[c]-quinolin-8-yl]-ethanone), como antagonistas selectivos, G15 (4-(6-bromo-benzo-[1,3]-dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta-[c]-quinoline) y G36 [4-(6-bromo-benzo-[1,3]-dioxol-5-yl)-8isopropyl-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta-(c)-quinoline] (Dennis et al., 2009; Dennis et al., 2011; Méndez-Luna et al., 2016; Méndez-Luna et al., 2015).

### 2.4. Señalización GPR30

Se ha reportado que dentro de las vías de transducción que dispara la estimulación de GPR30 por sus ligandos, están la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y la

movilización de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular (Olde and Leeb-Lundberg, 2009). También activa a la proteína tirosina cinasa Src (c-Src), que es responsable de la fosforilación de las metaloproteinasas 2/9 que liberan el factor de crecimiento epidérmico unido a heparina (HB-EGF), para inducir la cascada de fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)/ fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K)/proteína cinasa de serina/treonina (AKT), conduciendo a la activación subsiguiente de las vías de transducción de señales que participan en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Harari et al., 2007; Herbst, 2004).

Además de los rápidos eventos de señalización antes mencionados, GPR30 también puede regular la actividad transcripcional mediante la activación de los mecanismos de señalización que implican a proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), (Dennis et al., 2011) y proteína cinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2) (Fig. 1), lo cual promueve diferentes respuestas biológicas, tales como la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular (Filardo, 2000; Filardo, 2020; Filardo and Thomas, 2012; Hernández-Silva et al., 2020; Maggiolini and Picard, 2010).



**Figura 1. Mecanismos de transducción de señales de GPR30.** La estimulación de GPR30 desencadena múltiples efectores que dan como resultado la producción de adenosín

monofosfato cíclico (AMPc), así como la activación de proteína tirosina cinasa Src (c-Src), que activa la metaloproteinasa de la matriz (MMP) conduciendo a la liberación del factor de crecimiento epidérmico unido a heparina (HB-EGF), para transactivar a los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La activación de EGFR conduce a múltiples eventos posteriores, incluida la activación de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) y fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K). Como resultado, la estimulación de GPR30 puede conducir a la progresión del ciclo celular y a la proliferación celular.

## 2.5. Regulación transcripcional de la expresión de GPR30

Como se ha visto, GPR30 es un receptor que se expresa tanto en células sanas como en células malignas, participando activamente en diversas vías de señalización, las cuales desencadenan el crecimiento y la proliferación de células cancerosas (Chan et al., 2020; Ge et al., 2012; Lappano et al., 2014). Sin embargo, hasta ahora es muy poco lo que se conoce en relación a su regulación a nivel transcripcional, mecanismos que a su vez regulan su expresión en células cancerosas y/o sanas.

Recchia *et al.*, evaluaron el aumento en la expresión de GPR30 en respuesta a la hipoxia, una condición característica del cáncer cuando las células más internas de un tumor dejan de contar con un suministro de sangre oxigenada. Observaron que el CoCl<sub>2</sub>, un inductor de hipoxia, podía estimular la transcripción de GPR30, a través de la interacción funcional del factor inducible por hipoxia 1-alfa (HIF-1 $\alpha$ ) con tres elementos de respuesta a hipoxia (HREs) que localizaron dentro de la región promotora de *GPR30*, en células de cáncer de mama SKBR3. También realizaron ensayos de silenciamiento del HIF-1 $\alpha$ , bloqueando de esta manera la expresión de GPR30 (Recchia et al., 2011).

Otro estudio realizado por Vivacqua *et al.*, demostró que a través de la activación de la vía que transduce el EGFR, por EGF y TGF $\alpha$ , se induce a la expresión de *c-fos*, el cual se une al elemento AP-1 localizado en la región promotora del gen *GPR30*, aumentando la expresión de GPR30 en las células MCF-7 (Vivacqua et al., 2009).

Por otra parte, Sheng *et al.*, en su estudio con bisfenol A (BPA), un componente de los plásticos de policarbonato y con una estructura semejante a la del 17 $\beta$ -estradiol, encontró que a bajas concentraciones de BPA se daba un incremento en la expresión de GPR30. Incremento que era promovido por la unión del factor de transcripción *c-fos* al elemento AP-1 localizado en la región promotora del gen *GPR30*, causando una retroalimentación positiva entre GPR30 y *c-fos* (Dong *et al.*, 2011; Sheng *et al.*, 2013).

Sin embargo, estudios de la función que ejerce la expresión de GPR30 en el cáncer de mama resultan contradictorios, ya que se ha reportado que la expresión de este receptor de estrógenos (GPR30) puede regular negativamente la proliferación o migración, a pesar de que su expresión disminuye considerablemente en cada grado de diferenciación del cáncer de mama (Ariazi *et al.*, 2010; Filigheddu *et al.*, 2011; Poola *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2014a). Esta reducción en su expresión se ha atribuido al silenciamiento dado por la hipermetilación de las regiones flanqueantes río arriba de las islas CpG del gen *GPR30* (Weissenborn *et al.*, 2017; Weissenborn *et al.*, 2014a; Weissenborn *et al.*, 2014b), probablemente promovido por los cambios que ejerce el microambiente celular generado por la progresión del cáncer de mama.

El estudio realizado por nuestro grupo de investigación, en torno a la actividad transcripcional de la región promotora del receptor de estrógenos transmembranal GPR30, encontró evidencias que sugieren la interacción funcional del sitio de regulación transcripcional de alta homología con el elemento consenso para factores de la familia ETS localizado entre -625 a -631 del promotor de *GPR30* y uno o más de los factores de transcripción de la subfamilia *Polyomavirus enhancer activator 3 protein* (PEA3).

Debido al papel que desempeñan, tanto GPR30 como los factores de la subfamilia PEA3 en la carcinogénesis, el estudio de la posible transactivación de *GPR30* por la familia de factores de transcripción PEA3, aporta conocimientos en cuanto a los mecanismos de regulación transcripcional que gobiernan el patrón de expresión diferencial de GPR30 entre los subtipos de cáncer de mama metastásicos y no metastásicos. Esta información podría ser de utilidad para el diseño de nuevas estrategias que permitan el diagnóstico y tratamiento oportuno de pacientes con cáncer de mama, ya que las estrategias y métodos de detección de cáncer de mama actuales no han logrado evitar el incremento en el porcentaje de fallecimientos por cáncer de mama en gran parte debido a la carencia de tratamientos dirigidos a blancos terapéuticos específicos que son expresados por células en distintos grados de diferenciación del cáncer de mama. Lo anterior deja en evidencia la necesidad de contar con

mayor información sobre los mecanismos moleculares que regulan de manera específica la expresión génica de las células de cáncer de mama con fenotipo metastásico y no metastásico.

En este sentido, GPR30 podría funcionar como un biomarcador de cáncer de mama (Lappano et al., 2014; Olde and Leeb-Lundberg, 2009), así como de los factores de transcripción que impulsan su expresión en células de cáncer de mama, ya que se ha visto que los reguladores que participan en los mecanismos transcripcionales han demostrado ser buenos marcadores y blancos terapéuticos para diferentes patologías como HE4 en el cáncer de ovario (Dochez et al., 2019), AFP en cáncer de hígado (Gómez-Rodríguez et al., 2012), RE y RP en cáncer de mama (Beenken and Bland, 2002; Colomer et al., 2018; Vivanco, 2010), entre otros; ofreciendo información sobre el cáncer, el grado de malignidad, si es posible usar terapia dirigida y si el cáncer responderá al tratamiento.



### 3. Preguntas de investigación

¿Cuál es el papel de GPR30 en el crecimiento y migración de células de cáncer de mama con fenotipo metastásico y no metastásico?

¿Existen elementos de regulación transcripcional en la región promotora de GPR30 que expliquen su patrón de expresión en el cáncer de mama?

### 4. Hipótesis

La interacción funcional de algunos de los elementos reguladores en *cis* localizados en la región promotora de *GPR30* con algún factor de transcripción, tendrá implicaciones en la regulación transcripcional de GPR30 y por lo tanto en su expresión y en los procesos celulares que este receptor regula en las células de cáncer de mama.

### 5. Objetivo general

Determinar nuevos elementos en *cis* de la región promotora de *GPR30* que ayuden a explicar su patrón de expresión y su función en células de cáncer de mama.

#### 5.1. Objetivos específicos

- A. Contextualizar la importancia de la expresión de GPR30 en células de cáncer de mama.
- B. Establecer los posibles elementos reguladores de la región promotora de *GPR30*.
- C. Comprobar funcionalmente la interacción del posible elemento regulador en *cis* hallado en la región promotora de GPR30 con el factor de transcripción involucrado en la transactivación del gen *GPR30*.
- D. Evaluar la expresión de los factores de transcripción involucrados en la regulación transcripcional de *GPR30* en un contexto celular maligno en comparación con uno sano.
- E. Determinar la importancia de la regulación transcripcional de *GPR30*, causada por los factores de transcripción involucrados, en la sobrevivencia de células de cáncer de mama.

## 6. Material y Métodos

### 6.1. Líneas celulares

Se emplearon como modelos de estudio a las líneas celulares provenientes de tejido mamario: MCF-10A, células que expresan un fenotipo de célula epitelial sana; MCF-7, células con fenotipo tumoral no invasivo de carcinoma ductal de mama ER $\alpha$  (+); y MDA-MB-231, células de fenotipo metastásico triple negativo, derivadas de carcinoma mesénquimal invasivo de mama. Las células fueron cultivadas en los medios: *Mammary Epithelial Cells Growth Medium (MEGM)* (Lonza, Walkersville, MD, USA) suplementado con toxina de *Vibrio cholerae* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MD, USA) para el caso de las células MCF10A; en *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* (Gibco, Carlsbad, CA, USA) para las células MCF-7 y en medio *Leibovitz's L-15* (Gibco) para las células MDA-MB-231. Todos los medios de crecimiento fueron suplementados al 10% de suero fetal bovino (SFB) y todos los cultivos fueron incubados a 37°C, en una atmósfera húmeda y con 5% de CO<sub>2</sub>. Las líneas celulares se examinaron para detección de micoplasma mediante el sistema comercial *PCR Mycoplasma detection set*

(Takara Bio, inc.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. También se autentificaron por secuenciación mediante electroforesis capilar en *3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.).

## 6.2. Extracción de proteínas totales y nucleares

Se extrajeron proteínas totales y nucleares de las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231. Para el caso de la extracción de proteínas totales, se sembraron  $1.5 \times 10^6$  células en placas de 60 mm y se incubaron a 37°C, en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 48 horas. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con 1 ml de solución salina de fosfatos (PBS 0.01M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.016M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01M, NaCl 137 mM) antes de ser lisadas con amortiguador de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Tris/HCl 1M pH 7.4, EDTA 6.5M pH 8.0, NaCl 5M, Deoxyocolato 0.4%, IGEPAL-CA-630 0.8%), PMSF (*Phenylmethyl sulfonyl fluoride*), Complete Mini (Roche, Indianápolis, IN, USA). Las células se rasparon y se depositaron en un tubo de microcentrifuga para ser homogeneizadas mediante agitación vigorosa cada 2 minutos por un periodo de 10 minutos a 4°C. Finalmente se centrifugaron a 14600 g durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante para ser cuantificado.

Por otra parte, para la extracción de proteínas nucleares se sembraron  $3 \times 10^6$  células en placas de 100 mm y se incubaron bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con solución salina de fosfatos PBS 0.01M y se despegaron de la placa con Tripsina/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.25%. Las células colectadas fueron centrifugadas a 300 g por 3 minutos y la pastilla celular fue lavada dos veces con PBS 0.01M, se decantó y la pastilla de células fue resuspendida en amortiguador A (10mM HEPES pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl, 1mM NaF, 0.5mM DTT, 1mM ortovanadato de Na, NP-40 0.5%, *Complete Mini* (Roche)) y se obtuvo un homogeneizado celular mediante agitación vigorosa cada 2 minutos, durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se centrifugó durante 1 minuto a 4200 g a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. La pastilla fue nuevamente resuspendida en amortiguador B (RIPA, *Complete Mini* (Roche), 1mM NaF, 1mM ortovanadato de Na) y mezclada vigorosamente a intervalos de 5 minutos durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, el extracto se centrifugó a 12400 g durante 10 minutos

a 4°C y el sobrenadante, que contiene las proteínas nucleares, se recuperó para ser cuantificado.

La cuantificación de las proteínas totales y nucleares se realizó por duplicado mediante el método de Bradford (Bradford, 1976; Kruger, 1994) en un equipo *NanoDrop 2000/2000c* (Thermo Fisher Scientific, Delaware, USA), midiendo la absorbancia a 595nm.

### 6.3. Detección de proteínas por *Western blot*

Las detección de proteínas específicas se realizó por inmunoblot, las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE 10%). En el caso de GPR30, se emplearon 80 µg de proteína total de cada una de las líneas celulares antes mencionadas y se usó extracto de proteína total de la línea celular OVCAR3 (donado por la MC Isis Santos Paniagua) como control positivo. Previamente a la carga del gel, las muestras se sometieron a una incubación a 98°C durante 5 minutos, para asegurar la desnaturalización total de las proteínas. Para la separación de las proteínas se usó una cámara de electroforesis *Mini-Trans-Blot* (BioRad, Hercules, CA, USA) a 100 volts durante 2.5 horas.

La transferencia se realizó en membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) equilibradas en amortiguador de transferencia (Tris Glicina 10x, metanol 20%), mediante una cámara de transferencia semiseca *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad) a 20 volts durante 1.2 horas. La membrana se bloqueó con solución de bloqueo: solución salina tamponada con tris (TBS) 1x (Tris 50mM, NaCl 140mM), Tween-20 0.1% (TBS-Tween 0.1%) y albumina sérica bovina (BSA) 4% por 1 hora.

Posteriormente, la membrana se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario específico para GPR30, *Anti-GPR30* (Abcam, Cambridge, MA, USA) a una dilución de 1:625 en TBS-Tween 0.1% con BSA 4%; y como control de carga se detectó la expresión de la proteína constitutiva GAPDH, para lo cual se incubó con el anticuerpo primario *Anti-GAPDH* (Merck KGaA,) a una dilución de 1:10,000. La membrana se lavó tres veces durante 15 minutos cada lavado, con amortiguador TBS-Tween 0.1%. Después, las membranas se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios específicos para cada anticuerpo primario: IgG anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson

ImmunoResearch, Baltimore, USA) empleado para GPR30 y IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch) para GAPDH. A continuación, la membrana se lavó tres veces durante 10 minutos cada lavado, con amortiguador TBS-Tween 0.1%.

Para la detección de las proteínas se utilizó el sistema comercial de quimioluminiscencia *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce, Meridian Rd, Rockford, IL USA). La señal quimioluminiscente de las bandas se observó usando el escáner de membranas LI-COR *C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner* (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) con una exposición de 12 minutos y posteriormente se analizó por el software *Image Studio v2.1* (LI-COR Biosciences).

Para el caso de las proteínas específicas de los factores de transcripción del grupo PEA3, las proteínas nucleares fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Se cargaron 80 µg de proteínas nucleares y se usó como control positivo extracto de proteínas totales de tejido de cerebro de ratón para ER81, extracto nuclear comercial de células K562 (Santa Cruz Biotechnology, Delaware, CA, USA) y para PEA3 extracto nuclear comercial de MCF-7 (Santa Cruz Biotechnology), ya que se ha reportado que la línea celular MCF-7 expresa abundantemente a ERM (Baert et al., 1997). Previo a la carga del gel, las muestras se sometieron a una incubación de 98°C durante 5 minutos, para asegurar la desnaturalización total de las proteínas. La electroforesis se realizó en una cámara *Mini-Trans-Blot* (BioRad) a 75 volts durante 2.5 horas.

La transferencia se llevó a cabo en membranas PVDF (Millipore) equilibradas en amortiguador de transferencia, con una cámara de transferencia semiseca *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad) a 70 mA durante 6 horas. Las membranas fueron bloqueadas con solución de bloqueo (TBS 1x, Tween-20 0.1% con leche sin grasa en polvo al 5%) durante 1 hora.

Las membranas se incubaron a 4°C por 16 horas en agitación con el anticuerpo primario específico Anti-ERM (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:250; Anti-ER81 (Abcam) a una dilución 1:250; y Anti-PEA3 (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:100 en TBS-Tween 0.1% con BSA 4% para ERM, ER81 y PEA3 respectivamente. Las membranas fueron lavadas durante 15 minutos con amortiguador TBS-tween 0.1% tres veces. Posteriormente se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios específicos a cada anticuerpo primario: IgG anti-conejo acoplado a la peroxidasa de rábano (Jackson InmunoResearch) para ERM y ER81; IgG anti-ratón acoplado a

peroxidasa de rábano (Jackson InmunoResearch) para PEA3. Finalmente, las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos cada lavado con amortiguador TBS-Tween 0.1%.

Para la detección específica de proteínas se utilizó el sistema comercial de quimioluminiscencia *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce). La señal quimioluminiscente de las bandas se observó usando el escáner de membranas LI-COR *DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner* (LI-COR Biosciences) a una exposición de 12 minutos y posteriormente analizada por el software *Image Studio v2.1* (LI-COR Biosciences).

#### 6.4. Ensayos de crecimiento celular

Las células MDA-MB-231 y MCF-7 se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad de  $7.5 \times 10^3$  células y se incubaron durante 24 horas a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente, las células se sincronizaron mediante un ayuno de 16 horas con medio sin SFB. Pasado el ayuno, las células se estimularon con G1 y G15 (Azano Biotech, Albuquerque, NM) a concentraciones de 0, 1 y 10 µM para G1 y 0, 10 y 20 µM para G15, en sus correspondientes medios de crecimientos. El efecto de las diversas concentraciones de G1 y G15 sobre el crecimiento celular, se analizaron a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la estimulación.

Para su análisis las células se fijaron con 100 µl de formaldehído al 1.1% durante 15 minutos, se retiró el formaldehído y se lavaron 3 veces con 100 µl de agua bidestilada, se retiró el agua y se dejaron secar a temperatura ambiente. Después de que las células se secaron a temperatura ambiente, se tiñeron con 30 µl de cristal violeta al 0.1% en ácido fórmico durante 20 minutos. El exceso de cristal violeta se retiró y las células se lavaron tres veces con 100 µl de agua bidestilada, se quitó el agua y se dejaron secar a temperatura ambiente y se adicionaron 100µl de ácido acético a cada pozo, manteniéndolos en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la absorbancia de cada pozo se determinó a 590 nm utilizando el lector de microplacas *Synergy HT* (BioTek, Winooski, VT, EE. UU.).

## 6.5. Ensayo de migración celular

Se sembraron  $7.5 \times 10^5$  células MDA-MB-231 y MCF-7 en placas de 12 pozos con medio Leibovitz's para MDA-MB-231 y DMEM para MCF-7, ambos medios suplementados con 10% de SFB. Las células se incubaron a 37°C, en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5% hasta alcanzar la confluencia celular. Para la sincronización de las células, primero fue retirado el medio de crecimiento y las células se lavaron tres veces con 1 ml de PBS 0.01M.

Posteriormente, las células se dejaron en ayuno durante 24 horas en su respectivo medio sin SFB. Para realizar la herida la monocapa fue cuidadosamente segmentada por la mitad con una punta de pipeta de 100 µl estéril. Las células se lavaron tres veces con 1 ml de PBS 0.01 M para eliminar las células desprendidas por la acción de la herida. Después, las células adheridas restantes se incubaron con los diversos tratamientos contenidos en medio Leibovitz's o DMEM sin SFB. Los tratamientos consistieron en dimetilsulfóxido (DMSO) (vehículo / control), 5 µM de G1 (Azano Biotech), 10 µM G15 (Azano Biotech) y la combinación de G1 (5 µM) + G15 (10 µM).

Las células se incubaron a 37°C, en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5% durante diferentes tiempos (0, 24 y 48 horas) y se tomaron imágenes en diversas zonas a lo largo de la herida utilizando un microscopio *Axiinvert 25* (Carl Zeiss AG) con un objetivo *CP-Achromat 10x / 0.25 Ph1* (Carl Zeiss AG) y una cámara fotográfica digital *PowerShot A580* (Canon, Inc.) equipada con un adaptador de cámara *DC150* (Leica Microsystems GmbH). El procesamiento y análisis de las imágenes fue realizado con el programa de cómputo, *Icy Bioimage Analysis v2.0.3.0* (<http://icy.bioimageanalysis.org>), midiendo la distancia existente entre los bordes de la herida en cada intervalo de tiempo establecido.

## 6.6. Clonación del promotor génico de GPR30

Para la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico, se cultivaron las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 en placas de 100 mm hasta llegar a una densidad del 75% en medios de cultivo DMEM y Leibovitz's respectivamente, ambos medios suplementados

al 10% con SFB. Las células se cosecharon con Tripsina/EDTA 0.25% y se lavaron con PBS, antes de ser lisadas con buffer de extracción pH 8.0 (Tris/HCl 1M, EDTA 0.5M, RNAsa 100µg/ml, SDS 10%).

La suspensión de ambas células se mantuvo a 37°C durante una hora y posteriormente se incubó durante 3 horas a 55°C. Pasado el tiempo de incubación, se llevaron a cabo las extracciones con fenol equilibrado en Tris/HCl 0.1M pH 8.0 y las fases se separaron centrifugando el lisado a 2000 g durante 15 minutos. La fase acuosa se recuperó en un tubo de centrifuga para llevar a cabo la precipitación del ADN genómico de cada línea celular con acetato de amonio 7.5 M y etanol absoluto en una proporción de 1:16. La solución se dejó precipitando toda la noche a -20°C. El ADN genómico obtenido de cada línea, se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 4600 g por 5 minutos. El precipitado se secó y eluyó en buffer Tris/EDTA. La cuantificación de cada muestra de ADN genómico se realizó por duplicado en un equipo *NanoDrop 2000/2000c* (Thermo Fisher Scientific), midiendo la absorbancia a A260 y A280.

Posteriormente, usando como molde el ADN genómico extraído anteriormente de cada línea celular, se amplificó por PCR un fragmento de ~2kpb el cual contiene la región promotora del gen *GPR30* humano. La reacción se preparó con los cebadores de polimerización específicos (Tabla 1) y con Taq DNA polimerasa *Expand Long Template PCR System*, (Roche). El programa de temperaturas empleado consistió en 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 segundos, con un alineamiento a 50.4°C por 1 minuto y una polimerización a 68°C por 4 minutos, seguido de una extensión final a 68°C por 7 minutos.

El producto de amplificación de ambas líneas celulares se ligó al vector pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) y el plásmido resultante pGEM-GPR30 se propagó en células competentes *E. coli JM109* (Promega). Cuatro clonas positivas de cada línea celular se seleccionaron para la preparación de ADN plasmídico mediante el sistema comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Cada clona se secuenció por el método de incorporación de dideoxinucleótidos fluorescentes usando el sistema comercial *Big Dye Terminator* (Applied Biosystem).

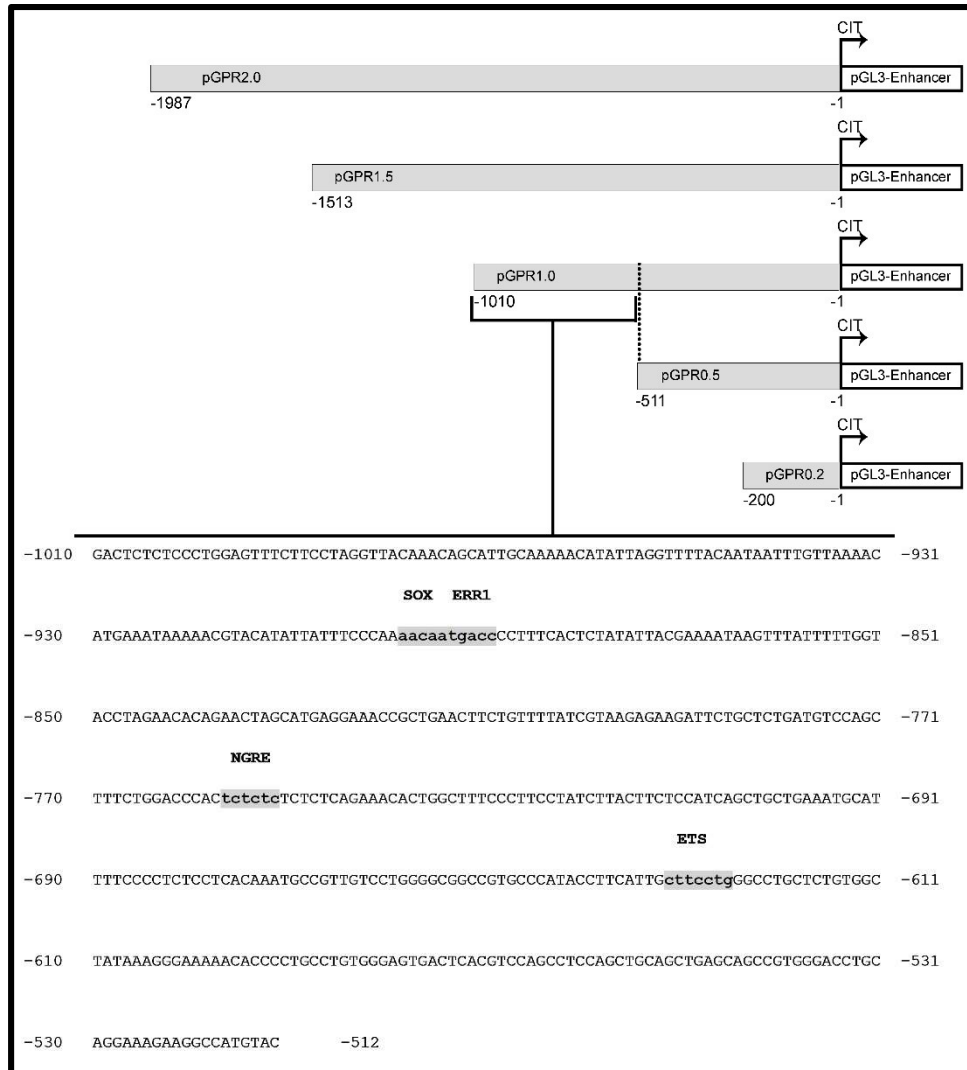


**Tabla 1. Oligonucleótidos usados en las aplicaciones de los ensayos.**

Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5'→3')	Longitud (nt)
ADN Genómico		
5FGPR30-s2	5'-AAGCAATAGGTCAACAAATCTCTAG-3'	25
5FGPR30-as	5'-GTCTCTGCACCGTGCAGCTTTCAAGA-3'	26
Construcciones reporteras		
GPR30-s2000	5'-ACGCAGATCTTGTCAACAAATCTCTAG-3'	27
GPR30-s1500	5'-ACGCAGATCTTCTTGGGCACCTGTCCCTAG-3'	29
GPR30-s1000	5'-ACGCAGATCTTACTCTCTCCCTGGAG-3'	27
GPR30-s500	5'-ACGCAGATCTTTTCCCACAGGCGACTC-3'	27
GPR30-s200	5'-ACGCAGATCTTAGCATCTGTTCTTCCC-3'	27
GPR30-as	5'-ACGAAGCTTGTCTCTGCACCGTGCAGC-3'	27
Transcripción inversa-PCR		
GPR30	S: 5'-TTCAGCAGTGCCGTGTAGA-3'	19
	As: 5'-GTGTGCAGCTCCCGAGTC-3'	18
ERM	S: 5'-GTTGTGCCTGAGAGACTGGAAG-3'	22
	As: 5'-CATTGGCTGGGTCATCAAGAAG-3'	22
PEA3	S: 5'-CCCAACAAATGCCCATTTTCATTGC-3'	24
	As: 5'-AACGCTCACCAGCCACCTTC-3'	20
ER81	S: 5'-GTACCACGACCCAGTGTATGAAC-3'	23
	As: 5'-GGATGAGCCAGGAAGCCTTC-3'	20
GAPDH	S: 5'-GCTCTCTGCTCCTCCTGTTTC-3'	21
	As: 5'-ACGACCAAATCGTTGACTC-3'	19
Mutagénesis		
ETS1 $\mu$ -s	5'-TACCTTCATTGCCCCCTGGGCCTGCTC-3'	27
ETS1 $\mu$ -as	5'-GAGCAGGCCAGGGGGCAATGAAGGTA-3'	27
SOX5 $\mu$ -s	5'-ATTTCCCAAACCATGACCCCTTTC-3'	25
SOX5 $\mu$ -as	5'-GAAAGGGGTGATGGAAAAGGGAAAT-3'	25
ERR1 $\mu$ -s	5'-TCCCAAACAATTTCCCCTTTCACTC-3'	26
ERR1 $\mu$ -as	5'-GAGTGAAAGGGGAAATTGTTTTGGGA-3'	26
NGRE $\mu$ -s	5'-ACTCTCTCCCTGTTGTTTCTTCCTAG-3'	26
NGRE $\mu$ -as	5'-CTAGGAAGAAACAACAGGGAGAGAGT-3'	26
ETS1c-s	5'-TACCTTCATTACTTCCGGTGCCTGCTC-3'	27
ETS1c-as	5'-GAGCAGGCACCGGAAGTAATGAAGGTA-3'	27

## 6.7. Diseño y elaboración de construcciones génicas reporteras

Una vez que se obtuvo el plásmido pGEM-GPR30, que contiene la secuencia de 1987 pb de la región promotora de *GPR30*, obtenido a partir del ADN genómico de la línea celular MCF-7, fue usado como molde para la amplificación por PCR de cinco segmentos de diferentes longitudes (~2.0 kpb, ~1.5 kpb, ~1.0kpb, ~0.5 kpb y ~0.2 kpb) de la región promotora del gen *GPR30* humano (Fig. 2). Para la preparación de las reacciones, se usaron cebadores de polimerización específicos para cada segmento seleccionado (Tabla 1). Cada uno de los oligonucleótidos en sentido, contiene un sitio de restricción para la endonucleasa *Bgl* II en el extremo 5', mientras que el oligonucleótido en antisentido contiene un sitio de restricción para la endonucleasa *Hind* III. Las reacciones se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de PCR mencionadas previamente. Los productos de PCR se purificaron mediante el sistema comercial *GeneClean III Kit* (MP Biomedical, Solon, Ohio, USA) y posteriormente fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bgl* II y *Hind* III (Roche). Cada segmento digerido fue nuevamente purificado y clonado en el vector reportero *pGL3-Enhancer* (Promega) previamente digerido con las enzimas de restricción *Bgl* II y *Hind* III (Roche). Las construcciones resultantes (pGPR2.0, pGPR1.5, pGPR1.0, pGPR0.5, y pGPR0.2) fueron propagadas en células competentes *E. coli JM109* (Promega). Tres clones de cada construcción se seleccionaron para verificar la fidelidad de los segmentos clonados mediante el sistema de secuenciación anteriormente mencionado.



**Figura 2. Representación esquemática de las construcciones génicas reporteras de la región promotora de GPR30.** En la parte superior se muestran las supresiones sucesivas de 5' a 3' de la región promotora de GPR30 ligadas al vector reportero pGL3-Enhancer; indicado con corchete se muestra la secuencia nucleotídica de ~500 pb que va de la construcción de -511 pb (pGPR0.5) a la construcción de -1010 pb (pGPR1.0), en sombreado y con letra minúscula se indican los elementos seleccionados para las mutagénesis sitio dirigidas; SOX, *SRY-box transcription factor* (SOX); ERR1 *estrogen-related receptor1*; NGRE, *negative glucocorticoid response element*; ETS, *E26 transformation-specific*; CIT, codón de inicio de la traducción.

## 6.8. Mutagénesis sitio-dirigida

Mediante el uso del programa de cómputo, JASPAR (<http://jaspar.genereg.net>), se realizó un análisis predictivo de los elementos en *cis* putativos, determinándose los posibles elementos involucrados en la regulación transcripcional del promotor de GPR30. Una vez realizado el análisis se tomó como molde la construcción pGPR1.0 y se llevó a cabo reacciones de mutagénesis sitio dirigida en el “core” de los elementos *E26 transformation-specific* (ETS), *estrogen-related receptor1* (ERR1), *negative glucocorticoid response element* (NGRE) y *SRY-box transcription factor* (SOX) (Fig. 2). En el caso específico del elemento ETS, se realizó una modificación en su secuencia nucleotídica para la pérdida de función (mutante) y otra para mejora de la función (consenso) de dicho elemento. Los elementos fueron modificados a través de PCR usando cebadores de polimerización específicos para cada una de las diferentes construcciones mutantes (Tabla 1). Las reacciones de PCR se catalizaron por *Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase* (Agilent, Stevens Creek Boulevard, Santa Clara, CA, USA) durante 30 ciclos con una desnaturalización a 94°C, 20 segundos, un alineamiento a 56°C durante 30 segundos y una polimerización a 72°C, por 12 minutos; seguido de una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de amplificación fueron digeridos con la endonucleasa *Dpn I* (Roche) y se transformaron en células competentes *E. coli JM109* (Promega). Tres clonas fueron seleccionadas para la preparación de ADN plasmídico mediante el sistema comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Cada clona fue secuenciada para confirmar los cambios en la secuencia nucleotídica causada por la mutagénesis sitio dirigida, así como para verificar la fidelidad del resto de la secuencia nucleotídica. Las construcciones reporteras mutantes con pérdida ( $\mu$ ) y ganancia (c) de función fueron identificadas como ETS<sub>c</sub>, ETS <sub>$\mu$</sub> , ERR <sub>$\mu$</sub> , NGRE <sub>$\mu$</sub>  y SOX <sub>$\mu$</sub> .

## 6.9. Ensayos de transfección transitoria de la región promotora de GPR30

Las células MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231 se sembraron por separado en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad por pozo de  $1.5 \times 10^4$ . Las células se transfectaron transitoriamente con las construcciones génicas reporteras pGPR2.0, pGPR1.5, pGPR1.0,

pGPR0.5, y pGPR0.2. El medio de transfección se realizó mezclando 100 ng de ADN plasmídico (construcción génica reportera), 25 ng del plásmido pRL-tk y 0.4  $\mu$ l de lípido catiónico *FuGENE HD transfection Reagent* (Roche) en 50  $\mu$ l de medio *Opti-MEM* (Gibco) para cada uno de los pozos con las células a transfectar. El medio de transfección se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregó a sus respectivos pozos y se dejó incubar por 15 minutos antes de ser sembradas las células en 50  $\mu$ l de medio de crecimiento para cada línea celular. Las células se dejaron transfectar y expresar por 48 horas sin retirar el medio de transfección. Cabe mencionar que se usó el vector reportero pGL3-Enhancer vacío para determinar el ruido de fondo y al plásmido pRL-tk como control de normalización de la transfección para cada pozo. Para el análisis las células fueron lisadas con 25  $\mu$ l de *Cell Culture Lysis Reagent 1x* (Promega) y la actividad de la regulación transcripcional de las construcciones fue medida utilizando el sistema comercial *Dual-Luciferase Reporter Assay* (Promega) en un luminómetro *Sirius L Single Tube Luminometer* (Huntsville, AL, USA).

#### 6.10. Ensayos de Inhibición de fosforilación *in vitro*

Las células MDA-MB-231 se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad por pozo de  $1.5 \times 10^4$ . Las células se transfectaron con 100 ng de ADN plasmídico (construcciones génicas reporteras pGPR1.0 y pGPR0.5), 25 ng del plásmido pRL-tk y 0.4  $\mu$ l de lípido catiónico *FuGENE HD transfection Reagent* (Roche) en 50  $\mu$ l de medio *Opti-MEM* (Gibco). Este medio de transfección se dejó incubar por 45 minutos a temperatura ambiente, pasada la incubación, el medio de transfección fue depositado en los respectivos pozos dejándose incubar por 15 minutos antes de ser sembradas las células en 50  $\mu$ l de medio de crecimiento. Posteriormente se dejaron transfectar y expresar por 24 horas sin retirar el medio de transfección. Las células transfectadas fueron tratadas con los inhibidores de las proteínas cinasas p38 / SB203580 (Millipore); PKA / H89 (Millipore); y ERK / PD98059 (Millipore) a una concentración final de 10  $\mu$ M en medio de crecimiento durante 48 horas. Como tratamiento control se utilizó DMSO (vehículo) y como control de normalización de la transfección se usó el plásmido pRL-tk. Para la cuantificación de la luminiscencia, las células se lisaron con 25  $\mu$ l de *Cell Culture Lysis Reagent 1x* (Promega) por pozo y la actividad de la regulación transcripcional de las construcciones fue medida utilizando el sistema comercial *Dual-*

*Luciferase Reporter Assay* (Promega) en un luminómetro *Sirius L Single Tube Luminometer* (Huntsville).

#### 6.11. Ensayos de estimulación con ácido retinoico

Las células MCF-7 se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad por pozo de  $1.5 \times 10^4$ . Las células se transfectaron con 100 ng de ADN plásmidico (construcciones pGPR1.0 y pGPR0.5), 25 ng del plásmido pRL-tk y 0.4  $\mu$ l de lípido catiónico *FuGENE HD transfection Reagent* (Roche) en 50  $\mu$ l de medio *Opti-MEM* (Gibco). El medio de transfección se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente, pasada la incubación el medio de transfección fue depositado en los respectivos pozos dejándose incubar por 15 minutos antes de sembrarse las células en 50  $\mu$ l de medio de crecimiento. Las células se dejaron transfectar y expresar por 24 horas sin retirar el medio de transfección, pasado este periodo se retiró el medio de transfección y cada pozo se lavó con 100  $\mu$ l de PBS. Finalmente, las células se estimularon con una de las concentraciones crecientes (0 (Vehículo),  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M) de ácido retinoico (AR) en medio DMEM sin rojo de fenol (Sigma-Aldrich) y suplementado al 10% con SFB tratado (para eliminar las hormonas) con carbón activado (GE Healthcare-HyClone, South Logan, UT, USA) durante 48 horas. Por otra parte, también se realizaron ensayos de transfección transitoria con las construcciones génicas pGPR1.0 (silvestre), ETSc (consenso) y ETS $\mu$  (mutante), aunque en este caso se estimuló únicamente con la dosis de  $10^{-6}$  M de AR. En ambos casos, se usó DMSO como vehículo y como control de normalización de la transfección se usó el plásmido pRL-tk. Para su lectura las células se lisaron con 25  $\mu$ l de *Cell Culture Lysis Reagent 1x* (Promega) por pozo y la actividad de la regulación transcripcional de las construcciones fue medida utilizando el sistema comercial *Dual-Luciferase Reporter Assay* (Promega) en un luminómetro *Sirius L Single Tube Luminometer* (Huntsville).

## 6.12. Ensayos de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT)-PCR

En placas de 60 mm se sembraron  $7.5 \times 10^5$  células de la línea celular MCF-7 con medio *DMEM* suplementado al 10% con SFB y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5% por 24 horas. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 0.01 M y se agregó medio *DMEM* sin SFB y sin rojo de fenol (Sigma-Aldrich) para un ayuno y sincronización de 24 horas. Pasado el periodo de ayuno las células se estimularon con  $10^{-6}$  M de AR en medio *DMEM* sin rojo de fenol (Sigma-Aldrich) suplementado al 10% con SFB tratado con carbón activado (GE Healthcare-HyClone) o con DMSO como control durante 48 horas.

Para extraer el ácido ribonucleico (ARN) total las células se lavaron con PBS 0.01 M frío y se lisaron con 1 ml de Trizol (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). El lisado celular se mezcló vigorosamente con 300 µl de cloroformo (MP Biomedicals) por 30 segundos y se centrifugó durante 40 minutos a 16900 g a 4°C. La fase acuosa se recuperó y el ARN total se precipitó con 1 ml de isopropanol (Amresco, Cochran Road Solon, OH, USA). a -20°C. A continuación, el ARN total se centrifugó 1 hora a 16900 g a 4°C y se retiró el isopropanol. El ARN total se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó por 12 minutos a 16900 g a 4°C, se decantó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, la pastilla obtenida del ARN total se resuspendió en 40 µl de agua tratada con policarbonato de dietilo (*DEPC treated water*) (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

A partir del ARN total obtenido de las células MCF-7 con y sin tratamiento de AR se generó el ADN complementario (ADNc) mediante el sistema comercial *Phusion RT-PCR Kit* (Finnzymes, Woburn, MA, USA). Los ensayos de PCR se realizaron a partir del ADN complementario (ADNc) de la línea celular MCF-7 con y sin tratamiento de AR y el uso de oligonucleótidos de polimerización específicos (Tabla 1) para los transcrito de los genes GPR30, ERM, ER81, PEA3 y GAPDH (usado como control constitutivo). La reacción de PCR se catalizó por el sistema comercial *Clone Amp HiFi PCR Mix*, (Clontech, Mountain View, CA, USA) durante 30 ciclos con una desnaturalización a 94°C, 30 segundos, un alineamiento a 56.5°C (para ER81), 58°C (para ERM), 60°C (para PEA3 y GPR30) durante 45 segundos y una polimerización a 73°C, por 1 minuto, seguido de una extensión final de 5 minutos a 74°C. Los productos de amplificación se resolvieron en gel de poliacrilamida al 10%, teñidos con

bromuro de etidio (0.5 µg / ml) y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta *UVP MultiDoc-It Imaging System* (Analytik Jena AG, Upland, CA, USA).

### 6.13. Ensayos de crecimiento celular en células MCF-7 estimuladas con AR

Las células MCF-7 se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad por pozo de  $7.5 \times 10^3$  y se incubaron a 37°C en atmosfera humedad al 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Para ayunar y sincronizar las células se lavaron con PBS 0.01 M y se les agregó 100 µl de medio *DMEM* sin SFB y sin rojo de fenol (Sigma-Aldrich) a cada pozo durante 24 horas. Pasado el periodo de ayuno las células se estimularon con AR ( $10^{-6}$  M) o con DMSO (control) en medio *DMEM* sin rojo de fenol (Sigma-Aldrich) suplementado al 10% con SFB tratado con carbón activado (GE Healthcare-HyClone) durante 48 horas. Posteriormente, el crecimiento celular se midió a las 0, 24, 48 y 72 horas.

Para su análisis las células se fijaron con 100 µl de formaldehído al 1.1% durante 15 minutos, se retiró el formaldehído y se lavaron 3 veces con 100 µl de agua bidestilada, se retiró el agua y se dejaron secar a temperatura ambiente. Después de que las células se secaron a temperatura ambiente, cada pozo fue teñido con 30 µl de cristal violeta al 0.1% en ácido fórmico durante 20 minutos. El exceso de cristal violeta fue retirado y las células se lavaron 3 veces con 100 µl de agua bidestilada, se retiró el agua y se dejó secar a temperatura ambiente. Para su lectura cada pozo fue desteñido con 100 µl de ácido acético al 10% durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente. La absorbancia de cada pozo se determinó a 590 nm con el lector de microplacas *Synergy HT* (BioTek).

### 6.14. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos están expresados como la media ± desviación estándar. Las comparaciones entre 2 grupos fueron analizadas por ANOVA de una vía, seguido de la prueba post hoc de Tukey. Por otro lado, los efectos generados por las mutagénesis sitio dirigidas, así

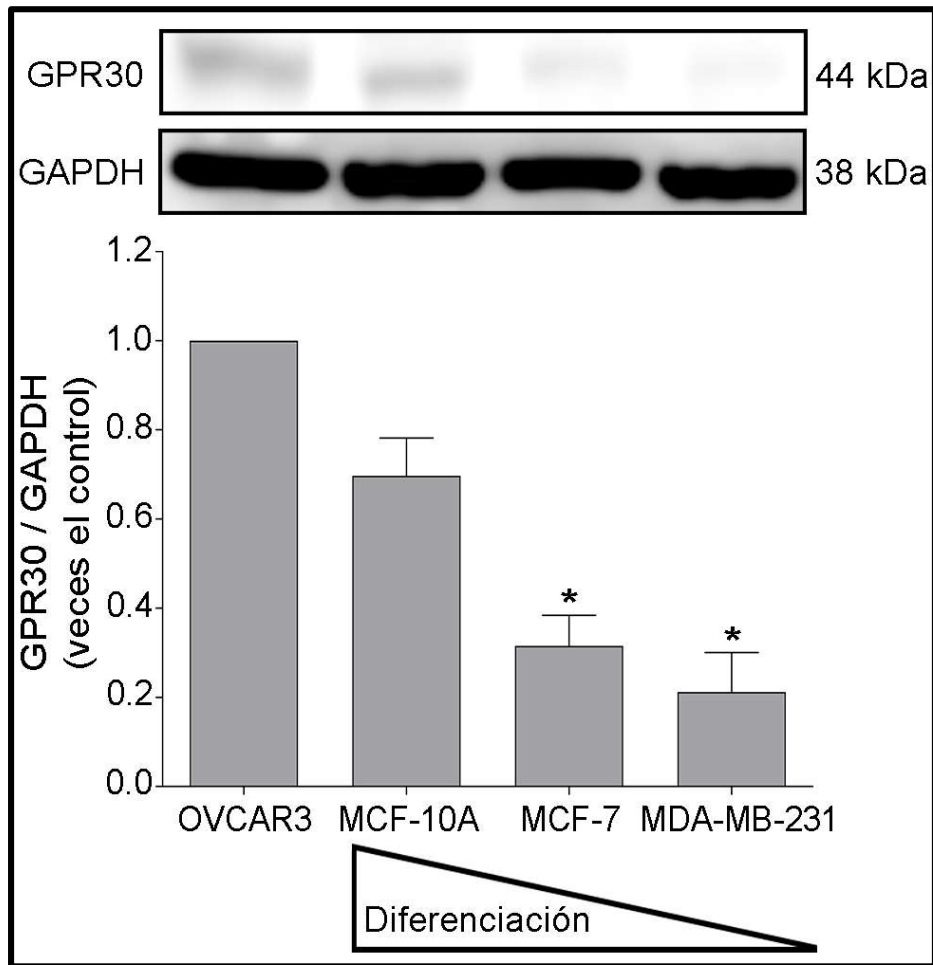


como de los diferentes tratamientos de G1, G15, AR e inhibidores de fosforilación fueron comparados con respecto a la construcción silvestre o al control (vehículo), estos se analizaron mediante la prueba de Dunnett's. Estos análisis se realizaron con el programa de cómputo *SigmaPlot 12.0* (Systat Software, inc) para el sistema operativo Windows. Cada ensayo se realizó por triplicado. Se consideró a la  $P < 0.05$  como diferencia estadísticamente significativa.

## 7. Resultados

### 7.1. La expresión de GPR30 disminuye en células de cáncer de mama

Para evaluar la expresión de GPR30 en cáncer de mama con diferentes grados de diferenciación celular, se comparó directamente el patrón de expresión del receptor transmembranal GPR30 a través de inmunotransferencia en las líneas celulares provenientes de tejido mamario, representado por las células MCF-10A (fenotipo de célula epitelial sana), MCF-7 (fenotipo tumoral no invasivo) y MDA-MB-231 (fenotipo metastásico). Este análisis mostró que todas las líneas celulares empleadas como modelos de estudio fueron positivas para la expresión de una proteína de 44 kDa correspondiente al receptor transmembranal GPR30. Sin embargo, esta expresión presentó una clara variación entre los diferentes grados de malignidad del cáncer de mama probados. Mediante el análisis con densitometría óptica se determinó que la expresión relativa de GPR30 en la línea celular MCF-10A fue de 0.69 veces, de 0.31 veces para el caso de las células MCF-7 y 0.21 veces en la línea celular MDA-MB-231, respecto a la expresión de la proteína en las células OVCAR3, usadas como control positivo (Fig. 3).



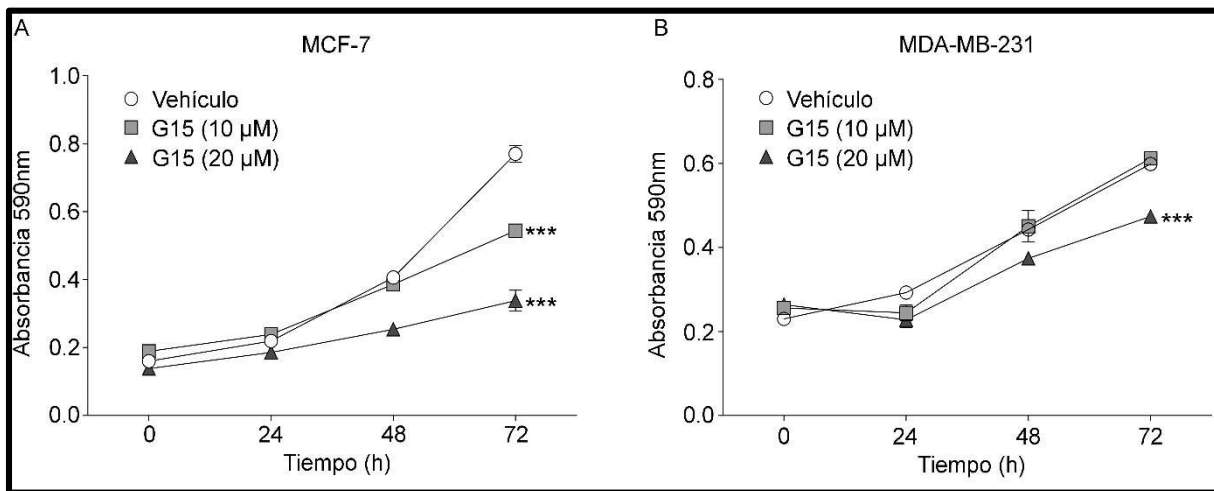
**Figura 3. Expresión del receptor GPR30 en células mamarias.** Inmunotransferencia representativa del nivel de expresión de la proteína de 44 kDa correspondiente a la detección del receptor GPR30 en la línea celular MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231. La línea celular de cáncer de ovario OVCAR3 se usó como control positivo y GAPDH se usó como control de carga y de normalización. Los datos están presentados como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes. \* $P < 0.05$  vs. OVCAR3.

## 7.2. GPR30 regula el crecimiento celular en células metastásicas y no metastásicas *in vitro*

El establecimiento del papel que juega el receptor GPR30 en el crecimiento de células malignas: MDA-MB-231 (metastásicas) y MCF-7 (no metastásica), se realizó a través del tratamiento de GPR30 con su antagonista y agonista selectivo, G15 y G1 respectivamente. Los resultados en torno a la inhibición de la actividad de GPR30 por G15 mostraron que en los casos en donde sólo se aplicó DMSO (vehículo), los valores obtenidos marcaron un destacado crecimiento celular en ambas líneas celulares.

En las células MCF-7 se observó que la cantidad de células aumentó significativamente 4.8 veces a las 72 horas con respecto al número inicial de células. Sin embargo, a partir de las 48 horas de exposición al antagonista G15 se obtuvo una disminución significativa del 19.6% en el crecimiento celular con la dosis de 10  $\mu\text{M}$  y del 27.8% con la dosis de 20  $\mu\text{M}$ , ambas con respecto al vehículo. Esta restricción en el crecimiento celular fue significativamente mayor a las 72 horas de estimulación, ya que se disminuyó un 40.2% con la dosis de 10  $\mu\text{M}$  y 49.3% con la dosis de 20  $\mu\text{M}$ , ambas con respecto al vehículo (Fig. 4-A).

Por otra parte, en las células MDA-MB-231 se observó un aumento significativo en el número de células de 2.6 veces en comparación con la cantidad inicial de células. En cambio, a partir de las primeras 24 horas y hasta las 72 horas de exposición con la dosis más alta de G15 (20  $\mu\text{M}$ ) existe una restricción significativa en el crecimiento de aproximadamente 30% respecto al vehículo. Sin embargo, a pesar de existir una disminución en el crecimiento celular con la dosis de 10  $\mu\text{M}$  a las 72 horas ésta no fue significativa ya que únicamente llega a disminuir un 8.1% en comparación con el vehículo (Fig. 4-B).

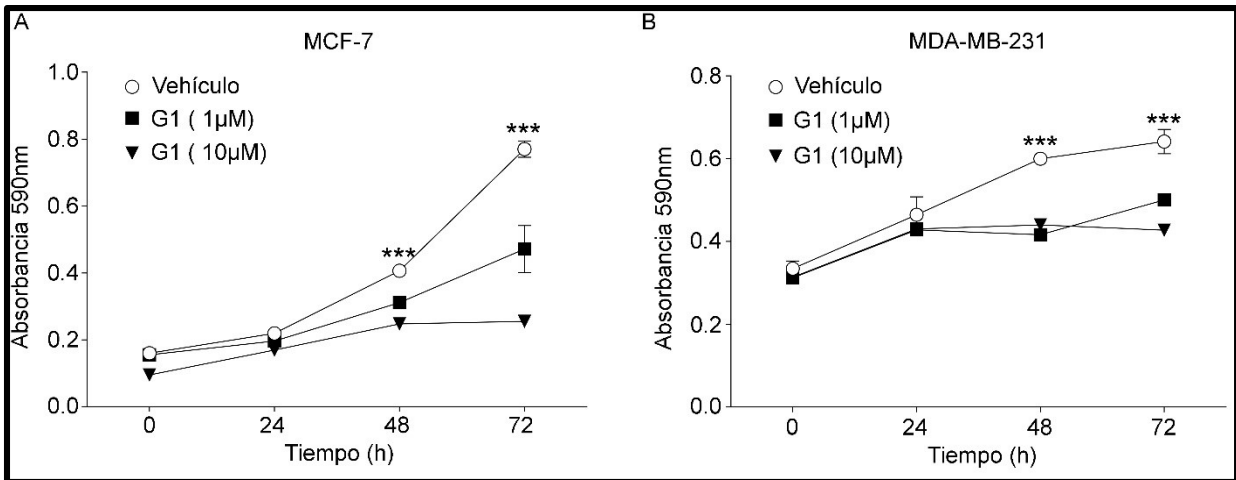


**Figura 4. G15 restringe el crecimiento de células de cáncer de mama a través de GPR30.**

Se aplicaron dosis de G15, antagonista selectivo del receptor GPR30, a concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{M}$ . La exposición a los tratamientos con G15 fue de 0, 24, 48 y 72 horas en las líneas celulares A) MCF-7 y B) MDA-MB-231. En estos ensayos se usó DMSO como vehículo. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes realizados al menos por triplicado. \*\*\* $P < 0.001$  vs. vehículo.

Los resultados con respecto a la activación de GPR30 por G1 mostraron que en ambas líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 se dio una reducción significativa en el crecimiento celular. En las células MCF-7, a partir de las 48 horas de exposición al agonista G1, se presentó una disminución significativa en el crecimiento celular del 23.3% con la dosis de 1  $\mu\text{M}$  y del 39% con la dosis de 10  $\mu\text{M}$ , ambas con respecto al vehículo. Mientras que a las 72 horas de estimulación disminuye un 38.8% con la dosis de 1  $\mu\text{M}$  y 66.9% con la dosis de 10  $\mu\text{M}$ , ambas con respecto al vehículo (Fig. 5-A).

En las células MDA-MB-231 también se observó una disminución significativa en el crecimiento celular a las 48 horas de estimulación del 30.6% con la dosis de 1  $\mu\text{M}$  y del 26.6% con la dosis de 10  $\mu\text{M}$ , ambas con respecto al vehículo. A las 72 horas de exposición a G1 con la dosis de 1  $\mu\text{M}$  se da una disminución significativa del 21.9% y con la dosis de 10  $\mu\text{M}$  del 33.3%, en ambos casos con respecto al vehículo (Fig. 5-B).



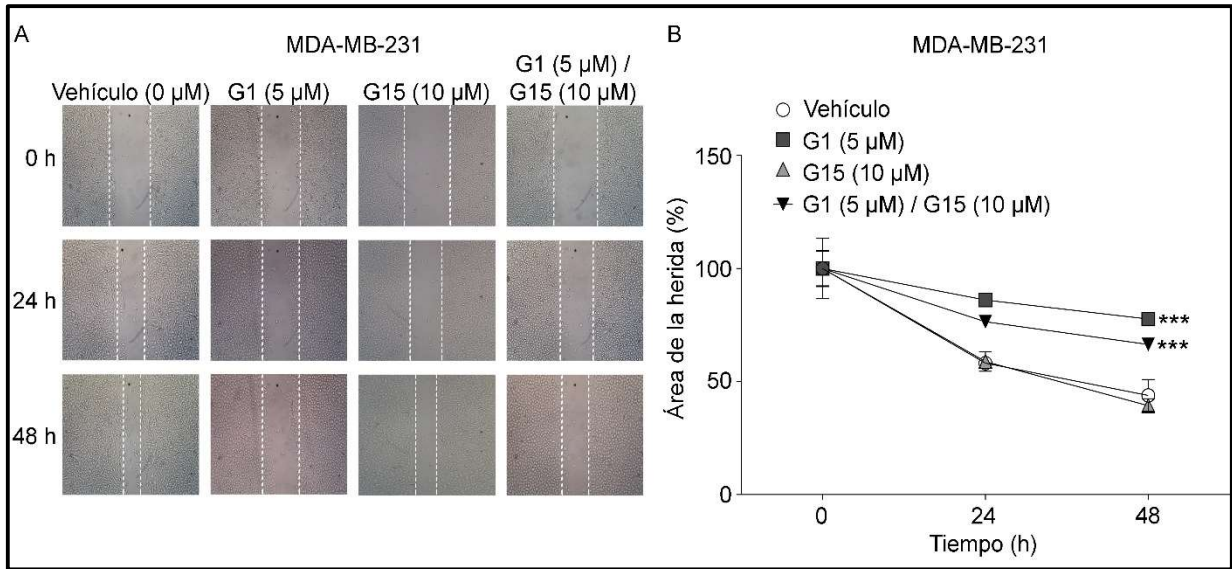
**Figura 5. G1 restringe el crecimiento de células de cáncer de mama a través de GPR30.**

Se aplicaron dosis de G1, agonista selectivo del receptor GPR30, a concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{M}$ . La exposición a los tratamientos con G1 fue de 0, 24, 48 y 72 horas en las líneas celulares A) MCF-7 y B) MDA-MB-231. En estos ensayos se usó DMSO como vehículo. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes realizados al menos por triplicado. \*\*\* $P < 0.001$ .

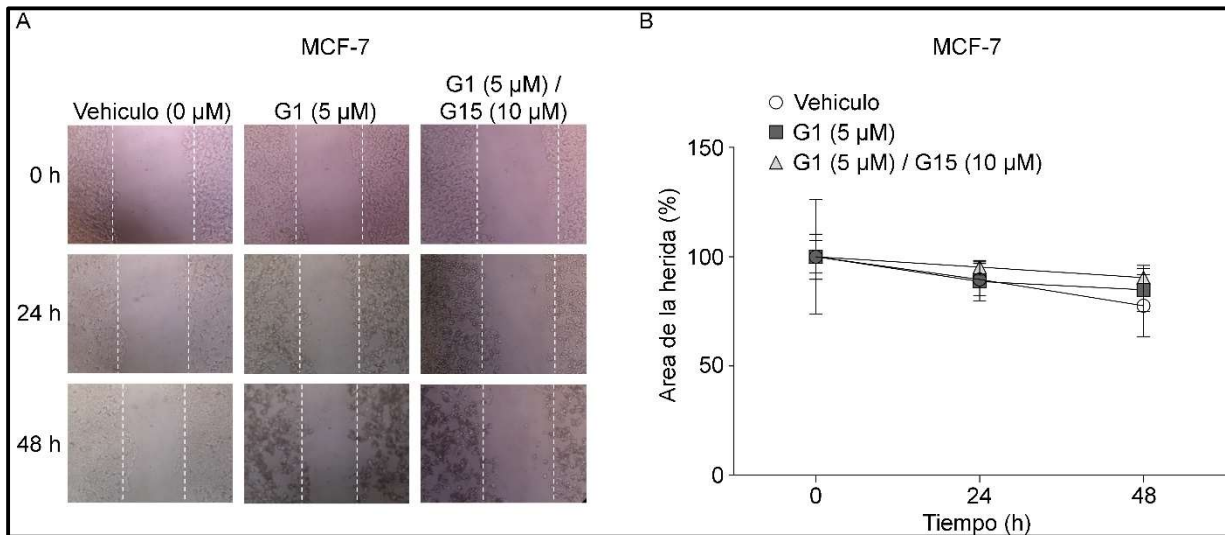
### 7.3. GPR30 regula la migración de células de cáncer de mama metastásico *in vitro*.

A través de ensayos de cicatrización de herida en la monocapa celular, se evaluaron los cambios en la migración de células MDA-MB-231 (metastásicas y triple negativo) a las cuales se les estimuló o bloqueó al receptor GPR30 con G1 y G15, agonista y antagonista respectivamente (Fig. 6-A). Se observó que el área de la herida de la monocapa celular con el vehículo se cierra significativamente un 41% dentro de las primeras 24 horas y un 56% a las 48 horas, ambas con respecto al área del herida inicial (0 horas). Por otra parte, cuando se aplicó el tratamiento con G1, la migración de las células MDA-MB-231 se redujo significativamente, ya que las células con 24 horas de exposición a G1 cerraron un 14% y a las 48 horas un 22%. Esto indicó que, cuando a las células MDA-MB-231 son tratadas con el agonista selectivo de GPR30, G1, existe una restricción significativa en la migración de un 27% a las 24 horas y de un 34% a las 48 horas, ambas en comparación a cuando GPR30 no fue activado (vehículo). Cabe señalar que con la administración de G15, la migración de las células MDA-MB-231 no se ve afectada a lo largo de todo el ensayo ya que no hubo cambio que resultara ser estadísticamente significativo con respecto al control. Es importante mencionar que al administrar ambos tratamientos simultáneamente (G1 + G15) hubo una recuperación en la migración, ya que el área de la herida logró cerrar 24% a las 24 horas y un 34% a las 48 horas. Esto significó una recuperación significativa del 10% y 12% a las 24 y 48 horas, respectivamente, ambas en comparación a cuando solamente se aplicó G1 (Fig. 6-B). Por otra parte, la migración de las células MCF-7 no tuvo cambios significativos en ninguno de los tratamientos ni en el grupo control (Fig. 7).





**Figura 6. La estimulación de GPR30 limita la migración de células metastásicas de cáncer de mama.** (A) Imágenes representativas de las heridas realizadas en la monocapa celular y (B) representación gráfica del porcentaje de migración celular en las heridas con los diferentes tratamientos (DMSO como vehículo, G1 5 $\mu$ M y/o G15 10 $\mu$ M), a diferentes intervalos de tiempo (0, 24 y 48 horas). Los datos de migración se midieron en términos del ancho de la herida, obtenidas de siete cuadrantes por pozo, considerando el ancho inicial de la herida como el 100%. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes realizados al menos por triplicado. \*\*\*P<0.001 vs. vehículo.

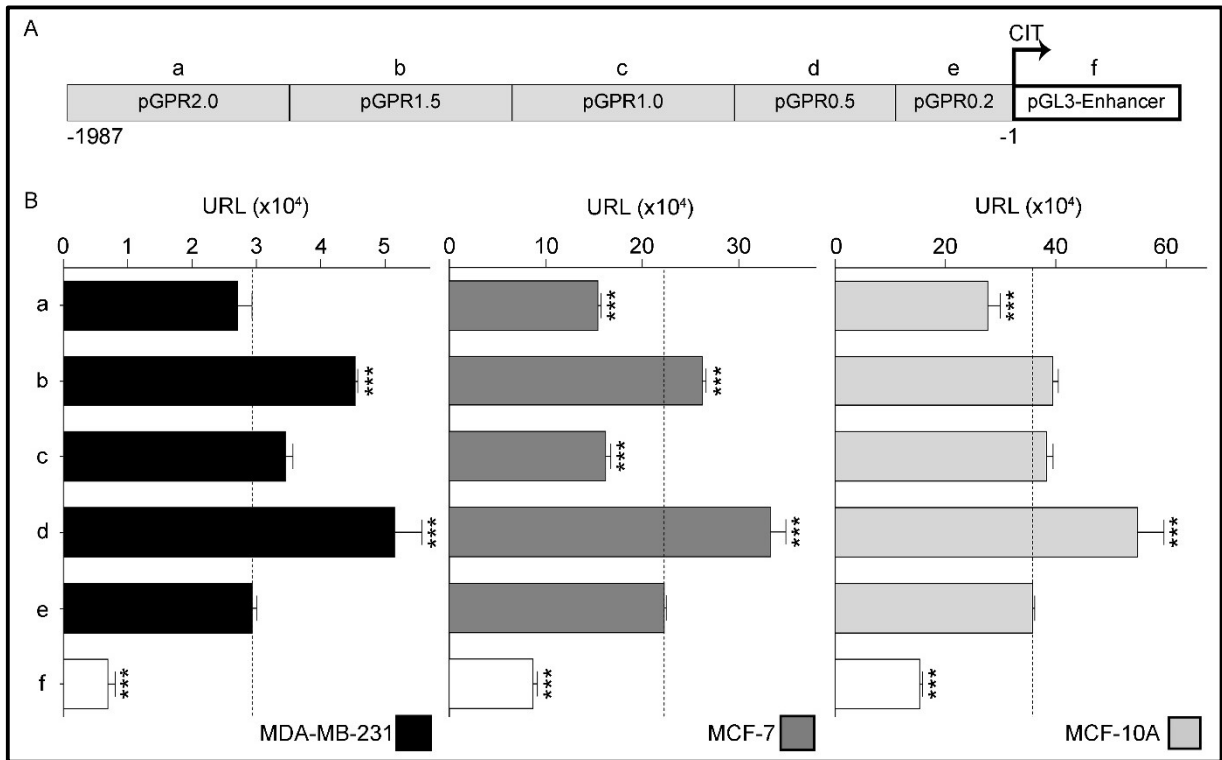


**Figura 7. La migración de células MCF-7 no se ve afectada por la estimulación de GPR30.**

(A) Imágenes representativas de las heridas realizadas en la monocapa celular y (B) representación gráfica del porcentaje de migración celular en las heridas con los diferentes tratamientos (DMSO como vehículo, G1 5  $\mu\text{M}$  y/o G15 10  $\mu\text{M}$ ), a diferentes intervalos de tiempo (0, 24 y 48 horas). Los datos de migración se midieron en términos del ancho de la herida, obtenidas de siete cuadrantes por pozo, considerando el ancho inicial de la herida como el 100%. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes realizados al menos por triplicado.

#### 7.4. Patrón de regulación transcripcional del promotor de GPR30 en líneas celulares derivadas de glándula mamaria

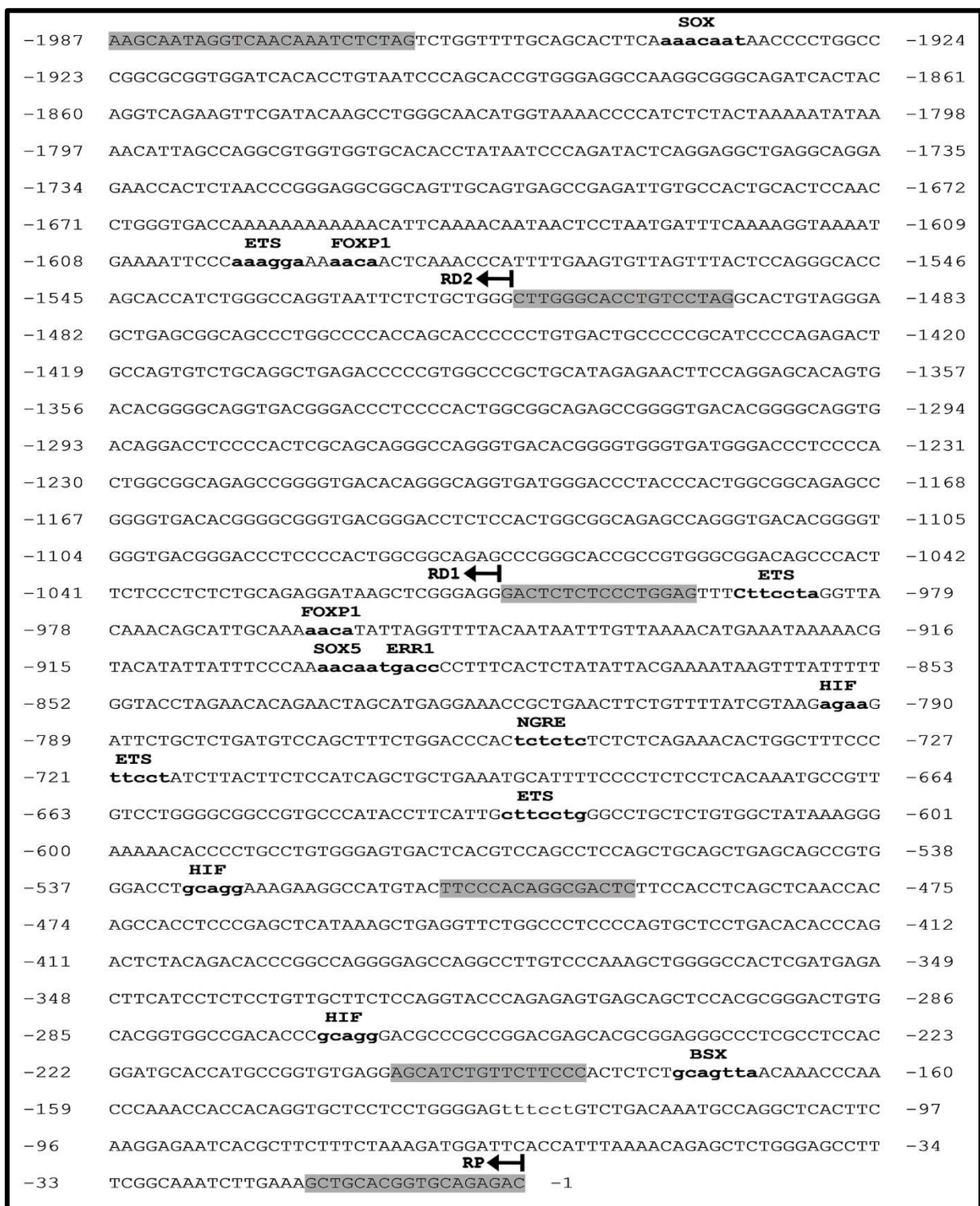
Después de observar que la actividad de GPR30 tiene repercusiones en el crecimiento y la migración de células de cáncer de mama, aún a pesar de presentar un nivel de expresión bajo, se realizaron ensayos de expresión transitoria con la región promotora del gen GPR30, representada por 5 segmentos de diferentes longitudes, en las líneas celulares de glándula mamaria: MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231. En general, las construcciones reporteras mostraron un patrón de regulación transcripcional similar en los tres modelos celulares en estudio. Sin embargo, la magnitud en la actividad transcripcional entre los diferentes contextos celulares resultó ser muy diferente. Los resultados observados de la actividad transcripcional basal (definida como la actividad transcripcional obtenida con la construcción más pequeña de 200 pb y denominada, pGPR0.2) de cada línea celular mostraron que el promotor de GPR30 posee una actividad transcripcional que resultó seis veces menor en las células MDA-MB-231 en comparación con la actividad basal de las células MCF-7 y once veces menor cuando se comparó con la actividad basal de las células MCF-10A. Por otra parte, con la construcción de 1987 pb (pGPR2.0) se obtuvo una actividad transcripcional significativamente menor a la actividad basal sólo en las células MCF-10A y MCF-7 del 60% y 49%, respectivamente. Posteriormente, con la construcción de 1513 pb (pGPR1.5), se observó un aumento significativo en las células MDA-MB-231 del 71% y en las células MCF-7 del 29%, ambas con respecto a la actividad transcripcional basal del promotor. Con la construcción de 1010 pb (pGPR1.0) únicamente las células MCF-7 mostraron una disminución significativa del 44% por debajo de la actividad basal del promotor; mientras que las células MDA-MB-231 y MCF-10A no presentaron cambios que resultaran significativos con respecto a la actividad transcripcional de la construcción pGPR0.2. Finalmente, al disminuir la longitud de la construcción a 511 pb (pGPR0.5), se obtuvo un incremento significativo en la actividad transcripcional del 92% en las células MCF-10A, del 80% en las células MCF-7 y de un 98% en las células MDA-MB-231, todas con respecto a la actividad transcripcional basal (pGPR0.2). Es importante mencionar que este aumento en la actividad transcripcional fue el más alto registrado dentro de todas las versiones truncadas del promotor de GPR30 en las tres líneas celulares en estudio, siendo MCF-10A 1.6 veces mayor que la actividad obtenida por MCF-7 y 8.8 veces mayor que la actividad observada por MDA-MB-231 (Fig. 8).



**Figura 8. Actividad transcripcional del promotor GPR30 en células de glándula mamaria con diferente grado de diferenciación.** A) Se muestra una representación esquemática del plásmido reportero pGL3-Enhancer, gobernado por diferentes segmentos truncados de la región 5' del promotor GPR30: a) pGPR2.0, b) pGPR1.5, c) pGPR1.0, d) pGPR0.5 y e) pGPR0.2. B) Representación gráfica de la actividad transcripcional de las construcciones reporteras transfectadas en células MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231. Se muestra la actividad del plásmido pGL3-Enhancer vacío (barra blanca) como ruido de fondo y la actividad de la construcción pGPR0.2 como actividad transcripcional basal de cada línea celular. URL, unidades relativas de luminiscencia; CIT, codón de inicio de la traducción. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes realizados por triplicado, \*\*\* $P < 0.001$  vs. la actividad de pGPR0.2 (basal).

## 7.5. Elementos reguladores en *cis* de la región promotora del gen GPR30

Aun cuando el alineamiento de las secuencias del promotor de GPR30 clonado de las células MCF-7 y MDA-MB-231 con la secuencias reportada en el Gene Bank (AC091729.4) no reveló ningún cambio nucleotídico que pudiera ser evaluado funcionalmente, el análisis de la regulación transcripcional del promotor de GRP30 reveló una región (-512 a -1010 pb) de regulación diferencial entre las células de cáncer de mama malignas y normales. Para obtener indicios de los elementos posiblemente involucrados en la regulación transcripcional de ésta y otras regiones del promotor de GPR30, se realizó un análisis predictivo de los elementos en *cis* putativos mediante el uso del programa de cómputo JASPAR (<http://jaspar.genereg.net>). El análisis estructural y predictivo de la secuencia nucleotídica que va de -1 a -1987 pb del promotor de GPR30 permitió caracterizarlo en tres regiones; una proximal (de -1 a -1009 pb a partir del CIT) que contiene una secuencia nucleotídica heterogénea; y dos regiones distales (de -1010 a -1512 pb y -1513 a -1987 pb del CIT), las cuales poseen un alto contenido de GC (70%) y de AT (72%), respectivamente. A pesar de que el programa de cómputo JASPAR encontró 14 posibles elementos reguladores en *cis* con una homología superior al 98% en relación con las secuencias consenso a lo largo de la región promotora (de -1 a -1987 pb) de GPR30 en estudio (Fig. 9), únicamente se seleccionaron para su análisis funcional aquellos elementos que se encontraron dentro de la región promotora que va de -512 a -1010 pb, región en donde se observó el mayor cambio en la regulación transcripcional entre las células en estudio. Así mismo, esta zona cumple con los criterios de poseer una alta homología del elemento putativo y una posible interacción con factores de transcripción asociados con el desarrollo del cáncer de mama. En base a lo antes mencionado, los elementos putativos seleccionados para su estudio y análisis fueron: ERR1, NGRE, ETS y SOX.



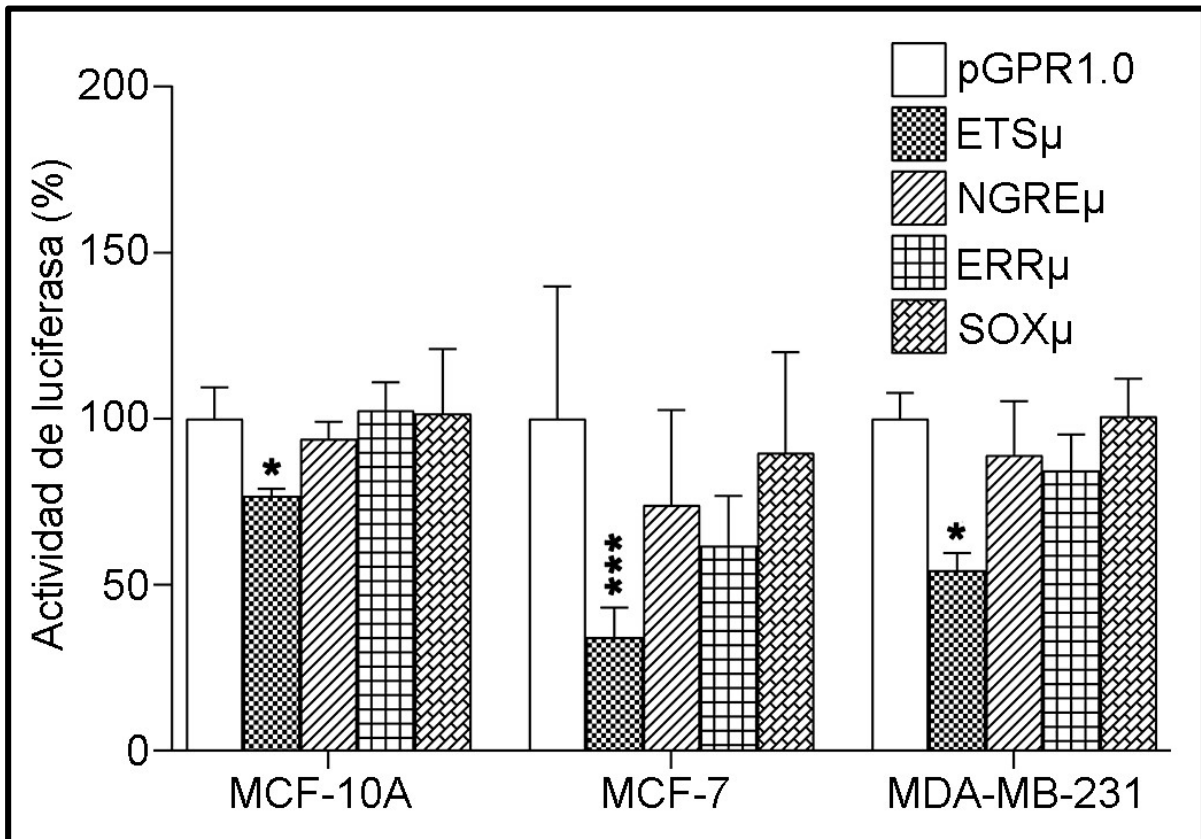
**Figura 9. Secuencia nucleotídica de la región flanqueante 5' del gen GPR30.** Secuencia nucleotídica de -1987 pb a partir del CIT, en letras minúsculas se muestran los probables

elementos reguladores en *cis* encontrados a través de la herramienta bioinformática JASPAR. Indicado con letras sombreadas se encuentran las secuencias de los oligonucleótidos que se emplearon para realizar las construcciones reporteras de las diferentes versiones truncadas del promotor de GPR30. BSX, *brain-specific homeobox*; RD1, región distal 1; RD2, región distal 2; ERR1, receptor 1 relacionado a estrógenos; ETS, E26 de transformación específico; FOXP1, *forkhead box P1*; HIF, factor inducible por hipoxia; NGRE, elemento negativo de respuesta a glucocorticoides; RP, región proximal; SOX, *SRY box transcription factor*.

## 7.6. Funcionalidad de los elementos reguladores en *cis* para ETS, ERR1, NGRE y SOX

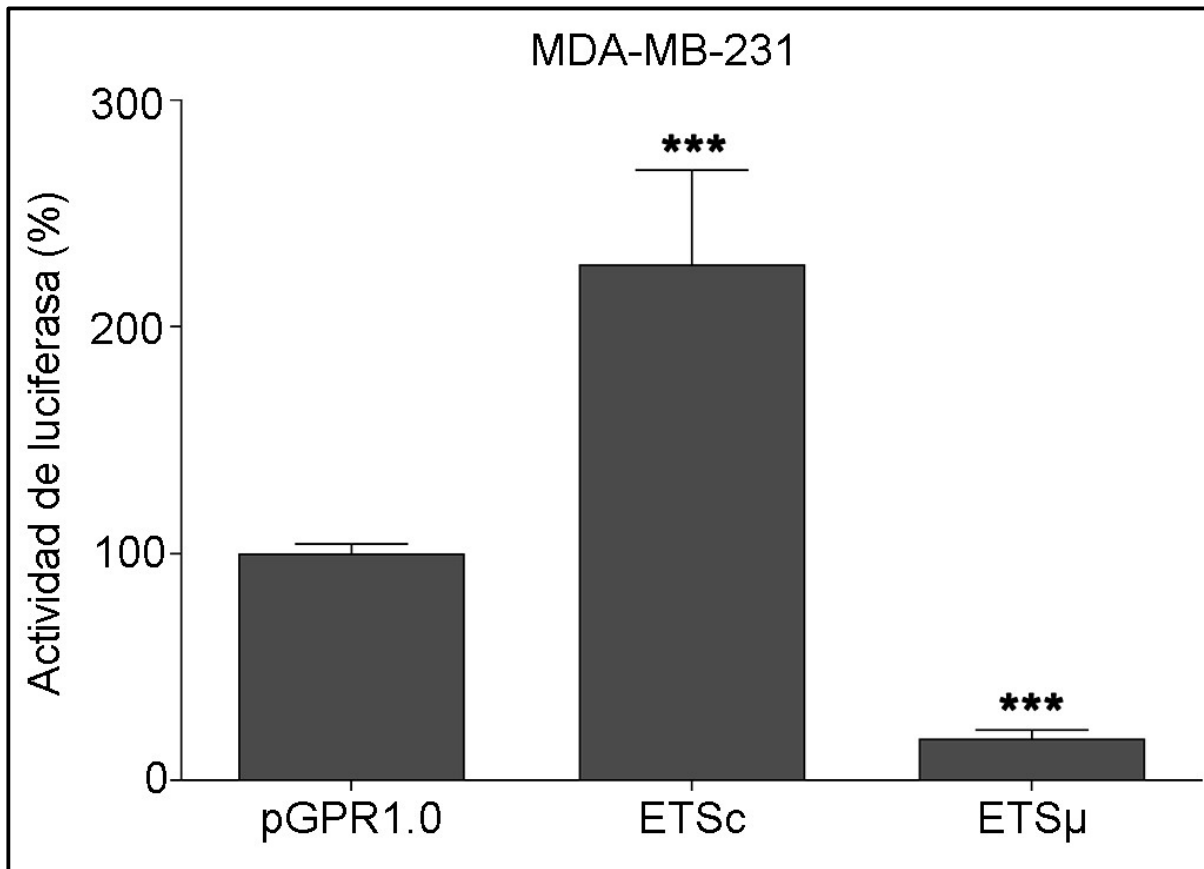
A través de los estudios de expresión transitoria con las construcciones reporteras mutantes con pérdida de función, ETS $\mu$ , ERR $\mu$ , NGRE $\mu$  y SOX $\mu$ , en las células MCF-10A, MCF-7 y MDA.MB-231, se probó la funcionalidad de los elementos reguladores en *cis* putativos en cuestión. De manera general, los resultados de los estudios de expresión transitoria de las construcciones mutantes para pérdida de función, ERR $\mu$ , NGRE $\mu$  y SOX $\mu$ , no presentaron cambios significativos en la regulación transcripcional con respecto a la construcción silvestre pGPR1.0 para todas las líneas celulares de estudio. Sin embargo, inesperadamente la construcción mutante ETS $\mu$  mostró una disminución significativa en la actividad transcripcional relativa del 24% en MCF-10A, del 65.8% en MCF-7 y del 46% en MDA-MB-231, en comparación con la actividad de la construcción silvestre pGPR1.0 (Fig. 10).





**Figura 10. Actividad transcripcional de los elementos reguladores en cis del promotor de GPR30 en células de cáncer de mama con diferente grado de diferenciación.** Se muestra la actividad de la construcción silvestre (pGPR1.0) y de sus versiones mutantes para pérdida de función (ETS $\mu$ , NGRE $\mu$ , ERR $\mu$  y SOX $\mu$ ) en células MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001 vs. pGPR0.1

Posteriormente, para confirmar la funcionalidad del elemento ETS seleccionado, se compararon la actividad de las construcciones mutantes reporteras con pérdida (ETS $\mu$ ) y ganancia (ETS $\sigma$ ) de función con la construcción silvestre mediante ensayos de expresión transitoria en la línea celular triple negativa y metastásica MDA-MB-231, ya que a pesar de presentar la expresión más baja de GPR30, este receptor continúa participando tanto en la proliferación como en la migración de esta línea celular. Los resultados mostraron la funcionalidad del elemento regulador en *cis* para ETS (-625 a -631 pb del CIT) de la región promotora de GPR30, ya que la construcción consenso (ETS $\sigma$ ) causó un aumento significativo en la actividad transcripcional de 1.27 veces más, mientras que la construcción para pérdida de función (ETS $\mu$ ) causó una disminución significativa en la actividad transcripcional de 0.8 veces menor, ambas en comparación con la construcción pGPR1.0, la cual contiene el elemento regulador ETS en su estado silvestre (Fig. 11).



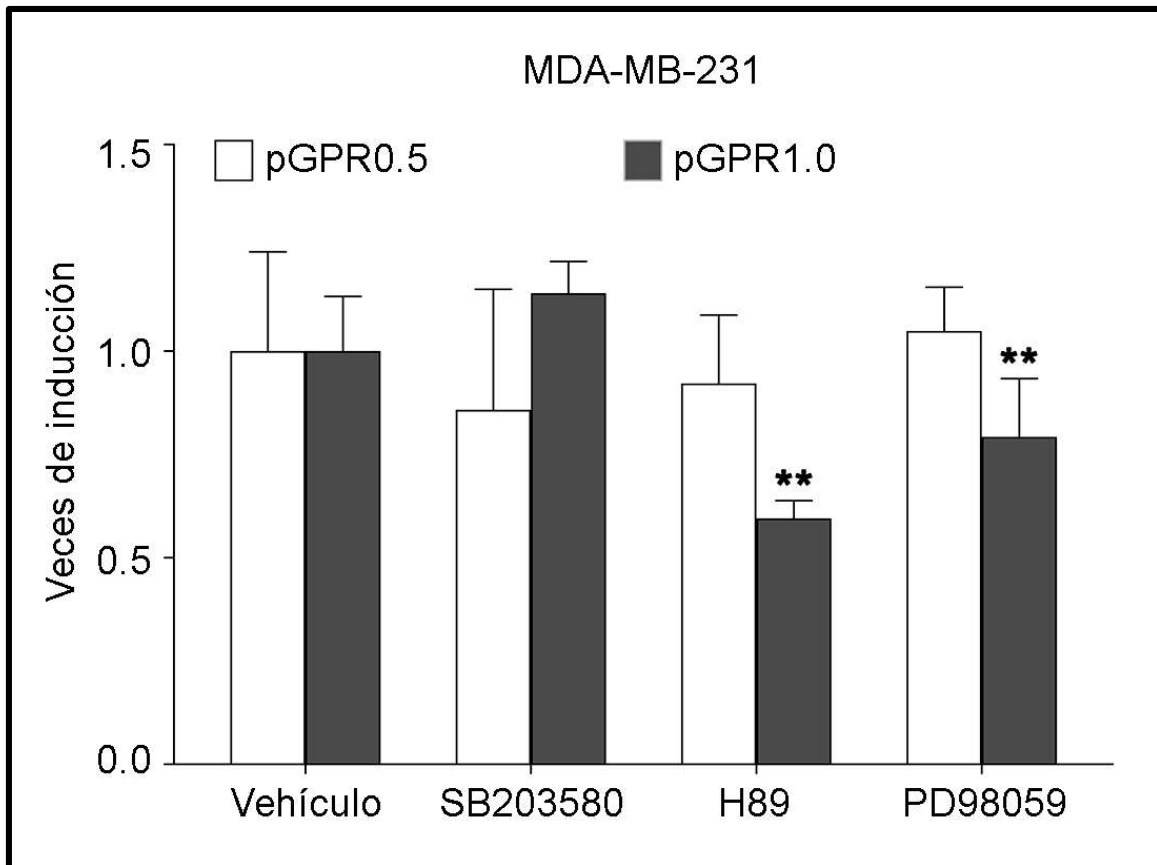
**Figura 11. Funcionalidad del elemento ETS del promotor GPR30 en células de cáncer de mama metastásicas.** Se muestra la actividad de la construcción silvestre (pGPR1.0) y sus versiones mutantes para ganancia (ETSc) y pérdida (ETSμ) de función en células MDA-MB-231. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. \*\*\*P<0.001 vs. pGPR0.1

## 7.7. La actividad de PKA y ERK promueven la regulación transcripcional de GPR30

En los ensayos previos se observó que el elemento ETS localizado entre -625 a -631 pb a partir del CIT es funcional, y ya que este elemento regulador puede ser reconocido por los 27 miembros que conforman a la familia de factores de transcripción ETS, se realizó una discriminación de los posibles factores de transcripción que podrían estar involucrados en la actividad transcripcional observada anteriormente con las construcciones mutantes. Primeramente, se excluyeron aquellos factores de transcripción que han sido reportados con una actividad transcripcional supresora, tales como: *Ets-2 repressor factor* (ERF), *ETS-like gen 3* (ELF3) y ETV6. Por otro lado, también se investigó que transactivadores se han reportado con un incremento en su expresión asociada al desarrollo del cáncer de mama, tales como: Ets-1, Ets-2, PEA3, ERM y ER81 (Galang et al., 2004).

Dado que la fosforilación de los factores miembros de las subfamilias ETS y PEA3 es efectuada principalmente a través de las proteínas cinasas activadas por mitógeno ERK 1/2 y p38, así como por la proteína cinasa A (PKA), se ensayó la expresión transitoria de las construcciones génicas reporteras pGPR1.0 (con elemento ETS) y pGPR0.5 (sin elemento ETS) en la línea celular MDA-MB-231 en presencia de los inhibidores SB203580, H89 y PD98059 las cuales inhiben a las cinasas p38, PKA y ERK1/2, respectivamente.

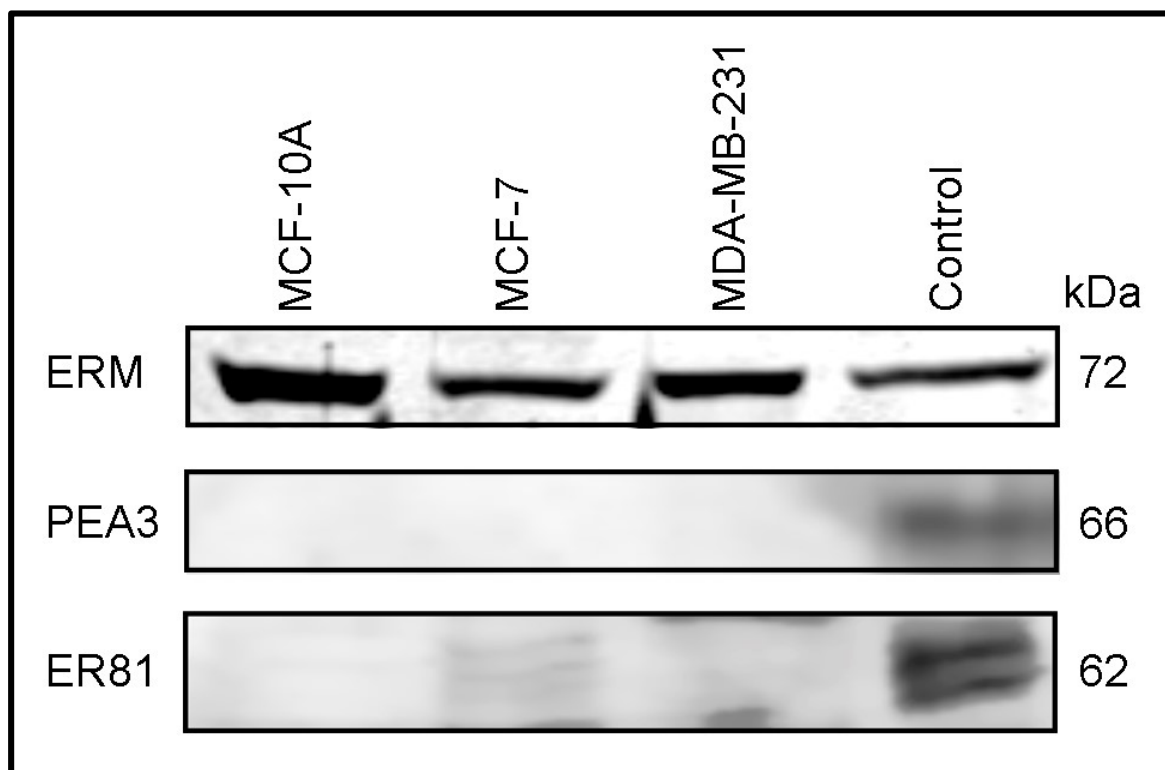
Al comparar la actividad de la construcción reportera pGPR1.0 sin tratamiento (vehículo) con la actividad obtenida con los inhibidores H89 (PKA) y PD98059 (ERK1/2), se obtuvo una disminución significativa de 40% y 21%, respectivamente. Mientras que el tratamiento con el inhibidor SB203580, para la cinasa p38, no presentó cambios que resultaran significativos. Por otro lado, en la transfección de la construcción reportera pGPR0.5 en presencia de los mismos inhibidores no causó cambios que resultaran significativos con respecto al vehículo (Fig. 12).



**Figura 12. Los inhibidores H89 y PDE98069 suprimen la actividad transcripcional del promotor de GPR30.** Se observa el efecto de los inhibidores de p38 (SB203580), PKA (H89) y ERK1/2 (PD98059) sobre la actividad transcripcional de las construcciones reporteras pGPR0.5 (blanco), la cual no posee el sitio funcional ETS y pGPR1.0 (negro) que contiene el sitio ETS, en células MDA-MB-231. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. \*\*P<0.01 vs. vehículo.

## 7.8. ER81 se expresa específicamente en células MCF-7

Dado que la actividad transcripcional de la construcción pGPR1.0 disminuyó con los inhibidores de las proteínas cinasas PKA (H89) y ERK (PD98059), y ya que ambas pueden fosforilar a los factores de transcripción de la subfamilia PEA3 (ERM, ER81 y PEA3), se realizó la detección de estos factores de transcripción en las células MCF-10A, MCF-7 y MDA.MB-231 por inmunotransferencia con el fin de conocer su patrón de expresión. Los resultados mostraron la expresión de una proteína de 72 kDa, correspondiente al factor de transcripción ERM, tanto en las tres líneas celulares en estudio, como en el extracto nuclear comercial de células MCF-7. Por otro lado, la expresión de una proteína de 62 kDa, correspondiente al factor de transcripción ER81, fue detectada únicamente en la línea celular MCF-7 y en el extracto de cerebro de ratón usado como control. Sin embargo, no fue posible detectar la expresión de la proteína de 66 kDa correspondiente al factor de transcripción PEA3 en ninguna de las líneas celulares en estudio, únicamente se observó ésta en el extracto nuclear de células K562 empleadas como control (Fig. 13).

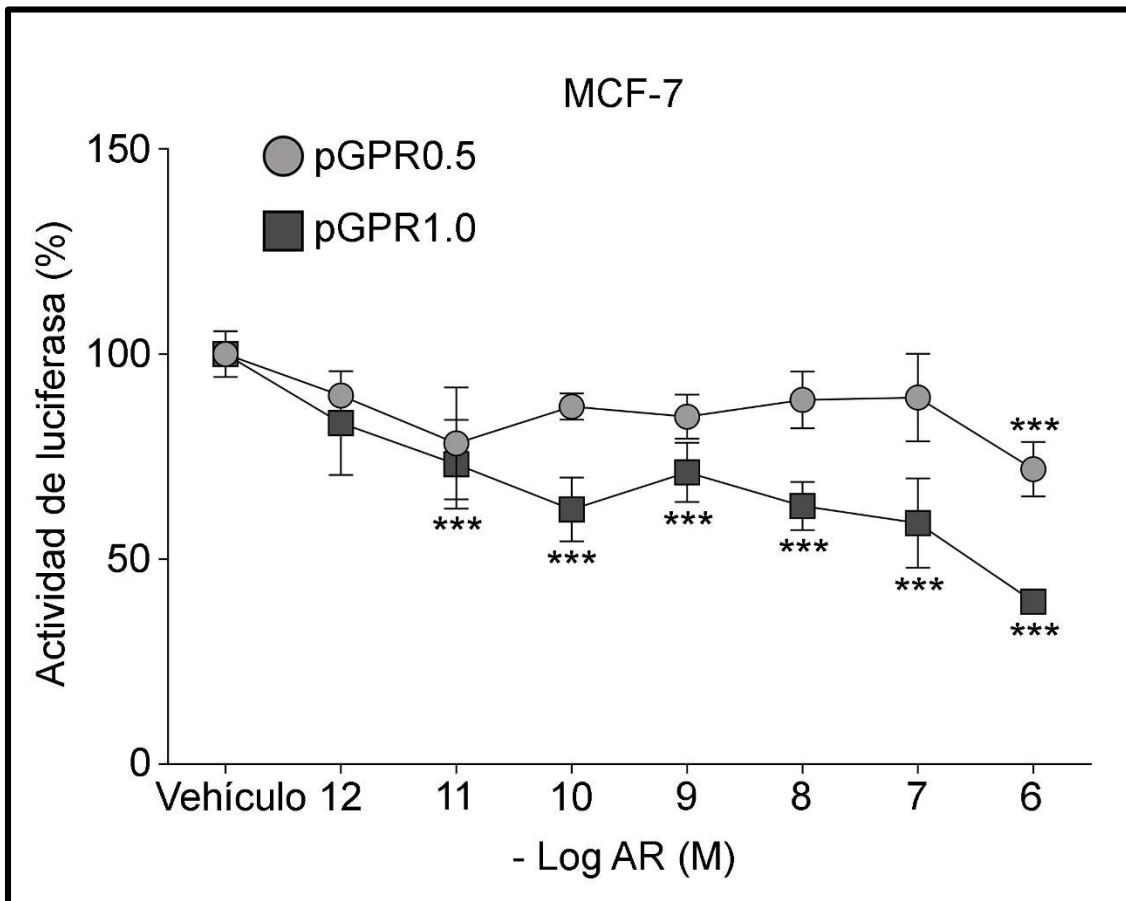


**Figura 13. Detección de los factores de la subfamilia PEA3 en células de tejido mamario con diferentes grados de diferenciación.** La expresión de ERM se detectó en todas las células en estudio, mientras que la expresión de ER81 únicamente se observó en las células MCF-7. PEA3 solo se localizó en el extracto nuclear de células K562, usadas como control. Los controles empleados para ERM y ER81 fueron: extracto nuclear de células MCF-7 y cerebro de ratón, respectivamente.

## 7.9. El AR suprime la actividad transcripcional del promotor de GPR30

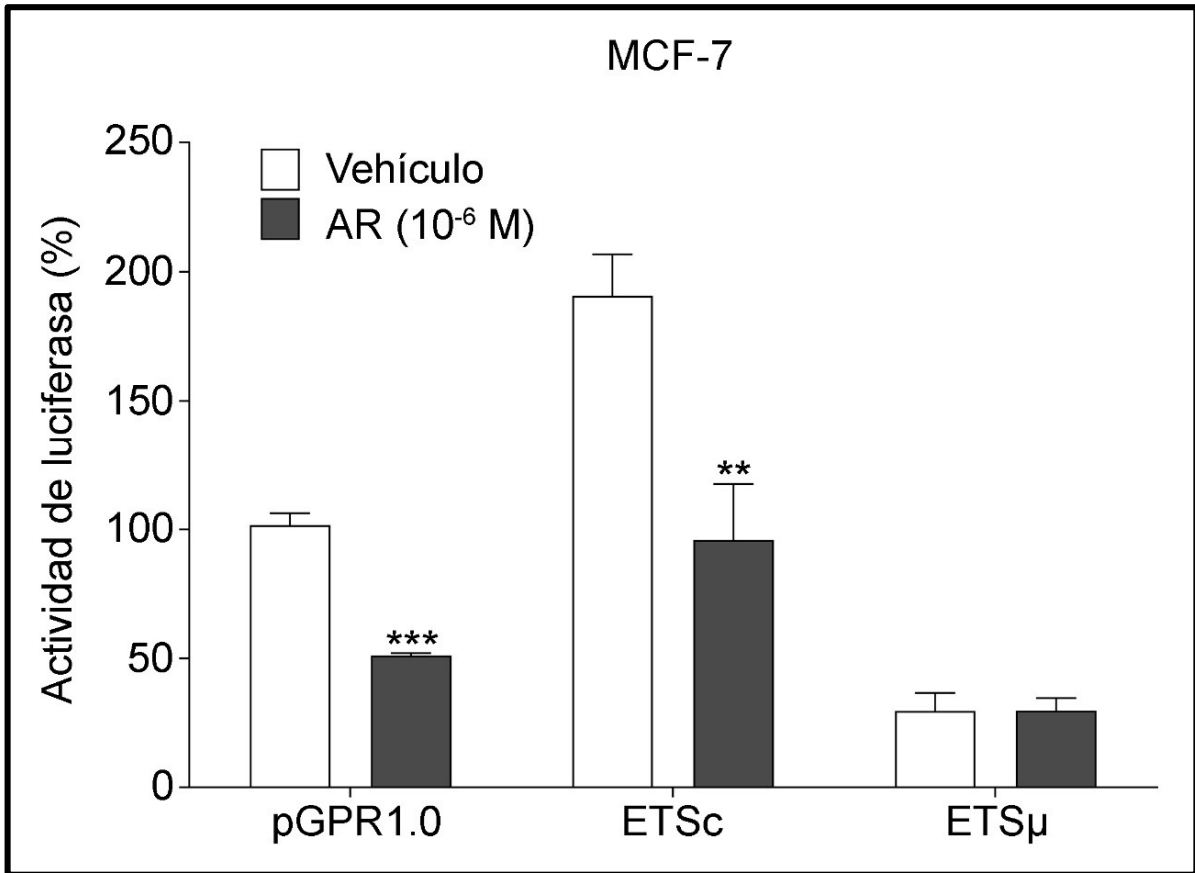
Estudios previos en torno al estímulo con AR en células de cáncer de mama han determinado que la expresión de algunos de los factores de transcripción pertenecientes a la subfamilia PEA3 se ve alterada por la acción biológica de este metabolito del retinol (Afonja et al., 2002; Endo et al., 2008; Xin et al., 1992). Y dado que en la región promotora de GPR30 que va de -511 a -1010 pb a partir del CIT contiene al menos un elemento regulador funcional para factores de transcripción de la subfamilia PEA3, se llevaron a cabo ensayos de expresión transitoria de las construcciones pGPR0.5 (sin elemento ETS) y pGPR1.0 (con elemento ETS) en células MCF-7 estimuladas durante 48 horas con concentraciones crecientes de AR. Fue posible determinar que ambas construcciones del promotor de GPR30 probadas con la concentración más alta ( $10^{-6}$  M) de AR respondieron negativamente al AR. Sin embargo, si se compara con el control (vehículo), únicamente en la construcción pGPR1.0 que posee el elemento regulador funcional ETS en estudio, presentó una tendencia negativa en la actividad transcripcional a partir de la dosis  $10^{-11}$  M de AR, llegando a suprimirla significativamente en un 60% con la dosis más alta ( $10^{-6}$  M AR). En contraste, la construcción pGPR0.5 únicamente con la dosis más alta de AR ( $10^{-6}$  M) logró suprimir significativamente la actividad transcripcional del promotor en un 28% con respecto al control (vehículo) (Fig. 14).





**Figura 14. Supresión de la actividad transcripcional del promotor de GPR30 por AR en células de cáncer de mama MCF-7.** La gráfica muestra la actividad de las construcciones génicas reporteras pGPR0.5 (círculo gris), sin elemento ETS, y pGPR1.0 (cuadro negro), con el elemento ETS, en células MCF-7 expuestas a una curva de dosis respuesta de AR. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. \*\*\* $P < 0.001$  vs. vehículo.

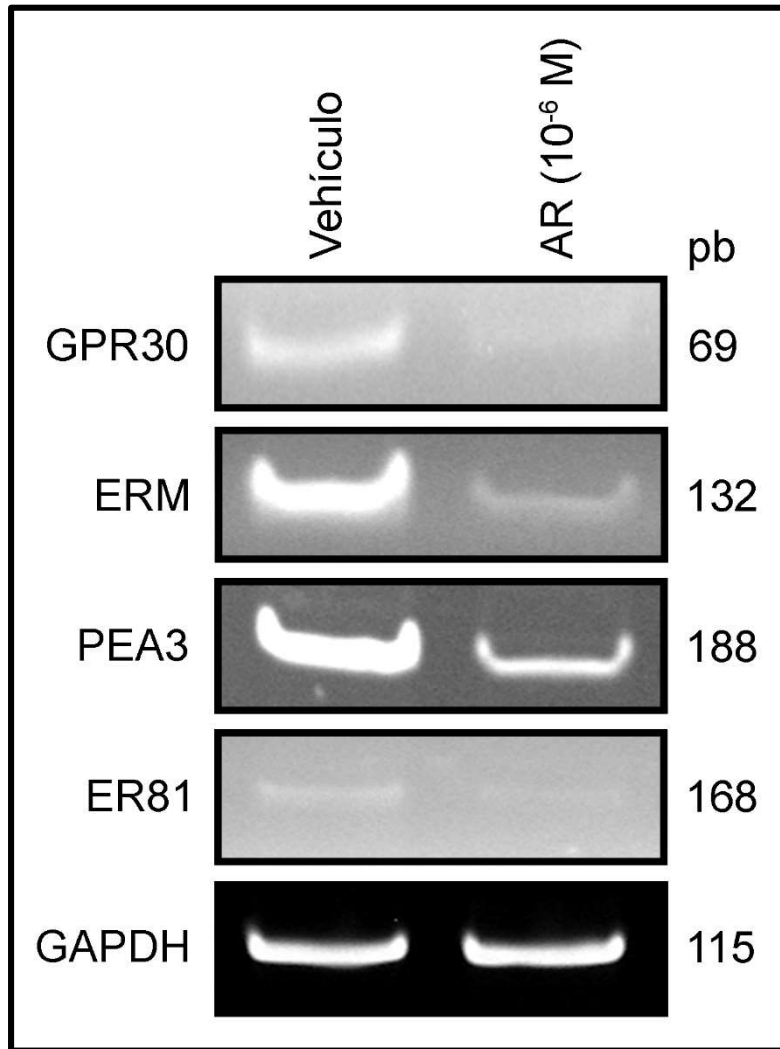
Por otra parte, al probar el efecto de AR sobre la actividad de las construcciones reporteras que contienen las mutaciones para pérdida (ETS $\mu$ ) y ganancia (ETS $c$ ) de función del elemento regulador para ETS de la región promotora de GPR30 en la línea celular MCF-7, se observó que tanto la construcción silvestre pGPR1.0 como la construcción consenso ETS $c$  disminuyen significativamente su actividad transcripcional en presencia de  $10^{-6}$  M AR en un 50.2% y 50.3% respectivamente, con respecto al ensayo control (vehículo). Por otro lado, la construcción ETS $\mu$  no mostró alteraciones en su actividad transcripcional con la concentración de  $10^{-6}$  M AR (Fig. 15).



**Figura 15. Efecto del AR en la actividad del elemento ETS localizado de -625 a -631 del promotor de GPR30 en células de cáncer de mama diferenciadas.** Mediante ensayos de expresión transitoria de las construcciones pGPR1.0, ETSc y ETSμ se evaluaron los cambios en la expresión reportera causados por el tratamiento de AR (10<sup>-6</sup> M) en células MCF-7. Los datos se presentan como la media ± DE de tres experimentos independientes por triplicado. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. vehículo.

#### 7.10. El AR suprime la expresión de GPR30 y de los factores de la subfamilia PEA3

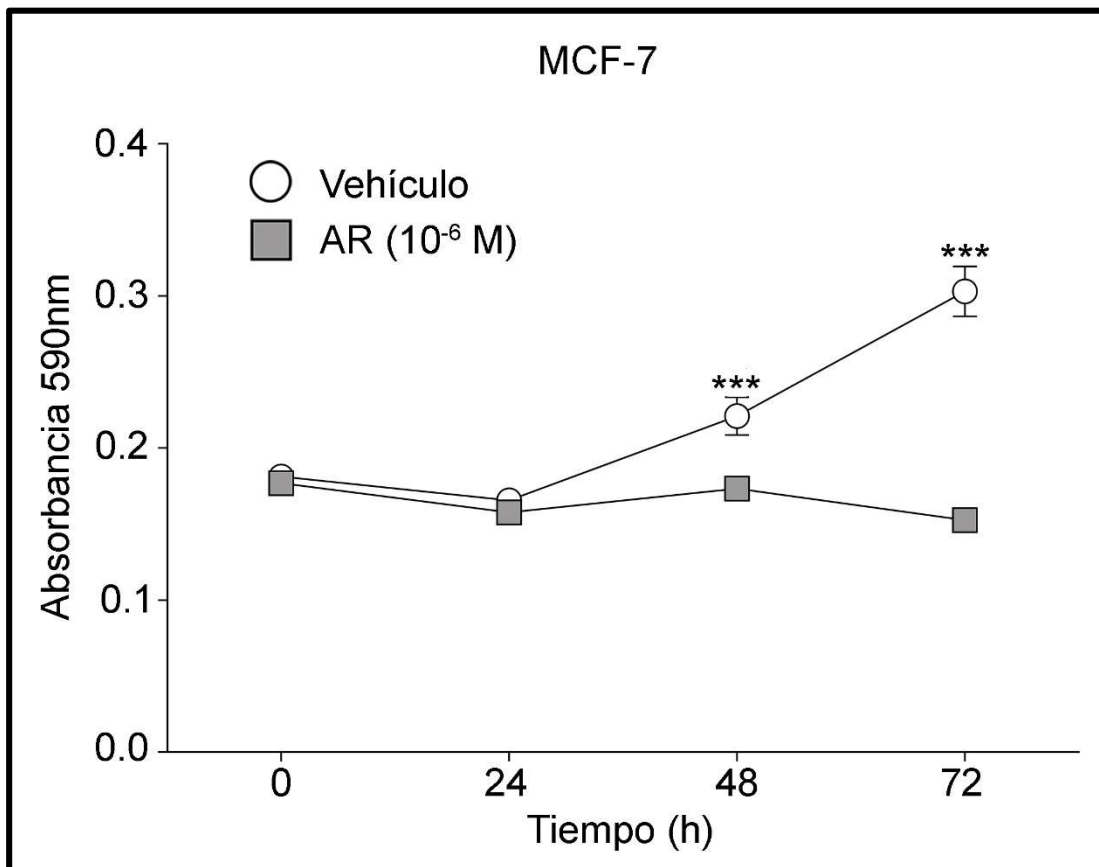
Los resultados de los cambios en la expresión de los transcritos tanto para el receptor GPR30 como para los factores de transcripción de la subfamilia PEA3 se determinó a través de ensayos de RT-PCR en la línea celular MCF-7 tratada con  $10^{-6}$  M de AR. En los resultados se observó la amplificación específica de los fragmentos de 69 pb, 132 pb, 168 pb y 188 pb, correspondientes para GPR30, ERM, ER81 y PEA3 respectivamente. Sin embargo, en todos los casos se presentó una marcada disminución en la producción de amplicones específicos de los diferentes transcritos cuando las células fueron tratadas con  $10^{-6}$  M de AR. Cabe señalar que únicamente la amplificación del fragmento específico para GAPDH, de 115 pb y usado como control constitutivo, no presentó cambio en la expresión de su transcrito (Fig. 16).



**Figura 16. El AR reduce la expresión del ARNm de GPR30 ERM, ER81 y PEA3 en células de cáncer de mama diferenciadas.** Se observan las bandas pertenecientes a los amplicones de los transcritos de GPR30 (69 pb), ERM (132 pb), ER81 (168 pb), PEA3 (188 pb) y GAPDH (115pb) en las células MCF-7 con y sin tratamiento de AR.

### 7.11. El AR reduce el crecimiento de células MCF-7

Dado que los resultados previos en cuanto al papel que juega el receptor GPR30 en el crecimiento celular en los cultivos de MCF-7 y que la expresión del ARN mensajero (ARNm) del receptor GPR30 fue disminuida por la acción del AR en estas células, se realizaron ensayos de crecimiento celular con la administración de la dosis única de  $10^{-6}$  M de AR durante 24, 48 y 72 horas. Los resultados mostraron que cuando no se aplicó AR (vehículo), los valores obtenidos marcaron un aumento significativo en el crecimiento celular a partir de las 48 horas del 21% y del 67% a las 72 horas, ambas en comparación con el número inicial de células (0 horas). Por otra parte, en los casos en donde se trató con  $10^{-6}$  M de AR, el crecimiento celular se redujo significativamente hasta 21.5% a las 48 horas y 50% a las 72 horas, con respecto al tratamiento control (vehículo) (Fig. 17).



**Figura 17. Supresión en el crecimiento celular causado por el AR en células de cáncer de mama.** Se observan los cambios en el crecimiento de células MCF-7 al ser tratadas con AR, en comparación a cuando no hay tratamiento (vehículo). Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. \*\*\*P<0.001 vs. vehículo.

## 8. Discusión

La respuesta a la terapia endocrina en el cáncer de mama depende principalmente de la presencia de los receptores hormonales (RE y RP), y la ausencia de éstos dificulta la elección del tratamiento que resulte más adecuado para cada paciente (Chacon and Costanzo, 2010; Montemurro et al., 2012; Osborne, 1998). Estas dificultades han llevado a la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos durante el desarrollo del cáncer de mama, como es el caso del receptor huérfano GPR30. A partir de su identificación (Carmeci et al., 1997; Owman et al., 1996), se ha estudiado la expresión y función de GPR30 dentro del proceso canceroso en el tejido mamario (Albanito et al., 2007; Feng and Gregor, 1997; Filardo, 2000; Filardo et al., 2002; Hsu et al., 2019; Ignatov et al., 2010; Ignatov et al., 2013; Kuo et al., 2007; Lappano et al., 2014; Long et al., 2017; Olde and Leeb-Lundberg, 2009; Prossnitz and Barton, 2009; Prossnitz and Barton, 2011; Wang et al., 2010).

Pese a los estudios sobre este receptor, existe una gran controversia en torno a si su expresión y/o función resulta perjudicial o benéfica para los pacientes con cáncer de mama (Hsu et al., 2019) ya que se ha reportado que GPR30 incrementa la proliferación de células con fenotipo canceroso (Albanito et al., 2007; Filardo, 2000; Filardo et al., 2002; Filardo and Thomas, 2012; Kuo et al., 2007; Kvingedal and Smeland, 1997; Liu et al., 2009; Pandey et al., 2009; Scaling et al., 2014; Yu et al., 2014) y por otro lado existen reportes que resaltan la participación de GPR30 en la restricción de la proliferación de células de tejidos cancerosos (Ariazi et al., 2010; Broselid et al., 2013; Chan et al., 2020; Chen et al., 2016; Weißenborn et al., 2014b).

Sin embargo, a pesar de lo anterior es poco lo que se ha reportado acerca de cómo se regula la expresión de GPR30 en los diversos contextos celulares del tejido de mama sano y neoplásico (Manjegowda et al., 2017; Recchia et al., 2011; Vivacqua et al., 2009) así como también de las diferencias en los niveles de expresión de GPR30 en células de tejido mamario con diferentes grados de diferenciación, lo cual dificulta la interpretación del papel que juega este receptor en el proceso del cáncer de mama.

En este sentido, nuestro estudio evidenció que existe una diferencia en la expresión del receptor GPR30 con respecto a la progresión del cáncer de mama, observada a través de la detección del receptor GPR30 por *Western blot* en donde las células diferenciadas MCF-



10A (células epiteliales de tejido mamario sano) mostraron una mayor expresión de GPR30 en comparación con los niveles de expresión observados en los contextos celulares de cáncer de mama que poseen un grado de desdiferenciación parcial (MCF-7) y aún más con las completamente desdiferenciadas (MDA-MB-231).

Por otra parte, a pesar de haberse observado la participación de GPR30 en la inducción de la proliferación, como fue reportado por Pandey *et al.*, en 2009 y Vivacqua *et al.*, en 2006, es importante hacer énfasis en que GPR30 no induce el crecimiento celular con la misma intensidad en ambos modelos celulares. Esto se podría explicar con base en el nivel de expresión de GPR30 observado en la detección por inmunotransferencia, ya que el grado de inducción del crecimiento celular dependiente de GPR30, resultó marcadamente más significativo en las células MCF-7 en comparación con las células MDA-MB-231 cuando fueron tratadas con G15.

Cabe señalar que, a pesar de obtenerse una disminución significativa en los ensayos de crecimiento celular dependiente de GPR30 por el estímulo de G1 en las células MCF-7 y MDA-MB-231, los resultados no fueron considerados para su evaluación e interpretación ya que existe evidencia de que G1 puede suprimir la proliferación de células de cáncer de mama e inducir la apoptosis celular de manera independiente a GPR30 (Holm *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012).

Por otra parte, en los ensayos de migración se pudo observar cómo G1 restringe la capacidad migratoria de las células desdiferenciadas MDA-MB-231 a través de la activación de GPR30. Sin embargo, esta restricción se ve afectada por el efecto inhibitorio de G15 sobre GPR30, llegando a observar una recuperación parcial en la migración, indicando con esto la participación activa de GPR30 en el proceso migratorio de células malignas con alto grado de desdiferenciación, como lo son las células MDA-MB-231. De igual manera, se evaluó el efecto de G1 y de G15 en la migración de células MCF-7; sin embargo, no fue posible observar dichos efectos debido a que esta línea celular, al no poseer características metastásica (Kia *et al.*, 2019; Mon *et al.*, 2017), no mostró cambio alguno en su migración, aún sin ningún tipo de tratamiento (control).

Es preciso señalar que, de manera contraria a los ensayos de crecimiento celular, GPR30 tiene un efecto supresor de la migración en células MDA-MB-231, hecho que se ve soportado por lo reportado por Liang *et al.*, en donde demostró que la activación de GPR30 por G1 suprime la migración de células triple negativas de cáncer de mama (Liang *et al.*, 2017).

Esto supone que GPR30 podría participar a través de vías diferentes en los procesos de crecimiento celular y migración (Fig. 18). Dicho de otra manera, probablemente GPR30 puede participar de manera particular en cada uno de los procesos de proliferación y migración celular debido a los cambios en el fenotipo que requirieron las células de cáncer de mama metastásicas para lograr atravesar de un estado proliferativo a uno invasivo (Sciacovelli and Frezza, 2017). Esto se ve apoyado por algunos autores en donde evaluaron la conservación de la interrupción del ciclo celular en la fase G1/G0, deteniendo parcialmente la proliferación celular de células con fenotipo epitelial, para dar lugar a la adquisición de un fenotipo con características de invasividad (Kohrman and Matus, 2017). Además, que se ha reportado que GPR30 es capaz de inducir la reorganización del citoesqueleto de actina (Haumann et al., 2020; Lachowski et al., 2020; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2019).

Al igual que en los resultados de *Western blot* y de crecimiento celular, el grado de actividad transcripcional de la región promotora de GPR30 que presentaron los modelos celulares de estudio, dejó de manifiesto una evidente pérdida gradual en la actividad transcripcional relacionada con la progresión del cáncer de mama. En donde, a partir de las células completamente diferenciadas (MCF-10A) existe una actividad transcripcional superior, perdiéndose conforme va en aumento el grado de desdiferenciación celular representado por las células MCF-7 y MDA-MB-231; lo que supone un cambio en la expresión génica que sufren las células de cáncer de mama durante el proceso de desdiferenciación causando el silenciamiento gradual de GPR30. Lo cual está en línea con algunos grupos de investigación que han reportado que el gen que codifica el receptor GPR30, a lo largo del desarrollo del cáncer de mama sufre de procesos epigenéticos que llevan al silenciamiento de su expresión a través de la metilación en la región promotora (Liu et al., 2017; Manjegowda et al., 2017; Manjegowda and Limaye, 2018; Weissenborn et al., 2017; Weissenborn et al., 2014a; Weissenborn et al., 2014b).

Además, de los resultados observados en la actividad transcripcional basal de cada línea celular, donde MDA-MB-231 resultó seis veces menor que MCF-7 y once veces menor que MCF-10A, es importante resaltar que mientras mayor es el grado de desdiferenciación, mayor es la pérdida en la actividad transcripcional, esto apoya la idea de la reprogramación en la expresión génica para llevar a cabo la transición epitelial-mesenquimal (TEM) que pueden sufrir las células malignas y en donde la expresión de GPR30 ésta regulada negativamente (Chan et al., 2020; Chen et al., 2016; De Francesco et al., 2018; Liu et al., 2017;

Manjegowda et al., 2017; Manjegowda and Limaye, 2018; Weißenborn et al., 2014a; Weißenborn et al., 2014b).

La importancia de lo hallado hasta el momento en cuanto a la expresión y función de GPR30 a lo largo del proceso de desdiferenciación celular que se da durante el transcurso del cáncer de mama, deja un panorama más claro acerca del porqué algunos estudios reportan la expresión de GPR30 como un factor desfavorable para los pacientes con tratamiento hormonal (Ignatov et al., 2010; Mo et al., 2013; Scaling et al., 2014; Yang et al., 2008), mientras que otros ven a GPR30 como un factor favorable para la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama RE (+) (Ariazi et al., 2010; Broselid et al., 2013; Ignatov et al., 2013; Martin et al., 2018).

El haber encontrado funcionalidad de GPR30 en el crecimiento y migración de células de cáncer de mama, el hallazgo de un patrón similar en la regulación transcripcional de GPR30 en los modelos celulares de estudio y la poca información al respecto (Albanito et al., 2008; Recchia et al., 2011; Sheng et al., 2013; Vivacqua et al., 2009), nos llevó a investigar los mecanismos que regulan y mantienen la expresión de GPR30 a nivel transcripcional, aún a pesar del silenciamiento que sufre. Creemos que además de la regulación epigenética que sufre la expresión de GPR30 a lo largo del progreso del cáncer de mama (Liu et al., 2017; Manjegowda et al., 2017; Manjegowda and Limaye, 2018; Weissenborn et al., 2017), es de suma importancia tratar de determinar si dentro del progreso del cáncer de mama (representado por nuestros modelos de estudio), existe algún cambio en la expresión celular capaz de causar indirectamente el mantenimiento de la expresión de GPR30.

Lo anterior se sostiene a través de los datos obtenidos del análisis predictivo de la región del promotor del gen GPR30 y de los ensayos de transfección transitoria de los posibles elementos reguladores en *cis*, en donde resultó funcional y específico un elemento regulador para los miembros de la familia ETS, localizado entre -625 y -631 pb del CIT de la región promotora de GPR30 para todos nuestros modelos celulares de estudio (Fig. 18). Sin embargo, dicho elemento presentó mayor actividad en los contextos celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) en comparación con células de mama en un contexto celular sano (MCF-10A), sugiriendo un cambio en la expresión génica que causa la reaparición o el aumento de reguladores transcripcionales (factores de transcripción) silenciados antes de la reprogramación génica causada por el proceso del cáncer de mama (Sciacovelli and Frezza, 2017; Suvà et al., 2013).

Por otra parte, es importante hacer notar que este elemento regulador en *cis* para miembros de la familia ETS presentó una función contraria a la esperada, ya que, al mutar el elemento regulador para pérdida de función, se esperaba un incremento en la regulación transcripcional. Sin embargo, se obtuvo una reducción en la regulación transcripcional, lo cual sugiere que el elemento regulador en *cis* para miembros de la familia ETS tiene la función de activador y promueve la transcripción.

En este sentido y debido a que la familia de factores de transcripción ETS se caracteriza por conservar evolutivamente su dominio de unión al ADN y por lo tanto reconocen el mismo sitio de unión en el ADN (Oikawa and Yamada, 2003; Sharrocks, 2001), se infirieron los posibles factores de transcripción ETS involucrados en la regulación transcripcional de GPR30 a través del elemento ubicado entre -625 a -631 pb del CIT. Debido a que el factor de transcripción involucrado posee características de ser un activador, se excluyeron a todos aquellos factores de transcripción miembros de la familia ETS con actividad represora, como es el caso de YAN, ERF, *new Ets factor* (NET), ELF3, *E74-like factor 1* (ELF1) y ETV6 (Enfield et al., 2019; Lelièvre et al., 2001; Lopez et al., 1999; Mavrothalassitis and Ghysdael, 2000; Sgouras et al., 1995), seleccionando únicamente a los factores de transcripción Ets-1, Ets-2 y los miembros de la subfamilia PEA3 (ERM, PEA3 y ER81).

En el caso de estos factores, además de ser capaces de activar la transcripción, su expresión se ve favorecida durante el progreso del cáncer de mama (Baert et al., 1997; Baert et al., 2002; Barrett J. M., 2002; Bièche et al., 2004; de Launoit, 1996; de Launoit, 1997; Galang et al., 2004; Maroulakou and & Bowe, 2000; Switzer et al., 2012; Wallace et al., 2013; Watson et al., 2010). También se ha reportado que los factores Ets-1, Ets-2 y miembros de la subfamilia PEA3 son blanco de las vías de fosforilación de ERK y de p38 (Goetze et al., 2001; Janknecht, 1996; Janknecht, 2003; Liu et al., 2005; Svensson et al., 2005), y que ERM y ER81 también pueden ser fosforilados a través de la vía de PKA (Baert et al., 2002; Janknecht et al., 1996; Oh, 2012; Watson et al., 2010), además que las vías de fosforilación de estas proteínas cinasas se llegan a encontrar desreguladas durante el desarrollo del cáncer de mama, impulsando la expresión y activación de varios oncogenes (Baert et al., 2002; Bièche et al., 2004; de Launoit, 1996; de Launoit, 1997; de Launoit, 2006; De Luca et al., 2012; Oh, 2012).

Considerando lo anterior y con los datos de los ensayos de expresión transitoria de las construcciones reporteras pGPR1.0 y pGPR0.5 en las células MDA-MB-231, a las que se les bloquearon las principales vías de fosforilación (ERK, p38 y PKA), se logró determinar que,

conforme a lo esperado, la actividad transcripcional observada no está siendo causada por algún otro elemento regulador en *cis* ubicado fuera del intervalo entre -511 y -1010 pb a partir del CIT, ya que con la construcción reportera pGPR0.5 no se presentó ningún cambio en la actividad transcripcional, en cambio con la construcción pGPR1.0 se presentó una disminución considerable en la actividad transcripcional. Por otra parte, las vías de fosforilación de PKA y ERK son las causantes de la inducción de la actividad transcripcional de GPR30 (Fig. 18). Esto resulta importante considerando que los factores de transcripción Ets-1 y Ets-2 sólo necesitan de la vía de ERK y no de PKA para ser fosforilados y activados (Cho et al., 2008; De Luca et al., 2012; Liu et al., 2012; Svensson et al., 2005), mientras que los miembros de la subfamilia PEA3 pueden ser fosforilados tanto por la vía de ERK como de PKA (de Launoit, 1996; de Launoit, 2006; Janknecht, 1996; Janknecht et al., 1996; Keld et al., 2011; Oh, 2012), sugiriendo así la participación de algunos de los miembros de la subfamilia PEA3 en la transactivación del gen de GPR30.

Una vez determinada la funcionalidad del elemento regulador ETS, ubicado entre -625 a -631 pb del CIT de la región promotora de GPR30, el cual resultó específico para miembros de la subfamilia PEA3, esto llevó a encontrar las diferencias existentes en la expresión de los miembros de dicha subfamilia en todos nuestros modelos celulares de estudio. En este sentido, los datos de los *Western blot* mostraron la presencia de ERM en todas las líneas de células de mama en estudio, sugiriendo que este factor de transcripción tiene la mayor probabilidad de interactuar con el sitio de unión localizado entre -625 y -631 de la región promotora de GPR30. Sin embargo, esto no excluye que en la línea celular MCF-7 el factor de transcripción ER81 también pueda estar interactuando con el elemento regulador en cuestión, ya que por estudios previos se sabe que los factores de transcripción de la subfamilia PEA3 comparten entre sí una identidad en sus aminoácidos del dominio de unión al DNA del 95% (Baert et al., 1997), por lo que todos los miembros de esta subfamilia tendrían la misma oportunidad de interactuar con el mismo sitio regulador dentro de la región promotora de GPR30.

Se ha visto que de manera normal esta subfamilia de factores se expresa en varios tejidos; por ejemplo: ERM se expresan en cerebro, testículo, colon y pulmón; ER81 es expresado en cerebro, pulmón y corazón; PEA3 presenta una expresión más restringida a cerebro y epidídimo (Chotteau-Lelievre, 1997; Chotteau-Lelievre, 2001). No obstante, el patrón de expresión del ARN mensajero (ARNm) de dichos factores de transcripción puede ser drásticamente diferente en diversos tejidos neoplásicos (Bièche et al., 2004; Chotteau-Lelievre

et al., 2004; Oh, 2012), lo que podría sugerir que no están regulados de la misma manera y por ende podrían tener roles celulares distintos. Por otra parte, su expresión ha mostrado amplias variaciones en tejidos de cáncer de mama en comparación con su expresión en tejido de mama sano (Bièche et al., 2004). Se ha visto que, una sobreexpresión de estos factores confiere un fenotipo más agresivo en células de cáncer de mama que aún mantienen la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2) y del RE. En contraste, la inhibición del grupo PEA3 retrasa el inicio de la tumorigénesis y reduce la progresión del tumor (Bosc, 2001; de Launoit, 2006; Netzer, 2002; Oh, 2012).

Por otro lado, se sabe que el ácido retinoico (AR) se ha empleado en el tratamiento del cáncer de mama no invasivo como un agente quimioterapéutico o quimiopreventivo debido a sus efectos antiproliferativos, proapoptóticos y antioxidantes (di Masi et al., 2015). Además, es capaz de regular la expresión de algunos miembros de los factores de transcripción de la subfamilia PEA3 (Benbow et al., 1999; Endo et al., 2008; Park et al., 2014).

Considerando que la región promotora de GPR30 posee un elemento regulador ubicado entre -625 a -631 pb del CIT en donde se ha sugerido la participación de al menos uno de los factores de transcripción de la subfamilia PEA3 y dado que también GPR30 participa activamente en el proceso del crecimiento celular en células que todavía mantienen características epiteliales, se determinó si el AR tiene un efecto sobre la regulación transcripcional de GPR30 y por ende, en el crecimiento celular dependiente de GPR30.

En este sentido, los ensayos de expresión transitoria de la región promotora de GPR30 en células MCF-7 que fueron sometidas a una curva creciente de AR, mostraron una disminución significativa en la actividad transcripcional de la región promotora de GPR30 y del elemento regulador en *cis* localizado entre -625 a -631 pb del CIT. De igual forma, también se logró determinar que el AR causa una reducción en la expresión tanto de GPR30 como de los posibles factores de transcripción (ERM, PEA3 y ER81) involucrados en la regulación transcripcional de GPR30, ya que al ser tratadas con AR se observó una marcada reducción en los transcritos de GPR30, ERM, PEA3 y ER81.

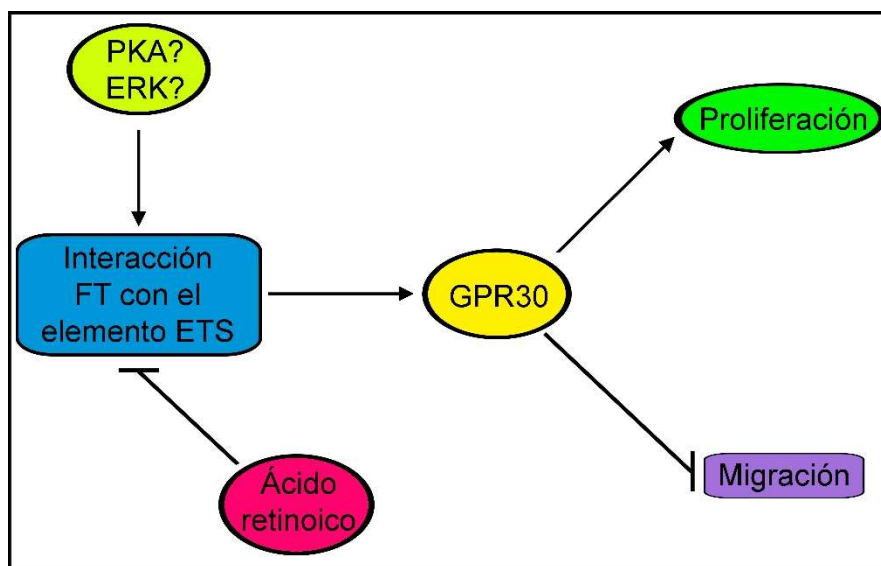
Es importante resaltar que dentro de la región del promotor de GPR30 que fue analizada no se encontraron elementos de respuesta al AR que pudieran estar siendo activados y causantes de dicha disminución en la actividad transcripcional de GPR30, dejando de manifiesto que el tratamiento con AR causa la disminución en la regulación transcripcional

de manera indirecta, debido a los cambios que causa en la expresión de los factores de la subfamilia PEA3 (Fig. 18).

Por otra parte, los datos de la expresión de los transcritos de la subfamilia PEA3 concuerdan con los obtenidos en la inmunotransferencia para los factores de transcripción ERM y ER81 en las células MCF-7, sin embargo, a pesar de haberse observado la producción de amplicones específicos para el factor de transcripción PEA3, no se observó banda que indicara la expresión de dicho factor de transcripción en los ensayos de inmunotransferencia en células MCF-7. Sin embargo, dado que el anticuerpo comercial anti-PEA3 (Santa Cruz) reconoce a la proteína PEA3 de los extractos nucleares del control positivo (K562), es posible que la eficacia de la traducción de PEA3 sea muy baja y por lo tanto que la cantidad de proteína PEA3 sea demasiado baja para ser detectable por *Western blot* (Baert et al., 1997; de Launoit, 1997).

Los datos anteriores en torno a los efectos del AR en la regulación transcripcional y expresión de GPR30, así como de la disminución en la expresión de la subfamilia PEA3, sugieren que la disminución en torno a la reducción significativa el crecimiento celular dependiente de GPR30 en células MCF-7 es debida a una regulación indirecta por parte del AR. No obstante, dado que el crecimiento celular descontrolado es una característica que forma parte del comportamiento de las células de cáncer de mama con fenotipo epitelial, se debe considerar que dentro del efecto supresor del AR sobre el proceso proliferativo subyace una reprogramación de la expresión génica dirigida a la transición epitelial-mesenquimal que a su vez promueve un fenotipo de cáncer de mama invasivo (De Francesco et al., 2018; Kohrman and Matus, 2017; Weißborn et al., 2014a; Weißborn et al., 2014b; Yuan et al., 2015).

Es importante considerar que la activación específica de GPR30 puede contribuir al tratamiento de cáncer de mama no invasivo o podría detener y revertir la invasividad de tumores muy agresivos para emplear tratamientos estándar.



**Figura 18. Esquema del mecanismo propuesto de la actividad de GPR30 en la proliferación y migración en células de cáncer de mama.** Las flechas indican activación, mientras que las líneas indican inhibición. PKA, proteína cinasa A; ERK, proteína cinasa regulada por señales extracelulares; FC, factor de transcripción; GPR30; receptor 30 acoplado a proteína G.



## 9. Conclusión

Las evidencias aquí señaladas indican que GPR30 participa activamente en regular positivamente el crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7; sin embargo, en células de cáncer de mama invasivas y triple negativo MDA-MB-231 detiene el proceso de migración. Por otra parte, dentro de la región promotora de *GPR30* se logró identificar un elemento regulador en *cis* ubicado entre -625 a -631 pb del CIT, el cual reguló la transcripción y por ende la expresión de GPR30 a través de la interacción con alguno de los factores de transcripción ERM y ER81, pertenecientes a la subfamilia PEA3. Dada la función que desempeñan los factores de la subfamilia PEA3 en la regulación transcripcional de GPR30 y dado el papel que este receptor juega durante la evolución del cáncer de mama, el desarrollo de estrategias terapéuticas y diagnósticas basados en este mecanismo podrían contribuir en el tratamiento de esta neoplasia.

## 10. Perspectivas

- I. Identificar de manera específica cuál de los miembros de los factores de transcripción de la subfamilia PEA3 se unen al elemento en *cis* ETS de la región promotora de GPR30 a través de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) *in vivo*.
  
- II. Una vez identificado el factor de transcripción implicado en la regulación transcripcional de GPR30 por la unión al elemento ETS se realizarán ensayos de silenciamiento y sobre expresión de este factor de transcripción para observar los cambios que se causan en la regulación transcripcional y de expresión de GPR30.

## 11. Referencias

- AFONJA, O., RAAKA, B. M., HUANG, A., DAS, S., ZHAO, X., HELMER, E., JUSTE, D. & SAMUELS, H. H. 2002. RAR agonists stimulate SOX9 gene expression in breast cancer cell lines: evidence for a role in retinoid-mediated growth inhibition. *Oncogene*, 21, 7850-60.
- ALBANITO, L., MADEO, A., LAPPANO, R., VIVACQUA, A., RAGO, V., CARPINO, A., OPREA, T. I., PROSSNITZ, E. R., MUSTI, A. M., ANDO, S. & MAGGIOLINI, M. 2007. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res*, 67, 1859-66.
- ALBANITO, L., SISCI, D., AQUILA, S., BRUNELLI, E., VIVACQUA, A., MADEO, A., LAPPANO, R., PANDEY, D. P., PICARD, D., MAURO, L., ANDÒ, S. & MAGGIOLINI, M. 2008. Epidermal growth factor induces G protein-coupled receptor 30 expression in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Endocrinology*, 149, 3799-808.
- ARIAZI, E. A., BRAILOIU, E., YERRUM, S., SHUPP, H. A., SLIFKER, M. J., CUNLIFFE, H. E. & JORDAN, V. C. 2010. The G Protein-Coupled Receptor GPR30 Inhibits Proliferation of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells. *Cancer research*, 70, 1184-1194.
- BAERT, J.-L., BEAUDOIN, C., COUTTE, L. & DE LAUNOIT, Y. 2002. ERM transactivation is up-regulated by the repression of DNA binding after the PKA phosphorylation of a consensus site at the edge of the ETS domain. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 1002-1012.
- BAERT, J. L., MONTÉ, D., MUSGROVE, E. A., ALBAGLI, O., SUTHERLAND, R. L. & LAUNOIT, Y. D. 1997. Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells. *International journal of cancer*, 70, 590-597.
- BARRETT J. M., P. M. A., SINGH G., AND TOZER R. G. 2002. Expression of Ets-related transcription factors and matrix metalloproteinase genes in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 72, 227-232.
- BARROS, R. P. & GUSTAFSSON, J. 2011. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab*, 14, 289-99.
- BEENKEN, S. W. & BLAND, K. I. 2002. Biomarkers for breast cancer. *Minerva chir*, 57, 437-448.
- BENBOW, U., RUTTER, J. L., LOWREY, C. H. & BRINCKERHOFF, C. E. 1999. Transcriptional repression of the human collagenase-1 (MMP-1) gene in MDA231 breast cancer cells by all-trans-retinoic acid requires distal regions of the promoter. *Br J Cancer*, 79, 221-8.
- BIÈCHE, I., TOZLU, S., GIRAULT, I., ONODY, P., DRIOUCH, K., VIDAUD, M. & LIDEREAU, R. 2004. Expression of PEA3/E1AF/ETV4, an Ets-related transcription factor, in breast tumors: positive links to MMP2, NRG1 and CGB expression. *Carcinogenesis*, 25, 405-411.
- BOSC, D. G., & JANKNECHT, R. 2001. Regulation of Her2/neu promoter activity by the ETS transcription factor, ER81. *Journal of cellular biochemistry*, 86, 174-183.
- BOYD, N. F., GUO, H., MARTIN, L. J., SUN, L., STONE, J., FISHELL, E., ... & YAFFE, M. J. 2007. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 356, 227-236.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRANDAN, M. E., & VILLASEÑOR, Y. 2006. Detección del cáncer de mama: estado de la mamografía en México. *Cancerología*, 1, 147-162.
- BROSELID, S., CHENG, B., SJÖSTRÖM, M., LÖVGREN, K., KLUG-DE SANTIAGO, H. L., BELTING, M., JIRSTRÖM, K., MALMSTRÖM, P., OLDE, B. & BENDAHL, P.-O. 2013. G Protein-Coupled Estrogen

- Receptor Is Apoptotic and Correlates with Increased Distant Disease-Free Survival of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 19, 1681-1692.
- BRUNSSING, R. L. & PROSSNITZ, E. R. 2011. Induction of interleukin-10 in the T helper type 17 effector population by the G protein coupled estrogen receptor (GPER) agonist G-1. *Immunology*, 134, 93-106.
- 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, 607-617.
- CHACON, R. D. & COSTANZO, M. V. 2010. Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*, 12 Suppl 2, S3.
- 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, 1674-1685.
- CHEN, Z.-J., WEI, W., JIANG, G.-M., LIU, H., WEI, W.-D., YANG, X., WU, Y.-M., LIU, H., WONG, C. K. & DU, J. 2016. Activation of GPER suppresses epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells via NF- $\kappa$ B signals. *Molecular oncology*, 10, 775-788.
- CHO, M. C., CHOI, H. S., LEE, S., KIM, B. Y., JUNG, M., PARK, S. N. & YOON, D. Y. 2008. Epiregulin expression by Ets-1 and ERK signaling pathway in Ki-ras-transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 377, 832-7.
- CHOTTEAU-LELIEVRE, A., DESBIENS, X., PELCZAR, H., DEFOSSEZ, P. A., & DE LAUNOIT, Y. 1997. Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development. *Oncogene*, 15, 937-952.
- CHOTTEAU-LELIEVRE, A., DOLLE, P., PERONNE, V., COUTTE, L., DE LAUNOIT, Y., & DESBIENS, X. 2001. Expression patterns of the Ets transcription factors from the PEA3 group during early stages of mouse development. *Mechanisms of development*, 108, 191-195.
- CHOTTEAU-LELIEVRE, A., RÉVILLION, F., LHOTELLIER, V., HORNEZ, L., DESBIENS, X., CABARET, V., DE LAUNOIT, Y. & PEYRAT, J.-P. 2004. Prognostic value of ERM gene expression in human primary breast cancers. *Clinical cancer research*, 10, 7297-7303.
- CHUANG, S. C., CHEN, C. H., CHOU, Y. S., HO, M. L. & CHANG, J. K. 2020. G Protein-Coupled Estrogen Receptor Mediates Cell Proliferation through the cAMP/PKA/CREB Pathway in Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci*, 21.
- COLOMER, R., ARANDA-LÓPEZ, I., ALBANELL, J., GARCÍA-CABALLERO, T., CIRUELOS, E., LÓPEZ-GARCÍA, M., CORTÉS, J., ROJO, F., MARTÍN, M. & PALACIOS-CALVO, J. 2018. Biomarkers in breast cancer: A consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. *Clin Transl Oncol*, 20, 815-826.
- DE FRANCESCO, E. M., MAGGIOLINI, M. & MUSTI, A. M. 2018. Crosstalk between Notch, HIF-1 $\alpha$  and GPER in Breast Cancer EMT. *Int J Mol Sci*, 19.
- DE LAUNOIT, Y., BAERT, J. L., CHOTTEAU-LELIEVRE, A., MONTE, D., COUTTE, L., MAUEN, S., ... & VERREMAN, K. 2006. The Ets transcription factors of the PEA3 group: transcriptional regulators in metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1766, 79-87.
- DE LAUNOIT, Y., BAERT, J. L., CHOTTEAU, A., MONTE, D., DEFOSSEZ, P. A., COUTTE, L., ... & LEENDERS, F. 1997. Structure-function relationships of the PEA3 group of Ets-related transcription factors. *Biochemical and molecular medicine*, 61(2), 127-135., 61, 127-135.
- DE LAUNOIT, Y., BAERT, J. L., CHOTTEAU, A., MONTE, D., DEFOSSEZ, P. A., XOUTTE, L., ... & LEENDERS, F. 1996. Characterization of the PEA3 group of ets-related transcription factors: role in breast cancer. *Breast Cancer. Advances in Biology and Therapeutics. John Libbey Eurotext*, 115-122.

- DE LUCA, A., MAIELLO, M. R., D'ALESSIO, A., PERGAMENO, M. & NORMANNO, N. 2012. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16, S17-S27.
- DENNIS, M. K., BURAI, R., RAMESH, C., PETRIE, W. K., ALCON, S. N., NAYAK, T. K., BOLOGA, C. G., LEITAO, A., BRAILOIU, E. & DELIU, E. 2009. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nature chemical biology*, 5, 421.
- DENNIS, M. K., FIELD, A. S., BURAI, R., RAMESH, C., PETRIE, W. K., BOLOGA, 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, 358-66.
- DI MASI, A., LEOFFE, L., DE MARINIS, E., PAGANO, F., CICCIONI, L., ROCHETTE-EGLY, C., LO-COCO, F., ASCENZI, P. & NERVI, C. 2015. Retinoic acid receptors: from molecular mechanisms to cancer therapy. *Mol Aspects Med*, 41, 1-115.
- DOCHEZ, V., CAILLON, H., VAUCEL, E., DIMET, J., WINER, N. & DUCARME, G. 2019. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *J Ovarian Res*, 12, 28.
- DONG, S., TERASAKA, S. & KIYAMA, R. 2011. Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environ Pollut*, 159, 212-218.
- ENDO, Y., DEONAUTH, K., PRAHALAD, P., HOXTER, B., ZHU, Y. & BYERS, S. W. 2008. Role of Sox-9, ER81 and VE-cadherin in retinoic acid-mediated trans-differentiation of breast cancer cells. *PLoS One*, 3, e2714.
- ENFIELD, K. S. S., MARSHALL, E. A., ANDERSON, C., NG, K. W., RAHMATI, S., XU, Z., FULLER, M., MILNE, K., LU, D., SHI, R., ROWBOTHAM, D. A., BECKER-SANTOS, D. D., JOHNSON, F. D., ENGLISH, J. C., MACAULAY, C. E., LAM, S., LOCKWOOD, W. W., CHARI, R., KARSAN, A., JURISICA, I. & LAM, W. L. 2019. Epithelial tumor suppressor ELF3 is a lineage-specific amplified oncogene in lung adenocarcinoma. *Nat Commun*, 10, 5438.
- FELDMAN, R. D. & LIMBIRD, L. E. 2017. GPER (GPR30): A Nongenomic Receptor (GPCR) for Steroid Hormones with Implications for Cardiovascular Disease and Cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 57, 567-584.
- FENG, Y. & GREGOR, P. 1997. Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 231, 651-4.
- FILARDO, E. J. 2020. Therapeutic Perspectives on the Modulation of G-Protein Coupled Estrogen Receptor, GPER, Function.
- FILARDO, E. J., QUINN, J. A., FRACKELTON, A. R., JR. & BLAND, K. I. 2002. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol*, 16, 70-84.
- FILARDO, E. J., QUINN, J. A., BLAND, K. I., & FRACKELTON, A. R. 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular endocrinology*, 14, 1649-1660.
- FILARDO, E. J. & THOMAS, P. 2012. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology*, 153, 2953-2962.
- FILIGHEDDU, N., SAMPIETRO, S., CHIANALE, F., PORPORATO, P. E., GAGGIANESI, M., GREGNANIN, I., RAINERO, E., FERRARA, M., PEREGO, B., RIBONI, F., BALDANZI, G., GRAZIANI, A. & SURICO, N. 2011. Diacylglycerol kinase  $\alpha$  mediates 17- $\beta$ -estradiol-induced proliferation, motility, and

- anchorage-independent growth of Hec-1A endometrial cancer cell line through the G protein-coupled estrogen receptor GPR30. *Cell Signal*, 23, 1988-96.
- FORD, J., HAJIBEIGI, A., LONG, M., HAHNER, L., GORE, C., HSIEH, J. T., CLEGG, D., ZERWEKH, J. & OZ, O. K. 2011. GPR30 deficiency causes increased bone mass, mineralization, and growth plate proliferative activity in male mice. *J Bone Miner Res*, 26, 298-307.
- GALANG, C. K., MULLER, W. J., FOOS, G., OSHIMA, R. G. & HAUSER, C. A. 2004. Changes in the expression of many Ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 11281-11292.
- GE, C., YU, M. & ZHANG, C. 2012. G protein-coupled receptor 30 mediates estrogen-induced proliferation of primordial germ cells via EGFR/Akt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Endocrinology*, 153, 3504-16.
- GINGERICH, S., KIM, G. L., CHALMERS, J. A., KOLETAR, M. M., WANG, X., WANG, Y. & BELSHAM, D. D. 2010. Estrogen receptor  $\alpha$  and G-protein coupled receptor 30 mediate the neuroprotective effects of 17 $\beta$ -estradiol in novel murine hippocampal cell models. *Neuroscience*, 170, 54-66.
- GIRGERT, R., EMONS, G. & GRÜNDKER, C. 2018. Estrogen Signaling in ER $\alpha$ -Negative Breast Cancer: ER $\beta$  and GPER. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 781.
- GOETZE, S., KINTSCHER, U., KANESHIRO, K., MEEHAN, W. P., COLLINS, A., FLECK, E., HSUEH, W. A. & LAW, R. E. 2001. TNF $\alpha$  induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis*, 159, 93-101.
- GÓMEZ-RODRÍGUEZ, R., ROMERO-GUTIÉRREZ, M., ARTAZA-VARASA, T., GONZÁLEZ-FRUTOS, C., CIAMPI-DOPAZO, J. J., DE-LA-CRUZ-PÉREZ, G. & SÁNCHEZ-RUANO, J. J. 2012. The value of the Barcelona Clinic Liver Cancer and alpha-fetoprotein in the prognosis of hepatocellular carcinoma. *Rev Esp Enferm Dig*, 104, 298-304.
- HAAS, E., BHATTACHARYA, I., BRAILOIU, E., DAMJANOVIĆ, M., BRAILOIU, G. C., GAO, X., MUELLER-GUERRE, L., MARJON, N. A., GUT, A., MINOTTI, R., MEYER, M. R., AMANN, K., AMMANN, E., PEREZ-DOMINGUEZ, A., GENONI, M., CLEGG, D. J., DUN, N. J., RESTA, T. C., PROSSNITZ, E. R. & BARTON, M. 2009. Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. *Circ Res*, 104, 288-91.
- HAMMOND, R. & GIBBS, R. B. 2011. GPR30 is positioned to mediate estrogen effects on basal forebrain cholinergic neurons and cognitive performance. *Brain Res*, 1379, 53-60.
- HAMMOND, R., NELSON, D. & GIBBS, R. B. 2011. GPR30 co-localizes with cholinergic neurons in the basal forebrain and enhances potassium-stimulated acetylcholine release in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*, 36, 182-92.
- HARARI, P. M., ALLEN, G. W. & BONNER, J. A. 2007. Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol*, 25, 4057-65.
- HAUMANN, I., STURM, M. A., ANSTÖTZ, M. & RUNE, G. M. 2020. GPER1 Signaling Initiates Migration of Female V-SVZ-Derived Cells. *iScience*, 23, 101077.
- HERBST, R. S. 2004. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 59, 21-6.
- 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.
- HERYNK, M. H. & FUQUA, S. A. 2007. Estrogen receptors in resistance to hormone therapy. *Adv Exp Med Biol*, 608, 130-43.
- HOLM, A., GRÄNDE, P. O., LUDUEÑA, R. F., OLDE, B., PRASAD, V., LEEB-LUNDBERG, L. M. & NILSSON, B. O. 2012. The G protein-coupled oestrogen receptor 1 agonist G-1 disrupts endothelial cell microtubule structure in a receptor-independent manner. *Mol Cell Biochem*, 366, 239-49.

- HSIEH, C. C., TRICHOPOULOS, D., KATSOUYANNI, K., & YUASA, S. 1990. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: Associations and interactions in an international case-control study. *International journal of cancer*, 46, 796-800.
- HSU, L.-H., CHU, N.-M., LIN, Y.-F. & KAO, S.-H. 2019. G-protein coupled estrogen receptor in breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 20, 306.
- HUA, H., ZHANG, H., KONG, Q. & JIANG, Y. 2018. Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer. *Exp Hematol Oncol*, 7, 24.
- IGNATOV, A., IGNATOV, T., ROESSNER, A., COSTA, S. D. & KALINSKI, T. 2010. Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast cancer research and treatment*, 123, 87-96.
- IGNATOV, T., TREECK, O., KALINSKI, T., ORTMANN, O. & IGNATOV, A. 2020. GPER-1 expression is associated with a decreased response rate to primary tamoxifen therapy of breast cancer patients. *Arch Gynecol Obstet*, 301, 565-571.
- IGNATOV, T., WEIßENBORN, C., POEHLMANN, A., LEMKE, A., SEMCZUK, A., ROESSNER, A., COSTA, S. D., KALINSKI, T. & IGNATOV, A. 2013. GPER-1 expression decreases during breast cancer tumorigenesis. *Cancer investigation*, 31, 309-315.
- ISENSEE, J., MEOLI, L., ZAZZU, V., NABZDYK, C., WITT, H., SOEWARTO, D., EFFERTZ, K., FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., BUSCH, D., ADLER, T., DE ANGELIS, M. H., IRGANG, M., OTTO, C. & NOPPINGER, P. R. 2009. Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology*, 150, 1722-30.
- JANKNECHT, R. 1996. Analysis of the ERK-stimulated ETS transcription factor ER81. *Mol Cell Biol*, 16, 1550-6.
- JANKNECHT, R. 2003. Regulation of the ER81 transcription factor and its coactivators by mitogen- and stress-activated protein kinase 1 (MSK1). *Oncogene*, 22, 746-55.
- JANKNECHT, R., MONTÉ, D., BAERT, J. L. & DE LAUNOIT, Y. 1996. The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA. *Oncogene*, 13, 1745-54.
- JUNG, J. 2019. Role of G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Cancer Progression. *Toxicol Res*, 35, 209-214.
- KELD, R., GUO, B., DOWNEY, P., CUMMINS, R., GULMANN, C., ANG, Y. & SHARROCKS, A. 2011. PEA3/ETV4-related transcription factors coupled with active ERK signalling are associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. *British journal of cancer*, 105, 124.
- KIA, V., MORTAZAVI, Y., PARYAN, M., BIGLARI, A. & MOHAMMADI-YEGANEH, S. 2019. Exosomal miRNAs from highly metastatic cells can induce metastasis in non-metastatic cells. *Life Sci*, 220, 162-168.
- KNAUL, F. M. & FRENK, J. 2005. Health insurance in Mexico: achieving universal coverage through structural reform. *Health Aff (Millwood)*, 24, 1467-76.
- KNAUL, F. M., NIGENDA, G., LOZANO, R., ARREOLA-ORNELAS, H., LANGER, A., & FRENK, J. 2009. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Publica de Mexico*, 51, S335-S344.
- KOHRMAN, A. Q. & MATUS, D. Q. 2017. Divide or Conquer: Cell Cycle Regulation of Invasive Behavior. *Trends Cell Biol*, 27, 12-25.
- KRUGER, N. J. 1994. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*, 32, 9-15.
- KUO, W. H., CHANG, L. Y., LIU, D. L. Y., HWA, H. L., LIN, J. J., LEE, P. H. & HSIEH, F. J. 2007. The interactions between GPR30 and the major biomarkers in infiltrating ductal carcinoma of the breast in an Asian population. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 42, 135-145.
- KVINGEDAL, A. M. & SMELAND, E. B. 1997. A novel putative G-protein-coupled receptor expressed in lung, heart and lymphoid tissue. *FEBS Lett*, 407, 59-62.

- LACHOWSKI, D., CORTES, E., MATELLAN, C., RICE, A., LEE, D. A., THORPE, S. D. & DEL RÍO HERNÁNDEZ, A. E. 2020. G Protein-Coupled Estrogen Receptor Regulates Actin Cytoskeleton Dynamics to Impair Cell Polarization. *Front Cell Dev Biol*, 8, 592628.
- LANGER, G., BADER, B., MEOLI, L., ISENSEE, J., DELBECK, M., NOPPINGER, P. R. & OTTO, C. 2010. A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids*, 75, 603-10.
- LAPPANO, R., PISANO, A. & MAGGIOLINI, M. 2014. GPER function in breast cancer: an overview. *Frontiers in endocrinology*, 5, 66.
- LAPPANO, R., ROSANO, C., DE MARCO, P., DE FRANCESCO, E. M., PEZZI, V. & MAGGIOLINI, M. 2010. Estriol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 320, 162-70.
- LELIÈVRE, E., LIONNETON, F., SONCIN, F. & VANDENBUNDER, B. 2001. The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 33, 391-407.
- LIANG, S., CHEN, Z., JIANG, G., ZHOU, Y., LIU, Q., SU, Q., WEI, W., DU, J. & WANG, H. 2017. Activation of GPER suppresses migration and angiogenesis of triple negative breast cancer via inhibition of NF- $\kappa$ B/IL-6 signals. *Cancer Lett*, 386, 12-23.
- LIU, H., DUAN, Z., ZHENG, H., HU, D., LI, M., TAO, Y., BODE, A. M., DONG, Z. & CAO, Y. 2012. EBV-encoded LMP1 upregulates Igk 3'enhancer activity and Igk expression in nasopharyngeal cancer cells by activating the Ets-1 through ERKs signaling. *PLoS One*, 7, e32624.
- LIU, Q., CHEN, Z., JIANG, G., ZHOU, Y., YANG, X., HUANG, H., LIU, H., DU, J. & WANG, H. 2017. Epigenetic down regulation of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) functions as a tumor suppressor in colorectal cancer. *Mol Cancer*, 16, 87.
- LIU, Q., LI, J. G., ZHENG, X. Y., JIN, F. & DONG, H. T. 2009. Expression of CD133, PAX2, ESA, and GPR30 in invasive ductal breast carcinomas. *Chinese Medical Journal (English Edition)*, 122, 2763-2769.
- LIU, S., LIANG, Y., HUANG, H., WANG, L., LI, Y., LI, J., LI, X. & WANG, H. 2005. ERK-dependent signaling pathway and transcriptional factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-beta1 stimulated glomerular podocytes. *Cell Physiol Biochem*, 16, 207-16.
- LONG, N., LONG, B., MANA, A., LE, D., NGUYEN, L., CHOKR, S. & SINCHAK, K. 2017. Tamoxifen and ICI 182,780 activate hypothalamic G protein-coupled estrogen receptor 1 to rapidly facilitate lordosis in female rats. *Hormones and behavior*, 89, 98-103.
- LOPEZ, R. G., CARRON, C., OURY, C., GARDELLIN, P., BERNARD, O. & GHYSDAEL, J. 1999. TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem*, 274, 30132-8.
- LUO, J. & LIU, D. 2020. Does GPER Really Function as a G Protein-Coupled Estrogen Receptor in vivo? *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 148.
- LV, X., HE, C., HUANG, C., HUA, G., WANG, Z., REMMENG, S. W., RODABOUGH, K. J., KARPF, A. R., DONG, J., DAVIS, J. S. & WANG, C. 2017. G-1 Inhibits Breast Cancer Cell Growth via Targeting Colchicine-Binding Site of Tubulin to Interfere with Microtubule Assembly. *Mol Cancer Ther*, 16, 1080-1091.
- MAGGIOLINI, M. & PICARD, D. 2010. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J Endocrinol*, 204, 105-14.
- MALICH, A., FISCHER, D. R., WURDINGER, S., BOETTCHER, J., MARX, C., FACIUS, M., & KAISER, W. A. 2005. Potential MRI interpretation model: differentiation of benign from malignant breast masses. *American Journal of Roentgenology*, 185, 964-970.
- MANGASARIAN, O. L., STREET, W. N., & WOLBERG, W. H. 1995. Breast cancer diagnosis and prognosis via linear programming. *Operations Research*, 43(4), 570-577., 45, 570-577.

- MANJEGOWDA, M. C., GUPTA, P. S. & LIMAYE, A. M. 2017. Hyper-methylation of the upstream CpG island shore is a likely mechanism of GPER1 silencing in breast cancer cells. *Gene*, 614, 65-73.
- MANJEGOWDA, M. C. & LIMAYE, A. M. 2018. DNA methylation dependent suppression of GPER1 in colorectal cancer. *Medical Research Archives*, 6.
- MAROULAKOU, I. G. & BOWE, D. B. 2000. Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene*, 19(55), 19, 6432-6442.
- MARTIN, S. G., LEBOT, M. N., SUKKARN, B., BALL, G., GREEN, A. R., RAKHA, E. A., ELLIS, I. O. & STORR, S. J. 2018. Low expression of G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER) is associated with adverse survival of breast cancer patients. *Oncotarget*, 9, 25946.
- MAVROTHALASSITIS, G. & GHYSDAEL, J. 2000. Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. *Oncogene*, 19, 6524.
- MCPHERSON, K., STEEL, C., & DIXON, J. M. 2000. ABC of breast diseases: breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ: British Medical Journal*, 321, 624-628.
- MÉNDEZ-LUNA, D., BELLO, M. & CORREA-BASURTO, J. 2016. Understanding the molecular basis of agonist/antagonist mechanism of GPER1/GPR30 through structural and energetic analyses. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 158, 104-116.
- MÉNDEZ-LUNA, D., MARTÍNEZ-ARCHUNDIA, M., MAROUN, R. C., CEBALLOS-REYES, G., FRAGOSO-VÁZQUEZ, M. J., GONZÁLEZ-JUÁREZ, D. E. & CORREA-BASURTO, J. 2015. Deciphering the GPER/GPR30-agonist and antagonists interactions using molecular modeling studies, molecular dynamics, and docking simulations. *J Biomol Struct Dyn*, 33, 2161-72.
- MEYER, M. R., FREDETTE, N. C., DANIEL, C., SHARMA, G., AMANN, K., ARTERBURN, J. B., BARTON, M. & PROSSNITZ, E. R. 2016. Obligatory role for GPER in cardiovascular aging and disease. *Sci Signal*, 9, ra105.
- 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 Research*, 15, R114.
- 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.
- MOLINA, L., BUSTAMANTE, F. A., BHOOLA, K. D., FIGUEROA, C. D. & EHRENFELD, P. 2018. Possible role of phytoestrogens in breast cancer via GPER-1/GPR30 signaling. *Clin Sci (Lond)*, 132, 2583-2598.
- MOLINA, L., FIGUEROA, C. D., BHOOLA, K. D. & EHRENFELD, P. 2017. GPER-1/GPR30 a novel estrogen receptor sited in the cell membrane: therapeutic coupling to breast cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, 21, 755-766.
- MON, N. N., SENGA, T. & ITO, S. 2017. Interleukin-1 $\beta$  activates focal adhesion kinase and Src to induce matrix metalloproteinase-9 production and invasion of MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Lett*, 13, 955-960.
- MONTEMURRO, F., ROSSI, V., COSSU ROCCA, M., MARTINELLO, R., VERRI, E., REDANA, S., ADAMOLI, L., VALABREGA, G., SAPINO, A., AGLIETTA, M., VIALE, G., GOLDHIRSCH, A. & NOLE, F. 2012. Hormone-receptor expression and activity of trastuzumab with chemotherapy in HER2-positive advanced breast cancer patients. *Cancer*, 118, 17-26.
- NETZER, S., LEENDERS, F., DUMONT, P., BAERT, J. L., & DE LAUNOIT, Y. 2002. Ectopic expression of the ets transcription factor ER81 in transgenic mouse mammary gland enhances both urokinase plasminogen activator and stromelysin-1 transcription. *Transgenic research*, 11, 123-131.
- OH, S., SHIN, S., & JANKNECHT, R. 2012. ETV1, 4 and 5: an oncogenic subfamily of ETS transcription factors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1826, 1-12.
- OIKAWA, T. & YAMADA, T. 2003. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene*, 303, 11-34.



- OLDE, B. & LEEB-LUNDBERG, L. M. 2009. GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends Endocrinol Metab*, 20, 409-16.
- OSBORNE, C. K. 1998. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat*, 51, 227-38.
- OSOSKI, A. L. & KENNELLY, E. J. 2003. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res*, 17, 845-69.
- 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. *Biochem Biophys Res Commun*, 228, 285-92.
- PANDEY, D. P., LAPPANO, R., ALBANITO, L., MADEO, A., MAGGIOLINI, M. & PICARD, D. 2009. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *The EMBO journal*, 28, 523-532.
- PARK, S. W., DO, H. J., HA, W. T., HAN, M. H., SONG, H., UHM, S. J., CHUNG, H. J. & KIM, J. H. 2014. Differential expression of ETS family transcription factors in NCCIT human embryonic carcinoma cells upon retinoic acid-induced differentiation. *Biol Pharm Bull*, 37, 659-65.
- PEREZ-SOLIS, M. A., MAYA-NUNEZ, G., CASAS-GONZALEZ, P., OLIVARES, A. & AGUILAR-ROJAS, A. 2016. Effects of the lifestyle habits in breast cancer transcriptional regulation. *Cancer Cell Int*, 16, 7.
- POOLA, I., ABRAHAM, J., LIU, A., MARSHALLECK, J. J. & DEWITTY, R. L. 2008. The cell surface estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30 (GPR30), is markedly down regulated during breast tumorigenesis. *Breast cancer: basic and clinical research*, 1, 65., 1, 65-78.
- PROSSNITZ, E. R., ARTERBURN, J. B. & SKLAR, L. A. 2007. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265-266, 138-142.
- PROSSNITZ, E. R. & BARTON, M. 2009. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 89, 89-97.
- PROSSNITZ, E. R. & BARTON, M. 2011. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 7, 715-26.
- PROSSNITZ, E. R., SKLAR, L. A., OPREA, T. I. & ARTERBURN, J. B. 2008. GPR30: a novel therapeutic target in estrogen-related disease. *Trends Pharmacol Sci*, 29, 116-23.
- RAE, J. M. & JOHNSON, M. D. 2005. What does an orphan G-protein-coupled receptor have to do with estrogen? *Breast Cancer Res*, 7, 243-4.
- RAMASWAMY, S., TAMAYO, P., RIFKIN, R., MUKHERJEE, S., YEANG, C. H., ANGELO, M., ... & GOLUB, T. R. 2001. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 15149-15154.
- RECCHIA, A. G., DE FRANCESCO, E. M., VIVACQUA, A., SISI, D., PANNO, M. L., ANDO, S. & MAGGIOLINI, M. 2011. The G protein-coupled receptor 30 is up-regulated by hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in breast cancer cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 286, 10773-82.
- SAHA, T., MAKAR, S., SWETHA, R., GUTTI, G. & SINGH, S. K. 2019. Estrogen signaling: An emanating therapeutic target for breast cancer treatment. *Eur J Med Chem*, 177, 116-143.
- SATHYA, S., SUDHAGAR, S. & LAKSHMI, B. S. 2015. Estrogen suppresses breast cancer proliferation through GPER / p38 MAPK axis during hypoxia. *Mol Cell Endocrinol*, 417, 200-10.
- SCALING, A. L., PROSSNITZ, E. R. & HATHAWAY, H. J. 2014. GPER mediates estrogen-induced signaling and proliferation in human breast epithelial cells and normal and malignant breast. *Horm Cancer*, 5, 146-160.
- SCIACOVELLI, M. & FREZZA, C. 2017. Metabolic reprogramming and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Febs j*, 284, 3132-3144.
- SGOURAS, D. N., ATHANASIOU, M. A., BEAL, G. J., JR., FISHER, R. J., BLAIR, D. G. & MAVROTHALASSITIS, G. J. 1995. ERF: an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can

- suppress ets-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation. *Embo j*, 14, 4781-93.
- SHARROCKS, A. D. 2001. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 827-37.
- SHENG, Z. G., HUANG, W., LIU, Y. X. & ZHU, B. Z. 2013. Bisphenol A at a low concentration boosts mouse spermatogonial cell proliferation by inducing the G protein-coupled receptor 30 expression. *Toxicology and applied pharmacology*, 267, 88-94.
- SUVÀ, M. L., RIGGI, N. & BERNSTEIN, B. E. 2013. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science*, 339, 1567-70.
- SVENSSON, S., JIRSTRÖM, K., RYDÉN, L., ROOS, G., EMDIN, S., OSTROWSKI, M. C. & LANDBERG, G. 2005. ERK phosphorylation is linked to VEGFR2 expression and Ets-2 phosphorylation in breast cancer and is associated with tamoxifen treatment resistance and small tumours with good prognosis. *Oncogene*, 24, 4370.
- SWITZER, C. H., CHENG, R. Y., RIDNOUR, L. A., GLYNN, S. A., AMBS, S. & WINK, D. A. 2012. Ets-1 is a transcriptional mediator of oncogenic nitric oxide signaling in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 14, R125.
- VIVACQUA, A., BONOFILIO, D., RECCHIA, A. G., MUSTI, A. M., PICARD, D., ANDÒ, S. & MAGGIOLINI, M. 2006. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol Endocrinol*, 20, 631-46.
- VIVACQUA, A., LAPPANO, R., DE MARCO, P., SISCI, D., AQUILA, S., DE AMICIS, F., FUQUA, S. A., ANDÒ, S. & MAGGIOLINI, M. 2009. G protein-coupled receptor 30 expression is up-regulated by EGF and TGF $\alpha$  in estrogen receptor  $\alpha$ -positive cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 23, 1815-1826.
- VIVANCO, M. 2010. Biomarkers in breast cancer. *Methods Mol Biol*, 593, 137-56.
- WALLACE, J. A., LI, F., BALAKRISHNAN, S., CANTEMIR-STONE, C. Z., PECOT, T., MARTIN, C., KLADNEY, R. D., SHARMA, S. M., TRIMBOLI, A. J. & FERNANDEZ, S. A. 2013. Ets2 in tumor fibroblasts promotes angiogenesis in breast cancer. *PLoS one*, 8, e71533.
- WANG, C., LV, X., HE, C., HUA, G., TSAI, M. Y. & DAVIS, J. S. 2013. The G-protein-coupled estrogen receptor agonist G-1 suppresses proliferation of ovarian cancer cells by blocking tubulin polymerization. *Cell Death Dis*, 4, e869.
- WANG, C., LV, X., JIANG, C. & DAVIS, J. S. 2012. The putative G-protein coupled estrogen receptor agonist G-1 suppresses proliferation of ovarian and breast cancer cells in a GPER-independent manner. *Am J Transl Res*, 4, 390-402.
- WANG, D., HU, L., ZHANG, G., ZHANG, L. & CHEN, C. 2010. G protein-coupled receptor 30 in tumor development. *Endocrine*, 38, 29-37.
- WANG, Z., SUN, L., LIANG, S., LIU, Z. C., ZHAO, Z. Y., YANG, J., WANG, D. & YANG, D. Q. 2019. GPER stabilizes F-actin cytoskeleton and activates TAZ via PLC $\beta$ -PKC and Rho/ROCK-LIMK-Cofilin pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 516, 976-982.
- WATSON, D. K., TURNER, D. P., SCHEIBER, M. N., FINDLAY, V. J. & WATSON, P. M. 2010. ETS Transcription Factor Expression and Conversion During Prostate and Breast Cancer Progression. *Open Cancer Journal*, 3, 24-39.
- WEI, W., CHEN, Z., ZHANG, K., YANG, X., WU, Y., CHEN, X., HUANG, H., LIU, H., CAI, S. & DU, J. 2014a. The activation of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) inhibits proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cell death & disease*, 5, e1428.
- WEI, W., CHEN, Z. J., ZHANG, K. S., YANG, X. L., WU, Y. M., CHEN, X. H., HUANG, H. B., LIU, H. L., CAI, S. H., DU, J. & WANG, H. S. 2014b. The activation of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) inhibits proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis*, 5, e1428.

- WEIGEL, M. T., & DOWSETT, M. 2010. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocrine-related cancer*, 17(4), R245-R262., 17, R245-R262.
- WEISSENBORN, C., IGNATOV, T., NASS, N., KALINSKI, T., DAN COSTA, S., ZENCLUSSEN, A. C. & IGNATOV, A. 2017. GPER promoter methylation controls GPER expression in breast cancer patients. *Cancer investigation*, 35, 100-107.
- WEIßENBORN, C., IGNATOV, T., OCHEL, H. J., COSTA, S. D., ZENCLUSSEN, A. C., IGNATOVA, Z. & IGNATOV, A. 2014a. GPER functions as a tumor suppressor in triple-negative breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 140, 713-23.
- WEIßENBORN, C., IGNATOV, T., POEHLMANN, A., WEGE, A. K., COSTA, S. D., ZENCLUSSEN, A. C. & IGNATOV, A. 2014b. GPER functions as a tumor suppressor in MCF-7 and SK-BR-3 breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 140, 663-71.
- XIN, J. H., COWIE, A., LACHANCE, P. & HASSELL, J. A. 1992. Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the Ets oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Genes Dev*, 6, 481-96.
- YANG, J. W., KIM, M. R., KIM, H. G., KIM, S. K., JEONG, H. G. & KANG, K. W. 2008. Differential regulation of ErbB2 expression by cAMP-dependent protein kinase in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Archives of pharmacal research*, 31, 350-356.
- YU, T., CHENG, H., DING, Z., WANG, Z., ZHOU, L., ZHAO, P., TAN, S., XU, X., HUANG, X., LIU, M., PENG, M. & QIU, Y. A. 2020. GPER mediates decreased chemosensitivity via regulation of ABCG2 expression and localization in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 506, 110762.
- YU, T., LIU, M., LUO, H., WU, C., TANG, X., TANG, S., HU, P., YAN, Y., WANG, Z. & TU, G. 2014. GPER mediates enhanced cell viability and motility via non-genomic signaling induced by 17 $\beta$ -estradiol in triple-negative breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 143, 392-403.
- YUAN, J., LIU, M., YANG, L., TU, G., ZHU, Q., CHEN, M., CHENG, H., LUO, H., FU, W., LI, Z. & YANG, G. 2015. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype in the tamoxifen-resistant breast cancer cell: a new role for G protein-coupled estrogen receptor in mediating tamoxifen resistance through cancer-associated fibroblast-derived fibronectin and  $\beta$ 1-integrin signaling pathway in tumor cells. *Breast Cancer Res*, 17, 69.
- ZHANG, Y. Y., LIU, M. Y., LIU, Z., ZHAO, J. K., ZHAO, Y. G., HE, L., LI, W. & ZHANG, J. Q. 2019. GPR30-mediated estrogenic regulation of actin polymerization and spatial memory involves SRC-1 and PI3K-mTORC2 in the hippocampus of female mice. *CNS Neurosci Ther*, 25, 714-733.
- ZOLFAROLI, I., TARIN, J. J. & CANO, A. 2018. The action of estrogens and progestogens in the young female breast. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 230, 204-207.

## 12. Anexos

# GPR30 expression and function in breast cancer cells are induced through a *cis*-acting element targeted by ETS factors

DAVID SECURA-BAUTISTA<sup>1,2</sup>, ALIHA OLIVARES<sup>1</sup>, PATRICIA CASAS-COCCALÉZ<sup>1</sup>,  
EDMUNDO BONILLA<sup>3</sup>, ZAYIL SALAZAR<sup>2</sup> and MARCO ALLÁN PÉREZ-SOLÍS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical Research Unit in Reproductive Medicine, UMAE Hospital de Clínica Obstétrica no. 4 "Luis Castelnuovo-Negrete", Instituto Mexicano del Seguro Social, México City 01090; <sup>2</sup>Biological and Health Sciences PhD Program and <sup>3</sup>Department of Health Science, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México City 09340, México

Received August 9, 2019; Accepted January 16, 2020

DOI: 10.3892/or.2020.7940

**Abstract.** The capacity that G protein-coupled receptor 30 (GPR30) has demonstrated for triggering estrogen-dependent signaling pathways has attracted the interest of breast cancer researchers; however, the reported expression profiles and functions of GPR30 in breast cancer are inconsistent. The main purpose of the present investigation was to identify transcriptional mechanisms underlying the expression of GPR30 that allow a better understanding of its role in breast cancer progression. In the cell lines used as different polarity models in the present study, it was determined immunologically that GPR30 is expressed in normal mammary gland cells and that this expression decreased considerably during breast cancer development, where cell identity is lost. However, it was also determined that, in spite of low GPR30 expression levels in breast cancer cells with 100% differentiation, the membrane estrogen receptor (ER) is able to increase cell viability and suppress migration in cells that have acquired metastatic capacity. In addition, through transient expression assays in breast cancer cells, it was revealed that a transcriptional mechanism dependent on protein kinase A and susceptible to estrogenic acid in ER-positive cells induces GPR30 expression through a *cis*-regulatory element for E25 transformation-specific transcription factors, located between -831 and -825 bp from the GPR30 translation start codon. Overall, these results suggested that *in vitro* transcriptional regulation of GPR30 expression in breast cancer cells may serve a relevant role in the conservation of an epithelial phenotype, and also may be important to avoid the transition to metastasis.

## Introduction

With the current advances in determining the mechanisms underlying estrogen-dependent cell proliferation in breast cancer, it has been possible to treat patients with *in situ* (non-invasive) ductal carcinoma, which are estrogen receptor (ER) positive, through hormone therapy with antagonist molecules, such as tamoxifen or toremifene (1). Although these treatments are partially responsible for an ~40% decrease in the mortality rate over the last three decades (2), one-third of patients with breast cancer are not positive for hormone nuclear receptors and, therefore, do not respond favorably to such treatments. These treatments may be detrimental for certain intrinsic molecular subtypes (3). In the last 20 years, signal transduction through G protein-coupled receptor 30 (GPR30) has been considered a mechanism involved in the resistance to endocrine therapy, owing to its ability to trigger signaling pathways induced by antiestrogens (4). Additionally, it has been reported that GPR30 serves a regulatory role in several cellular processes, such as migration (5), proliferation (6) and cell survival (7) in breast cancer.

Although GPR30 was initially classified as an orphan receptor, subsequent biochemical studies demonstrated that this membrane receptor is strongly stimulated by estrogens, as well as by other compounds, including insecticides (i.e., DDT), phytoestrogens (i.e., genistein), xenoestrogens (i.e., bisphenol A) and antagonistic modulators of ER $\alpha$  and ER $\beta$  (i.e., toremifene and tamoxifen) (8,9). In addition, selective binding compounds for GPR30, such as the agonists G1 [1-(4-[6-bromobenzoo-(1,3)-dioxol-5-yl]-3a,4,5,8b-tetrahydro-3H-cyclopenta-[c]-quinolin-8-yl)-ethanone] and G26 [4-(6-bromo-benzo-[1,3]-dioxol-5-yl)-8-isopropyl-3a,4,5,8b-tetrahydro-3H-cyclopenta-[c]-quinoline], and the antagonist G15 [4-(6-bromo-benzo-[1,3]-dioxol-5-yl)-3a,4,5,8b-tetrahydro-3H-cyclopenta-[c]-quinoline], have been synthesized to monitor the specific biological activity of GPR30 (10-12).

Previous studies on GPR30 function have reported the involvement of this receptor in the induction of the epidermal growth factor receptor/ERK signaling pathway that promotes tamoxifen resistance (13), as well as in the transactivation of genes linked to proliferation and migration in breast cancer, such as connective tissue growth factor and N-cyclophosphamide

Correspondence to: Dr. Marco Allán Pérez-Solís, Medical Research Unit in Reproductive Medicine, UMAE Hospital de Clínica Obstétrica no. 4 "Luis Castelnuovo-Negrete", Instituto Mexicano del Seguro Social, 289 Av. Río Magdalena, Level 6, Tlalpan San Ángel, C.P. México City 01090, México  
E-mail: marco\_perezsolis@yachema.com

**Key words:** G protein-coupled receptor 30 protein, cell viability, metastasis, transcription, breast cancer

amidohydrolyase 1 (14,15). There is also evidence that GPR30 expression in breast cancer can be regulated by a positive feedback loop with hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) (16). Recently, it was also reported that the activity of both proteins, GPR30 and HIF-1, is linked to a complex cross-talk process with the Notch1 signaling pathway, which in turn induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) (17). However, the data reported thus far from GPR30 expression and function studies during the course of breast cancer is contradictory; for example, GPR30 expression has been reported to be down-regulated during breast cancer development, and variously reported to function as a suppressor or inducer of proliferation or migration (14,18-26). Considering the importance of the expression profile of GPR30 for the integral understanding of its role in the progress of breast cancer, the present study aimed to determine the transcriptional mechanisms that regulate GPR30 expression in cellular models of different breast cancer subtypes (metastatic and non-metastatic).

#### Materials and methods

**Cell cultures.** The non-metastatic MCP-7 (HTB-22; American Type Culture Collection [ATCC]) and metastatic MDA-MB-231 (HTB-26; ATCC) breast cancer cell lines, as well as the normal breast cell line MCP-10A (CRL-10317; ATCC), were cultured in DMEM (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) supplemented with 10% FBS (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Leibovitz's L-15 medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) supplemented with 8% FBS and Mammary Epithelial Cells Growth Medium (Lonza Walkersville, Inc.) supplemented with cholecalciferol (Sigma-Aldrich; Merck KGaA), respectively. All cultures were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. All cell lines were tested for mycoplasmas and cellular authentication by commercial PCR Mycoplasma Detection Set (Takara Bio, Inc.) according with its manufacturer's instructions, and capillary electrophoresis in a 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.), respectively.

**Western blotting.** For GPR30 immunoblotting, total protein was isolated from  $1.5 \times 10^5$  cells of MCP-10A, MCP-7, MDA-MB-231 by lysis with RIPA buffer (1 M Tris/HCl pH 7.4; 6.5 M EDTA pH 8.0; 5 M NaCl; 0.4% deoxycholate; 0.8% K12PAL-CA-650; PMSF and Complete Mini protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics). For the ETS translocation variant (ETV1), ETV4 and ETV5 immunoblot, nuclear extracts were obtained from MCP-10A, MCP-7 and MDA-MB-231 cell lines, following the protocol described by Schmitz *et al.* (27). The total and nuclear protein extracts (80 µg) were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (EMD Millipore). Subsequently, the membranes were incubated overnight with the following primary antibodies in TBS-Tween 20 (TBST; 50 mM Tris; 140 mM NaCl; 0.1% Tween-20) with 4% BSA: Anti-GPR30 (1:625; cat. no. ab39742; Abcam), anti-E2f3 (transformation-specific (ETS) translocation variant (ETV4; 1:100; cat. no. sc-113; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-ETV3 (1:250; cat. no. sc-22897; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and anti-ETV1 (1:250; cat. no. ab81086; Abcam). As loading control, GAPDH expression was detected with anti-GAPDH

(1:10,000; cat. no. MAB379; Merck KGaA) for total extracts. Commercial nuclear extracts of MCP-7 (cat. no. sc-2149; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and K-562 (cat. no. sc-2130; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) were used as positive controls (40 µg) for ETV3 and ETV4, respectively. In the case of ETV1 and GPR30, 80 µg of total mouse brain and OVCAR3 nuclear extracts (courtesy of Ms. Iain Santos Paragaguá) were used as positive controls, respectively. The membranes were washed 3 times (15 min each) with TBST buffer and subsequently incubated with the following horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies: Goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG; 1:2,000; cat. no. 111-035-003; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) and goat anti-mouse IgG (1:10,000; cat. no. 115-035-003; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Immune complexes were visualized by enhanced chemiluminescence with SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce; Thermo Fisher Scientific, Inc.) according to the manufacturer's instructions in a C-DIGIt Blot Scanner (LI-COR Biosciences) during an exposure of 12 min and analyzed by Image Studio v2.1 software (LI-COR Biosciences).

**Cell viability assay.** MCP-7 and MDA-MB-231 cells were seeded into 96-well culture plates at a density of  $7.5 \times 10^3$  cells/well. The adhered cells were subjected to a starvation period of 6 h and stimulated afterwards with either 10 µM or 20 µM G15 (Arazo Biotech) or 10 µM G1 (Arazo Biotech) (Fig. 5f) or  $10^{-6}$  M retinoic acid (R.A; Sigma-Aldrich; Merck KGaA) or vehicle (DMSO) incorporated into the corresponding growth medium. Cells were subsequently fixed at 0, 24, 48 and 72 h with 1.1% formaldehyde for 15 min, washed with water three times and left to dry at room temperature. The cells were stained with crystal violet for 20 min, washed three times with water and allowed to dry at room temperature. Finally, 10% acetic acid was added for 20 min. The absorbance of each well was determined at 590 nm using a Synergy HT microplate reader (BioTek Instruments, Inc.).

**Migration assay.** A migration assay was performed on the MCP-7 (Fig. 5g) and MDA-MB-231 metastatic cell lines. Cells were seeded in 6-well culture plates with a  $7.5 \times 10^5$  cell density and grown in Leibovitz's L-15 medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) supplemented with 10% FBS, until they reached confluence. The cell monolayer was carefully wounded using a 100 µl pipette tip and the detached cells were removed by washing with FBS. The wounded monolayer cultures were subjected to a 24 h starvation period and were incubated afterwards for 48 h in serum-free medium containing 5 µM G1 (Arazo Biotech) or 5 µM G1 + 10 µM G15 (Arazo Biotech). Images of the wounds were captured at 0, 24 and 48 h using an Axiovert 25 microscope (Carl Zeiss AG) with a CP-Achromat 10x/0.25 Ph1 objective (Carl Zeiss AG) and a PraxioShot A280 digital photographic camera (Caron, Inc.) equipped with a DC150 camera adaptor (Leica Microsystems GmbH). The wound areas were analyzed with the key histology analysis software v2.0.3.0 (<http://keyhistologyanalysis.org>).

**GPR30 3' flanking region cloning.** MCP-7 and MDA-MB-231 cells seeded and grown to 75% confluence in 100 mm plates and genomic DNA was isolated according to the procedure described by Sambrook *et al.* (28). A 1987 bp DNA fragment

from both genetic materials was amplified by PCR using the following thermocycling conditions: Initial denaturation of 94°C for 30 sec, followed by 30 cycles of 94°C for 30 sec, 50.4°C for 1 min, and 68°C for 4 min, followed by a final extension at 68°C for 7 min. PCR was carried out with an Expand Long Template PCR system (Roche Diagnostics) and the pair of specific primers described in Table I. The amplification product was separated by 1.0% agarose gel electrophoresis, visualized by Visual Violet Gel Additive (Amresco, LLC), purified with a Gene Clean III kit (Bio 90; MP Biomedicals, LLC) and ligated with T4 DNA Ligase (Promega Corporation) into a pGEM-T vector (Promega Corporation), according to the manufacturer's instructions. The recombinant plasmid was propagated in JM109 *Escherichia coli* (Promega Corporation) and purified with a Wizard Plus SV Miniprep system (Promega Corporation). To obtain a reliable sequence of the cloned fragment, three different recombinant plasmids of each cell line were sequenced with a Big Dye Terminator System and an ABI PRISM 77 automatic sequencer (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.).

**Sequence analysis.** The nucleotide sequences obtained from the fragment of the 3' flanking region of GPR30 cloned from the MCP-7 and MDA-MB-231 cell lines was analyzed using BLAST (National Center for Biotechnology Information; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Both sequences were compared with each other and with the chromosome 7 sequence reported with the AC091729 accession number in the EMBL nucleotide sequence database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/08643712>). In addition, the binding sites for transcription factors were scanned with the prediction program in the JASPAR website (<http://jaspar.genomat.com>).

**Reporter gene constructs.** The recombinant plasmid harboring the human GPR30 promoter from MCP-7 cells was used as template to amplify five segments of different lengths (0.2, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 kbp), using specific forward and reverse primers with *Xba*I and *Bam*HI restriction sites, respectively. Each amplicon was purified using a GeneClean III kit (MP Biomedicals, LLC) and subsequently digested with *Xba*I and *Bam*HI restriction enzymes (Roche Diagnostics). Each digested segment was again purified and cloned into a pGL3-Enhancer firefly luciferase reporter vector (Promega Corporation), previously digested with the same restriction enzymes. The resulting constructs (pGPR2.0, pGPR1.5, pGPR1.0, pGPR0.5, and pGPR0.2) were amplified by transformation in competent JM109 *E. coli* cells (Promega Corporation). The putative *cis*-acting elements located at -628, -754, -895- and -896 bp from the translation start codon (TSC) were selected based on their high similarity with consensus sequences for ETS, negative glucocorticoid response element (NGRE), estrogen-related receptor  $\alpha$  (ERR1), SKY-box transcription factor (SON), and by site-directed mutagenesis in their 'core' sequence using the reporter construct pGPR1.0 as the template and the specific oligonucleotides described in Table I. Reporter constructs with loss-of-function mutations ( $\mu$ ) were indicated as ETS $\mu$ , NGRE $\mu$ , ERR $\mu$  and SON $\mu$ , and the construct with the only gain-of-function mutation was named ETS $\delta$ . Three clones of each plasmid were selected to verify the fidelity of the mutagenesis procedure by incorporation of

fluorescent dinucleotides using the Big Dye Terminator system (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.), according to the manufacturer's instructions.

**Transfections.** MCP-80A, MCP-7 and MDA-MB-231 cell lines were cultured in 96-well plates with a density of  $1.5 \times 10^4$  cells/well. The three cell lines were transiently transfected with 100 ng of each reporter gene construct, using the FuGENE HD Transfection reagent (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's protocol. A total of 100 ng of pGL3-Enhancer (Promega Corporation) plasmid was transfected to determine the background luminescence, and the pRL-TK Renilla luciferase control reporter plasmid (25 ng) was co-transfected as a normalization control. After 48 h of expression, luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase Reporter assay system (Promega Corporation) in a Sirius L Single Tube Luminometer (Turner-Biochem).

**Transient expression assays with phosphorylation inhibitors.** To assess the role of the main phosphorylation pathways activating the ETS factors associated with breast cancer in the regulation of the GPR30 promoter region with the functional ETS binding site, p38 kinase inhibitor SB203580, protein kinase A (PKA) inhibitor H89, and ERK inhibitor PD98059 (all from Merck, KJLA) were used at a 10  $\mu$ M concentration each in transient expression assays. Transient transfections were performed in the three cell seeded ( $1.5 \times 10^4$  cells/well) in 96-well plates. Each well was transfected with 100 ng of the reporter constructs pGPR0.5 and pGPR1.0 with or without inhibitors. The empty pGL3-Enhancer vector (100 ng/well) and pRL-TE (25 ng/well) were transfected as the background and internal control, respectively. After 22 h of starvation, each of the three inhibitors was added to the growth medium. Luciferase activity was measured 48 h after the application of the inhibitors using the Dual-Luciferase Reporter assay system in a Sirius L Single Tube Luminometer, aforementioned.

**Stimulation assays with RA.** MCP-7 cells were cultured in 96-well plates at a density of  $1.5 \times 10^4$  cells/well, and transfected with pGPR0.5 or pGPR1.0, aforementioned, and subsequently synchronized for 24 h with DMEM without phenol red (Sigma-Aldrich; Merck, KJLA), supplemented with inactivated FBS (HyClone; GE Healthcare Life Sciences) and stimulated with increasing RA concentrations in DMSO (0,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  and  $10^{-6}$  M) for 48 h. Reporter gene activity was measured using the Dual-Luciferase Reporter assay system in a Sirius L Single Tube Luminometer, aforementioned.

**Reverse transcription (RT)-PCR assays.** MCP-7 cells were seeded at a density of  $7.5 \times 10^5$  cells in 60 mm dishes with DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humid atmosphere for 24 h. Subsequently, the cells were washed with PBS and synchronized for 24 h with free-serum DMEM medium without phenol red. Later the cells were treated with RA ( $10^{-6}$  M) or with vehicle (DMSO) for 48 h. At the end of the stimulation, cells were washed with cold PBS and lysed with 1 ml of Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.). The cell lysate was mixed vigorously with 0.2 ml of chloroform (MP Biomedicals,

Table 1. Oligonucleotides used in the different applications.

Class	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Length (nt)
<b>Genomic DNA</b>		
SPCPR30- <i>+</i>	AAGCAATAGGTCACAAATCTCTAG	25
SPCPR30- <i>−</i>	GTCTCTGCACCCGTCAGCTTTC AAGA	26
<b>Reporter construction</b>		
pGPR3.0	ACCCAGATCTTGTCAACA AATCTCTAG	27
pGPR1.4	ACCCAGATCTTCTTGGGACCTGTCCCTAG	29
pGPR1.0	ACCCAGATCTTGAATCTCTCCCTGGAG	27
pGPR0.5	ACCCAGATCTTTTTCACACAGGCGACTC	27
pGPR0.2	ACCCAGATCTTAGCATTGTTTCTTCCX	27
pGPR- <i>−</i>	ACCAAGCTTGTCTCTGCACCCGTCAGC	27
<b>Reverse transcription-PCR</b>		
GPR30	F: TTCAGCAGTCCCTGTGAGA R: GTTGTCAAGCTCCCGACTC	19 18
ETV3	F: GTTGTGCTGTGAGAGACTGGAG R: CATTTGCTGCGTTCATCAAGAAAG	22 23
ETV4	F: CCCAACAAAGTCCCATTTCAATGC R: AAGGCTCACCAAGCCACCTTC	24 20
ETV1	F: GTACCAGGACCCAGTGTATGAAAC R: GGTATGAGCCAGGAAAGGCTTC	23 20
GLP1RH	F: GCTCTCTGCTCCTCCTGTTTC R: ACCAGCCAAATGTTTGACTC	21 19
<b>Metagenesis</b>		
ETS <sub>2</sub> - <i>+</i>	TACCTTCATTGCCCCGTGGGCTGCTC	27
ETS <sub>2</sub> - <i>−</i>	GAAGCAGGCCCCAGGCGGCAATGAAAGCTA	27
SOX <sub>2</sub> - <i>+</i>	ATTTCGCAAAACCATTGACCCGTTTC	25
SOX <sub>2</sub> - <i>−</i>	GAAGGCGTTCATGGAAAGAGGGAAAT	25
ERK1 <sub>β</sub> - <i>+</i>	TCCCAAAAACAATTTCCGTTTCACTC	26
ERK1 <sub>β</sub> - <i>−</i>	GAATGAAAAGGGGAAATTTTFTTGGGAA	26
NUR1 <sub>β</sub> - <i>+</i>	ACTCTCTCCCTGTGTTTCTTCTCTAG	26
NUR1 <sub>β</sub> - <i>−</i>	CTAGGAAAGAAACAACAGGCGAGAGAGT	26
ETS <sub>2</sub> - <i>+</i>	TACCTTCATTACTTCCGTTGCTGCTC	27
ETS <sub>2</sub> - <i>−</i>	GAAGCAGGCCACCGGAAAGTAAAGGCTA	27

*g*, loss-of-function mutant; *−*, antisense; *+*, gain-of-function mutant; ERK1, estrogen-related receptor  $\alpha$ ; ETS, E2b transformation-specific; F, forward; GPR30, G protein-coupled receptor 30; NUR1, nuclear receptor  $\beta$ ; SOX, SOX-box transcription factor; *+*, sense.

LLC) for 30 sec and centrifuged for 40 min at 14,000 rpm and 4°C. The aqueous phase was recovered and mixed in 1 ml of isopropanol (Amresco, LLC) to precipitate RNA, followed by centrifugation at 14,000 rpm and 4°C for 1 h. The RNA pellet was washed with 75% ethanol and centrifuged at 14,000 rpm and 4°C for 12 min. Finally, the total RNA was resuspended in water treated with diethyl pyrocarbonate (Thermo Fisher Scientific, Inc.); cDNA was synthesized using the Phasor RT-PCR kit (Pharmacia; Thermo Fisher Scientific, Inc.), and PCR assays were performed using the cDNA as template and specific oligonucleotides (Table 1) for amplification of the transcripts corresponding to GPR30, ETV1, ETV4, ETV3 and housekeeping gene GAPDH. PCR was carried out with Clontech HIFI PCR mix (Clontech

Laboratories, Inc.) with the following thermocycling conditions: initial denaturation of 94°C for 30 sec; followed by 30 cycles of 94°C for 30 sec, 58°C for 45 sec and 72°C for 1 min, followed by a final extension period of 5 min at 74°C. The amplification products were resolved in a 10% polyacrylamide gel, stained with ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml) and visualized in a UV transilluminator.

**Statistical analysis.** The results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Comparisons between  $\geq 2$  groups were made using ANOVA followed by Tukey's post hoc test, or by Dunnett's post hoc test for comparisons between treatments and the vehicle control. Statistical analyses were performed using the SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc.) software for

Windows. Each assay was performed in triplicate.  $P < 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference.

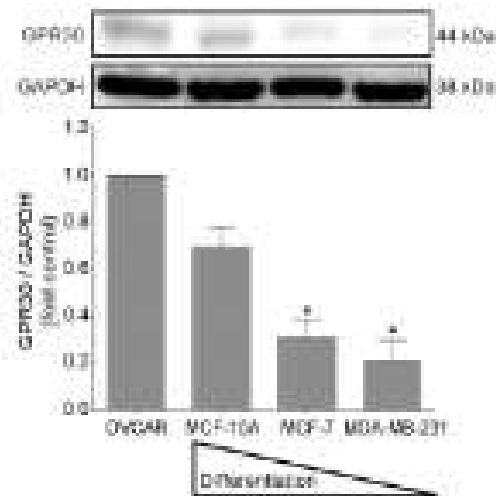
## Results

**GPR30 regulates cell viability and migration of breast cancer cells.** The assays carried out for the immunodetection of GPR30 revealed a 44-kDa band corresponding to the molecular weight of this receptor (29) in the extracts of non-malignant epithelial cells (MCF-10A) and in dedifferentiated malignant cells (Fig. 1). Densitometric evaluation of the bands obtained indicated that after the control cell line (ovarian cancer cell line OVCAR3), the non-tumorigenic mammary gland cell line MCF-10A exhibited highest relative expression level of GPR30 (7.7%), followed by the non-malignant breast cancer cell line MCF-7 (2.4%) and the metastatic MDA-MB-231 line (1.2%).

The effects of the specific GPR30 antagonist, G15, on MCF-7 and MDA-MB-231 viability was evaluated at 0, 24, 48 and 72 h (Fig. 2). The viability of MCF-7 cells treated with G15 was significantly reduced at 72 h compared with the vehicle-treated control group (Fig. 2A). MCF-7 cells that were cultured for 72 h in the absence of G15 increased their absorbance 4.8-fold compared with the 0 h time point, whereas G15-treated cells increased their absorbance 2.8-fold with a 10  $\mu$ M concentration and 2.4-fold with a 20  $\mu$ M concentration. These data indicated that in cell cultures treated for 72 h with 10 and 20  $\mu$ M G15, cell viability decreased regarding untreated cells 40 and 49%, respectively. However, although an increase in viability in the MDA-MB-231 cell cultures was also observed with and without G15 treatment, there was a significant decrease in viability in cells treated with 20  $\mu$ M G15 for 72 h compared with vehicle-treated cells at the same time point (Fig. 2B). The absorbance obtained in untreated-cells after 72 h of culture was 2.0-fold greater compared with cells at 0 h, whereas the increase in absorbance in cells treated with 10 and 20  $\mu$ M G15 was 2.3 and 1.7-fold compared with the respective 0 h time point. These results indicated that MDA-MB-231 cell viability decreased 31% when cells were treated with 20  $\mu$ M G15 compared with control cells at 72 h.

In the cell viability assays, untreated MCF-7 cell viability was increased 4.8-fold at 72 h compared with the 0 h time point, whereas the viability of cells treated with the GPR30 agonist (10  $\mu$ M G1) increased only 2.0-fold over the same time period (Fig. 3A). In the case of MDA-MB-231 cells, viability increased 1.9-fold after 72 h without treatment, whereas the G1-treated cells increased only 1.35-fold after the same time elapsed (Fig. 3B). These data demonstrated that the viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells decreased significantly by 74 and 64%, respectively, after 72 h of treatment with G1, compared with the respective control at the same time point.

The role of GPR30 in cell migration was examined by wound-healing assays with the metastatic MDA-MB-231 cell line (Fig. 2C and D), since the MCF-7 cell line showed no significant changes in its migration (Fig. 5). In untreated MDA-MB-231 cells, the wound area was reduced by 41% after 24 h and 59% after 48 h. Conversely, in G1-treated cells the wound area reduced only by 17% at 24 h and 22% at 48 h. To confirm that the suppressive effect of G1 on migration was through GPR30, the effect of its antagonist, G15, on migration impaired by G1 was also assayed. For this, a G15 concentration



**Figure 1.** Expression of GPR30 protein in mammary gland cell lines. Representative immunoblot of GPR30 protein expression levels in the non-tumorigenic mammary epithelial cell line MCF-10A and the breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. The ovarian cancer cell line OVCAR3 was used as positive control and GAPDH was used as loading control and for normalization. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. \* $P < 0.05$  vs. OVCAR3. GPR30: G protein-coupled receptor 30.

twice as high as the minimum G1 concentration that was required to observe an effect on migration was used, since the affinity of the antagonist for the receptor is three times lower compared with that of G1 (18). The cells treated simultaneously with both G1 and G15, drastically the wound area 23% at 24 h and 35% at 48 h. This means that G1-treated cells lost 36% of its migratory capacity with respect to untreated cells, while cells treated with both agonist and antagonist recovered 20% of its migratory capacity regarding cells treated only G1.

**Structural analysis of the 5' flanking region of the GPR30 encoding gene.** Through structural and predictive analysis of the 1,987 bp sequence cloned from the 5' flanking region of the gene encoding the GPR30 receptor, it was possible to characterize the GPR30 promoter fragment in these regions. A proximal region ranging from -1 to -1,009 bp from TSC with a heterogeneous sequence, and two distal regions ranging from -1,010 to -1,512 bp and -1,513 to -1,887 bp from the TSC, which have a high GC content (70%) and a high AT content (72%), respectively (Fig. 3). The sequence alignment of the GPR30 promoter cloned from both MCF-7 and MDA-MB-231, with the chromosome 7 sequence did not reveal any mismatch (data not shown). In addition, 14 putative cis-regulatory elements with a similarity greater than 98% in relation to consensus sequences for forkhead box P1 (FOX P1), ESR1, NRE1, home-specific homeobox (BSX) and members of the ETS, SOX and hypoxia-inducible factors (HIF) families, were found by JASPAR program. Given its high nucleotide heterogeneity, the distribution of these possible sites of transcriptional regulation are concentrated in the proximal region, whereas owing to the low nucleotide heterogeneity of distal regions, it was only possible to find three sites in one of them (Fig. 3).



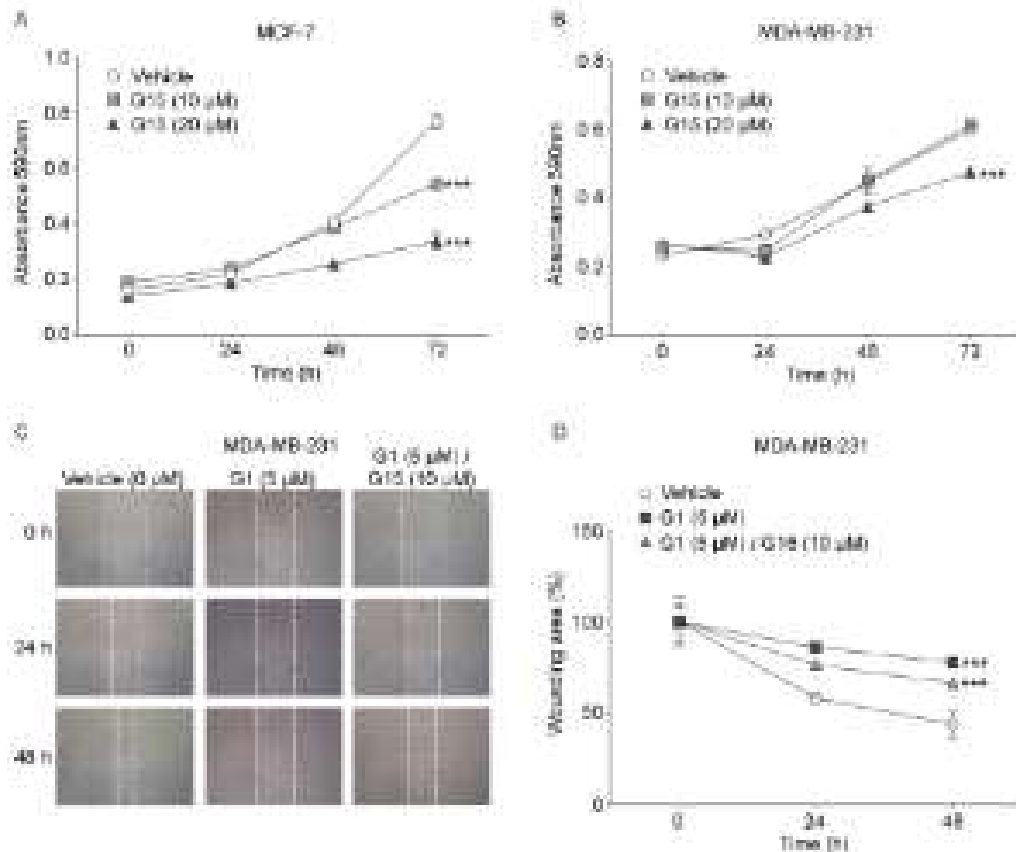


Figure 2. Effects of GPR30 on viability and migration of breast cancer cells. Effect of G15 on the cell viability of (A) MCF-7 and (B) MDA-MB-231. <sup>\*\*\*</sup>P<0.001 vs. Vehicle at 72 h. (C) and (D) Effect of GPR30 activation by G1 and the G1/G15 competition on the migration of the metastatic cell line MDA-MB-231. The migration data was measured in terms of wound width, obtained at 0, 24 and 48 h from seven quadrants per well, considering initial wound width as 100%. <sup>\*\*\*</sup>P<0.001 vs. Vehicle at 48 h. Data are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments, performed at least in triplicate. G1, a GPR30 agonist; G15, a GPR30 antagonist; GPR30, G protein-coupled receptor 30.

**Transcriptional regulation pattern of the GPR30 promoter in breast cancer.** The transient expression of the five reporter constructs governed by different length versions of the GPR30 promoter truncated at the 5' end (Fig. 3), revealed that even without the background activity generated by the empty vector, the transcriptional regulation pattern of the promoter turned out to be very similar in all three mammary gland cell lines. All reporter constructs transfected in the three cell lines, except pGPR1.0 in MCF-10A, produced a similar change pattern in luciferase activity. The maximum activity of GPR30 promoter was found in pGPR0.5 being this 1.8-fold higher in MCF-83A compared with its MCF-7, and approximately 8.8-fold higher compared with MDA-MB-231 (Fig. 4). Using the luciferase activity induced solely by the initial 200 bp (pGPR0.2) of the GPR30 promoter in each cell line as the basal promoter activity, it was demonstrated that in MCF-10A cells the activity of pGPR0.5 significantly increased 93%, whereas activity with pGPR2.0 significantly decreased by 22% of basal activity of promoter. In the case of MCF-7, luciferase activity with pGPR1.5 and pGPR0.5 significantly increased 80 and 29% of basal activity, respectively. Conversely, the reporter activity of pGPR1.0 and pGPR1.0 in the same cell line, significantly

decreased 44 and 70% of basal activity, respectively. Similarly, luciferase activity in MDA-MB-231 also significantly increase 98 and 71% of basal activity with pGPR1.5 and pGPR0.5, respectively. Although the activity of the reporter gene with pGPR2.0 and pGPR1.0 in MDA-MB-231 had a similar pattern of change as was observed in MCF-7, such changes were not significant (Fig. 4). Altogether, the changes observed in the three cell lines, suggest that the GPR30 promoter fragments ranging from 2.0 to 1.5 kbp and 1.0 to 0.5 kbp could contain transcriptional suppressing elements, while fragments ranging from 1.5 to 1.0 kbp and 0.5 to 0.2 kbp could host transcription activating elements.

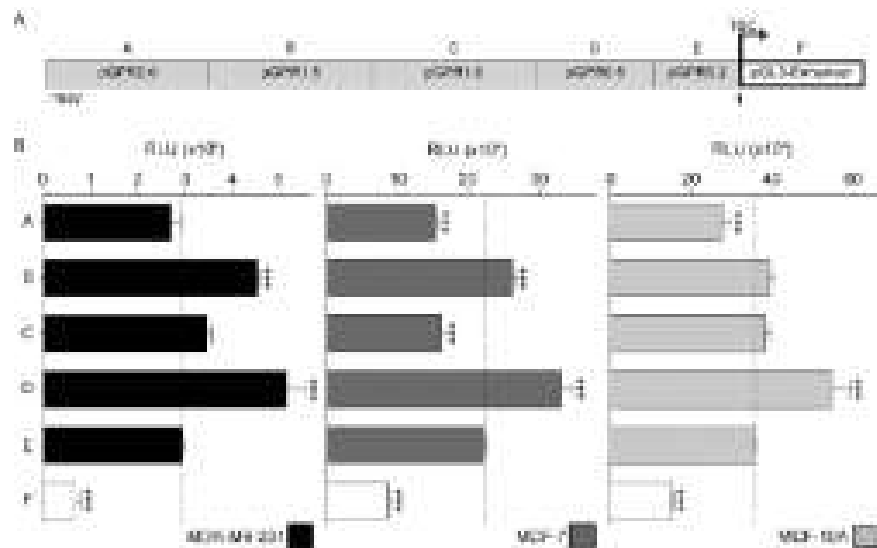
**A cis-regulatory element that resembles the polyomavirus enhancer activator 2 homolog (PEA3) ubiquitously conserved sequence, activates the GPR30 promoter.** Bearing in mind the role of the sequence between -1,009 to -311 bp contained in the construct pGPR1.0 in the suppression of the transcription, functional analysis of the putative cis-regulatory elements for negative regulation factors located in this region was conducted. This was done by the transient expression of the ETS $\alpha$ , NCRE $\beta$ , ERK $\beta$  and SOX $\alpha$  reporter



Figure 1. Nucleotide sequence of the cloned 5' flanking region of the GPR39 gene. Fragments of 987bp upstream of the translation start codon of GPR39 gene cloned from MCP-7 and MDA-MB-231. The putative cis-regulatory elements predicted by JASPAR are indicated by bold, lowercase letters. The sequences corresponding to the oligonucleotides that were synthesized to hold the different reporter constructs are indicated in shaded letters. The arrows indicate the beginning of the different regions in which GPR39 was divided. BDN, brain-specific homeobox; DR1, distal region 1; DR2, distal region 2; ERS1, estrogen-related receptor  $\alpha$ ; ETS, E26 transcription factor; FOXO1, forkhead box P1; GPR39, G protein-coupled receptor 39; HNF, hepatocyte nuclear factor; NRE, negative glucocorticoid response element; PR, proximal region; SOX, SOX box transcription factor.

constructs. None of the mutations exhibited increased luciferase activity, as expected; however, the ETS $\alpha$  mutation significantly decreased the reporter gene activity by 24% in MCP-10A, 65.8% in MCP-7 and 46% in MDA-MB-231 compared with the wild-type construct pGPR3.0 (Fig. 5A). Although with the site-directed mutations in the ERK $\alpha$ , NRE $\alpha$  and SOX $\alpha$  constructs also is observed a decrease in the reporter gene activity in any of transfected cell

lines, these changes were not statistically significant. The functionality of a putative ETS cis-regulatory element was confirmed by comparing the activity of pGPR3.0 and the construct containing an ETS factor consensus elements (ETS $\alpha$ ) in the MDA-MB-231 cell line (Fig. 5B). As expected, the luciferase activity obtained with ETS $\alpha$  was 1.27-fold greater compared with the pGPR3.0 construct containing the wild-type GPR39 promoter.



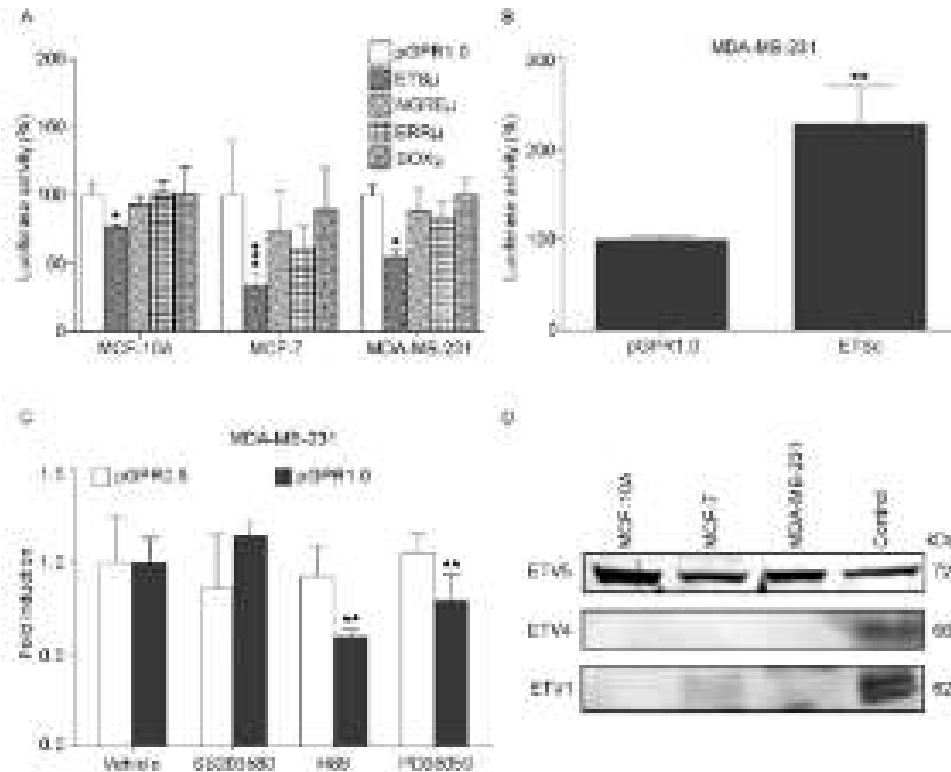
**Figure 4.** Transcriptional regulation of the GPR30 promoter cloned in mammary gland cell lines with different differentiation grade. (A) Schematic representation of the fully pGL3-Eukaryotic basic transcription reporter plasmid, driven by different 5' truncated segments of the GPR30 promoter: pGPR30, pGPR30.5, pGPR30.10, pGPR30.15 and pGPR30.2. (B) Cells were co-transfected with the different constructs of the GPR30 promoter or pGL3-Eukaryotic (white bar) and the plasmid pRL-TK (*Renilla* luciferase) in the MCF-10A, MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines, for assay promoter activity (RLU). Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate. \* $P < 0.05$  vs. basal levels (pGPR30.2, GPR30, 0 protein-coupled receptor 30; RLU relative luciferase assay; TSC, translation start-codon).

In addition, to gather additional evidence regarding the participation of any of the factors of the ETS family in the positive regulation of the GPR30 promoter observed with the ETS element studied, the common phosphorylation pathways of such factors were inhibited to verify if GPR30 promoter activity decreases. For this, transient expression assays performed with pGPR30.0 (with ETS sites) and pGPR30.5 (without an ETS site) on MDA-MB-231 cells, treated with SB203580 (p38 inhibitor), H89 (PKA inhibitor) and PD98059 (ERK1/2 inhibitor) demonstrated statistically significant changes only with the 1.0 kbp GPR30 promoter in presence of H89 and PD98059, reducing its activity to 0.39 and 0.79-fold, respectively (Fig. 5C). Similar assays using the pGPR30.5 construct had no significant effect on the activity of the reporter gene, since the ETS factors of the PEA3 subfamily require the phosphorylation of PKA and ERK to perform their transcriptional activity (30-32), and given that the functional ETS element identified is located in the region affected by these inhibitors (pGPR30.0), the results obtained from assays with protein kinase inhibitors point to ETV1, ETV4 and ETV5 as the factors with the greatest possibility of interacting with this element.

The activity of the factors of the PEA3 subfamily have been closely related to the development of breast cancer (33-37), but the expression of each of them may be committed to specific phenotypes. To confirm which of these factors may be active in the cellular models in the present study, and possibly involved in the activation of the GPR30 promoter through the inducing ETS element, their expressions were verified qualitatively by immunoblotting assays (38). ETV5 has been previously reported as a factor expressed by MCF-7 (39). Therefore, the immunoblotting with anti-ETV5 was carried out using a commercial MCF-7 nuclear extract as positive control. This

assay confirmed the expression of a 72 kDa protein that correspond to the molecular weight of ETV5 factor (40) in the nuclear extracts of all mammary gland cell lines used in the previous experiments and in the nuclear extract of positive control as expected. Conversely, a 66 kDa protein corresponding to the molecular weight of ETV4 was detected with anti-ETV4 only in the positive control extract (K-562) (40). In addition, a 62 kDa protein corresponding to the molecular weight of ETV1 (40) was also detected with anti-ETV1 in the nuclear extracts of the MCF-7 cell line and the positive control (mouse brain) (Fig. 5D). These results suggested that ETV5 and ETV1 may be able to transactivate GPR30 expression through the ETS element found as functional in pGPR30.

RA suppresses the activity of the GPR30 promoter and its ETS site located at -630 bp. Since RA suppresses proliferation in ER-positive breast cancer (41,42) and regulates the expression of several factors of the ETS family (43), dose-response assays with this metabolite were carried out on the MCF-7 cell line transfected with pGPR30.5 (without ETS site) and pGPR30.0 (with ETS site). In the case of the pGPR30.5 construct, the reporter gene activity exhibited a statistically significant suppression of 28.1% only when it was exposed to a final concentration of  $10^{-6}$  M. By contrast, with the pGPR30.0 construction containing the inducer element for ETS factors, the activity of the promoter decreased significantly from  $10^{-12}$  M concentration and continued significantly decreasing up to  $10^{-6}$  M with the highest concentration (Fig. 6A). In addition, the transient expression assays in RA-treated and untreated MCF-7 cells with the transfected pGPR30.0, ETSc or ETSp constructs, exhibited a statistically significant decrease of ~50% in luciferase activity promoted by pGPR30.0 and ETSc,



**Figure 5.** PEAS affinity is involved in GPR30 transactivation in breast cancer cells. Reporter gene activity (*luciferase*) induced by the pGPR30 construct and its (A) list-of-function mutant versions ET5a, MGR1a, ERR $\alpha$ , and SOX2 in MCF-10A, MCF-7 and MDA-MB-231 cells and (B) gain of function mutant, ET5a, in MDA-MB-231 cells. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 and \*\*\**P*<0.001 vs. pGPR30.1. (C) Effects of the inhibition of p38 (SB203580), PKA (BAY) and ERK1/2 (PD0325901) on reporter gene activity of the GPR30 promoter constructs pGPR30.7 without the functional ETS site (white) and pGPR30.8 containing ETS site (black) in MDA-MB-231 cells. F6080, F6080.1 and F6080.2 vs. Vehicle. (D) Immunoblots of ETV3, ETV4 and ETV1 performed with nuclear extracts of MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 and positive controls as was described in the *materials and methods*. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments in triplicate. ETS, E2F transcription-specific; MGR1, negative glucocorticoid response element; ERR $\alpha$ , estrogen-related receptor  $\alpha$ ; SOX, SOX-box transcription factor; PKA, protein kinase A; PEAS, polyomastrans activator 3 binding; GPR30, G protein-coupled receptor 30.

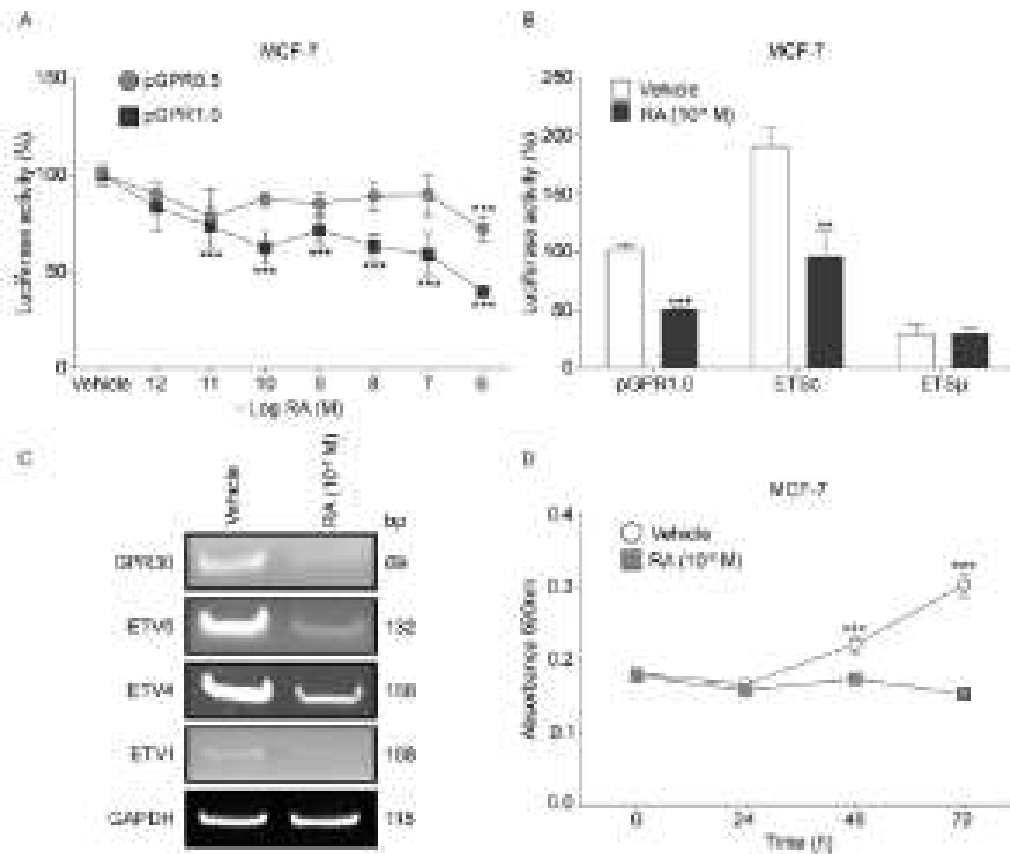
when the cells are treated with RA, while with ET5a no effect was observed (Fig. 9B).

The RT-PCR assays of GPR30 and its possible transcriptional regulators, performed with total RNA isolated from MCF-7 cells exhibited a notable decrease in amplicon production of GPR30, ETV3, ETV4 and ETV1 transcripts in RA-treated cells compared with the vehicle-treated cells (Fig. 9C). Similarly, viability assays using RA-treated MCF-7 cells showed no significant changes in absorbance during different culture times, whereas the absorbance of vehicle-treated MCF-7 cells increased 21% at 48 h and 67% at 72 h of cultivation. No significant differences in viability were identified in RA-treated cells at any time point compared with the respective 0 h control, which indicated a complete depletion of viability in MCF-7 cells associated with RA (Fig. 9D).

## Discussion

A few years after the identification of GPR30 as an orphan receptor in 1996 (44), the expression and function of this membrane receptor in breast cancer was intensively studied.

However, although it has been reported that the expression of GPR30 in the mammary gland is well (45) or restricted to myoepithelial cells (46), Scolding *et al.* (47) have provided evidence that suggests the involvement of GPR30 in upregulation of the *in vitro* proliferation of breast tissue epithelial cells. Conversely, data reported by other research groups regarding the role of GPR30 in breast cancer are allowed to infer its therapeutic importance (6,48-50). The lack of a well-defined expression pattern of GPR30 in the course of breast cancer hinders the correct interpretation of evidence concerning the role that this receptor may serve in the development of this malignancy (7,51-53). In the present study, the GPR30 transactivating assays showed that in the most differentiated-mammary gland cell line (MCF-10A) there is a greater expression of GPR30 compared with expression levels in the cellular models of breast cancer that have a partially (MCF-7) or completely (MDA-MB-231) lost cell polarity. In turn, the difference observed between the GPR30 expression in MCF-7 and MDA-MB-231, helps to explain why the GPR30-dependent induction on proliferation deduced from viability assays with G15 in MCF-7 cells is more evident than in MDA-MB-231 cells. It is important to mention that the effect caused by G5



**Figure 8.** GPR30 promoter and its ETS cis-element located -530 bp from TSC is repressed by RA in MCF7 differentiated breast cancer cells. (A) Analysis of reporter gene activity of pGPR3.0 and pGPR1.0 in transient expression assays performed in MCF-7 cells exposed to a RA dose-response curve. <sup>\*\*\*</sup>P<0.001, <sup>\*\*\*</sup>P<0.0001 vs. Vehicle. (B) Assessment of reporter gene activity of the pGPR3.0, ETS0, and ETS4 constructs in RA-treated and untreated MCF-7 cells. <sup>\*\*\*</sup>P<0.001, <sup>\*\*\*</sup>P<0.0001 vs. Vehicle. (C) Effects of RA treatment (10<sup>-6</sup> M) on mRNA expression of GPR30 and ETS4 regulatory factors in MCF-7 cells were determined by reverse transcription-PCR. (D) Viability of MCF-7 cells in the absence (vehicle control) and presence of RA. <sup>\*\*\*</sup>P<0.001, <sup>\*\*\*</sup>P<0.0001 vs. 0 h. Data are presented as the mean ± SD of three independent experiments in triplicate. ETVs, E26 transformation-specific; GPR30, G-protein-coupled receptor 30; RA, retinoic acid; TSC, transcription start codon.

on the viability of the two models of breast cancer was not considered for the interpretation of the GPR30 activity, since it has been recently reported that this agonist suppresses proliferation through an GPR30-independent pathway (54). Overall, these results, together with the gradual loss observed in transcriptional regulation of the GPR30 promoter in breast cancer cell lines, indicate that mammary gland epithelial cells such as MCF-7/RA have GPR30 activity and that this can be extinguished in the course of breast cancer as a result of gene expression reprogramming that the malignant cells undergo during their dedifferentiation. In this regard, several research groups have reported that this can occur with GPR30 in breast cancer through epigenetic mechanisms that act at the promoter level (49,51,55).

However, the viability and migration assays of the present study show that despite the role epigenetic silencing may be playing in the expression of GPR30, poorly differentiated breast cancer cells, such as MDA-MB-231, still retain responsiveness to both the agonist and the GPR30 antagonist. Contrasting the results obtained from the viability assays with

those of migration, it is interesting to note that agonist and antagonist of GPR30 promote contrary effect in the migration, which indicated that G1 may reduce migratory ability through GPR30 and that G15 may be able to at least partially block this suppressive effect. These results also suggested that GPR30 induced proliferation through a different pathway to the one with which it suppresses migration, which could help to explain how the antagonism proposed by some authors between proliferation and metastasis could happen (56). It was not possible to evaluate the effects of G1 and G15 on the migration of MCF-7 because this cell line showed no ability to migrate from untreated cells, which had been previously reported by other authors (57). It was also verified that the doses used in the different assays of viability and migration did not have toxic effects that would alter the results obtained (data not shown). Therefore, since the results indicated that GPR30 expression and function are subject to changes in cell differentiation in the course of breast cancer, it is possible to better interpret why there are some studies that report the expression of GPR30 as a risk factor for the use of hormonal

therapy (13,58) and other studies that postulate this receptor as a favorable prognostic factor for disease-free survival of patients with ER-positive breast cancer (50,51,59).

Confirmation of GPR30 biological activity at different differentiation stages in breast cancer led to the investigation of the mechanisms that regulate GPR30 expression at the transcriptional level. The present study aimed to determine if there are different transcriptional mechanisms of GPR30 that match with its performance in the different phenotypes studied, since the studies in this regard are scarce and the majority have focused on establishing the role of epigenetic regulation in GPR30 expression (16,31,55,60,61). The predictive analysis of *cis*-regulatory elements performed on the 5' flanking region of the GPR30 gene obtained from the two malignant cell lines found only three putative sites in DR1 (GC 70%) and none in DR2 (AT 72%) probably due to its low heterogeneity, whereas in the proximal region of greatest heterogeneity 11 putative sites were identified for diverse transcription factors previously related to breast cancer. According to the data obtained from the transient expression assays carried out with pGPR3.2, the basal activity in MDA-MB-231 cells resulted in six-fold lower than MCF-7 and eleven-fold lower than MCF-10A. These results support the notion that GPR30 could be downregulated by EMT epigenetic reprogramming that malignant cells may undergo (51,55,61). However, this same epigenetic reprogramming could at the same time be indirectly involved in the positive regulation of GPR30 expression, since a specific *cis*-regulatory element for members of the ETS family found between -631 and -625 bp of the TSC in the promoter of GPR30 exhibited the greatest activity in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells compared with activity in non-malignant mammary gland cells (MCF-10A), suggesting an incorporation of transcriptional regulators that was absent in the program of gene expression.

To determine possible transcription factors of the ETS family that may be involved in the transactivation of GPR30 through *cis*-regulatory element located between -631 and -625 bp from TSC, those repressor factors of this family, such as Ets-2 repressor factor, ETV5, ETV7, ETS-like gene 3, and E74-like factor 1, were identified through previous reports on their predominant function (62,63). Subsequently, taking as inclusion criterion their relationship with the progression of breast cancer, only the activators ETS1 (64), ETS2 (65) and the TEA3 subfamily (66) remained as possible interactors with the ETS binding site of the GPR30 promoter. To complete this analysis, transient expression assays were conducted with the reporter constructs pGPR1.0 and pGPR0.5 in untreated MDA-MB-231 cells and in cells treated with inhibitors of the main phosphorylation pathways, including SH203680 (p38), H89 (PKA), PD98059 (ERK1/2); exposure to H89 and PD98059 produced the expected suppressor effect on the pGPR1.0 construct. Several previous studies have reported that the PKA and ERK phosphorylation pathways are reactivated during the development of breast cancer, which promotes the expression, stability and activation of several oncogenes (67-70). However, ETS1 and ETS2 are factors that only need to be phosphorylated by the ERK pathway to be activated (71,72), whereas TEA3 subfamily factors can be phosphorylated by both PKA and ERK (73,74). Western blotting data from the present study demonstrated that only ETV5 is expressed in the

three mammary gland cell lines, where the activity of the ETS binding site was observed. Although these results suggested that ETV5 has the highest possibility of interacting with the GPR30 promoter in MCF-10A and MDA-MB-231, it does not imply that other factors, such as ETV1 in MCF-7, are not involved in the transactivation of GPR30.

Since cell growth is a process favored by the gene expression program of malignant cells with a still epithelial phenotype (56), as well as by GPR30 activation, it was proposed to investigate whether RA, an anti-proliferative agent frequently used as an adjuvant in the treatment of non-invasive breast cancer, exerted a suppressive effect on GPR30 expression. Transient expression assays in MCF-7 revealed that even though the GPR30 promoter does not harbor an RA response element, this metabolite significantly decreased the activity not only of the promoter but also of ETS binding site found between -631 and -625 bp from TSC. The data of the RA-dependent reduction in the expression of GPR30 and the transcription factors possibly involved with its transcriptional regulation indicated that RA suppressed the activity of the transcription factors that bind to the *cis*-regulatory element in MCF-7 cells. The discrepancy between the results obtained from immunoblot and those from RT-PCR for the ETV4 expression may be due to a poor performance in the translation of their mRNA, since with the nuclear extracts of positive control (K562) was detected a 66 kDa protein corresponding with the molecular weight of ETV4 (46).

In conclusion, the results suggested a possible mechanism by which GPR30-dependent cell viability in non-invasive and ER-positive breast cancer cells may be downregulated by RA, but with a risk of triggering dedifferentiation. This indicated that specific activation of GPR30 may contribute to the treatment of non-invasive breast cancer tumors, preventing the transition to a more aggressive phenotype or may intervene by reversing the invasiveness of more aggressive tumors for the use of a more conventional treatment. Given the implications that the mechanism proposed in the present study may have for the prognosis and optimization of treatments for breast cancer at specific stages, it is also important to consider that the evidence reported here comes only from *in vitro* assays. Therefore, it is required that in subsequent studies, the functional ETS site between -631 and -625 bp from the TSC in the GPR30 promoter, as well as its possible transactivators, be included in assays that have a closer approach to the *in vivo* conditions, such as RNA interference or CRISPR.

#### Acknowledgments

The authors wish to thank Ms. Iris Santos Paraguan (Medical Research Unit in Reproductive Medicine, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)) for the total mouse brain and nuclear OVCAR3 extracts, as well as for her guidance in the standardization of cell viability assays with crystal violet. We would also like to thank Dr. Doraolinda Maya Nether (Medical Research Unit in Reproductive Medicine, IMSS) for the technical advice provided during the reverse transcription-PCR assays, and Dr. Arturo Aguilar Rojas (Medical Research Unit in Reproductive Medicine, IMSS) for the MDA-MB-231 cell line (American Type Culture Collection) and for his technical advice during the standardization of wound-healing assays.

### Funding

The present study was supported by Fondo de Investigación en Salud IMSS (grant nos. FIS/IMSS/PROY/O12/1154, FIS/IMSS/PROY/O12/1150 and FIS/IMSS/PROY/O17-2/120) and IMSS and CONACYT scholarships from the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa to DSB.

### Availability of data and materials

The datasets used during the present study are available from the corresponding author upon request.

### Authors' contributions

DSB, MAPS and AO conceived and designed the experiments. DSB, MAPS and PCO performed the experiments. DSB, MAPS and AO analyzed the data. MAPS, ZS and EB substantially contributed to the conception and drafting of work and revising it critically for important intellectual content. DSB, MAPS, PCO and AO wrote the paper. All authors read and approved the manuscript and agreed to be accountable for all aspects of the research in ensuring that the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

### Patient consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### References

1. Vergara J, Arcani F, Lamon K, Van Goy T, Barilotti F and Nicos F: Metastatic breast cancer: Sequencing hormonal therapy and positioning of fulvestrant. *Int J Gynecol Cancer* 18 (Suppl 2): S24-S26, 2008.
2. DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD,oding Sauer A, Jemal A and Siegel RL: Breast cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 69: 438-451, 2019.
3. Fan W, Chang J and Fu F: Endocrine therapy resistance in breast cancer: Current status, possible mechanisms and overcoming strategies. *Future Med Chem* 7: 1515-1538, 2015.
4. Barton M, Filardo EJ, Lolait SJ, Thomas F, Maggiolini M and Ponsatti EK: Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: Historical and personal perspectives. *J Steroid Biochem Mol Biol* 176: 4-15, 2016.
5. Ruan XJ, Wang JW, Wang ZH and Zhang SX: Regulation of HMG- $\beta$ -induced proliferation, migration and invasion of MCF-7 cells by upregulation of GPER30 expression. *Mol Med Rep* 9: 131-138, 2012.
6. Clizet K, Emme G and Othman C: 17 $\beta$ -estradiol-induced growth of triple-negative breast cancer cells is promoted by the reduction of GPER expression after treatment with gefitinib. *Oncol Rep* 37: 1252-1258, 2017.
7. Molina L, Figueroa CD, Blasco RD and Ehrenfeld P: GPER-1/GPER30 a novel estrogen receptor cited in the cell membrane: Therapeutic coupling to breast cancer. *Expert Opin Ther Targets* 21: 255-266, 2017.
8. Thomas F and Dang J: Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPER30 by an intramembral estrogen: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol* 162: 173-179, 2016.
9. Long N, Long B, Mann A, Lu D, Nguyen L, Chokri S and Stachek K: Tamoxifen and ICI 162,780 activate hypoxanthine G protein-coupled estrogen receptor 1 to rapidly facilitate biosynthesis in female rats. *Horm Behav* 93: 96-103, 2017.
10. Bologna CO, Ravankar CM, Young SM, Edwards BS, Arribas JB, Kissler AS, Parker MA, Trachonko SE, Sawchuk NF, Etkar LA, et al: Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPER30. *Nat Chem Biol* 7: 207-212, 2010.
11. Dennis MK, Barai R, Ramiah C, Patrie WK, Akam SN, Nayak TK, Bologna CO, Luffin A, Bralston E, Datta E, et al: In vivo effects of a GPER30 antagonist. *Nat Chem Biol* 5: 421, 2009.
12. Dennis MK, Pined A5, Barai R, Ramiah C, Patrie WK, Bologna CO, Oprea TI, Yamaguchi Y, Higashi S, Siler LA, et al: Identification of a GPER/GPER30 antagonist with improved estrogen receptor coreceptor selectivity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127: 356-369, 2011.
13. Mo Z, Liu M, Yang F, Liu H, Li Z, Tu C and Yang Q: GPER30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer. *Breast Cancer Res* 15: R114, 2013.
14. Fandry DP, Lappin R, Albanis L, Muller A, Maggiolini M and Pined A5: Tamoxifen GPER30 signaling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J* 28: 323-332, 2009.
15. Luck NC and Sewer MB: Oestrogen stimulates MCF-7 breast cancer cell growth by inducing acid ceramidase (ASAH1) gene expression. *J Biol Chem* 286: 19399-19408, 2011.
16. Rocchi AG, De Francesco EM, Vinciguerra A, Sisti D, Pansò ML, Anzilò E and Maggiolini M: The G protein-coupled receptor 30 is up-regulated by hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in breast cancer cells and carcinomycytoma. *J Biol Chem* 286: 10773-10782, 2011.
17. De Francesco EM, Maggiolini M and Mushi AM: Crosstalk between Notch, HIF-1 $\alpha$  and GPER in Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 19: pii E2011, 2018.
18. Ariazi EA, Bralston E, Verran S, Shapp HA, Sotnik MJ, Cavillito HE, Black MA, Dennis AL, Arribas JB, Oprea TI, et al: The G protein-coupled receptor GPER30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Res* 70: 1184-1194, 2010.
19. Chen ZJ, Wei W, Jiang DM, Liu H, Wu WD, Yang X, Wu YM, Liu H, Wang CK, Du J and Wang HS: Activation of GPER suppresses epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells via NF- $\kappa$ B signals. *Mol Oncol* 10: 773-784, 2016.
20. Pizarro EI, Quinn JA, Prackelton AR, Jr and Hamed EL: Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPER30: Stimulation of adenyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 16: 79-84, 2002.
21. Filigheddu N, Sappalotto S, Chianale F, Porporato PE, Giugliano M, Orignani J, Raimoro E, Ferrara M, Ferraro B, Etkar P, et al: Diacylglycerol kinase  $\alpha$  mediates 17- $\beta$ -estradiol-induced proliferation, motility, and anchorage-independent growth of Her-2/EA endometrial cancer cell line through the G protein-coupled estrogen receptor GPER30. *Cell Signal* 23: 1888-1896, 2011.
22. Gu C, Yu M and Zhang C: G protein-coupled receptor 30 mediates estrogen-induced proliferation of preneoplastic germ cells via EGF/Akt1/3-catenin signaling pathway. *Endocrinology* 151: 3944-3956, 2012.
23. Hsu LH, Chu NM, Lin YF and Kao SH: G-protein coupled estrogen receptor in breast cancer. *Int J Mol Sci* 20: pii E306, 2019.
24. Pylet L, Abraham J, Liu A, Marchantek D and DeWitty KL: The cell surface estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30 (GPER30), is markedly down regulated during breast carcinogenesis. *Breast Cancer (Aukb)* 1: 65-78, 2005.
25. Wei W, Chen ZJ, Zhang KB, Yang XL, Wu YM, Chen XH, Huang BB, Liu HL, Cai SH, Du J and Wang HS: The activation of G protein-coupled receptor 30 (GPER30) inhibits proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis* 7: e1425, 2016.

26. Yu T, Liu M, Luo H, Wu C, Tang X, Tang S, He F, Yan Y, Wang Z and Tu G: GPER mediates enhanced cell viability and motility via non-genomic signaling induced by 17 $\beta$ -estradiol in triple-negative breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 140: 392-403, 2014.
27. Schreiber E, Mathias P, Miller MM and Schaffner W: Rapid detection of antigen-binding proteins with 'mini-emulsions' prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17: 6473, 1989.
28. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1-3, 1989.
29. Filardi EJ and Thomas P: Mini-review: G protein-coupled estrogen receptor-1 (GPER-1): Its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology* 153: 2950-2962, 2012.
30. Jankovcic B, Mendi D, Baeri JL and de Lencastre Y: The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of squamous carcinomas involving MAPK and PKA. *Oncogene* 13: 1745-1754, 1996.
31. Wu J and Jankovcic B: Regulation of the ETS transcription factor ERM1 by the 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 and protein kinase A. *J Biol Chem* 277: 42609-42619, 2002.
32. Yang JW, Kim MR, Kim HD, Kim SK, Jeong HD and Kang KW: Differential regulation of ERK1/2 expression by cAMP-dependent protein kinase in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Arch Pharm Res* 31: 250-256, 2008.
33. Barrett JM, Foglia MA, Singh G and Font RD: Expression of Ets-related transcription factors and matrix metalloproteinase genes in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 72: 227-232, 2002.
34. Christian-Lheritre A, Rivellini F, Lhéritier V, Horner L, Dedhans X, Cahani V, de Lencastre Y and Foyat JP: Prognostic value of ERM gene expression in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res* 10: 7297-7303, 2004.
35. O'Neill BS and Jankovcic B: Upregulation of the catalytic isoformase induced by the transcription factor ERM1 and oncogenic HRS2/Yes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 24-28, 2004.
36. Jiang J, Wei Y, Liu D, Zhou J, Shen J, Chen X, Zhang S, Kong X and Du J: E1A7 promotes breast cancer cell cycle progression via upregulation of Cyclin D1 transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 53-58, 2007.
37. Shepherd TD, Kockaric L, Scrajber MR, Miller WJ and Haxell JA: The pax3 subfamily ETS genes are targeted for HRS2/Yes-mediated extrinsic oncogenesis. *Curr Biol* 11: 1739-1744, 2001.
38. Wu X and Sakran S: ETS genes in breast cancer: A step in the right direction. *Cancer Res Treat* 11: 83-84, 2007.
39. Hong H, Yu H, Yuan J, Cao C, Cao H, Li W and Xiao C: MicroRNA-200b impacts breast cancer cell migration and invasion by regulating E-cadherin-Moesin. *Med Sci Monit* 22: 1946-1952, 2016.
40. Baeri JL, Mendi D, Muzgon EA, Albugli O, Sutherland RL and Lencastre Y: Expression of the PEAS group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells. *Int J Cancer* 70: 590-597, 1997.
41. Miller P, Kier S, Gustafson JA and Steins A: The anti-estrogenic effect of all-trans-retinoic acid on the breast cancer cell line MCF-7 is dependent on HES-1 expression. *J Biol Chem* 277: 28376-28379, 2002.
42. Miller P, Crofts JD, Newman BS, Bridgewater LC, Liu CY, Gustafson JA and Steins A: SGN1 mediates the retinoic acid-induced HES-1 gene expression in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 120: 317-326, 2010.
43. Park S-W, Do H-J, Ha W-T, Han MH, Song H, Uhm SI, Chung HJ and Kim HC: Differential expression of ETS family transcription factors in NCCIT human embryonic carcinoma cells upon retinoic acid-induced differentiation. *Biol Pharm Bull* 57: 679-685, 2004.
44. Owens C, Ray P, Nilsson C and Lohoff M: Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelical G-protein-coupled receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 285-292, 1996.
45. Okabe S and Luo-Lundberg LM: GPER30/GPER1: Searching for a role in estrogen physiology. *Trends Endocrinol Metab* 20: 409-416, 2009.
46. Zhou X, Wang S, Wang Z, Peng X, Liu F, Li XB, Li F, Yu FX, Sun Y, Yuan H, et al: Estrogen regulates Hippo signaling via GPER in breast cancer. *J Clin Invest* 129: 2123-2135, 2019.
47. Scolding AL, Prensley ER and Hathaway HJ: GPER mediates estrogen-induced signaling and proliferation in human breast epithelial cells and normal colonic/placental tissue. *Hum Cancer* 5: 140-160, 2014.
48. Lippman R, Plesano A and Maggiolini M: GPER function in breast cancer: An overview. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9: 96, 2014.
49. Wolfenbarger C, Ignatov T, Pashinian A, Wago AK, Costa SD, Zamboni AC and Ignatov A: GPER functions as a tumor suppressor in MCF-7 and SK-BR-3 breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 140: 663-671, 2014.
50. Martin SD, Label MN, Sokkari B, Ball G, Ghosh AR, Kotha EA, Ellis HJ and Starr SE: Low expression of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) is associated with adverse survival of breast cancer patients. *Oncotarget* 9: 25946-25956, 2018.
51. Mangayapada MC, Gupta PB and Linsay AM: Hypo-methylation of the upstream CpG island cluster is a likely mechanism of GPER1 silencing in breast cancer cells. *Onc* 64: 65-71, 2017.
52. Ignatov T, Wolfenbarger C, Pashinian A, Lentsch A, Senozuka A, Rossmann A, Costa SD, Kallunki T and Ignatov A: GPER-1 expression decreases during breast cancer tamoxifenosis. *Cancer Invest* 31: 309-315, 2013.
53. Holman J, Peralta EA, Lewis S and Kamei O: Biology of the estrogen receptor, GPER30, in triple negative breast cancer. *Am J Surg* 206: 698-703, 2003.
54. Li X, He C, Huang C, Hua G, Wang Z, Katsunaga SW, Rodabaugh KA, Kuyf AR, Deng J, Davis JS and Wang C: G-1 inhibits breast cancer cell growth via targeting calcineurin-binding site of tubulin to interfere with microtubule assembly. *Mol Cancer Ther* 16: 1081-1091, 2017.
55. Wolfenbarger C, Ignatov T, Noss N, Kallunki T, Das Costa S, Zamboni AC and Ignatov A: GPER promoter methylation controls GPER expression in breast cancer patients. *Cancer Invest* 35: 880-893, 2017.
56. Korkmaz AG and Matus DJ: Divide or conquer: Cell cycle regulation of lysosomal tubularin. *Trends Cell Biol* 27: 12-20, 2017.
57. Kamath I, Moshani A, Piss F and Kolopelias A: Signaling from protein-activated receptor-1 inhibits migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res* 69: 5023-5040, 2009.
58. Ignatov A, Ignatov T, Rossmann A, Costa SD and Kallunki T: Role of GPER30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 123: 87-96, 2010.
59. Brumsted S, Cheng B, Sigurdson M, Løvgrén K, Ring-Davies HL, Beding M, Jirstrom K, Malmström P, Okla B, Banzhaf PJ, et al: G protein-coupled estrogen receptor is a specific and correlates with increased distant disease-free survival of estrogen receptor-positive breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 19: 1081-1092, 2013.
60. Viroqueva A, Lippman R, De Marco F, Sicut D, Aquila S, De Amico F, Pappas SA, Aquila S and Maggiolini M: G protein-coupled receptor 30 expression is up-regulated by EGF and TGF alpha in estrogen receptor alpha-positive cancer cells. *Mol Endocrinol* 23: 1812-1826, 2009.
61. Mangayapada MC and Linsay AM: DNA methylation dependent suppression of GPER1 in colorectal cancer. *Med Res Arch* 6: 2018.
62. Lohoff M, Linsay AM, Seyda F and Yandembauder B: The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in oncogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 361-367, 2001.
63. Mavrouliadis O and Olyslager J: Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. *Oncogene* 19: 6524-6532, 2000.
64. Kim DC, Kwon HK, Lee CG, Verma S, Kwon D, Kim T, Kang K, Nam JH, Kim Y and Im SH: Upregulation of Hsp1 expression by NPAT2 and NPK1/IKK4 promotes breast cancer cell invasion. *Oncogenesis* 7: 91, 2018.
65. Wallace JA, Li F, Balakrishnan S, Cantorin-Stone CZ, Facot T, Martin C, Klatsky RD, Sharma SM, Trimboli AJ, Fernandez SA, et al: EtsC in tumor thyroiditis promotes angiogenesis in breast cancer. *PLoS One* 8: e71553, 2013.
66. de Lencastre Y, Christian-Lheritre A, Szankleis C, Costa L, Nogue S, Breton C, Brestat I and Baeri JL: The PEAS group of ETS-related transcription factors: Role in breast cancer metastasis. *Adv Exp Med Biol* 480: 107-116, 2000.
67. De Luca A, Maitello MR, D'Allesio A, Pergameno M and Normanno N: The RAS/RAP/MEK/ERK and the FUS/ACT signaling pathways: Role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 16 (Suppl 2): S17-S27, 2012.
68. Jiang F, Emeryto A and Takahashi M: Cell biology of the movement of breast cancer cells: Intracellular signaling and the actin cytoskeleton. *Cancer Lett* 264: 122-130, 2009.



66. Nguyen DH, Hussaini IM and Gomas SL: Binding of urokinase-type plasminogen activator to its receptor in MCF-7 cells activates extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 which is required for increased cellular motility. *J Biol Chem* 273: 8262-8267, 1998.
67. Pafundi R, Votta G, Florio Y, De Vito G, De Palma S, Aiello C, Vaso M, Ricciardiello F, Lombardi FF, Cirilli C, *et al.*: Protein kinase A activation promotes cancer cell resistance to glucose starvation and anoikis. *PLoS One* 12: e0192933, 2016.
71. Svensson S, Hristova K, Rydén L, Rone G, Ernäs S, Ostrowski MC and Lundberg U: ERK phosphorylation is linked to VEGFR2 expression and Ets-2 phosphorylation in breast cancer and is associated with tamoxifen treatment resistance and small tumours with good prognosis. *Oncogene* 24: 4370-4379, 2005.
72. Switzer CH, Chang BY, Kabaner LA, Ghossein SA, Amis S and Wink DA: Ets-1 is a transcriptional modulator of oncogenic nitric oxide signaling in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 14: R125, 2012.
73. Buser J-L, Bruchstein C, Cresto L and De Larosière Y: ERK transactivation is up-regulated by the repression of DNA binding after the ERK A phosphorylation of a consensus site at the edge of the ETS domain. *J Biol Chem* 277: 3903-3912, 2002.
74. Kold R, Gao B, Downey F, Cameron R, Chalmers C, Ang YS and Sharrock AD: FEAL/ETV4-related transcription factors coupled with active ERK signaling are associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. *Br J Cancer* 105: 124-130, 2011.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00110

Matrícula: 2161800962

Estudio del efecto de la transactivación de GPR30 por factores de la subfamilia PEA3 en cáncer de mama.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 11:00 horas del día 6 del mes de mayo del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ
- DRA. MARIA MARGARITA ZAYIL SALAZAR CAMPOS
- DR. ARTURO AGUILAR ROJAS
- DRA. PATRICIA CASAS GONZALEZ
- DR. MARCO ALLAN PEREZ SOLIS

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: DAVID SEGURA BAUTISTA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



DAVID SEGURA BAUTISTA  
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

VOCAL

DRA. MARIA MARGARITA ZAYIL SALAZAR CAMPOS

VOCAL

DR. ARTURO AGUILAR ROJAS

VOCAL

DRA. PATRICIA CASAS GONZALEZ

SECRETARIO

DR. MARCO ALLAN PEREZ SOLIS