



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
CARRERA DE QUIMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**EFFECTO DEL 17 BETA AMINOESTRÓGENO PENTOLAME  
EN EL PERFIL DE CITOCINAS PRO Y ANTIINFLAMATORIAS  
EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA  
P R E S E N T A :  
BRENDA REYES PLATA**

**JURADO DEL EXAMEN**

**DIRECTORA: DRA. MARIANA SEGOVIA MENDOZA  
ASESOR: MTRA. LEONOR AGUILAR SANTELISES  
ASESOR: DR. RODRIGO ANIBAL MATEOS NAVA  
SINODAL: MTRA. MARÍA CATALINA CÁRDENAS ASCENCIÓN  
SINODAL: DRA. ADRIANA REYES HERNÁNDEZ**



**CIUDAD DE MÉXICO**

**OCTUBRE 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# Contenido

AGRADECIMIENTOS .....	4
DEDICATORIA .....	4
ABREVIATURAS .....	5
RESUMEN .....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
MARCO TEÓRICO .....	8
Definición de cáncer .....	8
Estadísticas del cáncer de mama.....	8
Diagnóstico .....	9
Clasificación celular del CM de acuerdo con su origen celular.....	9
Clasificación molecular del CM.....	10
Funciones biológicas de los estrógenos.....	12
17 beta aminoestrógenos (17 $\beta$ -AEs) .....	13
Señalización del GPER1.....	14
Tabla 1. Efectos biológicos del GPER1 asociados con acciones pro-tumorales en líneas celulares de CM .....	16
Efectos celulares del GPER1 por su activación con moléculas agonistas en CM.....	17
Tabla 2. Efectos inhibitorios de la proliferación celular por la activación del GPER1 inducida por el ligando G1 en células de CM .....	18
Efectos celulares del GPER1 por su bloqueo con moléculas antagonistas en CM .....	19
Tabla 3. Efectos del bloqueo del GPER1 por el antagonista G15 en la proliferación de células de CM .....	20
Papel de las citocinas en la metástasis tumoral, enfoque en acciones pro y anti- inflamatorias .....	21
IL-1 .....	22
IL-6.....	23
IL-8.....	24
IL-10.....	25
IL-17 .....	25
INF $\gamma$ .....	26
TNF $\alpha$ .....	27

TGFβ.....	28
Tabla 4. Mecanismos pro tumorales de citocinas con funciones pro y antiinflamatorias en CM....	30
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVO GENERAL .....	33
OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
Evaluación de analitos solubles por ELISA.....	36
Expresión del GPER1 en las células tumorales .....	42
Proliferación celular.....	42
Papel del GPER1 en la proliferación celular.....	47
Modulación de la expresión de citocinas asociadas al proceso inflamatorio por efectos del GPER1..	48
Análisis bioinformático del interactoma de la expresión de citocinas proinflamatorias .....	57
DISCUSIÓN .....	58
CONCLUSIÓN.....	65
ANEXO 1.....	66
REFERENCIAS.....	67

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue posible gracias a la dirección de la Dra Mariana Segovia y la M. en C. Cristina Lemini del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina en la UNAM. Su paciente apoyo, su dedicación y su determinación por enseñar a otros el amor a la ciencia es sumamente valioso, y es algo con lo que siempre estaré agradecida. Esta tesis también fue el resultado de la generosidad, tiempo y consejos brindados por el Dr. David Barrera Hernández del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, el Dr. Heriberto Prado García, del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y el Dr. Luis Miranda del Instituto de Química, UNAM; cuya ayuda fue fundamental en mi aprendizaje y el desarrollo de principio a fin del presente trabajo.

Agradezco también al proyecto PAPIIT IN200222 por ofrecer los recursos para desarrollar este proyecto, a mis asesores y sinodales, cuya guía y autorización me permitió presentar esta tesis.

También quiero extender mi agradecimiento a mis amigos, quienes estuvieron presentes en cada momento de este periodo en mi vida; a Linna, con esa virtud que la característica para escuchar y aconsejar.

Esto es el resultado de su incondicional apoyo y trabajo, de corazón ¡Gracias!

## **DEDICATORIA**

Empecé este proyecto, esta carrera debido a la presencia y apoyo de mi familia. Para ustedes es esto: Para mi mamá, por siempre promover mi pensamiento, por apoyarme e inspirarme para continuar con mis estudios, a seguir lo que siempre deseé. A mi abuelita, por las incontables veces en que su paciencia y actitud me ayudaron y me sostuvieron. A mi padre, por demostrarme la importancia de la perseverancia. A mis hermanas, por estar presentes y ayudarme en infinitas ocasiones. A mi tío Memo, quien, a pesar de la distancia, siempre está con nosotras brindándonos todo de él. Y a ti, abuelito mío, con tu sonrisa y actitud positiva ante cualquier circunstancia, ante todo. Gracias por ser mis pilares incondicionales, gracias por darme tanto.

## ABREVIATURAS

17 $\beta$ -AEs	17 beta aminoestrógenos
AAT	Adipocitos asociados a tumor
AKT	Proteína cinasa B
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AR	Receptor de andrógenos
CA	Antígenos del cáncer
CAF	Fibroblastos asociados a tumor
CA-IX	Anhidrasa carbónica
CM	Cáncer de mama
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
CSF	Factor estimulante de colonias
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
E2	Estradiol
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMT	Transición epitelio -mesénquima
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GP130	Receptor de estrógenos de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo II
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleucina
IM	Inmunomodulador
JAK/STAT	Citocinas Janus cinasa/ transductor de señal y activador de transcripción (vía de señalización)
LAR	Receptor de andrógenos positivo
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos (vía de señalización)
MDSC	Células supresoras derivadas de mieloides
MES	Mesenquimatoso
miARN/miR	Micro ARN
MMP	Metaloproteinasas de matriz
NAT	Neutrófilos asociados a tumor
NF-kB	Factor nuclear kB (Vía de señalización)
PAMS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PD-1	Proteína de muerte celular programada
PD-L1	Ligando de la proteína de muerte celular programada 1
PI3k	Fosfatidilinositol 3 cinasa (vía de señalización)
RE	Receptor de estrógenos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP	Receptor de progesterona
TAM	Macrófagos asociados a tumor
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TME	Microambiente tumoral
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocitos T reguladores
TRH	Terapia de reemplazo hormonal
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

## RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia femenina más frecuente a nivel mundial, su establecimiento y desarrollo se ha relacionado con la expresión de citocinas capaces de generar procesos inflamatorios. A su vez, hormonas esteroideas como el estradiol ( $E_2$ ) pueden regular la secreción de citocinas proinflamatorias a través de la interacción con sus receptores específicos. Diferentes moléculas sintéticas análogas al  $E_2$  que representan alternativas de terapia de reemplazo hormonal se han evaluado, entre ellas, se encuentra el  $17\beta$ -aminoestrógeno (AE) pentolame. Sin embargo, la interacción de este compuesto con el receptor de estrógenos membranal (GPER1) y su relación con la metástasis del cáncer de mama por la producción de citocinas involucradas en procesos proinflamatorios no se ha dilucidado a profundidad.

En este trabajo de tesis se evaluó el efecto del  $17\beta$ -AE pentolame, por su interacción con el GPER1 en distintos eventos biológicos en líneas celulares de cáncer de mama con diferentes tipos moleculares, incluyendo la proliferación celular y la modulación del perfil de citocinas pro y anti inflamatorias involucradas en procesos de carcinogénesis y metástasis. Para lograr lo anterior, se realizó la identificación del GPER1 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama por microscopia confocal. Posteriormente, se determinó el porcentaje de proliferación celular debido a la exposición del pentolame, del  $E_2$ , y del agonista del GPER1, el G1, solos o en combinación con el antagonista del GPER1, el G15, mediante el ensayo de sulforrodamina B. Finalmente, la secreción de citocinas pro inflamatorias fue determinada a través de inmunoensayos como ELISA y la medición de analitos solubles por citometría de flujo en los sobrenadantes de los cultivos expuestos a los tratamientos descritos.

Los resultados confirmaron que el GPER1 está expresado en las tres líneas celulares de cáncer de mama con diferentes tipos moleculares utilizadas. También, se puede inferir que la activación o inhibición del GPER1 con el pentolame, el  $E_2$ , el G1 y el G15 tiene efectos biológicos en la regulación de citocinas asociadas al crecimiento y la invasión en el cáncer de mama. Se destaca que el pentolame no indujo proliferación celular ni mayor expresión de citocinas proinflamatorias en comparación con el  $E_2$  en ninguna de las líneas celulares utilizadas.

En conclusión, los resultados de este estudio apoyan la hipótesis de que el pentolame podría ser una alternativa de terapia de reemplazo hormonal segura y efectiva en situaciones con predisposición al desarrollo de cáncer de mama.

Además, este trabajo sugiere la importancia de investigar el papel del GPER1 en otras condiciones patológicas que implican procesos inflamatorios.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial que presenta características importantes como una elevada tasa proliferativa, la cual es propiciada en parte por el entorno proinflamatorio en el microambiente tumoral o TME (por sus siglas en inglés, tumor microenvironment). El TME está conformado distintas estirpes celulares y factores solubles, entre los cuales se encuentran las citocinas [1].

Específicamente, el cáncer de mama (CM) representa el primer lugar de incidencia y mortalidad por neoplasias en las mujeres a nivel mundial, lo que ocasiona un problema importante de salud pública [2]. Los tumores mamarios se clasifican en tres tipos: 1) luminal (receptor de estrógenos (RE) y receptor de progesterona (RP) positivo), 2) el tipo enriquecido en el receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo II (HER2 positivo), y 3) el triple negativo (TN) [3].

Por otro lado, se sabe que las hormonas esteroides como el estradiol ( $E_2$ ) ejercen sus acciones biológicas uniéndose a receptores específicos entre los que se encuentran los receptores nucleares ( $RE\alpha$  y  $RE\beta$ ), los cuales regulan procesos transcripcionales de genes blanco [3]. Además, se ha descrito que el  $E_2$  también puede actuar a través de su unión del receptor de estrógenos membranal GPER1, el cual se expresa en los distintos tipos de CM. Específicamente, en el CM tipo luminal se ha estudiado ampliamente el papel del  $E_2$  en la promoción de la proliferación celular y la metástasis [4, 5]. Sin embargo, los efectos biológicos de esta hormona por la unión al GPER1 relacionados con la secreción de citocinas pro o antiinflamatorias no se han profundizado en los distintos tipos de esta neoplasia.

Por otra parte, se conoce que la terapia de reemplazo hormonal (TRH) en mujeres menopáusicas se ha asociado con el desarrollo de CM. La TRH se basa en la administración de estrógenos sintéticos con la finalidad de disminuir las consecuencias de la depleción hormonal asociadas con el agotamiento folicular ovárico característico de la menopausia [6, 7]. En la búsqueda de alternativas a los actuales medicamentos utilizados en la TRH, nuestro grupo de investigación se ha enfocado en la síntesis y caracterización farmacológica de análogos sintéticos del  $E_2$ , entre los cuales se encuentran los 17 beta aminoestrógenos o  $17\beta$ -AEs. Estas moléculas han mostrado presentar actividad estrogénica con una menor potencia que el  $E_2$  mediada por su interacción con el  $RE\alpha$ . En particular, el  $17\beta$ -AE pentolame

ha mostrado generar menores efectos proliferativos en líneas celulares de CM con tipo luminal en comparación con los efectos inducidos por el E<sub>2</sub> [4, 8, 9].

Es también importante mencionar que, algunas citocinas están implicadas en la progresión del CM, ya que su expresión está asociada a la inducción de un ambiente proinflamatorio que favorece la progresión tumoral, la invasión, la resistencia al tratamiento, y en consecuencia a la metástasis [10]

Por lo anterior, en el este trabajo se evaluó el efecto del 17 $\beta$ -AE pentolame por su interacción con el GPER1 y la regulación de la modulación del perfil de citocinas pro y anti inflamatorias involucradas en carcinogénesis y metástasis de diversas líneas celulares de CM que representan los tres tipos moleculares de esta enfermedad presentes en la clínica.

## **MARCO TEÓRICO**

### **Definición de cáncer**

El cáncer es un conjunto de enfermedades heterogéneas que se distingue por diversas alteraciones moleculares en el genoma, lo que ocasiona un crecimiento desregulado y descontrolado a nivel celular [1]. Una característica importante de las células transformadas o tumorales es la migración o propagación a otros tejidos u órganos lejanos, proceso conocido como metástasis. La diseminación del cáncer generalmente se presenta en estadios avanzados de la enfermedad y puede ocasionar la muerte del individuo. Tan solo en el 2020 se registraron a nivel mundial cerca de 20 millones de nuevos casos y alrededor de 10 millones de muertes por cáncer [2].

### **Estadísticas del cáncer de mama**

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia femenina más común según datos de la OMS reportados en el 2020, representando el 11.7 % del número total de casos (19 292 789 casos) por cáncer. Además, esta enfermedad se encuentra en el quinto lugar de mortalidad de manera global, pero es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres [2]. Estudios desarrollados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés, International Agency for Research on Cancer) indican que 1 de cada 8 mujeres desarrollará algún tipo de CM invasivo en su vida, cifra que ha ido en aumento, debido a los diversos factores de riesgo como la obesidad, la predisposición genética, la nuliparidad, la menopausia temprana, además de la ingesta prolongada de estrógenos derivada de la TRH, entre otros [3]. En México, la prevalencia del CM es similar, siendo el

cáncer registrado con mayor frecuencia en el 2020 con cerca de 30 mil nuevos casos y el más mortal en la población femenina [2].

## **Diagnóstico**

Actualmente la mamografía es la técnica más común para detectar el CM; sin embargo, algunas características del tumor o del paciente generan la necesidad del uso de otras tecnologías de imagen, por ejemplo: la resonancia magnética, el ultrasonido, la tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía por emisión de fotón único (SPECT). Cabe destacar que el diagnóstico a su vez debe de ser confirmado mediante la toma y análisis de biopsias [11].

No obstante, debido a la complejidad y costo de las técnicas antes mencionadas, se ha incrementado el interés y estudio por la presencia de biomarcadores químicos presentes en los fluidos corporales de los pacientes con cáncer. La expresión aumentada o alterada de diversas moléculas, entre las que se encuentran proteínas, genes, micro ARN o enzimas, pretende facilitar un diagnóstico temprano, y proveer una herramienta de control y seguimiento al tratamiento. Por el momento son aprobadas por la Agencia de administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA) los marcadores: HER-2, antígeno del cáncer (CA)15-3, CA27-29 y las células tumorales circundantes o CTC. Además, se llevan a cabo investigaciones con otras proteínas, entre ellas, el marcador de proliferación nuclear Ki-67, la expresión de receptores hormonales, metaloproteínas, y el marcador DEL- 1 (developmental endothelial locus-1), entre otros. Son también objeto de investigación diversos genes asociados al CM como BRCA1/2, PTEN, p53, la expresión de micro ARN circulante (*cuya función es regular la expresión de diversos genes en el periodo post-transcripcional*). Es importante mencionar que a pesar del prometedor enfoque de estos biomarcadores, aún son necesarias más evidencias que confirmen su selectividad y efectividad [3, 11].

## **Clasificación celular del CM de acuerdo con su origen celular**

El CM es una enfermedad heterogénea a nivel histológico y molecular. La OMS lo ha clasificado de manera histológica en dos tipos:

- Sarcomas. Sí se origina en el tejido conectivo
- Carcinomas. Sí se origina en las células epiteliales de la mama. Este tipo a su vez se subdivide en carcinoma “in situ” o “invasivo”. Siendo los carcinomas invasivos los más diagnosticados con aproximadamente el 80 % del total de los casos [3].

## Clasificación molecular del CM

La expresión de diversos biomarcadores génicos expresados en las células tumorales se han tomado de referencia para clasificar molecularmente a esta enfermedad, los principales son: el ER, el PR y el HER2 [3]. A continuación, se mencionan algunas características de la participación biológica de los blancos moleculares previamente mencionados.

ER: Receptor de estrógenos. Este receptor está involucrado en el crecimiento, proliferación y diferenciación de las células de la glándula mamaria. Se ha reportado que el ER $\alpha$  se encuentra expresado en el 80 % de los diferentes tipos de CM y su ausencia se relaciona a un mal pronóstico, mayor agresividad tumoral y menor eficacia del tratamiento. Además, en la clínica se utiliza como parámetro de decisión para el tratamiento con antiestrógenos de algunos tipos de cáncer dependientes de hormonas en la glándula mamaria [3].

PR: Receptor de progesterona. La función de este receptor se ha asociado con el crecimiento lóbulo-alveolar de las glándulas mamarias, las cuales son estructuras asociadas a la producción de leche. Al igual que el ER $\alpha$ , su ausencia indica una mayor agresividad del tumor [3].

HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo II. Es un receptor membranal con actividad catalítica de tirosina cinasa ubicado en el epitelio de las glándulas mamarias. Su sobreexpresión, se relaciona con eventos proliferativos e inestabilidad genómica [3].

Debido a la presencia o ausencia de estos biomarcadores, el CM se puede clasificar en tres grupos:

- Luminal A/B (ER+ y PR+)
- HER2 enriquecido o HER2+
- Triple negativo (TN)

Luminal A. Tiene una alta expresión del ER $\alpha$  y PR. Además de un mejor pronóstico que el Luminal B, debido a la menor presencia del Ki67, la cual es una proteína nuclear útil en la cuantificación de la proliferación celular, debido a que su expresión en el ciclo celular alcanza sus máximos niveles durante la mitosis [12]. Es importante mencionar, que la respuesta clínica a tratamientos anti hormonales en el tipo Luminal A es elevada y con buen pronóstico [3].

Luminal B. Este tipo de CM es positivo al ER $\alpha$  y puede o no ser positivo al PR. También puede presentar una expresión de HER2 (no mayor al 20 %) así como una expresión mayor al 20 % de Ki67, indicando la capacidad de una mayor proliferación tumoral con respecto al tipo luminal A. Su diagnóstico y respuesta a tratamientos anti hormonales es menos favorable en comparación con el tipo Luminal A debido a la menor expresión de los receptores hormonales [3].

HER2+ o HER2 enriquecido. Esta clasificación hace referencia a las células tumorales que sobreexpresan al marcador HER2 en más del 20%. Este tipo de cáncer no presenta buena respuesta a tratamientos endocrinos, pero si a tratamientos dirigidos, por ejemplo: los inhibidores de tirosina cinasa y anticuerpos monoclonales anti-HER-2 [3].

Triple negativo (CM TN) o TNBC por sus siglas en inglés *Triple-negative Breast Cancer*. Este tipo de neoplasia no presenta la expresión de ninguno de los blancos moleculares mencionados anteriormente. Es la clase de CM más agresiva, menos diferenciada y de peor pronóstico clínico. Debido a la ausencia de blancos moleculares, el tratamiento de elección para el CM TN es la quimio y radioterapia. Actualmente, diversas investigaciones se están enfocando en encontrar biomoléculas que puedan servir de estrategia terapéutica en este tipo de tumor [3].

Desde hace algunos años, diversos grupos de investigación han subclasificado al CMTN en cuatro tipos [13]

- Tipo basal: este subtipo de cáncer se relaciona con la expresión de genes mioepiteliales basales de la glándula mamaria, además del incremento en la proliferación celular y factores de crecimiento [13]. Este tipo de tumores puede presentar una pobre expresión de genes asociados a la regulación inmunitaria, la cual está directamente asociada con su pronóstico clínico [14].
- Mesenquimatoso o MES: en este tipo existen regulación al alza de genes de movilización asociados a la transición epitelio – mesénquima (EMT) y pluripotencialidad, asimismo, de vías de señalización del factor de crecimiento [13, 15].
- Inmunomodulador o IM: La mayoría de estos tumores se asocian con concentraciones elevadas de citocinas, células inmunes y moléculas inflamatorias, los cuales pueden tener un fuerte papel inmunosupresor [13, 15].
- Receptor de andrógenos positivo o LAR: en este subtipo celular, la alta expresión del receptor de andrógenos (AR) es un sello distintivo. Al mismo tiempo, se observa un incremento en las vías de señalización y las vías metabólicas de los andrógenos y otras hormonas esteroideas [13, 15].

Debido a que cada subtipo de los tumores TN presentan preferencias por diferentes vías de señalización e índices de sobrevivencia se han tratado de implementar distintas estrategias que permitan destruir células neoplásicas características de cada subtipo. En el caso de los subtipos basales el tratamiento se basa en inhibir la mitosis y bloquear vías de señalización sobreexpresadas. Los subtipos con importante infiltración de células inmunes se han beneficiado de la terapia dirigida al bloqueo de puntos de control inmunitario como la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) y su ligando PD-L1; además, se ha propuesto el desarrollo de tratamientos contra moléculas inflamatorias. En cuanto al tipo mesenquimatoso el tratamiento se ha centrado en el uso de fármacos que bloqueen factores de crecimiento y vías de señalización. Mientras que en el tipo LAR se han estudiado los efectos de fármacos antiandrógenos entre los cuales se encuentra la enzalutamida [16].

### **Funciones biológicas de los estrógenos**

Los estrógenos son un conjunto de hormonas esteroides que son sintetizadas de manera endógena en los ovarios. En la mujer existen cuatro tipos de estrógenos: la estrona, el E<sub>2</sub>, el estriol y el estretrol. El E<sub>2</sub> es el estrógeno fisiológico predominante en mujeres y con mayor afinidad por los receptores de estrógeno nucleares [17].

Las funciones biológicas del E<sub>2</sub> se han centrado en el mantenimiento y desarrollo de las características sexuales femeninas, sin embargo, también tienen efectos en múltiples sistemas como el sistema inmune, el sistema óseo, el sistema nervioso y el sistema cardiovascular, entre otros. Las acciones fisiológicas del E<sub>2</sub> están mediadas por su unión a receptores nucleares: ER $\alpha$  y ER $\beta$ , los cuales median la transcripción de diversos genes. Recientemente se ha descrito que el E<sub>2</sub> tiene afinidad por un receptor membranal conocido como GPER1, el cual está acoplado a proteínas G y media la formación de distintos segundos mensajeros, favoreciendo así la transcripción de genes proliferativos. De manera interesante, la expresión del GPER1 en CM se ha relacionado con la activación de vías mitogénicas debido a la transactivación inducida en receptores de factores de crecimiento. Este fenómeno biológico se ha reportado mayormente en células de CM TN [17].

Por otro lado, diversos reportes señalan que la exposición prolongada de estrógenos sintéticos o exógenos como lo serían compuestos empleados en la TRH en mujeres postmenopáusicas constituye uno de los principales factores que predisponen a desarrollar CM en mujeres [6, 7, 18]. Con relación a este punto, en la búsqueda de alternativas a los actuales medicamentos utilizados en la TRH, nuestro grupo de investigación se ha enfocado en la síntesis y caracterización

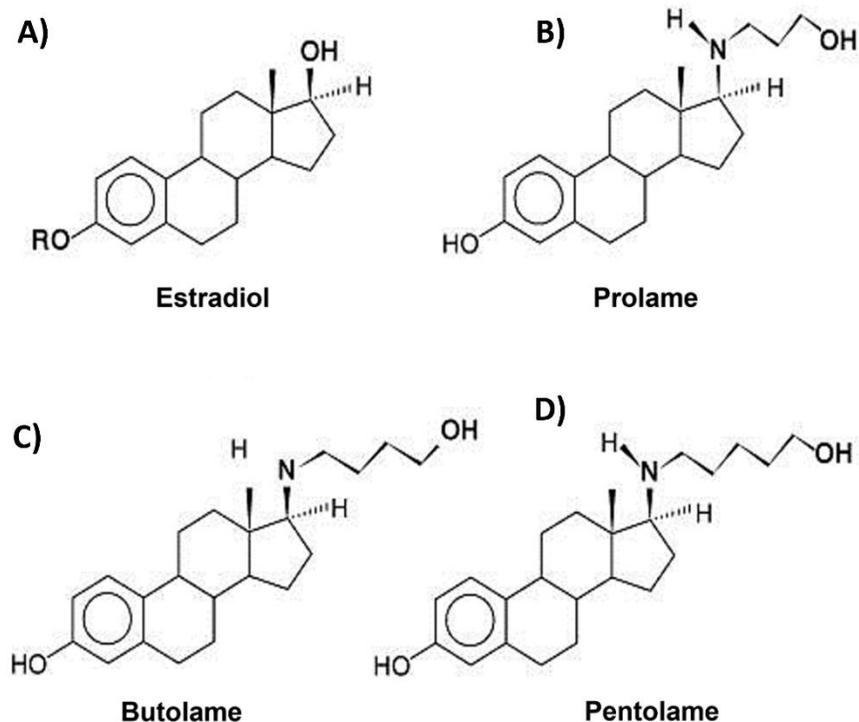
farmacológica de análogos sintéticos de E<sub>2</sub>, entre los cuales se encuentran los 17 beta aminoestrógenos o 17β-AEs.

### **17 beta aminoestrógenos (17β-AEs)**

Los 17β-AEs son moléculas sintéticas estructuralmente similares al E<sub>2</sub>, pero que en el carbono 17 tienen un sustituyente amino y diferentes grupos metilenos en vez del grupo hidroxilo característico del E<sub>2</sub>, Figura 1 (11).

Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en la caracterización de los efectos farmacológicos de algunos 17β-AEs: prolame, butolame y pentolame (Figura 1), los cuales han mostrado tener efectos estrogénicos, pero con menor potencia que el E<sub>2</sub> en líneas celulares de CM [19]. Además de mostrar efectos débiles en la inducción del peso uterino y efectos anticoagulantes moderados en modelos de ratas y ratones [8, 20], lo que ha sugerido su potencial uso como alternativas para TRH. En los estudios recientes de nuestro grupo de trabajo, se ha reportado que el 17β-AE pentolame ha mostrado estimular en menor medida la proliferación celular de células de CM de tipo luminal en comparación con el E<sub>2</sub> y otros 17β-AEs hasta la fecha evaluados, lo que sugiere que el pentolame podría tener menor riesgo para producir efectos adversos asociados con el carcinoma mamario dependiente de estrógenos [4, 19]. Es importante mencionar, que los efectos del pentolame relacionados a la proliferación de líneas celulares de CM de tipo luminal se ha asociado principalmente a su interacción con los receptores de estrógeno nucleares [4, 19]. Recientemente nuestro grupo de investigación se ha enfocado en la evaluación de los efectos biológicos de este compuesto por su interacción con el receptor de estrógenos membranal, el GPER1 [4]. A este respecto, diversos trabajos han establecido que el GPER1 promueve la proliferación celular en distintos tipos de CM. Además, que la presencia de este receptor se ha asociado con el desarrollo de resistencia a la terapia anti-hormonal convencional basada en tamoxifeno, fármaco inhibidor del ERα que se emplea en el tratamiento de CM [4, 5, 21].

Cabe destacar que las acciones biológicas del pentolame a través del GPER1 sobre la modulación de citocinas pro o anti inflamatorias asociadas con acciones pro tumorales en distintos tipos de células de CM no se han explorado. Por lo anterior, este trabajo se enfoca en estudiar si el 17β-AE pentolame tiene implicaciones en la modulación del perfil de citocinas pro y anti inflamatorias implicadas en el proceso metastásico en líneas celulares de CM con diferentes tipos moleculares a través de su interacción con el GPER1.



**Figura 1. Estructura del estrógeno y de los 17 $\beta$ -AES.** A) E<sub>2</sub>, estructura típica del ciclopentanoperihidrofenantreno, con un grupo hidroxilo en el C17; B) 17 $\beta$  AE prolame, con un grupo hidroxipropilamino que sustituye al grupo hidroxilo del E<sub>2</sub>; C) 17 $\beta$  AE butolame, con un grupo hidroxbutilamino que sustituye al grupo hidroxilo del E<sub>2</sub>; D) 17 $\beta$  AE pentolame, con un grupo hidroxipentilamino que sustituye al grupo hidroxilo del E<sub>2</sub>.

### Señalización del GPER1

El GPER1 es un receptor de estrógenos de siete dominios transmembranales acoplado a proteínas G, que media eventos no genómicos por la unión de distintos ligandos [22]. A partir del año 2000 diversos grupos trabajo se dedicaron a la identificación del GPER1, así como al estudio de la señalización de este receptor en células neoplásicas de carcinoma mamario. Derivado de estos estudios, se mencionó que este receptor puede actuar de la siguiente manera

- Inducir la movilización del calcio intracelular [23]
- Activar la actividad de la enzima adenilato ciclasa, con el consecuente incremento del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) [24].

- Permitir la activación de diversas vías de señalización como la vía activada por mitógenos MAPK/ERK1/2 [23, 25], o la vía fosfatidilinositol 3 cinasa PI3k/AKT [22], Hippo/YAP/TA2 [26, 27], entre otras
- Promover la transactivación del receptor de factor de crecimiento epidérmico EGFR [28]
- Favorecer la expresión de ciclina D que tiene efectos en el ciclo celular [29].
- Aumentar la expresión de la proteína antiapoptóticas BCL-2 y de proteínas de movilización [29, 30].

Por otro lado, no solo la activación del GPER1 ha llamado la atención, sino que también su localización celular se ha estudiado recientemente. Distinta evidencia muestra que este receptor se encuentra en la membrana plasmática y de manera intracelular en el retículo endoplásmico o en núcleo y esto determina sus efectos biológicos en líneas celulares de CM con distintos tipos moleculares [5, 21, 23, 24, 30, 31], además de su relación con el pronóstico clínico del CM [24, 31]. Cabe destacar que la presencia del GPER1 también se ha documentado en diversos tipos de neoplasias como cáncer de endometrio [32], cáncer de próstata [33], cáncer de ovario [34], cáncer de cerebro [21], cáncer de pulmón [35].

El efecto biológico del GPER1 en diferentes líneas de CM es controversial, por ejemplo, en células de CM de tipo luminal expuestas a E<sub>2</sub> indican que a través de su unión al GPER1 se regula a la baja la expresión de distintos micro ARN (miARN/miR), cuya función es controlar la expresión génica, favorecer la expresión de proteínas de activación y motilidad celular tales como CD151, impulsando en consecuencia, la metástasis del tumor. Además de la recurrencia y agresividad del tumor, así como la tumorigénesis en líneas celulares que representan los tres tipos clínicos de CM [5, 22, 23, 25-28, 36-44], Tabla 1. Cabe destacar que estudios recientes asocian la expresión del GPER1 con el desarrollo de resistencia a tratamientos anti hormonales basados en tamoxifeno en el CM de tipo luminal [45].

Por otro lado, existe poca evidencia acerca de la regulación de la expresión de citocinas proinflamatorias en CM. Con relación a lo anterior, se ha reportado que dos agonistas del GPER1 como el E<sub>2</sub> y el G1 promueven la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) a través de la activación del factor de transcripción inducido por hipoxia en células de CM [46], favoreciendo así el proceso metastásico en CM.

**Tabla 1. Efectos biológicos del GPER1 asociados con acciones pro-tumorales en líneas celulares de CM**

<b>Línea celular</b>	<b>Efecto encontrado</b>	<b>Referencias</b>
Luminal: MCF-7 Her2+: SKBr3 TN: MDA-MB -469 MDA-MB-436	Activación de las vías de señalización ERK1/2, MAPK, SRF, PI3K, Fosfolipasa C, EGFR	Filardo E 2000 [23] Prossnitz E 2008 [22] Pandey D 2009 [37] T Yu 2014 [36]
Luminal: MCF-7 Her2+: SKBr3 TN: MDA-MB-231 BT-20 (transfectados con GPER1)	Estimulación de oncogenes como c-fos, Egr-1	Filardo E 2000 [23] Maggiolini M 2010 [25]
Luminal: MCF-7 TN: MDA-MB-231 y BT549	Disminución de miARN reguladores de la expresión génica con funciones supresoras de tumores	Yang H 2021 [5] Tao S 2015 [38]
Luminal: MCF-7 Her2+: SKBr3 TN: BT-20 MDA-MB-468	Expresión de proteínas asociadas a la metástasis como: CTGF, ciclinas, CXCR1, glutamato, CD151 o activación de la vía Notch	Yang H 2021 [5] Pandey D 2009 [37] Li Y 2013 [39] Niu D 2015 [40] Mawson A 2005 [41] Pupo M 2014 [42] Yin J 2019 [43]
TN: BT-474 ZR-75-1 MDA-MB-361	Activación y estabilización de coactivadores de transcripción YAP/TAZ	Zhou X 2015 [27]
TN: ZR-75-30 BT-549	Inhibición de componentes de las vías supresoras de tumores como Hlppo	Deng Q 2018 [26] Zhou X 2015 [27]
Luminal: MCF-7 TN: MDA-MB-231	Señalización de HIF-1 $\alpha$ /GPER1 regula a la alza VEGF, CTGF e interleucinas proinflamatorias	De Francesco E 2013 [46] Ren J 2015 [44]

## **Efectos celulares del GPER1 por su activación con moléculas agonistas en CM**

Como se ha descrito, el E<sub>2</sub> puede unirse al GPER1 y evocar diversos efectos biológicos. Sin embargo, en el año 2006, se identificó un ligando específico para este receptor, el cual fue nombrado G1. La unión del G1 al GPER1 puede evocar respuestas asociadas con la proliferación celular similares a las del E<sub>2</sub>. Aunque de manera controversial, la activación y la respuesta inducida del GPER1 por distintos ligandos puede variar en función de la concentración de cada ligando en específico, la localización del GPER1 y el contexto celular en el cual se desarrolle la patología. Con relación a lo anterior, estudios experimentales han demostrado que la unión del G1 con el GPER1 a concentraciones altas (mayores 1  $\mu$ M) tiene un efecto supresor en el crecimiento y la invasión de diversas líneas celulares y xenoinjertos de CM [47-50]. En la Tabla 2 se enlistan diversos efectos relacionados con la inhibición de la proliferación celular mediante la activación del GPER1 por el G1 en líneas celulares de CM con distintos tipos moleculares.

De manera interesante, el GPER1 ha cobrado relevancia biológica, ya que diferentes moléculas pueden actuar de manera antagónica con los receptores de estrógenos nucleares o RE, y a su vez tener efectos agonistas para el GPER1. De esta manera la interacción de este receptor puede desencadenar eventos celulares pleiotrópicos. Una molécula que ha demostrado tener este efecto es el tamoxifeno; este fármaco se utiliza como terapia antihormonal en el CM tipo luminal, sin embargo, ha mostrado unirse al GPER1 y propiciar eventos proliferativos en células de CM, además de generar resistencia al tratamiento [51].

Por otro lado, diversos compuestos conocidos como disruptores endócrinos, los cuales son moléculas que sin poseer una estructura esteroidea presentan afinidad a distintos receptores de hormonas esteroideas y logran desencadenar efectos proliferativos, han mostrado también ser ligandos del GPER1. En este sentido los bisfenoles, moléculas derivadas de ciertos plásticos, han mostrado afinidad por el GPER1 y la consecuente activación del receptor, responsable de efectos asociados con proliferación celular [26, 52].

**Tabla 2. Efectos inhibitorios de la proliferación celular por la activación del GPER1 inducida por el ligando G1 en células de CM**

<b>Línea celular</b>	<b>Efecto encontrado</b>	<b>Referencias</b>
Luminal: MCF-7 HER2+: SKBr3 TN: MDA-MB-231	Arresto del ciclo celular en la Fase G2/M	Vo DH 2019 [47] Wei W 2014 [48] Weinberborn C 2014 [49, 50]
HER2+: SKBr3 TN: MDA-MB-231	Reducción de la expresión de ciclina B	Wei W 2014 [48]
Luminal: MCF-7	Generación de estrés al RE por movilización de Calcio	Vo DH 2019 [47]
Luminal: MCF-7 HER2+: SKBr3 TN: MDA-MB-231	Activación de proteínas asociadas a la apoptosis	Vo DH 2019 [47] Wei W 2014 [48] Weissenborn C 2014 [49, 50]
HER2+: SKBr3 TN: MDA-MB-231	Disminución de la proteína antiapoptótica Bcl-2	Wei W 2014 [48]
Luminal: MCF-7	Inhibición de la síntesis de proteínas	Wei W 2014 [48]
HER2+: SKBr3 TN: MDA-MB-231	Aumento en la producción de ROS	Wei W 2014 [48]
Luminal: MCF-7 HER2+: SKBr3 TN: MDA-MB-231 MDA-MB-468	Fosforilación mejorada de la histona 3	Weinbenborg C 2014 [49, 50]
HER2+: SKBr3 TN: MDA-MB-231	Afectación al potencial de membrana mitocondrial	Wei W 2014 [48]

## **Efectos celulares del GPER1 por su bloqueo con moléculas antagonistas en CM**

Debido a la relevancia biológica que ha cobrado la activación del GPER1 en CM y en distintas neoplasias, la síntesis y estudio de moléculas antagonistas para este receptor también ha sido de gran interés.

El G15 fue el primer antagonista selectivo del GPER1 descrito, el cual fue sintetizado en el año 2009 por el grupo de Dennis *et al.*, [53, 54], en estos trabajos se demostró que el uso del G15 en la línea celular de CM SKBr3, que corresponde a un tipo Her2 enriquecido, previamente tratada con E<sub>2</sub> o el G1 inhibió la movilización de calcio intracelular y bloqueó la activación de la vía PI3K/AKT mediada por GPER1 [53]. Otros trabajos han destacado que la exposición del G15 en líneas celulares de CM con distintos tipos moleculares impide transición epitelio-mesénquima, además de mejorar la sensibilidad a tratamientos con quimioterapia basados en doxorubicina [51, 55].

Otros trabajos han sustentado que el bloqueo de la activación del GPER1 con el G15 es relevante para inhibir la motilidad y la invasión de células de CM con tipo luminal, efecto que se asocia con la inhibición de la expresión de las metaloproteinasas. Y de manera interesante, el uso del G15 también se ha relacionado con la inducción de ciertos miRNAs involucrados en la disminución de la proliferación e invasión de células neoplásicas [5]. De esta manera, el bloqueo del GPER1 por medio de su unión con el G15 se ha planteado como una estrategia experimental con potenciales terapéuticos en distintos tipos de CM.

En la Tabla 3 se enlistan diversos efectos relacionados con la inhibición de la proliferación celular mediante el bloqueo del GPER1 por el G15 en líneas celulares de CM con distintos tipos moleculares.

**Tabla 3. Efectos del bloqueo del GPER1 por el antagonista G15 en la proliferación de células de CM**

<b>Línea celular</b>	<b>Efecto encontrado</b>	<b>Referencias</b>
HER2+: SKBr3	Inhibición de la activación de las vías de señalización PI3K/AKT	Dennis 2009 [53]
Luminal: MCF-7	Impedimento de la movilización intracelular de calcio	Molina 2020 [51]
Luminal: MCF-7	Aumento de la expresión de miARN reguladores Inhibición de la expresión de proteínas de motilidad e invasión	Yang H 2021 [5]
Luminal: MCF-7 TN: MDA-MB-231	Regulación de la EMT en las células tumorales.	Liu Y 2015 [55]
Luminal: MCF-7 TN: MDA-MB-231	Sensibilización de las células tumorales a quimioterapia	Liu Y 2015 [55]

Los datos mostrados anteriormente destacan el papel del GPER1 en la tumorigénesis del CM por eventos directos relacionados con su activación o bloqueo. Sin embargo, es importante destacar que el crecimiento tumoral es promovido también por moléculas pro y antiinflamatorias, como las citocinas, las cuales se han descrito que pueden ser moduladas en respuesta a los receptores de RE nucleares, principalmente en células del sistema inmunitario [56]. Sin embargo, el papel del GPER1 en la modulación de expresión de citocinas pro o antiinflamatorias en distintos tipos de CM aún no se ha estudiado a profundidad. Cabe destacar, que además de la participación de este receptor en el secretoma de citocinas, es de nuestro interés investigar los efectos del 17 $\beta$ -AE pentolame a través de su interacción con el GPER1 y comparar sus efectos con los inducidos por el E<sub>2</sub> en distintas líneas de CM que representan los tipos moleculares de esta patología encontrados en la clínica.

## **Papel de las citocinas en la metástasis tumoral, enfoque en acciones pro y anti- inflamatorias**

Las citocinas son pequeñas proteínas (hasta 70 kDa) que median diversos procesos biológicos, principalmente a través de mecanismos autocrinos y paracrinos. Su papel es fundamental en procesos inmunes, inflamatorios, hematopoyéticos y celulares. La interacción de estas proteínas con diversos tejidos y células es clave en la presentación antigénica, la activación, la diferenciación, el crecimiento, la migración celular e incluso en los procesos apoptóticos [10]. Según su función se pueden clasificar en diferentes familias [57], donde se incluyen:

- CSF- factores estimulantes de colonias
- Quimioquinas- citocinas que inducen la quimiotaxis
- IL- interleucinas
- INF- interferones
- TGF- factores de crecimiento transformante
- TNF- factor de necrosis tumoral

Es importante resaltar que, las citocinas pueden desempeñar un papel importante dentro del microambiente tumoral (TME), ya que pueden favorecer la carcinogénesis al propiciar un ambiente inflamatorio crónico, lo que conlleva al reclutamiento de células del sistema inmunitario e incluso formación de nuevos vasos sanguíneos.

Algunos de los efectos generados por la interacción de las citocinas con diversas células en el TME son:

- El sinergismo con otras citocinas que genera el ambiente inflamatorio.
- La capacidad de reclutamiento y diferenciación de diversas células inmunes a fenotipos inmunosupresores, causando anergia de las células citotóxicas.
- La activación de diversas vías de proliferación, oncogenes y factores de crecimiento.
- La inducción de angiogénesis y linfagiogénesis.
- Generación de la expresión de genes de pluripotencia en el tumor.
- Favorecimiento de la reprogramación metabólica del tumor.
- Incremento de la producción de quimioquinas, metaloproteasas.
- Inducción de la transición epitelio–mesenquima (EMT) en las células neoplásicas, factores que facilitan su migración y la metástasis [10, 57-59].

Debido a las múltiples funciones de las citocinas, estas se consideran mediadores solubles claves para el crecimiento, la proliferación, la invasión y la metástasis del cáncer. Es por ello que, la evaluación de la expresión de algunas citocinas

involucradas en el proceso inflamatorio por acciones de la activación o bloqueo del GPER1 con el E<sub>2</sub>, el pentolame, el G1 o sus combinaciones con el G15 en diferentes líneas celulares de CM son el objeto de estudio de este trabajo.

A continuación, se describen las principales características celulares de diversas citocinas con acciones pro y antiinflamatorias y sus efectos pro-tumorales asociados en modelos experimentales de CM.

## **IL-1**

La familia de la IL-1 cuenta con dos principales moléculas proinflamatorias: la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ . Ambas citocinas se han asociado con procesos de estrés, combate de infecciones y de cicatrización. En el TME se ha encontrado que es secretada principalmente por los adipocitos asociados al tumor (AAT), macrófagos asociados al tumor (TAM) y las propias células neoplásicas [60]. Su expresión en CM se ha reportado en estadios avanzados, comúnmente en tipos ductales invasivos [61] y en líneas celulares pertenecientes al subtipo CMTN [62, 63]. La IL-1 favorece la presentación antigénica, la función de los linfocitos T y la proliferación de células B [64]. Sin embargo, se ha reportado que tiene acciones antiproliferativas, las cuales se asocian con estadios tempranos del cáncer, ya que, en condiciones más avanzadas, su efecto es contrario, favoreciendo un ambiente inmunosupresivo al dirigir el fenotipo de los linfocitos T a linfocitos T reguladoras (Treg) e inducir la generación de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) [65, 66]. Aunado a lo anterior, el papel pro-tumoral de la familia de la IL-1 en CM se debe a su capacidad de activar diversas metaloproteinasas de matriz o MMP. La presencia de IL-1 se ha asociado con el proceso metastásico en cáncer, debido a que promueve la secreción del VEGF en células endoteliales y tumorales, generando así una sinergia [61, 65].

Por otra parte, la IL-1 es un importante mediador en la transición epitelio mesénquima, activando genes responsables de la adhesión celular y la expresión de diversas quimiocinas, factores asociados a la metástasis ósea y pulmonar [63]. También, a la IL-1 se le ha relacionado con la pluripotencialidad de células neoplásicas (stemness); a través de la activación de la proteína activadora AP1 y Smad/ID1 [67], además de la activación sostenida de factores de transcripción como NF-kB y la vía NOTCH [66]. De manera interesante, se ha postulado que la vía IL-1/NF-kB está asociada con la disminución de la expresión de receptores hormonales en CM, lo que conlleva a la generación de resistencia al tratamiento hormonal [66].

En resumen, la expresión de la IL-1 en CM genera un ambiente inflamatorio e inmunosupresivo; así como la invasión, proliferación y supervivencia de las células neoplásicas, favoreciendo la diseminación del cáncer.

## **IL-6**

La IL-6 es una de las citocinas primordialmente asociada con actividades proinflamatorias. La unión de esta citocina a sus receptores transmembranal (IL-6R) o soluble (sIL-6R $\alpha$ ) con un correceptor transductor de señales llamado gp130 crea un complejo que es capaz de activar diversas vías de señalización implicadas en procesos hematopoyéticos e inmunitarios. La IL-6 es secretada por macrófagos activados, linfocitos, adipocitos, MDSC y otras [10, 68]. Además, en el TME puede ser secretada por las células tumorales en respuesta al estímulo de otras citocinas, diversos factores de crecimiento, el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), entre otros. En CM se ha reportado un incremento en la expresión de la IL-6 en estadios avanzados y sobre todo en subtipos celulares sin receptores de estrógenos [68-75]. No obstante, su papel en la progresión tumoral es muy discutido. En este sentido, se ha informado que la administración exógena de IL-6 presenta efectos antiproliferativos y pro apoptóticos en líneas celulares ER+, pero no en líneas celulares de CM tipo TN [69-71]. A nivel clínico, se ha reportado que pacientes con CM invasivo en estadio temprano muestran niveles altos de IL-6, lo cual correlaciona con un menor grado tumoral, un menor tamaño de la neoplasia y mejor pronóstico [73]. Por lo anteriormente descrito, se sugiere que la administración exógena de IL-6 en cultivos de líneas tumorales ER+ pareciera tener efectos antiproliferativos. Sin embargo, la secreción autocrina de la IL-6 por células de CM ER+ se han asociado con una mayor proliferación tumoral y metástasis [71, 72, 76].

Algunas vías de señalización que son promovidas por la IL-6 son la vía Jak/STAT3 [77], las vía de las MAPK—ERK1/2, la vía P13K/AKT, la vía NOTCH y el potenciador de transcripción C-EBP $\beta$ , los cuales promueven la expresión de proteínas de motilidad, el crecimiento, y la metástasis del CM [78]. En células de CM de tipo TN, la IL-6 induce la expresión de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, y la expresión de genes que promueven la pluripotencia en las células tumorales, entre ellos: C-myc, Bmi-1, Oct-4 y SOX-2 [74, 78]. De manera similar, la vía NOTCH activada por la IL-6 favorece la resistencia de las células neoplásicas a compuestos citotóxicos al impulsar la expresión de la anhidrasa carbónica (CA-IX) en ambientes hipóxicos y facilitar la transformación en células madre de cáncer (CSC).

Aunado a esto, la señalización desencadenada por la vía IL-6/C-EBP $\beta$  otorga a las células tumorales resistencia a diversos fármacos quimioterapéuticos, al inducir la

expresión de genes y proteínas que codifican para bombas de expulsión de fármaco, particularmente el gen *mdr1* [68, 78]. La IL-6 también participa en el reclutamiento de células inmunosupresoras y propicia la expresión del VEGF, promoviendo en consecuencia la metástasis celular [78].

Por lo anterior la IL-6 se reporta como una molécula proinflamatoria con un papel fundamental en el crecimiento, migración y metástasis en el CM.

## **IL-8**

La IL-8 o CXCL8 es una citocina proinflamatoria que participa en procesos de quimiotaxis, es decir, tiene la capacidad de atraer a células inmunitarias, particularmente neutrófilos y granulocitos al sitio de infección o de inflamación. Es producida por células epiteliales, monocitos, macrófagos, fibroblastos y diversas líneas celulares de CM. De manera similar a la IL-6, la expresión de la IL-8 es desencadenada por la acción de las citocinas IL-1 y el TNF $\alpha$ , entre otras, así como por la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos o PAMS [79].

Niveles séricos elevados de IL-8 se han reportado en tumores metastásicos con subtipos moleculares HER2+ y TN [80, 81]. De hecho, reportes clínicos han sugerido que existe una correlación negativa entre la expresión del RE y la secreción de la IL-8 [82]. Si bien la mayor parte de la secreción de la citocina en el TME se debe a linfocitos, los trabajos con xenoinjertos murinos con líneas celulares de CM que representan estadios avanzados de la enfermedad demostraron que las células tumorales secretaban niveles altos de esta citocina, aunque en cantidades inferiores que las reportadas por células inmunitarias [83].

El papel de la IL-8 en el progreso neoplásico se asocia a la activación de la vía PI3K/AKT, en consecuencia, se ha reportado un aumento en la expresión de la ciclina B1 y un incremento en la fase de síntesis del ciclo celular [81]. Además, están involucradas otras vías de señalización como PLC/PKC, ERK 1/2, FAK-Src, Rho y NOTCH, que regulan la proliferación, supervivencia, motilidad, migración e invasión tumoral [79, 81]. Es importante señalar que el poder quimiotáctico de la IL-8 propicia un ambiente inmunosupresor [79].

Por otro lado, su interacción con otras citocinas favorece la metástasis del cáncer al inducir la generación de colonias independientes de anclaje y la expresión de proteínas antiapoptóticas en las células tumorales (mediante su colaboración con la IL-6) [80], mientras que la neovascularización es apoyada por su trabajo en conjunto con el VEGF [79]. Estos datos sugieren que la participación de la IL-8 en el TME del

CM está relacionada con un mal pronóstico al favorecer su progresión mediante diversos mecanismos.

### **IL-10**

La IL-10 es una citocina antiinflamatoria, generada por la mayoría de las células inmunitarias ante la presencia de PAMPS u otras citocinas como el interferón gamma IFN- $\gamma$ . Se caracteriza por tener una función inmunorreguladora capaz de inhibir la actividad de diversas células inmunes, entre los que se encuentran los macrófagos, las células NK y los linfocitos; además, puede impedir la secreción de citocinas por parte de las células inmunitarias al activar el supresor de señalización de citocinas-3 o SOCS3, inhibiendo de esta manera el daño tisular prolongado [73].

Los estudios acerca de la IL-10 en el cáncer han demostrado que esta proteína puede tener acciones duales protumorigénicas y antitumorigénicas dependiendo del tipo y estadio del tumor. Se ha reportado que, niveles altos de esta citocina junto con la IL-6 se asocian a un buen pronóstico en neoplasias tempranas y diferenciadas, donde la IL-10 parece favorecer la activación y expansión de los linfocitos CD8+, además de la secreción de IFN- $\gamma$  y la generación de anticuerpos mediante la diferenciación de células B; factores que promueven la muerte de las células tumorales [73, 84].

No obstante, también se ha reportado el papel protumorigénico de la IL-10 a través de la inducción de diversas células inmunitarias a fenotipos inmunosupresores entre los cuales se destacan los TAM, los cuales favorecen la expresión de proteínas antiapoptóticas y la activación de la vía STAT en células tumorales. Cabe señalar que se ha descrito una interrelación estrecha entre la IL-10 y el receptor de muerte programada 1 (PD-L1), la cual suprime la función de los linfocitos T citotóxicos, la inhibición de la presentación antigénica, abatiendo la actividad antitumoral del sistema inmune. Por lo anterior, la expresión de IL-10 en niveles avanzados del CM se relaciona con un pobre pronóstico [84-87]

### **IL-17**

La IL-17 es otra citocina cuya unión con sus receptores, IL-17RA y IL17RC, genera efectos proinflamatorios. Es secretada principalmente por los linfocitos Th17 ante el estímulo de la IL-1 y la IL-23. Además, su participación es esencial en la cicatrización de heridas y la producción de péptidos antimicrobianos (para combatir infecciones bacterianas y fúngicas) por los queratinocitos [88]. Puede ejercer efectos quimiotácticos en diversas células inmunosupresoras como los neutrófilos asociados al tumor (NAT) con la capacidad de suprimir la actividad citotóxica de las

células T CD8+, efectos logrados a través de la inducción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), de CXCL1 y CXCL5, [89]. Además, la generación de la IL-17 parece propiciar la proliferación y malignidad de células tumorales a través de cambios transcripcionales y postranscripcionales en diversas proteínas implicadas en procesos de diferenciación celular [90, 91]. Siendo de esperar que su expresión se encuentre alta en tumores de alto grado histológico, luminal B y CMTN [91]

Por otra parte, la unión de la IL-17 con sus receptores promueve la activación de las vías ERK1/2, NF- $\kappa$ B y C/EBP, JNK-c-JUN, NF- $\kappa$ B. Así como la expresión del oncogen c-fos y la activación del factor de transcripción AP-1 [90, 91]. Su actividad también se ha relacionado con el incremento de la liberación de MMP y la generación sostenida de IL-6, que junto con el IFN- $\gamma$  y el TNF $\alpha$  propician una inflamación crónica dentro del TME. De manera similar tiene efectos sinérgicos con el factor de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ) para inducir la formación de fibroblastos asociados al tumor. Asimismo, se ha descrito su participación con el EGFR, promoviendo así la reparación del tejido tumoral expuesto a fármacos antineoplásicos [90]. En conjunto, estos factores potencializan la supervivencia, proliferación, impasividad y metástasis del cáncer, a tal punto que la concentración elevada de esta citocina en el CM es considerada un factor de mal pronóstico.

## **INF $\gamma$**

INF $\gamma$  es una citocina con funciones fisiológicas variadas. Es producida ante el estímulo de diversas ILs, antígenos tumorales o patógenos e incluso puede ser inducida por el propio INF $\gamma$  en un ciclo de retroalimentación positiva. Las células que secretan esta citocina son principalmente células NK, NKT, linfocitos T, macrófagos, fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales [10].

El INF $\gamma$  es reconocido por diversas estirpes celulares inmunes, en macrófagos, por ejemplo, esta citocina estimula la eliminación de patógenos y de células tumorales. También, se le ha asociado con la inhibición de la activación del sistema inmunológico y el daño tisular. Su interacción con macrófagos favorece su diferenciación a un fenotipo M1 inflamatorio; mientras que en los linfocitos T, conduce a una respuesta de tipo Th1. En el caso de linfocitos citotóxicos el INF $\gamma$  es responsable de la maduración de estas células a linfocitos T CD8+ efectoras. Es importante mencionar que, el INF $\gamma$  inhibe la diferenciación de las células T a subtipos supresores como las Treg o Th17 [92].

La unión del INF $\gamma$  con su receptor desencadena la activación de la vía JAK/STAT1, la cual promueve la transcripción de diversos genes relacionados con la regulación del crecimiento celular. Esta vía activa a las caspasas y genera apoptosis de las

células tumorales. Además, se ha reportado que el IFN $\gamma$  en células tumorales activa la vía p16INK4a-Rb, responsable de inducir senescencia de las células tumorales. Otro mecanismo descrito para el IFN $\gamma$  en células tumorales es que incrementa la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, evitando que las células tumorales evadan la respuesta citotóxica por parte de las células del sistema inmune. Sumado a esto, el IFN $\gamma$  genera también una mejor eficiencia citotóxica en los linfocitos T CD8+ y es capaz de inhibir la angiogénesis al destruir células endoteliales y regular de manera negativa al VEGF-A. Debido a lo anteriormente mencionado, el IFN $\gamma$  se usa actualmente como adyuvante en diversas terapias anticancerígenas [92].

Sin embargo, el efecto que el IFN $\gamma$  ejerce sobre las células tumorales depende de diversos factores como la concentración y el entorno. Estudios en cáncer de pulmón de células no pequeñas demostraron que la exposición de IFN $\gamma$  a bajas concentraciones produce un efecto pro-cancerígeno, esto es debido a la expresión de PD-1, y diversos mediadores de especies reactivas y las proteínas implicadas en la apoptosis NOS, FAS, FASL e IDO en las células tumorales. Además, las bajas concentraciones de esta citocina conducen a la activación de la señalización de ICAM1-PI3K-Akt-Notch1 en células cancerosas teniendo en consecuencia la generación de células madre de cáncer [92, 93].

### **TNF $\alpha$**

El TNF $\alpha$  es una citocina proinflamatoria con efectos en el metabolismo celular y la angiogénesis. Es producido por macrófagos, algunas células mieloides y puede ser generado también por células tumorales [10].

El TNF $\alpha$  tiene dos receptores TNFR1 y TNFR2, ambos se expresan en células hematopoyéticas. La interacción de los receptores con su ligando induce la activación de diversas vías de señalización, que desencadenan funciones anti o protumorigénicas. El efecto de esta citocina en el cáncer se asocia con la activación de la vía PI3K /AKT y en consecuencia a un incremento en la proliferación celular. De manera conjunta con el factor de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ), las acciones del TNF $\alpha$  contribuyen al desarrollo de la EMT al activar el factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

El TNF $\alpha$  promueve además la expresión de MMPs y la estimulación de otras citocinas pro-inflamatorias como la IL-8. También favorece la secreción del VEGF-A por los macrófagos generando una mejor proliferación, invasión y metástasis de la neoplasia.

Los estudios acerca de la influencia de esta citocina en el CM indican que favorece la invasividad de las células tumorales debido a la expresión aumentada de MMP, genes relacionados con la EMT, además del aumento de la quimiocina CXCR-4 cuyo ligando, CXCL-12, se expresa en los órganos con mayor reporte de metástasis en el CM. Incluso las acciones del TNF $\alpha$  se han relacionado con la disminución de la actividad de algunos genes supresores de tumores, por ejemplo, el gen KiSS1 o la inducción de coactivadores transcripcionales, entre ellas TAZ, que favorecen la autorrenovación en las células neoplásicas. EL TNF $\alpha$  también puede tener efectos en el metabolismo celular, ya que incrementa la acción de enzimas con acciones de desintoxicación en especial la GST- $\pi$  y , que se relaciona con la resistencia al tratamiento con agentes quimioterapéuticos como la doxorrubicina [59, 60, 94-97].

## **TGF $\beta$**

El TGF $\beta$  es una citocina polipeptídica antiinflamatoria con un papel fundamental en la embriogénesis, la homeostasis celular, la reparación de tejidos y la inmunorregulación. Es elaborada por varias células inmunes y por células del estroma ante el estímulo de proteasas, integrinas y otros ligandos. La unión del TGF $\beta$  con sus receptores (TR $\beta$ I y TR $\beta$ II) desencadena la activación de la vía Smad y de manera no canónica interviene en las rutas señaladoras PI3K, SHC/GRB2/SOS, PAR6 y TRAF4/6 [10, 98].

La participación del TGF $\beta$  en la progresión del cáncer depende en gran medida del estadio del tumor. Con respecto al CM, se ha encontrado que, en etapas tempranas, la expresión del TGF $\beta$  inhibe el crecimiento tumoral induciendo la apoptosis. Sin embargo, esta condición se revierte en etapas avanzadas y sobre todo en CM con tipo TN; tipo de cáncer donde la expresión de esta citocina se ha encontrado en cerca del 40 % de los casos reportados de la neoplasia mamaria [99] El TGF $\beta$  tiene la capacidad de promover la EMT, la expresión de MMP-2 y MMP-9, y la expresión de proteínas del citoesqueleto y de adhesión como la actina y la E-cadherina [10, 98]. La función del TGF $\beta$  en cooperación con otras citocinas se ha estudiado ampliamente, por ejemplo, en conjunto con el VEGF induce la neovascularización. El efecto de la IL-6 con el TGF $\beta$  promueve la diferenciación de linfocitos T en fenotipos Th17 mientras que su colaboración con CXCL1/2 y 3 media el reclutamiento de TAMs al TME [59, 100].

De manera similar, se reporta que el TGF- $\beta$  induce la expresión de factores prometastásicos como la CXCR4 y la IL-11, las cuales facilitan la diseminación ósea y pulmonar [101]. Aunado a esto, la migración de las células neoplásicas se ve incrementada debido a la transactivación del EGFR mediante la vía TGF $\beta$  /Smad3 y ERK/Sp1 [98].

Otro punto importante en la progresión tumoral influenciado por el TGF $\beta$  es su función inmunosupresora y antiinflamatoria al disminuir la proliferación y función de linfocitos T, células NK y macrófagos. Además, favorece el reclutamiento de fenotipos inmunosupresores como Treg, NAT CAF y MDSC en el ambiente inflamatorio [98, 99, 102]. De manera que la presencia del TGF $\beta$  en el TME implica el crecimiento tumoral, la fibrosis y la metástasis en el CM [98, 99, 102].

En la Tabla 4 se enlistan diferentes citocinas mencionadas anteriormente, su acción pro tumoral y los mecanismos asociados a estos eventos proliferativos y metastásicos en células de CM.

**Tabla 4. Mecanismos pro tumorales de citocinas con funciones pro y antiinflamatorias en CM**

Citocina	Modelo	Función	Mecanismos de acción asociados	Referencia
IL-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Macrófagos (TAM)</li> <li>Adipocitos (AAT)</li> <li>Líneas celulares: ER+: ZR-75</li> <li>TN: BT-20</li> </ul>	Invasión y metástasis	Favorecimiento de la expresión de MMP, proteínas de adhesión, quimiocinas, EMT	Autenshylius 2017 [61] Bent 2018 [64] Tulotta 2019 [63] Gelfo 2020[65] Diep 2022 [66] Lu 2020 [67] Liu 2018 [79]
		Sinergia con otras citocinas	IL-6, IL-8, IL-17, VEGF	
		Troncalidad y formación de CSC	Activación de genes Smad/ID1, y vías NOTCH y NF-kB	
		Inmunosupresión en el TME	Reclutamiento de Tregs, MSDC	
		Resistencia al tratamiento	Producción sostenida de NF-kB y AP 1	
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> <li>MDSC</li> <li>Linfocitos CD4+</li> <li>Fibroblastos</li> <li>Líneas celulares: ER+:T47 MCF-7 ADRrMCF-7</li> <li>HER2+: SUM190</li> <li>TN: HCC38/ 70/ 1143/ 1937/ BT549 Hs578T MDA-MB-231/436 HS578T SUM149</li> </ul>	Aumento en la proliferación celular	Activación de vías de señalización: JAK/STAT3,PI3K,MAPK,MER-ERK Aumento del ciclo celular en la Fase G1	Chiu 1996 [70] Sasser 2007 [72] Ahmad 2018 [73] Manore 2022 [78] Hartman 2014 [80]
		Invasión y metástasis	Favorecimiento de la EMT y de la expresión de proteínas de movilidad	
		Sinergia con otras citocinas	IL- 1, IL-8, VEGF	
		Troncalidad y generación de CSC	Activación de vía NOTCH, expresión de genes c-myc, Bmi-1, Oct-4, SOX-2	
		Inmunosupresión	Reclutamiento de Tregs y MSDC	
		Resistencia al tratamiento	Expresión de proteínas antiapoptóticas Expresión de genes de resistencia a fármacos como MDR1 Producción de NF-kB por tejido tumoral	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Líneas celulares: ER+:MCF-7 MDA-MB-175/362/415</li> </ul>	Aumento en la proliferación celular	Activación de vías de señalización: PI3K,MAPK,MER-ERK,PLC/PKC, FAK, Rho Aumento de ciclina D1 Aumento del ciclo celular en la Fase S	

IL-8	<p>T47D ZR-75-1</p> <p>HER2+: SKBr3</p> <p>TN: HCC38/ 70/ 1143/1806/ 1937 BT549 Hs578T MDA-MB- 231/436/468 SUM159</p>			<p>Liu 2016 [79] Hartman 2014 [80] Deng 2021 [81] Ma 2017 [82]</p>
		Invasión y metástasis	Formación de colonias independientes de anclaje y disminución de E cadherina	
		Sinergia con otras citocinas	IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, VEGF	
		Troncalidad y formación de CSC	Regulación de vía NOTCH	
		Inmunosupresión	Reclutamiento de células inmunosupresoras y células asociadas al cáncer	
		Resistencia al tratamiento	Expresión de proteínas antiapoptóticas	
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células inmunes</li> <li>• Líneas celulares:</li> </ul> <p>TN: MDA-MB-231 HTB126</p>	Invasión y metástasis	Metástasis a ganglios linfáticos en sinergia con la IL-18	<p>Chang 2021 [84] Heckel 2011 [85] Sheikhpour 2019 [86] Ma T 2021 [87]</p>
		Sinergia con otras citocinas	TNF, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 (En estadios avanzados del tumor)	
		Inmunosupresión	Inducción de fenotipos inmunosupresores Disminución de proliferación y activación de linfocitos CD8+	
		Resistencia al tratamiento	Expresión de PD-L1 en células mieloides Expresión de Bcl-2 en células tumorales	
IL-17	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfocitos: Th17, CD8+, <math>\text{TY}\delta</math>, NKT</li> <li>• Línea celular (modelo murino) MA782 4T1</li> </ul>	Aumento en la proliferación celular	Activación de vías de señalización: ERK1/2, NF- $\kappa$ B y C/EBP, JNK-c-JUN, NF- $\kappa$ B Expresión del oncogen c-fos mediado por TPL2	<p>Du 2012 [83] Karpisheh 2022 [88] Coffelt 2014 [89] Zhao J 2020 [90] Kim 2013 [91]</p>
		Invasión y metástasis	Liberación de MMP, Bv8	
		Sinergia con otras citocinas	IL-1, IL-6, IL-23, G-CSF, CXCL1, CXCL5, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ y TGF- $\beta$	
		Troncalidad y formación de CSC	Regulación de la actividad de células madre Activación del locus de progresión tumoral 2 (TPL2)	
		Inmunosupresión	Reclutamiento de células inmunosupresoras (NAT) y factores proinflamatorios	
		Resistencia al tratamiento	Reclutamiento de moléculas adaptadoras como Act1 y reparación celular	

IFN $\gamma$	<ul style="list-style-type: none"> <li>NK</li> <li>linfocitos T</li> <li>Macrófagos</li> <li>Fibroblasto</li> <li>Células endoteliales</li> </ul>	Aumento en la proliferación celular	Activación de la vía de señalización JAK/STAT1	Jorgovanovic 2020 [92] Gocher 2022 [93]
		Troncalidad y formación de CSC	Generación de CSC mediante ICAM1-PI3K-Akt-Notch1	
		Resistencia al tratamiento	Aumenta expresión deIDO, FAS, PD-1 y su ligando PD-L1 en las células inmunitarias y transformadas	
TNF $\alpha$	<ul style="list-style-type: none"> <li>Macrófagos</li> <li>Células mieloides</li> </ul> Líneas celulares: ER+: MCF-7  HER2+: BT474  TN: MDA-MB-231/468	Aumento en la proliferación celular	Activación de vías: PI3k/STAT, MAPK Disminución en la expresión de genes supresores	Soria 2011 [60] Cai 2017 [95] Martínez-Reza 2017 [96] Zhang 2018 [97] Mercogliano 2020 [94]
		Invasión y metástasis	Aumenta expresión de MMP y la EMT	
		Sinergia con otras citocinas	TGF $\beta$ , VEGF, IL-8, CXCR.4	
		Troncalidad y formación de CSC	Sobre expresión de TAZ	
		Inmunosupresión	Aumento en la actividad de células supresoras	
		Resistencia al tratamiento	Sobreexpresión de moléculas que regulan la resistencia a la doxorubicina (GST y BCRP)	
TGF $\beta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>Células epiteliales</li> <li>Células inmunitarias</li> <li>Fibroblastos</li> <li>Líneas celulares de cáncer de mama</li> </ul> ER+: MCF-7  TN: M4, MDA-MB-231	Aumento en la proliferación celular	Activación de vías: SMAD, ERK, MAPK, PI3K, SHC/GRB2/SODS, PAR6 y TRAF4/6	Peng 2022 [98] Zarzynska 2014 [99] SenGupta 2021 [100] Drabsch 2011 [101] Ungerfrozen 2021 [102]
		Invasión y metástasis	Favorecimiento de la expresión de EMT, MMP, proteínas de motilidad y remodelación de citoesqueleto	
		Sinergia con otras citocinas	VEGF, CXCL1/2 y 3, CXCR4, FGF	
		Troncalidad y formación de CSC	Regulación de la cinética y expresión de marcadores de células madre	
		Inmunosupresión en el TME	Favorecimiento de fenotipos inmunosupresores y reclutamiento de TAN	
		Resistencia al tratamiento	Supresión de proteína apoptótica BIM	

IL: Interleucina, TNF: Factor de necrosis tumoral, IFN $\gamma$ : interferón gamma, VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, NF-kB: Factor nuclear kB, NAT: neutrófilos asociados a tumor

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Debido a que la TRH utilizada en la actualidad presenta mayor riesgo de producir efectos adversos (trombogénicos y neoplasias), la búsqueda de nuevos fármacos más seguros y eficaces que puedan ser empleados con esta finalidad es urgente y necesaria. El  $17\beta$ -AE pentolame se ha propuesto como un posible candidato en la TRH con menores riesgos que los estrógenos de uso actual. Por lo que, el conocimiento de los mecanismos de acción que involucran su interacción con el receptor GPER1, relacionados con la proliferación celular y la regulación en la expresión de citocinas que induzcan la metástasis del tumor mediante la generación de un microambiente proinflamatorio, serán cruciales para ofrecerlo como alternativa al TRH.

## **HIPÓTESIS**

Se ha observado que el  $17\beta$ -AE pentolame induce una menor proliferación celular de células de CM de tipo luminal en comparación con el estímulo con  $E_2$ , por lo que se espera que la interacción del pentolame con el GPER1 genere una menor expresión de citocinas proinflamatorias en células de CM humano con diferentes tipos moleculares en comparación con el  $E_2$ .

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la participación del GPER1 en la proliferación y la secreción de citocinas con acciones pro y anti inflamatorias en líneas celulares de cáncer de mama con distintos tipos moleculares expuestas al  $17\beta$ AE pentolame, al  $E_2$ , al agonista del GPER1, el G1, de manera independiente o en combinación con el antagonista del GPER1, el G15.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Identificar la presencia del GPER1 en diferentes líneas celulares de CM
- Determinar las concentraciones de  $E_2$ , pentolame y G1 en donde se induzcan los mayores cambios proliferativos en células de cáncer de

mama con diferentes tipos moleculares. mediante curvas concentración-respuesta

- Determinar los niveles de secreción de las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , y TGF $\beta$  en células de cáncer de mama con diferentes tipos moleculares expuestas a pentolame, E<sub>2</sub> o G1 solos o en presencia del antagonista del receptor de estrógenos membranal GPER1, G15.
- Realizar un interactoma de los procesos celulares involucrados en la metástasis de acuerdo con el perfil de citocinas modulado en las células de CM utilizadas

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Reactivos**

El 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub> o 1,3,5(10)-estratrien-3,17 $\beta$  diol), la sulforrodamina B, la albúmina sérica bovina y el ácido tricloroacético se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El 17 $\beta$ -AE, pentolame [17 $\beta$ -(5-hidroxi-1 pentolamina)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol], se preparó en el laboratorio a partir de estrona de acuerdo con métodos previamente reportados [103]. El G15 fue adquirido de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido).

El E<sub>2</sub>, el pentolame y el G15 se disolvieron en etanol absoluto Merck, Darmstadt, Alemania) en una solución stock de 1x10<sup>-3</sup> M para posteriormente realizar diluciones seriadas. Todos los reactivos y medios de cultivo celular se adquirieron de Gibco (Invitrogen Corporation, Waltham, MA, EE. UU.). La 7-aminoactinomicina D (7-AAD) se obtuvo de BioLegend, San Diego, CA, EE. UU. Los kits para la medición de citocinas fueron obtenidos de R&B System Inc (Bio-Techne, Minneapolis, MN, EE.UU): Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA Catálogo #: DY240, Human TNF-alpha DuoSet ELISA Catálogo #: DY210, Human IL-6 DuoSet ELISA Catálogo #: DY206, Human IL-1 DuoSet ELISA Catálogo #: DY201, Human IL-10 DuoSet ELISA Catálogo #: DY217B así como del Kit LEGENDplex™ de Biolegend para las citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-6,IL-8,IL-10,IL-17A, TNF $\alpha$  y IFN $\gamma$  .

### **Cultivo celular**

Las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, HCC1937 y SKBr3 fueron obtenidas del banco celular ATCC (Manassas, VA, USA). Las células se sembraron en medio RPMI adquirido de Gibco (Invitrogen Corporation, Waltham, MA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los medios se suplementaron con suero

bovino fetal al 5 % inactivado por calor (Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT, EE. UU.) y al 1% de penicilina / estreptomina. Todos los cultivos celulares fueron mantenidos a 37 °C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % y 95 % de humedad.

### **Ensayos de proliferación celular**

Cada línea celular fue sembrada en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad de 2500 células por pozo. Posteriormente, las distintas líneas celulares se incubaron en ausencia (0.1 % v/v de alcohol etílico) o presencia de concentraciones crecientes de ( $1 \times 10^{-11}$  M –  $1 \times 10^{-6}$  M) de E<sub>2</sub>, pentolame o G1, solos o en combinación con G15 ( $1 \times 10^{-6}$  M), durante 72 horas. Cabe señalar que los tratamientos se realizaron en medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor y tratado con carbón/dextran. Posteriormente, el porcentaje de proliferación celular se cuantificó mediante el ensayo sulforrodamina B [104]. Para ello, las células se fijaron con ácido tricloroacético al 10% durante una hora a 4 °C, se lavaron con agua y se tiñeron con sulforrodamina en ácido acético en agitación durante 20 minutos. Finalmente, las células se lavaron dos veces con ácido acético al 1 %; una vez secos los pozos se adicionó Tris Base 10 mM y se leyó la absorbancia a 492 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado en al menos tres ocasiones diferentes.

### **Expresión del GPER1 en las células tumorales**

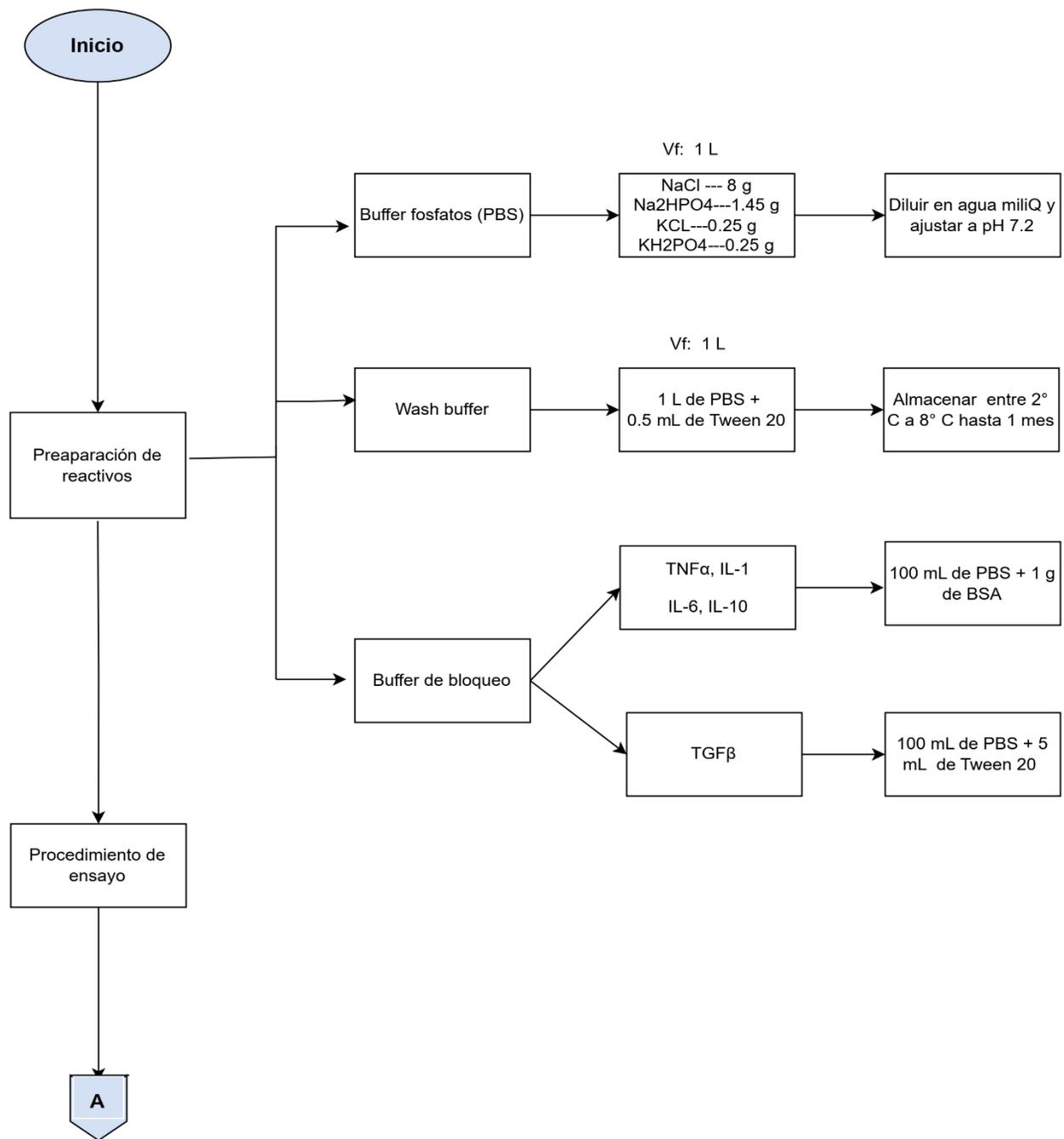
Para evaluar la expresión del GPER1 en las distintas líneas celulares, 18,000 células fueron sembradas en portaobjetos tratados para cultivo celular, a las 24 horas posteriores, las células fueron expuestas a la concentración de  $1 \times 10^{-8}$  M de E<sub>2</sub>, pentolame o G1 durante 72 horas. Al finalizar este periodo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% (en PBS pH 7.1) durante 10 minutos. En seguida, se lavaron con PBS, y usando Triton X-100 al 0.1 % (Sigma, St. Louis MO) se permeabilizaron por 15 minutos. Posteriormente, las células fueron expuestas a albúmina de suero bovino al 1 % (Sigma, St. Louis MO) para el bloqueo de epítopes inespecíficos durante 2 horas. Una vez transcurrido este tiempo, las células se incubaron con el anticuerpo policlonal de GPER1 (1:100) (N-15; Santa Cruz Biotechnology) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente fueron lavadas usando PBS/albúmina para incubar las células con el anticuerpo secundario durante 2 horas. Por último, las células se montaron en medio de montaje con DAPI Fluoroshield® (Sigma, St. Louis MO) y fueron almacenadas a 4 °C hasta su visualización con un microscopio confocal Nikon A1R + STORM (Nikon Co.) Las imágenes fueron capturadas con un objetivo de 20X. Para su visualización se usó el software NIS Elements Viewer 4.2.

## **Evaluación de analitos solubles por ELISA**

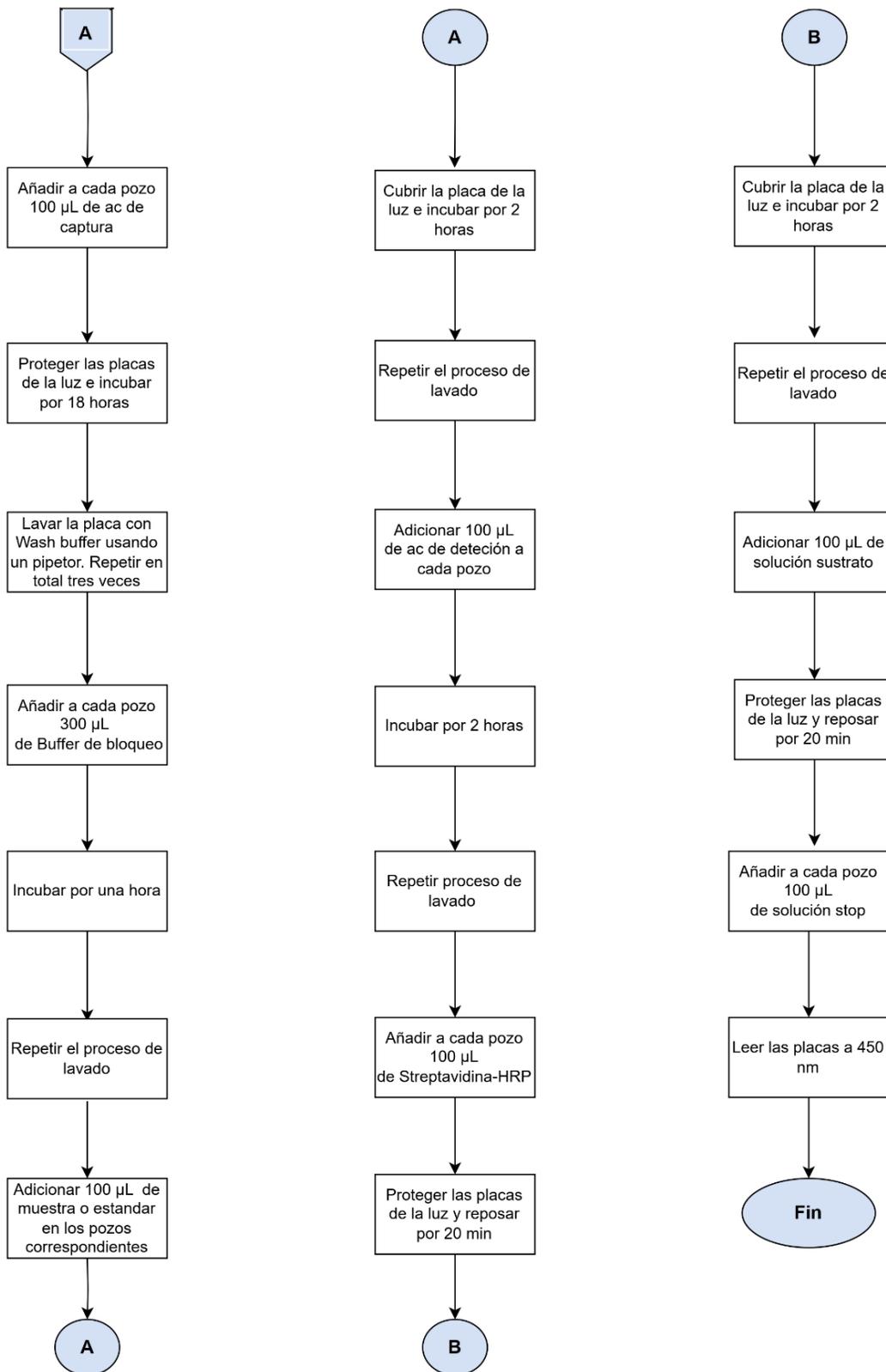
Para la medición de las citocinas se utilizó la técnica de análisis de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA), usando estuches comerciales DuoSet ELISA de la marca R&D Systems (Bio-Techne, Minneapolis, MN, EE. UU) para: TGF- $\beta$ 1 Catálogo No. DY240, TNF- $\alpha$  Catálogo No. DY210, IL-6 Catálogo No. DY206, IL-1 $\beta$ /IL-1F2 Catálogo No. DY201 e IL-10 Catálogo No. DY217B. Así como el kit LegendPlex de Biologend.

La metodología empleada para el análisis de citocinas (Figura 2) fue la siguiente: las líneas celulares fueron sembradas en cajas de 6 pozos en una densidad de 130,000 células por pozo y fueron expuestas a los tratamientos anteriormente descritos, el medio de cultivo se recolectó a las 48 y 72 horas posteriores. Cada citocina secretada fue cuantificada siguiendo los lineamientos descritos en cada estuche comercial como se describe a continuación:

Para comenzar, a placas de 96 pozos de alta adherencia a proteínas se adicionaron 100  $\mu$ L de anticuerpo de captura, reconstituido y diluido a la concentración de trabajo correspondiente a cada citocina, dejando en incubación a temperatura ambiente por 18 horas. Posteriormente, la placa fue lavada con solución de lavado y bloqueada con albúmina por 1 hora. Al terminar este periodo, se repitió el lavado e inmediatamente se adicionaron 100  $\mu$ L de los estándares para construir la curva de calibración y las muestras a evaluar, las cuales se incubaron durante 2 horas. A continuación, se lavaron las placas y se colocó el anticuerpo de detección, tras 2 horas de incubación se lavaron y se adicionó estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (estreptavidina-HRP por sus siglas en inglés; horseradish peroxidase) incubando la placa por 20 minutos. Después de un último lavado, se adicionó la solución sustrato (mezcla 1:1 de reactivo color A, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y reactivo de color B, tetrametilbencidina) por 20 minutos más, con lo cual, se llevó a cabo la reacción colorimétrica que fue detenida al adicionar 50  $\mu$ L de solución de paro (2NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Durante el procedimiento cada placa fue protegida de la luz. Para determinar la absorbancia de cada muestra, las placas fueron leídas a 450 nm usando un lector de placas Multiskan de Labsystems, cuyos datos obtenidos por la lectura derivada de la coloración, fue directamente proporcional a la concentración de citocina presente en cada muestra con base a la curva estándar. Los límites de detección para cada citocina fueron: TGF- $\beta$ 1 (31.2 a 2000 pg/mL), TNF- $\alpha$  (15.6 a 1000 pg/mL), IL-6 (9.37 a 600 pg/mL), IL-1 $\beta$ /IL-1F2 (3.91 A 250 pg/mL) e IL-10 (31.3 a 2000 pg/mL).



**Figura 2.** Diagrama de flujo del procedimiento de ELISA para la cuantificación de citocinas (parte 1)

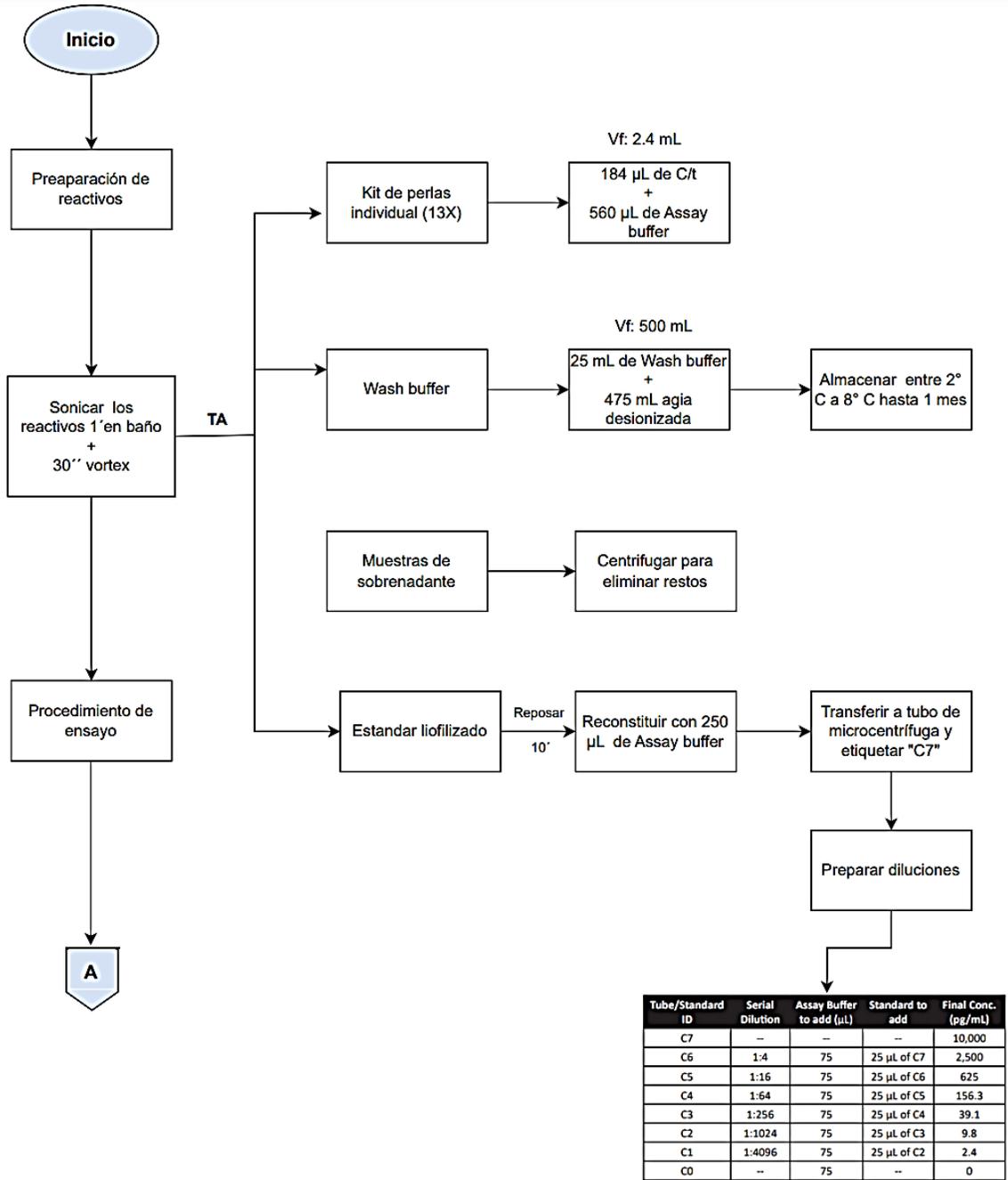


**Figura 2.** Diagrama de flujo del procedimiento de ELISA para la cuantificación de citocinas (parte 2)

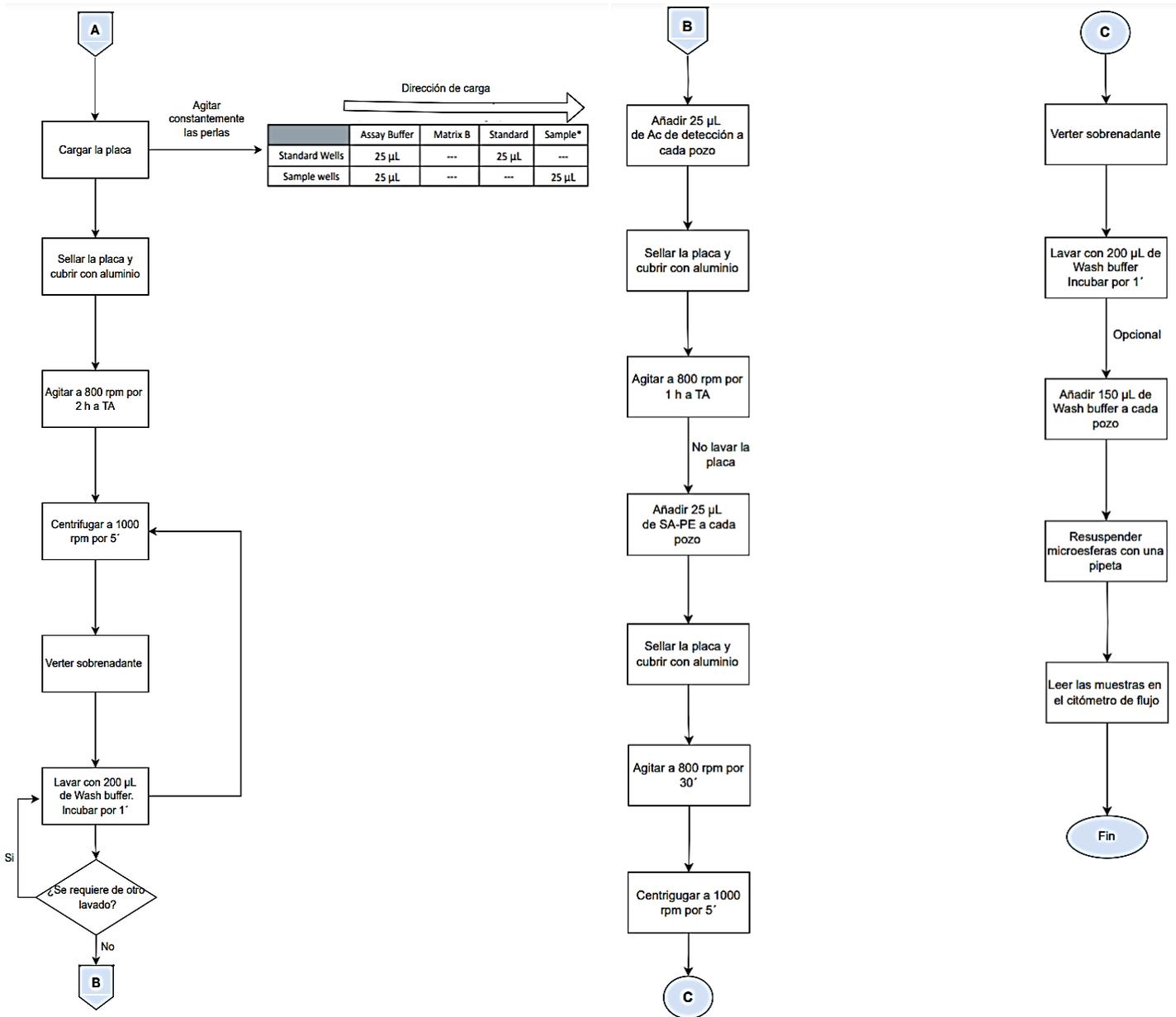
## **Evaluación de analitos solubles por citometría de flujo**

Para este ensayo se prepararon previamente los reactivos a usar (Figura 3a) y se utilizaron únicamente los sobrenadantes provenientes de cada línea celular sembrada a una densidad de 130,000 células por pozo en placas de 6 pozos, las cuales fueron expuestas a los tratamientos independientes de pentolame, E<sub>2</sub>, G1 y G15 o su combinación con G15 por 72 horas. Posterior a este periodo, el procedimiento (Figura 3b) se realizó en una placa de 96 pozos con filtro, donde cada pozo fue humedecido con 100 µL de solución amortiguadora de ensayo utilizando el kit de LegendPlex, posterior a 1 minuto, se eliminó el reactivo mediante filtración con vacío. Se procedió a colocar 25 µL de la solución anterior, seguido de 25 µL de estándar y 25 µL de cada muestra en los pozos correspondientes para después agregar a cada pozo 25 µL del anticuerpo de captura (Mixed beads, el kit de perlas individuales unidos a anticuerpos específicos para las citocinas: IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, TNFα y IFNγ). Una vez cargadas las placas con los volúmenes anteriores, estas fueron selladas y protegidas de la luz por 2 horas en constante agitación. A continuación, los pozos fueron lavados con 200 µL de solución amortiguadora de lavado y secadas mediante la aplicación de vacío. Después, se repitió el lavado e inmediatamente se adicionaron 25 µL de los anticuerpos de captura, los cuales constan de anticuerpos biotilados para generar conjugados tipo sándwich, de anticuerpos de detección de perlas de captura-analito. Las placas fueron selladas y cubiertas de la luz para incubarse durante 1 hora más. Posteriormente, a cada pozo se le agregó 25 µL de ficoeritrina-estreptavidina (SA-PE) por 30 minutos, cuya finalidad es unirse al anticuerpo biotilado y marcar al conjugado, para que mediante la fluorescencia interna de la PE se logre la cuantificación del analito. Más adelante, se colocaron 150 µL de buffer de lavado a cada pozo para eliminar cualquier agregado no específico.

Para finalizar, se transfirieron las muestras a tubos micro-FACS y se procedió a leer en el citómetro de flujo BD ACCURI 6C PLUS un total de 1000 A 5000 eventos por muestra. Los límites de detección para cada citocina fueron de 1: pg/mL a 10,000 pg/mL.



**Figura 3a.** Diagrama de flujo del procedimiento de análisis de solutos solubles por citometría de flujo



**Figura 3b.** Diagrama de flujo del procedimiento de análisis de solutos solubles por citometría de flujo

### Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre los grupos se determinaron empleando la ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Tukey, considerando un valor  $p < 0.05$ . Para el análisis se utilizó el software especializado Sigma Stat 3.5. Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (S.D.). Se realizaron tres repeticiones de cada muestra estudiada.

## **RESULTADOS**

### **Expresión del GPER1 en las células tumorales**

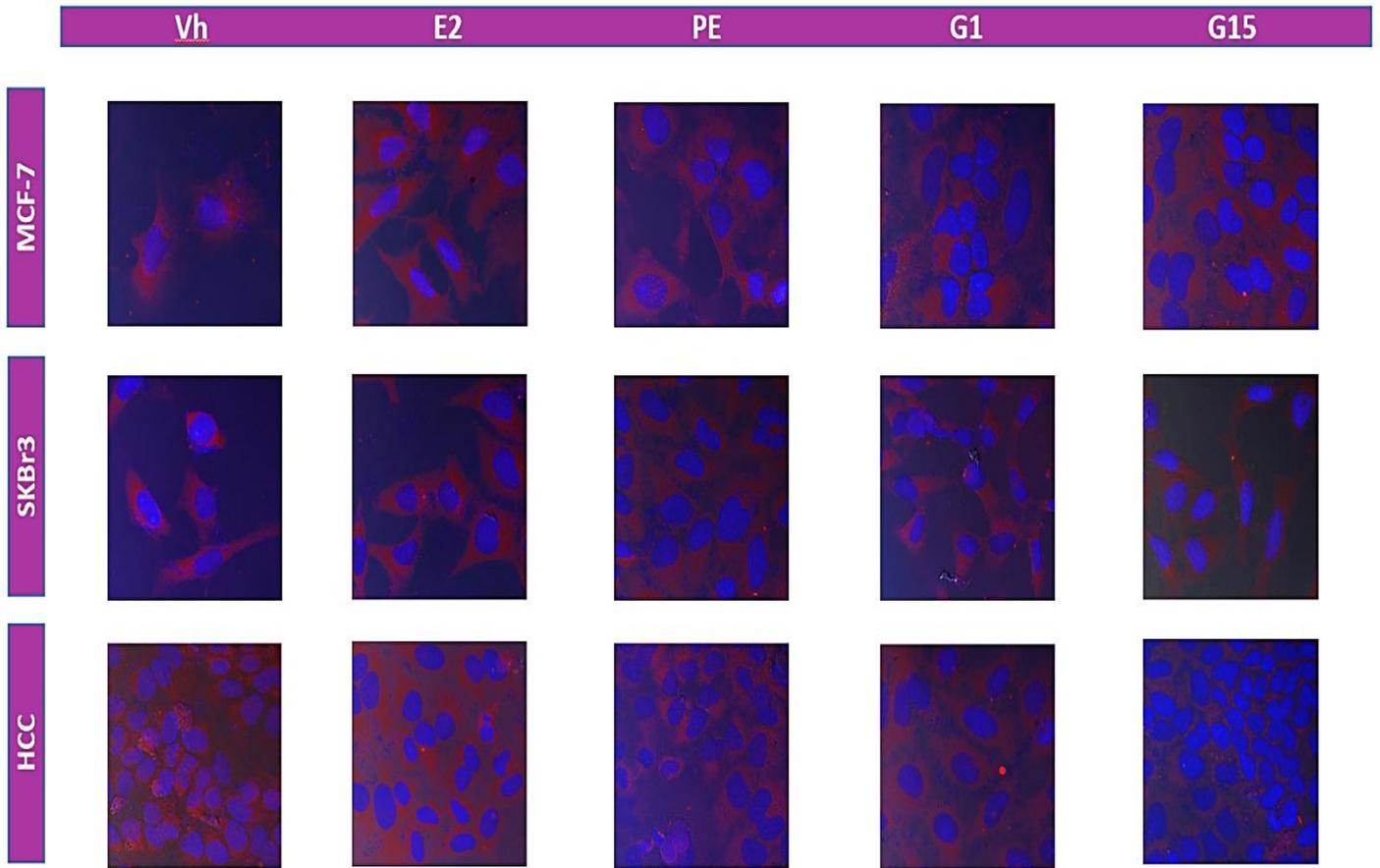
En la Figura 4 se muestra la expresión del GPER1 por microscopia confocal en los tres tipos de líneas celulares de CM utilizadas en este trabajo, las cuales fueron expuestas a E<sub>2</sub>, pentolame, G1 y G15.

La línea MCF-7 representa el tipo luminal de CM, se aprecia como la expresión del GPER1 se encuentra en los diferentes tratamientos. La presencia del GPER1 se encontró en la membrana plasmática y en núcleo celular. De manera interesante, la exposición de las células al G15 provocó una disminución de la expresión del receptor. En la línea celular SKBr3, la cual representa el tipo HER2 enriquecido del CM, se observó una tinción membranal y nuclear, similar a la encontrada en la línea luminal. Es interesante mencionar, que el tratamiento con pentolame parece disminuir la expresión del receptor GPER1 en comparación con el vehículo y con el E<sub>2</sub>.

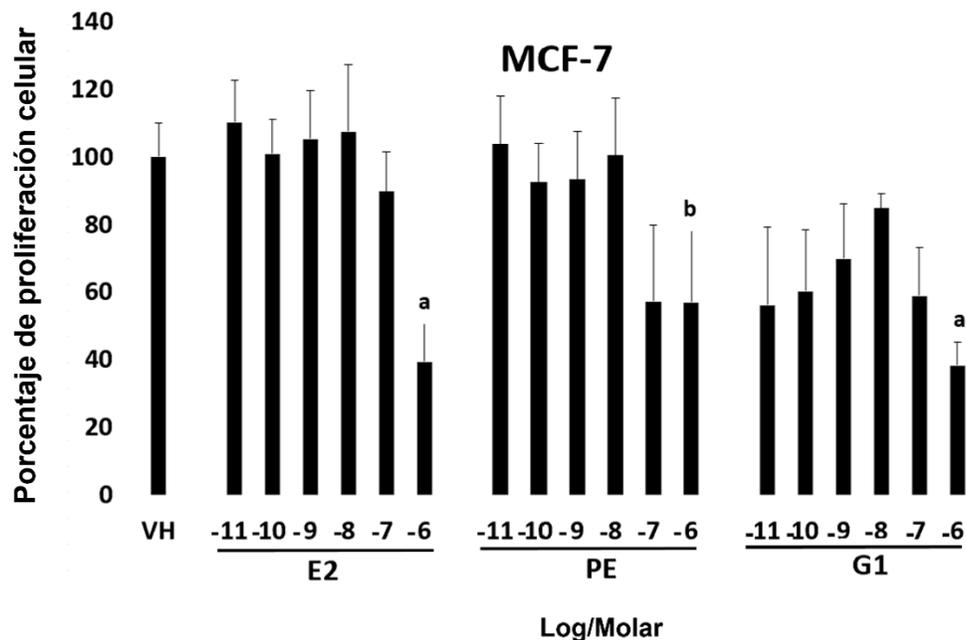
Finalmente, en la línea HCC1937, la cual es un tipo de CMTN, también se encontró la presencia del GPER1 a nivel membranal y nuclear. Cabe destacar que la exposición de estas células al vehículo y al E<sub>2</sub> muestran una expresión marcada en comparación con los tratamientos de pentolame y G1. Además, el tratamiento con el G15 mostró una disminución drástica de la expresión del receptor en comparación con los demás tratamientos y con las otras líneas celulares.

### **Proliferación celular**

La Figura 5 muestra el porcentaje de proliferación celular de la línea MCF-7 expuesta a curvas concentración-respuesta de E<sub>2</sub>, pentolame y G1. El tratamiento con E<sub>2</sub> generó un claro incremento de la proliferación celular, principalmente en las concentraciones de  $1 \times 10^{-11}$  M hasta  $1 \times 10^{-8}$  M. El tratamiento con pentolame no mostró cambios significativos para inducir la proliferación en comparación con el vehículo o con el tratamiento con E<sub>2</sub>. Es importante mencionar, que el tratamiento con G1 disminuyó la proliferación celular en comparación con las concentraciones equimolares de los otros tratamientos con E<sub>2</sub> y pentolame.

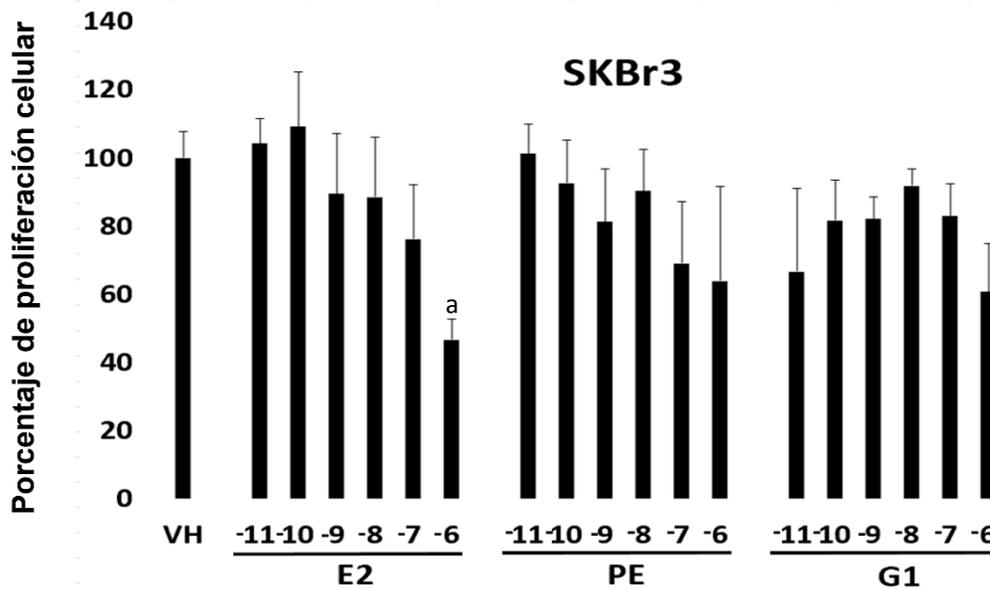


**Figura 4.** Expresión del receptor GPER1 en 3 líneas de CM representativas de cada subtipo molecular: MCF-7 (Luminal), SkBr3 (HER2+) y HCC1930 (CMTN) ante el estímulo de E<sub>2</sub> (Estradiol), PE (17β-AE pentolame), el agonista del GPER1, el G1 y el antagonista del GPER1, el G15.



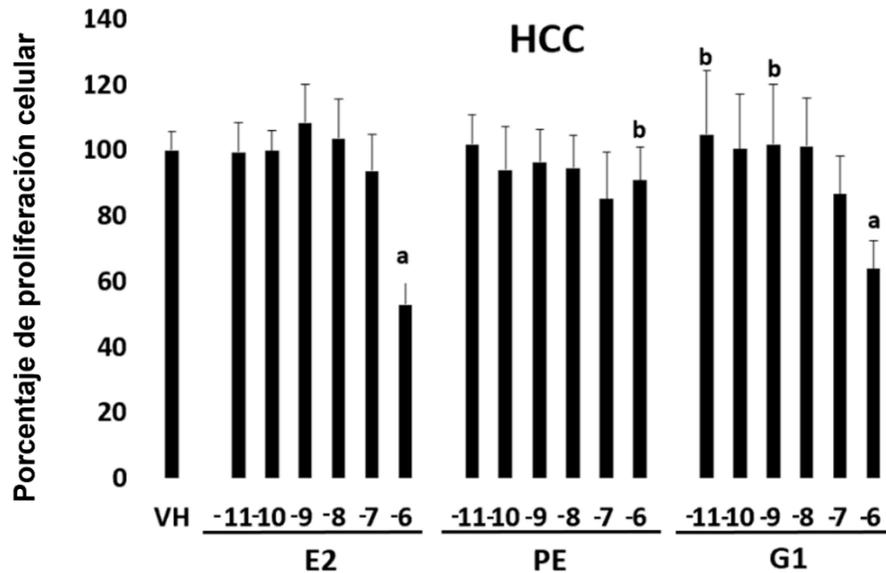
**Figura 5.** Proliferación celular de la línea MCF-7 ante el estímulo de E<sub>2</sub>, PE (17β AE pentolame) y el agonista del GPER1, el G1. Cada barra representa el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos de manera independiente. Significancia estadística posterior a un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey; valor de p < 0.05. Código de significancia estadística: diferencia vs. Vehículo a concentraciones equimolares, b: diferencia vs. E<sub>2</sub> a concentraciones equimolares. Los datos fueron normalizados contra el vehículo

En la Figura 6 se presentan las curvas de concentración-respuesta para la línea celular SKBR3 expuesta a E<sub>2</sub>, pentolame y G1. De manera general, los tratamientos de E<sub>2</sub> y pentolame inhiben la proliferación celular mientras se incrementa la concentración. Es de notar que, el tratamiento con G1 desde concentraciones muy bajas indujo disminución de la proliferación celular cercana al 40 %, manteniendo este mismo efecto a concentraciones mayores.



**Figura 6.** Proliferación celular de la línea SKBr3 ante el estímulo de E<sub>2</sub>, PE (17β AE pentolame) y el agonista del GPER1, el G1. Cada barra representa el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos de manera independiente. Significancia estadística posterior a un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey; valor de p < 0.05. Código de significancia estadística. a: diferencia vs. vehículo a concentraciones equimolares. Los datos fueron normalizados contra el vehículo.

La Figura 7 muestra las curvas concentración-respuesta para la línea celular HCC1937 expuestas a E<sub>2</sub>, pentolame y G1. Se observa que ninguno de los tratamientos mostró tendencia significativa para aumentar o disminuir la proliferación celular, a excepción de E<sub>2</sub> y G1 a concentraciones elevadas.



**Figura 7.** Proliferación celular de la línea de CM HCC1930 ante el estímulo de E<sub>2</sub>, PE(17β AE pentolame) y el agonista del GPER1, el G1. Cada barra representa el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos de manera independiente. Significancia estadística posterior a un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey; valor de p < 0.05.. Código de significancia estadística: diferencia vs. Vehículo a concentraciones equimolares, b: diferencia vs. E<sub>2</sub> a concentraciones equimolares. Los datos fueron normalizados contra el vehículo.

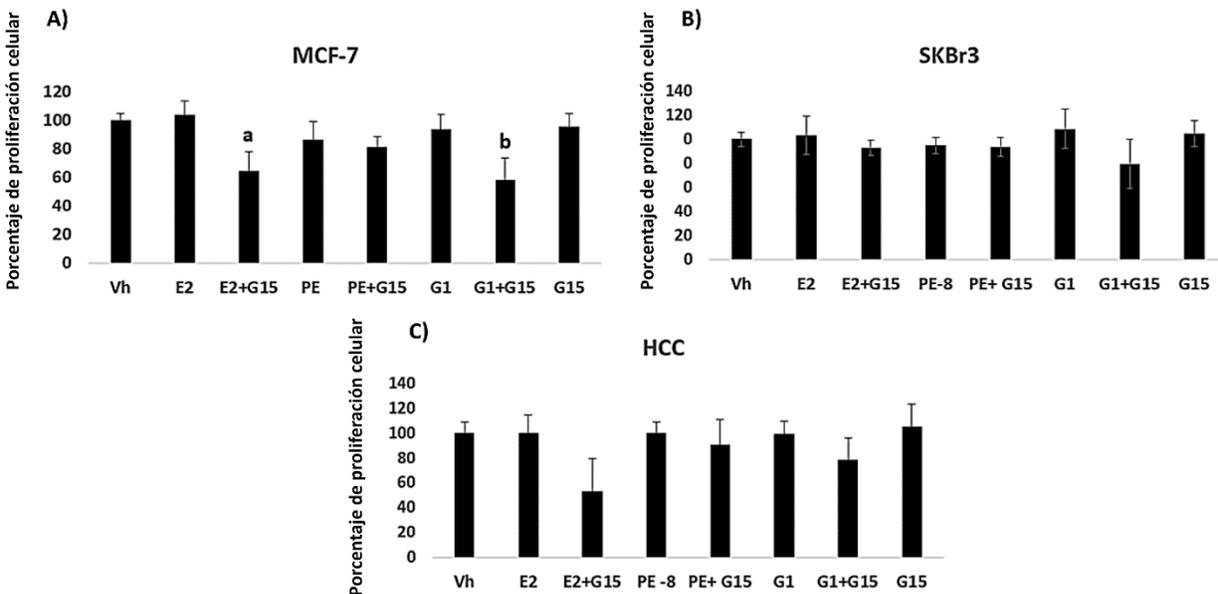
Derivado de los estudios de proliferación descritos anteriormente, donde no hubo diferencias significativas de manera concentración-respuesta con ninguno de los tratamientos, se decidió trabajar con concentraciones equimolares de E<sub>2</sub>, pentolame y G1, tomando como referencia la concentración de 1x10<sup>-8</sup> M para los experimentos subsecuentes. Cabe señalar que esta concentración esta cercana al rango fisiológico reportado para el E<sub>2</sub> en el suero de mujeres en edad reproductiva.

Además, para evaluar el papel del GPER1 por su interacción con el pentolame en el crecimiento celular de distintos tipos de líneas celulares de CM, se utilizó el tratamiento del antagonista del GPER1, el G15 de manera individual o en combinación con el pentolame, se consideraron también esquemas combinados de G15 con E<sub>2</sub> y G1 para poder realizar sus respectivas comparaciones.

## Papel del GPER1 en la proliferación celular

En la Figura 8A se muestran los tratamientos individuales de E<sub>2</sub>, pentolame, G1, G15 de manera independiente y en esquema combinado en la línea MCF-7. Se puede observar como la adición del antagonista del GPER1, el G15, disminuyó significativamente la proliferación celular en los tratamientos con E<sub>2</sub> y G1, sin cambios aparentes en su combinación con el pentolame.

En la Figura 8B y 8C se muestran los efectos sobre la proliferación celular de los tratamientos individuales o en combinación con G15 en la línea SKBR3 y HCC1937. Para la línea SKBr3 ninguno de los tratamientos tuvo efectos significativos sobre la proliferación celular. En el caso de la línea celular HCC1937, la adición de G15 a E<sub>2</sub> muestra una tendencia para disminuir el porcentaje de proliferación celular.



**Figura 8.** Proliferación celular de 3 líneas de CM representativas de cada subtipo molecular: a) MCF-7 (Luminal), b) SkBr3 (HER2+) y c) HCC1930 (CMTN) ante el estímulo de E<sub>2</sub>, PE (17β AE pentolame) y el agonista del GPER1, el G1 y el antagonista del GPER1, el G15 (solo o en combinación con los tratamientos). Cada barra corresponde al promedio más la desviación estándar de 5 experimentos independientes. Significancia estadística posterior a un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey; valor de p < 0.05. a: diferencia vs. E<sub>2</sub>, b: diferencia vs. G1.

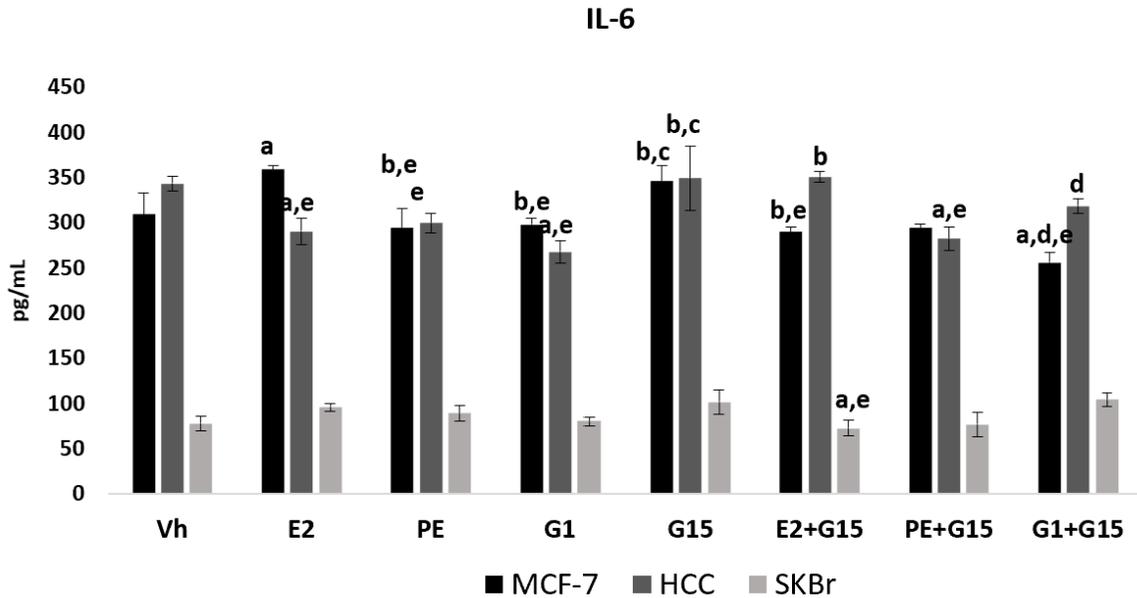
Con los datos anteriormente mostrados, donde solamente la línea MCF-7 tiene algunos resultados significativos, no podría concluirse que el GPER1 este o no directamente implicado en la proliferación celular de las líneas de CM utilizadas en este trabajo. Sin embargo, debido a que la participación de este receptor no se ha investigado en la modulación de citocinas pro y anti inflamatorias en CM, nosotros decidimos evaluar la expresión de distintas moléculas asociadas con el proceso inflamatorio, debido a que su presencia se ha asociado con la inducción de metástasis.

### **Modulación de la expresión de citocinas asociadas al proceso inflamatorio por efectos del GPER1**

La Figura 9 muestra los niveles de expresión de la IL-6 en los tres tipos de células de CM. En la línea MCF-7 se observó que el tratamiento con E<sub>2</sub> indujo mayor expresión de la citocina en comparación con el vehículo y los tratamientos de pentolame y G1. El tratamiento con G15 mostró inducir la secreción de esta citocina en niveles similares a las encontradas con la exposición a E<sub>2</sub>, y las combinaciones de E<sub>2</sub>, pentolame y G1 con el G15 mostraron disminuir la secreción de la IL-6 en alrededor del 30 %.

Para la línea celular HCC1937 se encontró que los tratamientos con E<sub>2</sub>, pentolame y G1 disminuyeron la secreción de la IL-6 en comparación con el vehículo, existiendo una diferencia mayormente significativa cuando las células fueron expuestas al G1. El uso del G15 incrementó la liberación de esta citocina en comparación con el vehículo, el pentolame y G1. De manera interesante, las combinaciones del E<sub>2</sub>, el pentolame y G1 con G15 mostraron disminuir la secreción de la IL-6 nuevamente en alrededor del 30 %.

En cuanto a la línea SKBr3, los resultados indicaron que la secreción de la IL-6 en estas células no fue modificada por ninguno de los tratamientos individuales o en combinación.



**Figura 9.** Expresión de la IL-6 en los tres subtipos moleculares de CM: MCF-7 (Luminal), SkBr3 (HER2+) y HCC1930 (CMTN) ante el estímulo de E<sub>2</sub>, PE(17β AE pentolame) y el agonista del GPER1, el G1 y el antagonista del GPER1, el G15 (solo o en combinación con los tratamientos. Cada barra representa el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos de manera independiente. Significancia estadística posterior a un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey; valor de p < 0.05.. Código de significancia estadística. a: diferencia vs. vehículo, b: diferencia vs. E<sub>2</sub>, c:diferencia vs. PE, d: diferencia vs. G1, e: diferencia vs. G15

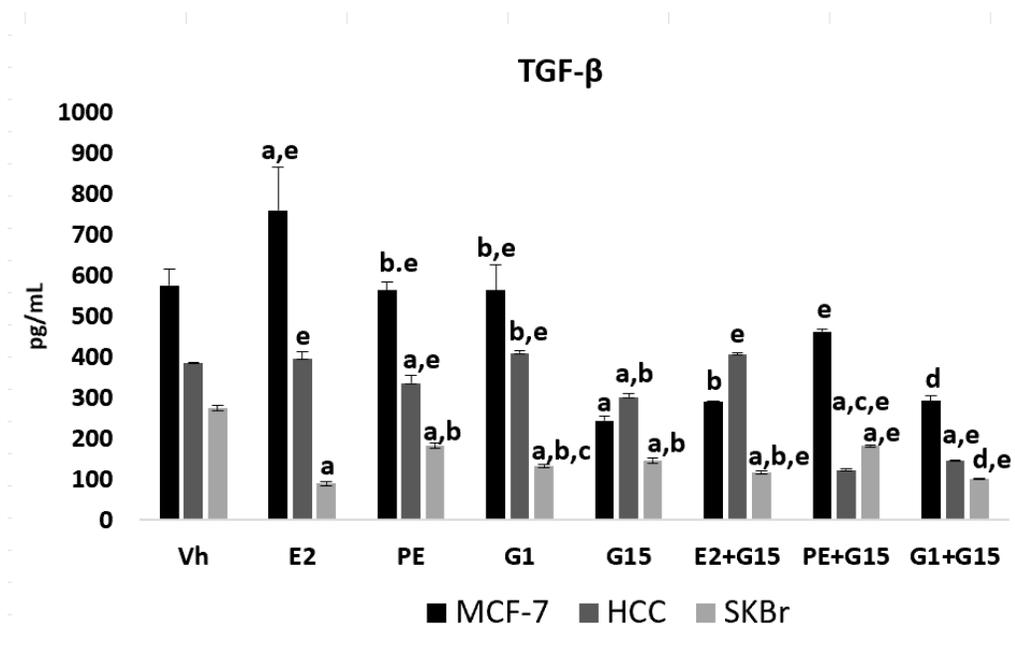
La Figura 10 muestra los niveles de expresión del TGFβ en los tres tipos de células de CM. En la línea MCF-7 se observó que el tratamiento con E<sub>2</sub> indujo aumento significativo de la expresión de esta citocina en comparación con el vehículo y los tratamientos de pentolame y G1, tendencia similar a la observada para la IL-6 en esta misma línea. De manera interesante, el tratamiento con pentolame y G1 mostró reducir la secreción del TGFβ en alrededor del 25 %, mientras que el G15 inhibió la secreción de la misma en 65 % en comparación con el tratamiento de E<sub>2</sub>. Cabe señalar que, los esquemas de combinación de E<sub>2</sub>, pentolame y G1 con el G15 disminuyeron la secreción de esta citocina en comparación con los tratamientos de manera independiente.

En las células HCC1937 el tratamiento con E<sub>2</sub> no mostró cambios significativos para aumentar o inhibir la secreción del TGFβ, mientras que la exposición de pentolame y G15 inhibió la secreción de esta citocina de manera significativa en comparación con el vehículo, E<sub>2</sub> y G1. De manera interesante, la combinación de G15 con E<sub>2</sub> no mostró cambios con respecto al efecto mostrado por el E<sub>2</sub>. Sin embargo, la adición

del antagonista G15 con pentolame y G1 tuvo efectos inhibitorios en la secreción del TGFβ al compararlos con los tratamientos de manera independiente.

Se encontró que los tratamientos con E<sub>2</sub>, pentolame y G1 disminuyeron la secreción de la IL-6 en comparación con el vehículo, existiendo diferencia mayormente significativa cuando las células fueron expuestas al G1. El uso del G15 incrementó la liberación de esta citocina en comparación con el vehículo, el pentolame y G1. De manera interesante, las combinaciones del E<sub>2</sub>, el pentolame y G1 con G15 mostraron disminuir la secreción de la IL-6 nuevamente en alrededor del 30 %.

De manera interesante, en la línea celular SKBR3, los tratamientos individuales de E<sub>2</sub>, pentolame y G1 de manera independiente o en combinación con el antagonista del receptor mostraron inhibir la secreción de esta citocina, aunque solamente el bloqueo del GPER1, con la adición del G15, ocasionó diferencia significativa en el tratamiento del G1.



**Figura 10.** Expresión del TGFβ en los tres subtipos moleculares de CM: MCF-7 (Luminal), SkBr3 (HER2+) y HCC1930 (CMTN) ante el estímulo de E<sub>2</sub>, PE (17β AE pentolame) y el agonista del GPER1, el G1 y el antagonista del GPER1, el G15 (solo o en combinación con los tratamientos). Cada barra representa el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos de manera independiente. Significancia estadística posterior a un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey; valor de p < 0.05. Código de significancia estadística: diferencia vs. vehículo, b: diferencia vs. E<sub>2</sub>, c: diferencia vs. PE, d: diferencia vs. G1, e: diferencia vs. G15.

Es importante mencionar que también se evaluaron otras citocinas implicadas en procesos de inflamación como la IL-1 $\beta$ , IL-10 y el TNF $\alpha$ , sin embargo, la expresión de estas citocinas no fue detectada en ninguno de los sobrenadantes, ya que los rangos de concentración detectados en la curva estándar se encontraron por debajo de los valores de referencia de los kits correspondientes.

No obstante, y debido a que el panel de ELISA tradicional no detectó la secreción de algunas citocinas, se decidió ampliar el estudio usando una determinación de analitos solubles a través de la identificación con fluorescencia. Cabe destacar que el panel ampliado se decidió evaluar en los sobrenadantes de las células MCF-7 y HCC1937, ya que en estas líneas fue donde mayor expresión de citocinas se observó con la técnica de ELISA convencional.

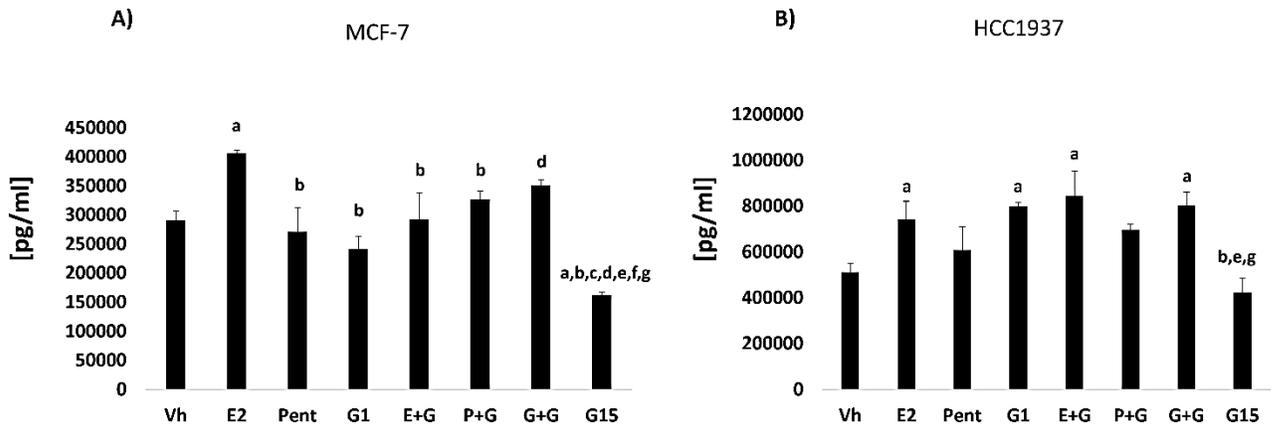
Con la técnica de analitos solubles por fluorescencia se analizó la expresión de las siguientes citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, IFN $\gamma$ , e TNF $\alpha$ . Es importante mencionar que, de las citocinas analizadas, únicamente se detectó la expresión de la IL-6, IL-8, IL-10 y la IL-17. Los niveles de expresión de la IL-1 $\beta$ , el IFN $\gamma$ , y el TNF $\alpha$  no fueron detectados en los sobrenadantes de ambas líneas celulares. En estos experimentos la IL-6 fue la proteína mayormente detectada.

En la Figura 11 A) se observan los niveles de expresión de la IL-6 en los sobrenadantes de las líneas celulares de CM utilizadas. Para la línea MCF-7, la exposición a E<sub>2</sub> indujo incremento significativo en la secreción de esta citocina con respecto al vehículo. De manera interesante, los tratamientos con pentolame o G1 disminuyeron los niveles de expresión de la IL-6 en comparación con los inducidos por el E<sub>2</sub>. La combinación de G15 con E<sub>2</sub> mostró disminuir los niveles de esta citocina en comparación con el tratamiento de E<sub>2</sub> solo, mientras que la combinación de G15 con pentolame o G1 mostró incrementar los niveles de expresión de esta citocina en comparación con el vehículo o con los tratamientos de manera independiente. Se destaca que, el efecto generado con el tratamiento de G15 causó el mayor decremento en la expresión de la IL-6, cercano al 50 % en comparación con el vehículo y 65 % con respecto al tratamiento de E<sub>2</sub>.

En las células HCC1937, Figura 11 B, se observó aumento en la expresión de la IL-6 con los tratamientos de E<sub>2</sub> y G1 en comparación con el vehículo, mientras que, el tratamiento con el pentolame no modificó los niveles de expresión de esta citocina en comparación con el vehículo. De manera interesante, las combinaciones con el G15 parecen incrementar los niveles de expresión de la IL-6, efecto contrario al observado con la exposición del G15 solo.

Además, es importante mencionar que, de manera general los efectos del E<sub>2</sub>, el pentolame y G1 de forma independiente muestran tendencia similar en ambas

líneas, asimismo, el G15 mostró un efecto inhibitor de esta citocina. Por otro parte, los niveles de expresión de la IL-6 fueron mayores en la línea celular HCC1937 que corresponde a un fenotipo mayormente agresivo.



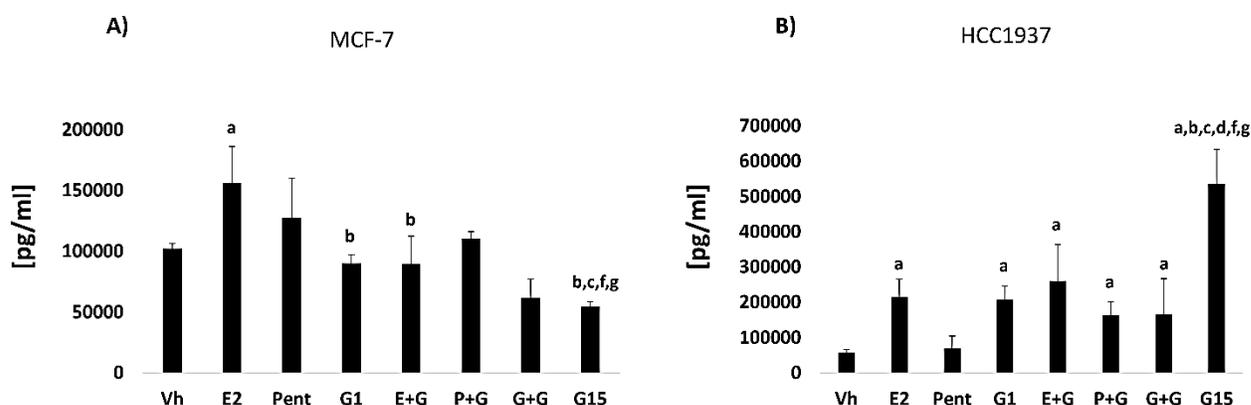
**Figura 11.** Expresión de la IL-6 en A) células MCF-7 y B) células HCC1937 expuestas al vehículo (Vh), al E<sub>2</sub>, al pentolame (Pent), el agonista del GPER1, el G1; y el antagonista del GPER1, el G15 (solos o en combinación). La cuantificación se llevó a cabo mediante el ensayo MULTIPLEX (medición de analitos solubles por citometría de flujo). Cada barra representa el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos de manera independiente. Significancia estadística posterior a un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey; valor de  $p < 0.05$ . Código de significancia estadística; a vs Vh; b vs. E<sub>2</sub>; c vs. Pent; d vs. G1; e vs. E+G; f vs. P+G; g vs. G+G; h vs. G15.

La Figura 12 A) muestra que el tratamiento con E<sub>2</sub> indujo incremento importante en la secreción de la IL-8, efecto que no se observó con la exposición al pentolame o al G1. El uso del G15 en combinación con E<sub>2</sub> inhibió revertió significativamente la secreción de esta citocina a la inducida por el E<sub>2</sub>. Además, la adición del G15 al pentolame o al G1 mostró inhibir la secreción de la IL-8 en comparación con la administración de pentolame o G1 de manera independiente. Al igual que en los niveles de expresión de la IL-6 para la línea MCF-7, el tratamiento con el G15 mostró reducción significativa en los niveles de expresión de la IL-8 a la inducida por el E<sub>2</sub>, el pentolame o el G1.

La Figura 12 B) muestra los resultados obtenidos en la línea celular HCC1937. La expresión de la IL-8 fue aumentada significativamente en los tratamientos de E<sub>2</sub>,

G1, G15, así como en todos los esquemas combinados con G15. De manera interesante, el tratamiento con el pentolame no mostró cambios significativos en la expresión de esta citocina en comparación con el vehículo. Se destaca que, los niveles de la IL-6 con el pentolame son alrededor de 3 veces menores que los exhibidos por el E<sub>2</sub>. También es importante recalcar que el tratamiento con el G15 indujo la expresión de IL-8 en alrededor de 6 veces más en comparación con el vehículo y el pentolame y 2.5 veces más en comparación con el E<sub>2</sub>.

Al igual que la expresión de la IL-6, los rangos de expresión de la IL-8 son mayores en la línea celular HCC1937.



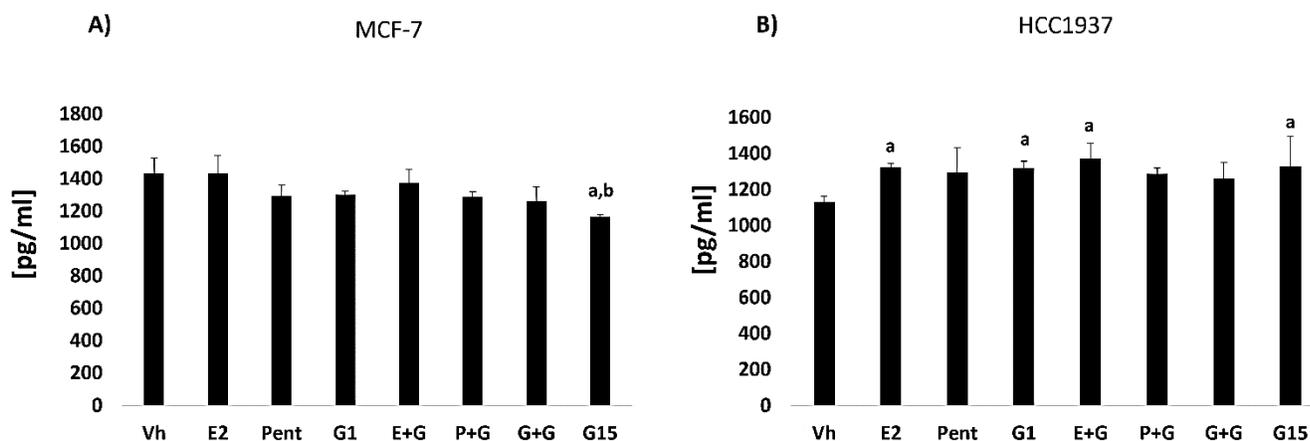
**Figura 12.** Expresión de la IL-8 en A) células MCF-7 y B) células HCC1937 expuestas al vehículo (Vh), al E<sub>2</sub>, al pentolame (Pent), el agonista del GPER1, el G1; y el antagonista del GPER1, el G15 (solos o en combinación). La cuantificación se llevó a cabo mediante el ensayo MULTIPLEX (medición de analitos solubles por citometría de flujo). Cada barra representa el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos de manera independiente. Significancia estadística posterior a un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey; valor de  $p < 0.05$ . Código de significancia estadística; a vs. Vh; b vs. E<sub>2</sub>; c vs. Pent; d vs. G1; e vs. E+G; f vs. P+G; g vs. G+G; h vs. G15.

Los niveles de expresión de la IL-10 fueron detectados en ambas líneas celulares, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La Figura 13 muestra los niveles de expresión de la IL-17A en la línea celular A) MCF-7 y B) HCC1937. Para la línea celular MCF-7 el tratamiento con el E<sub>2</sub>, así como su combinación con el G15 mostraron niveles de expresión de esta citocina similares a los del vehículo (1400 pg/mL). Los tratamientos de pentolame y el G1 solos o en combinación con el G15 mostraron una tendencia para disminuir los

niveles de expresión de la IL-17A. De manera interesante, el tratamiento con el G15 mostró inhibir significativamente los niveles de esta proteína en comparación con el vehículo y el E<sub>2</sub>, aunque sin cambios con el resto de los tratamientos.

En la línea celular HCC1937 expuesta al E<sub>2</sub>, al G1 y al G15, así como a la combinación de E<sub>2</sub>+G15 indujo un aumento significativo de los niveles de expresión de la IL-17A en comparación con el vehículo. El tratamiento con pentolame solo o en combinación con G15, así como la combinación de G1+G15 no mostró modular la expresión de esta citocina.



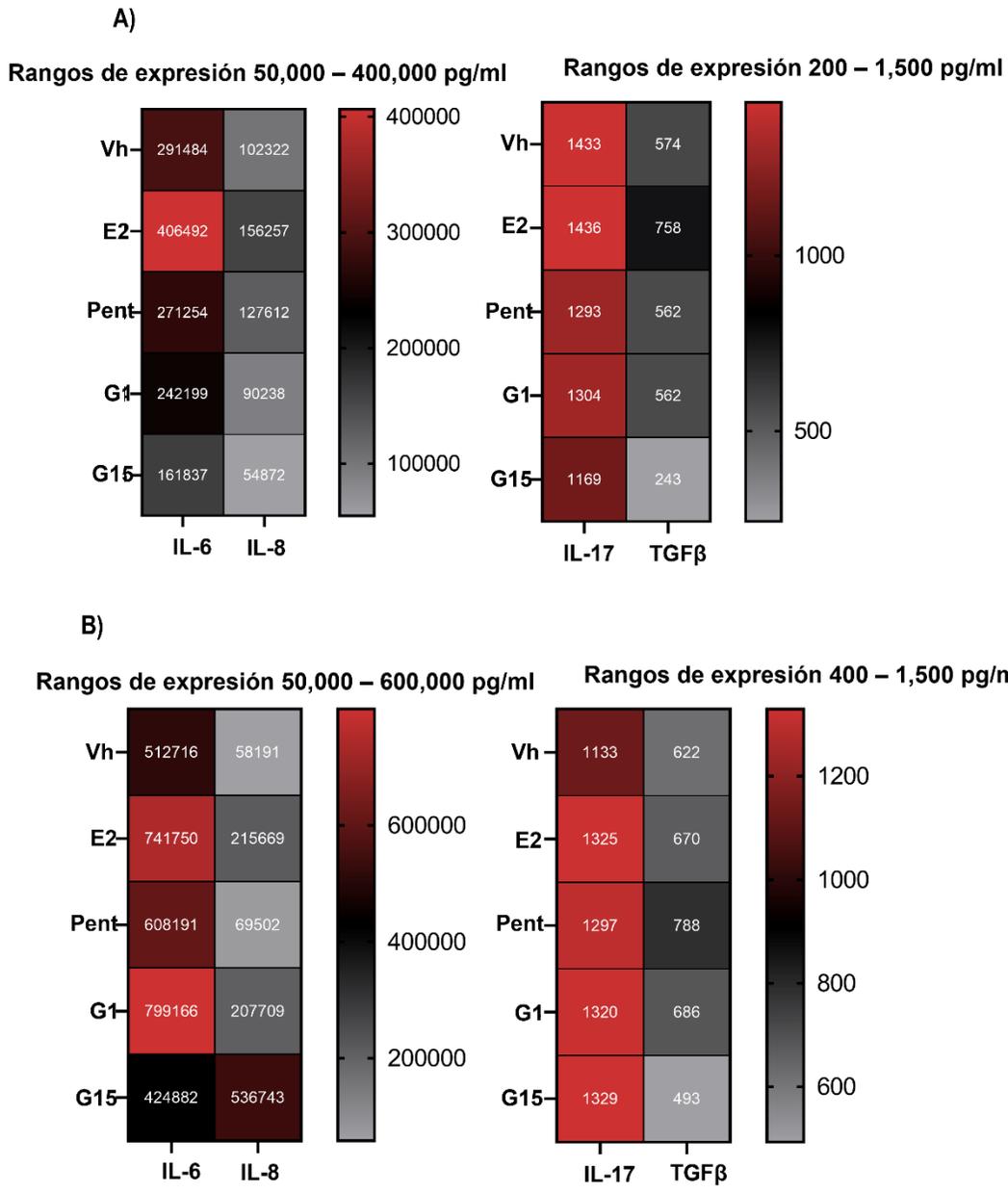
**Figura 13.** Expresión de la IL-17A en A) células MCF-7 y B) células HCC1937 expuestas al vehículo (Vh), al E<sub>2</sub>, al pentolame (Pent), el agonista del GPER1, el G1; y el antagonista del GPER1, el G15 (solos o en combinación). La cuantificación se llevó a cabo mediante el ensayo MULTIPLEX (medición de analitos solubles por citometría de flujo). Cada barra representa el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos de manera independiente. Significancia estadística posterior a un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey; valor de  $p < 0.05$ . de significancia estadística; a vs Vh; b vs E<sub>2</sub>; c vs. Pent; d vs. G1; e vs. E+G; f vs. P+G; g vs. G+G; h vs. G15.

Derivado de las mediciones en las citocinas anteriormente descritas, se determinó que la expresión de la IL-6, IL-8, IL-17A y TGF $\beta$  tuvieron cambios significativos en los dos tipos de líneas celulares de CM empleados. En la Figura 14 se puede

observar un mapa de calor donde se grafica la expresión de estas citocinas en ambos tipos celulares para los tratamientos individuales, lo anterior, con el objeto de visualizar de manera precisa el incremento o decremento de las citocinas ante los estímulos ya mencionados y comparando entre sí las líneas celulares MCF-7 y HCC1937.

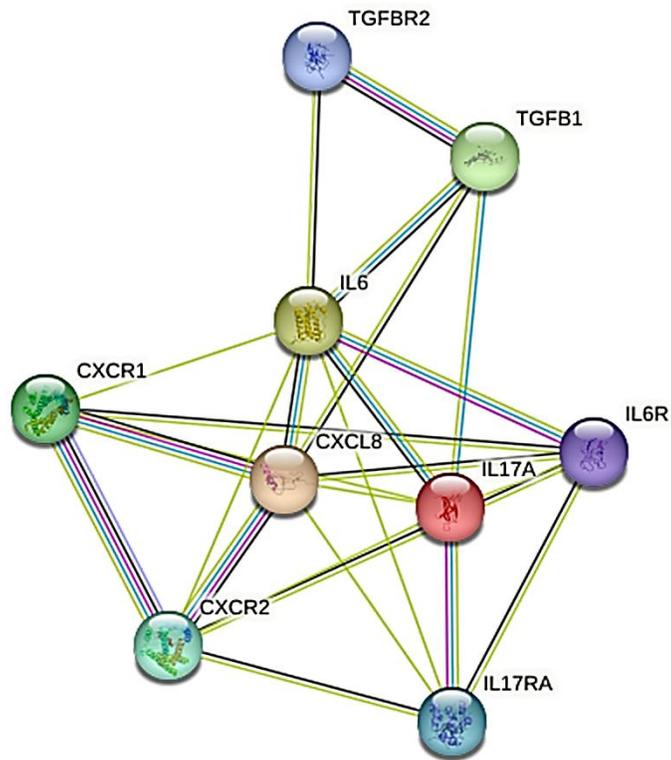
La Figura 14 A) corresponde a las células MCF-7, en donde se observa que el E<sub>2</sub> es el mayor inductor de la secreción de citocinas, sobre todo de la IL-6, seguida por el TGFβ y la IL-8. La expresión de la IL-17A también es aumentada por el tratamiento con E<sub>2</sub>, aunque el incremento es menor en comparación con los otros estímulos. El pentolame y el G1 mostraron disminuir la secreción de todas las citocinas evaluadas. Finalmente, el G15 mostró reducir los niveles de expresión de estas moléculas, mostrando un efecto mayor en la IL-6 y el TGFβ, donde el decremento fue cercano al 50 %.

Con relación a la línea celular HCC1937, Figura 14 B), el E<sub>2</sub> y el G1 fueron los mayores inductores de la expresión de la IL-6, mientras que el tratamiento con pentolame y el G15 muestra reducirla. Los niveles de expresión de la IL-8 fueron incrementados por los tratamientos de E<sub>2</sub>, G1 y en mayor medida por el G15, el pentolame no mostró favorecer la expresión de la IL-8. Por otro lado, todos los tratamientos indujeron la expresión de la IL-17A en comparación con el vehículo. Finalmente, los niveles de expresión del TGFβ fueron mayormente generados por el pentolame, mientras que el estímulo del G1 y el E<sub>2</sub> tuvieron una tendencia similar a la exhibida por el vehículo. Y el tratamiento con G15 tuvo el mayor efecto inhibitor para el TGFβ.



**Figura 13.** Mapa de calor que muestra los niveles de las citocinas IL-6, IL-8, IL-17 y TGFβ en A) células MCF-7 y B) células HCC1937 expuestas a E<sub>2</sub>, Pent, G1 y G15 Rojo: expresión aumentada, gris: expresión disminuida. Rangos de expresión entre 50,000 – 400,000 pg/mL y 200 – 1,500 pg/mL.

## Análisis bioinformático del interactoma de la expresión de citocinas proinflamatorias



Nó colorido: Proteína de consulta e primeira capa de interatores

### Interações conhecidas

- De bases de dados selecionadas
- Determinado experimentalmente

### Interações previstas

- Genes vecinos
- Fusões de genes
- Co-ocorrência de genes

### Otros

- Extração de textos
- Coexpressão
- Homologia de proteínas

**Figura 15.** Rede de interação citocina-citocina (e seus receptores) das citocinas sobreexpressadas em dois tipos de linhas celulares de CM empregadas: MCF-7 (Luminal) e HCC1937 (CMTN). O gráfico foi realizado através da base de dados String.

## DISCUSIÓN

En la sección introductoria se indicó que la exposición prolongada al E<sub>2</sub> tiene un papel importante en el desarrollo y crecimiento de neoplasias dependientes de estrógenos, entre los que destaca el CM. Por lo anterior, nuestro grupo de trabajo investiga el desarrollo de análogos estructurales del E<sub>2</sub>, entre los cuales se encuentran los 17β aminoestrógenos y su posible uso y aplicación como alternativas de TRH [4, 8, 19, 20, 103] Entre ellos, se decidió evaluar los efectos del compuesto pentolame sobre la proliferación celular y secreción de citocinas a través de su interacción con el receptor GPER1 en distintos tipos celulares de CM.

Es importante mencionar que existe amplia evidencia científica acerca de las acciones biológicas del E<sub>2</sub> en CM por su interacción con receptores nucleares y membranales [5, 28, 31, 105, 106]. Sin embargo, los mecanismos de acción y efectos celulares atribuidos al receptor GPER1 aún son escasos. El GPER1 media efectos no genómicos, y de esta manera impulsa la proliferación tumoral, la invasividad, la metástasis y la recurrencia del CM, principalmente de tipo luminal [5, 21-29, 56]. Pero sus efectos en este y en otros tipos de CM relacionados con la promoción de un ambiente proinflamatorio no han sido explorados en investigaciones previas. Es por ello que, el objetivo del presente trabajo correspondió a evaluar los efectos anti o proinflamatorios inducidos por la unión del pentolame al GPER1 y comparar sus efectos con agonistas o antagonistas específicos de este receptor en diferentes tipos celulares de CM.

Conforme a lo reportado en la literatura en muestras de pacientes con CM, nosotros corroboramos la presencia del GPER1 en las distintas líneas celulares de CM. Es importante mencionar que la presencia de este receptor se encontró a nivel membranal y nuclear. Los hallazgos anteriores concuerdan con los estudios de estrógeno fisiológico predominante en mujeres y con mayor afinidad por los receptores de estrógeno nucleares Revankar et al donde se observó la expresión del receptor GPER1 en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi de células MCF-7, SKBr3 y en menor medida en células MDA-MB-231, otra línea celular de CM TN [31]. De manera similar, los estudios de Hsu demostraron, mediante microscopía confocal, la expresión del GPER1 en el núcleo de las células MCF-7 [21].

Por otro lado, los resultados relacionados con los efectos proliferativos del E<sub>2</sub> mostraron que esta hormona incrementa la proliferación celular, especialmente en la línea MCF-7 correspondiente a un tipo luminal. Este resultado es similar a los que se obtuvieron anteriormente en el laboratorio al exponer células MCF-7 con E<sub>2</sub> a concentraciones de 1x10<sup>-14</sup> hasta 1 x 10<sup>-9</sup> M por 72 horas [5, 19]. Al respecto,

diversos estudios han propuesto algunos mecanismos para explicar el efecto proliferativo en las células luminales: Según los resultados de Revankar, la expresión del GPER1 en células MCF-7 es mayor en comparación con las líneas celulares HER2 enriquecida y TN [31]. Los trabajos de Filardo y Prossnitz con la misma línea celular demostraron que la señalización  $E_2$ /GPER1 en concentraciones de 1 nM activa diversas vías de señalización como MAPK, ERK1/2, PI3K, la movilización de calcio intracelular, además de la transactivación del EGFR y la regulación a la alza de oncogenes [22, 23]. De manera similar, el estímulo de las células luminales a una concentración de  $E_2$  de  $10^{-5}$  M hasta  $10^{-9}$  M indujo una sobreexpresión de la ciclina E [39,40] y de ciclina D1 [41], dependiente de la concentración; este mayor procesamiento de las proteínas reguladoras del ciclo celular se asocia a la tumorigénesis [39,40,41]. Aunado a esto, el trabajo de Yang con células MCF-7 tratadas en concentraciones de 5, 10 y 100 nM de  $E_2$ , demostró que este ligando activa el GPER1 y a través de esta señalización se regula negativamente la expresión del miR-124, un microARN cuya labor es inhibir la expresión de proteínas asociadas a la proliferación y movilidad celular, particularmente la traspanina CD151 [5].

Por lo que, acorde a los resultados obtenidos, la estimulación de las células MCF-7 con  $E_2$  y a través del GPER1 conduce a una mayor proliferación celular, mediada por la activación de vías de señalización y oncogenes, la desregulación del ciclo celular y la inducción en la expresión de proteínas asociadas a la motilidad celular.

Por otro lado, el pentolame no tuvo efectos proliferativos significativos en ninguna de las líneas celulares, datos similares a los ya reportados por el presente grupo de trabajo para la línea celular MCF-7 y una línea celular de cáncer cérvico uterino donde se usaron concentraciones crecientes de pentolame, de  $1 \times 10^{-12}$  hasta  $1 \times 10^{-9}$  [4].

De manera interesante, se observó que la exposición de todas las líneas celulares al agonista específico del GPER1, el G1, redujo el porcentaje de proliferación celular en comparación con el efecto encontrado por el  $E_2$ . Al respecto se han reportado diversos estudios acerca del papel represor del G1 en líneas de CM: El equipo de trabajo de Ho Vo con la línea MCF-7, observó que desde las 24 horas bajo el estímulo de G1 a la concentración de 1  $\mu$ M, la proliferación celular mostraba una disminución y una detención del ciclo celular, sus experimentos sugieren que la movilización de calcio ocasionada por el agonista desencadena una pérdida de calcio en el retículo endoplasmático y como consecuencia se genera un mal plegamiento de proteínas. Esto activa de manera prolongada la respuesta a proteínas desplegadas o UPR cuya estimulación sostenida desencadena la

señalización de proteínas proapoptóticas; además de detener el ciclo celular en G2/M [47].

De manera similar, los resultados de Weibenborn al estimular por 24, 48 y 72 horas con G1 a las células MCF-7, SKBr3, MDA-MB-231 y MDA-MB-468, demostraron que el incremento en la apoptosis de las células tumorales fue provocado por una fosforilación acelerada de la histona H3 que condujo a una alteración del ciclo celular, observando este efecto de manera marcada en las células luminales en concentraciones cercanas a  $1 \times 10^{-7} \mu\text{M}$  [49, 50]. Estos últimos datos concuerdan con los obtenidos por Wei en células ER- (SKBr3 y MDA-MB-231) usando concentraciones de  $1 \times 10^{-8}$  a  $1 \times 10^{-5}$  M de G1, donde de manera similar, se generó una detención del ciclo celular; Wei explica que la señalización G1/GPER1 genera la regulación negativa de la ciclina B y de Bcl-2; mientras que estimula las vías reguladoras mediadas por p21 y p53, además de la expresión de ROS y proteínas apoptóticas [48].

De manera que, con los resultados obtenidos en el este trabajo junto a las observaciones presentadas por otros autores, se puede inferir que el efecto antiproliferativo del GPER1 es producido solamente por su interacción con este agonista específico, el G1, ya que la unión del receptor membranal con  $E_2$  o diferentes fármacos sintéticos como el tamoxifeno u otros ligandos generan una mayor proliferación celular [5, 21, 39, 51].

Con relación a los efectos del antagonista del GPER1, el G15, nuestros resultados muestran que este compuesto no inhibe la proliferación celular cuando se administra de manera independiente; sin embargo, cuando el G15 se administra de manera conjunta con el  $E_2$ , parece ejercer un efecto inhibitorio. Estos hallazgos han sido previamente documentados en células de cáncer de pulmón [35] y en líneas celulares de CM.

El efecto del antagonista del G15 fue explorado en la línea MCF-7, la cual fue evaluada por Yang usando 100 nM de G15, el tratamiento con este compuesto logró disminuir los efectos provocados por el  $E_2$  en la proliferación, invasión y migración de las células tumorales [5]. De forma semejante Liu reportó una baja sensibilidad por parte de las células MCF-7 y MDA-MB-231 en la inhibición de la proliferación celular al usar de manera independiente el G15 en concentraciones de 0.1 a 0.625  $\mu\text{M}$ ; sin embargo, tuvo un potente efecto inhibitorio en combinación con doxorubicina, donde se generó una represión del GPER1, lo que condujo a una inhibición de la EMT en las células tumorales y a la disminución tumoral. Inclusive, este efecto también ha sido reportado en combinación con tamoxifeno [55]. Mientras que en células HER2+, Dennis observó que tanto la activación de la vía PI3K así como la movilización de calcio mediada por  $E_2$ /GPER1 era inhibida mediante el pretratamiento de las células con el antagonista [53]. Sin embargo, la combinación

de G15 con pentolame o G1 no indujo efectos inhibitorios de la proliferación celular de manera significativa. Lo anterior sugiere que el G15 antagoniza únicamente los efectos provocados por ciertos agonistas, en el caso del presente trabajo, por el E<sub>2</sub>.

Además, los hallazgos encontrados dan la pauta a estudiar la interacción molecular de los compuestos de manera simultánea en modelos *in silico* que permitan explicar las distintas conformaciones que toma el receptor en presencia de estos compuestos y con ello la interacción con distintos blancos moleculares. Con relación a este punto, el presente grupo de investigación ha realizado ensayos bioinformáticos *in silico*, donde se ha determinado que el pentolame induce una menor afinidad al GPER1 en comparación con el E<sub>2</sub> [4], datos que podrían explicar sus acciones biológicas con menores efectos proliferativos. No obstante, es importante reconocer la participación del GPER1 en procesos proliferativos en distintos tipos de tumores. Con los datos anteriormente expuestos, se podría concluir que el GPER1 muestra efectos proliferativos diferenciales en presencia de distintos agonistas, que pueden categorizarse como específicos o inespecíficos, con mayor o menor afinidad. También, con la evidencia de este trabajo y basado en artículos previos, nosotros sugerimos que la identificación de la localización celular del GPER1, así como la concentración de sus ligandos agonistas o antagonistas se necesita tomar en cuenta para determinar sus efectos biológicos.

Con relación al análisis del perfil de secreción de citocinas en las líneas celulares estudiadas, los resultados a través de la técnica de ELISA tradicional mostraron los mayores cambios en las líneas celulares MCF-7 y HCC1937, por ello se amplió el panel de citocinas estudiadas a través de la técnica de analitos solubles para su análisis por citometría de flujo. Los resultados mostraron que las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  no fueron secretadas por ninguna línea celular. No obstante, hay que resaltar que en este trabajo solo se utilizó el cultivo celular en monocapa como modelo experimental, sin embargo, para realizar afirmaciones más certeras sobre la secreción de estas citocinas en los distintos tipos de CM, se tendría que considerar la importancia del microambiente tumoral, donde diferentes estirpes celulares están inmersas.

En las células MCF-7 y HCC1937 se observó que el tratamiento con E<sub>2</sub> incrementó de manera significativa e importante la liberación de la IL-6, el TGF $\beta$ , la IL-8 y la IL-17A. La generación de un ambiente de inflamación crónica por esta hormona se ha documentado ampliamente en cáncer de mama [109]. Se destaca que, IL-6, el TGF $\beta$ , la IL-8 y la IL-17A están involucradas con procesos proinflamatorios, condiciones inmunosupresoras y metastásicas en el CM [37, 56, 73, 78, 80-82, 89, 98-102, 112]. Es importante mencionar que los rangos de secreción de IL-6 y la IL-8 se encontraron mayormente elevados en la línea HCC1937, mientras que los rangos de secreción del TGF $\beta$  e IL-17 en ambas líneas no son muy diferentes. De

manera interesante, la exposición del pentolame mostró tener niveles menores de secreción de todas estas citocinas en ambas líneas celulares en comparación con los inducidos por el E<sub>2</sub>, tendencia similar a la exhibida por la exposición del agonista específico del GPER1, el G1, de ambos tipos de líneas celulares. Con relación a este punto, en la literatura se ha mencionado que la unión de G1 con el GPER1 puede inhibir la secreción de IL-6 en líneas de CM TN, mediante la modulación de vías de señalización como STAT3, impactando en la función del factor de transcripción NF-κB [113]. Aunque mayores estudios sobre los mecanismos de acción diferenciales en donde esté implicado el GPER1 necesitan llevarse a cabo para hacer suposiciones más certeras.

De manera sobresaliente, el G15 mostró disminuir el perfil de citocinas pro-inflamatorio en comparación al inducido por el E<sub>2</sub>. La exposición del G15 presentó rangos menores de secreción de estas citocinas a los generados por el pentolame o el G1. Como soporte a nuestros resultados, existe poca evidencia científica, sin embargo, se ha reportado que la activación del GPER1 por su unión con una molécula derivada de plásticos con efectos estrogénicos, el bisfenol A, fue capaz de inducir la secreción de la IL-6 y la IL-8 en células adiposas derivadas de glándula mamaria, efectos que fueron revertidos por el G15 [114].

Con los datos anteriores podemos sugerir que el GPER1 tiene un importante papel en la modulación de la secreción de citocinas pro-inflamatorias en distintos contextos de CM, es decir, dependiente y no dependiente de hormonas. Este efecto, es independiente a las acciones proliferativas evaluadas en el presente trabajo. Ahora bien, sería conveniente evaluar en estrategias experimentales en animales, los efectos de los tratamientos en un esquema de administración prolongado y evaluar los niveles séricos de las diferentes citocinas, ya que se ha reportado que estas tienen efectos duales dependiendo del estadio y del tipo de tumor. Por mencionar un ejemplo, la IL-6 en líneas celulares de CM luminal se ha asociado con una mayor proliferación celular y metástasis mediante la inducción de vías de señalización [67, 71, 72, 76-78], mientras que en línea celulares TN provoca la expresión de proteínas antiapoptóticas y la pluripotencia en las células tumorales [67, 74, 78]. Además, esta citocina puede tener efectos sinérgicos con la IL-8, la cual es una citocina con propiedades quimioatrayentes, que en conjunto se han relacionado con un efecto inmunosupresor, derivando en la invasión y metástasis de los tumores [79-82]. Con relación a la IL-17A, se ha reportado ser secretada por diferentes tipos de líneas celulares de CM, y su función se ha relacionado con la supervivencia de células neoplásicas mediante la expresión de diversos oncogenes y la activación de diferentes vías de señalización [81, 91]. Además, tiene propiedades de feedback positivo para inducir la expresión de la IL-6 y el TGFβ.

En cuanto al TGF $\beta$ , esta citocina posee la capacidad de promover la invasión y metástasis [10, 98], funciones quimiotácticas [101], así como la generación de anergia de los linfocitos T citotóxicos [98, 99, 102]. Además, tiene la capacidad de crear sinergia con otras citocinas, como el VEGF, favoreciendo la angiogénesis [100].

Nuestros datos abren la oportunidad a nuevos campos de estudio de la implicación de GPER1 en diferentes patologías caracterizadas por alteraciones de la función de células inmunes o enfermedades inflamatorias incluyendo, condiciones autoinmunes, diabetes, entre otras. Además, quisiéramos resaltar que el papel del GPER1 también tendría que ser evaluado en distintas etapas dentro de la fisiopatología del CM, ya que se ha reportado que, en etapas tempranas, la activación de este receptor puede inducir apoptosis de las células tumorales [98, 99, 102], o dentro de la composición del microambiente tumoral, donde las citocinas tienen un papel preponderante [112]. Por lo que sería interesante evaluar su participación biológica en experimentos murinos de cáncer, posterior a la exposición de los compuestos antes mencionados.

Como perspectivas del trabajo sería interesante evaluar la expresión de los receptores de aquellas citocinas que estuvieron mayormente expresadas, así como los mecanismos de acción implicados. También, sería interesante determinar la composición celular y humoral del microambiente tumoral provenientes de animales expuestos a los compuestos evaluados en este estudio. Finalmente, con relación a los mecanismos de acción de los compuestos utilizados y las citocinas encontradas, en la Figura 16 se proponen algunos mecanismos de acción involucrados de manera integral.



## **CONCLUSIÓN**

En este trabajo se identificó la expresión del GPER1 en las distintas líneas celulares de CM estudiadas, además se evaluó que tanto la activación o la inhibición del GPER1, por su interacción con el E<sub>2</sub> o con ligandos sintéticos, tienen efectos biológicos en la regulación de citocinas con funciones pro-inflamatorias, las cuales están directamente relacionadas con la invasividad y metástasis tumoral. Asimismo, se concluye que la actividad de este receptor es dinámica y depende de varios factores como su localización, afinidad y concentración de los ligandos, estadio del tumor e incluso la co-administración de fármacos.

De manera interesante, este trabajo amplió el perfil farmacológico del pentolame, en donde se observa que este compuesto no induce proliferación celular por sí solo, ni su combinación con agonistas específicos del GPER1. Además, de no participar en la promoción de un ambiente pro-inflamatorio significativo en comparación con el E<sub>2</sub>, basado en los niveles de secreción de citocinas proinflamatorias; fortaleciendo el supuesto de que puede representar una alternativa segura e interesante en la terapia de reemplazo hormonal.

También este trabajo expone la necesidad de estudio del GPER1 en distintas condiciones patológicas en las cuales existan ambientes inflamatorios.

## **PERSPECTIVAS**

1. Evaluar la expresión de los receptores de aquellas citocinas que estuvieron mayormente expresadas y evaluar la composición celular y humoral del microambiente tumoral provenientes de animales expuestos a los compuestos evaluados en este estudio.
2. Estudiar los mecanismos de acción implicados en la secreción de citocinas por el pentolame en los diferentes tipos de CM
3. Estudiar al GPER1 en distintas condiciones patológicas en donde existan ambientes inflamatorios.
4. Evaluar el efecto del pentolame utilizando líneas celulares de tejido mamario no neoplásicas.

## ANEXO 1

Parte de los resultados de este trabajo se seleccionaron para participar en la modalidad de cartel en el 1er. Congreso de Farmacología México. Realizado el 17 y 18 de abril del 2023 en la Facultad de Medicina de la UNAM.

Farmacología México, Academia e Investigación, A.C en conjunto con el XXVIII Congreso Estudiantil de Farmacología y el XI Congreso de Estudiantes sin Fronteras, otorgan el presente:

**Reconocimiento a**

**Brenda Reyes Plata, Cristina Lemini,  
Luis Miranda, David Barrera y Mariana Segovia Mendoza**

Por la presentación de su video/cartel titulado

**Efecto del 17 beta aminoestrógeno pentolame en el perfil de citocinas pro y antiinflamatorias en células de cáncer de mama.**

**en el 1er. Congreso de Farmacología México,**  
realizado en la Facultad de Medicina del 17 al 18 de Abril del 2023.

Dr. Guadalupe Anguiles López  
Comité Directivo

Dr. Rubén Paz Velasco  
Comité Directivo

Dr. Mariana Segovia Mendoza  
Comité Directivo

Dr. Noemí Salinas Barrón  
Comité Directivo

Dr. David Leonardo Zambrano  
Comité Directivo

Dr. Andrés Carrasco  
Comité Directivo

Dr. Jorge Diego Carriá  
Comité Directivo

Cd. Universitaria, CDMX, a 18 de abril de 2023.

## REFERENCIAS

1. Dong H. *The Basic Concepts in Cancer Immunology and Immunotherapy*. En: Dong H and Markovic SN, editors. *The Basics of Cancer Immunotherapy*. : Springer Cham;2018. p. 1-19.
2. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory (*Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, World, females, all ages*) [Internet]. Lyon: IARC; 2021. [Citado 25 abr 2023]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multibars?v=2020,2023>
3. Zubair M, Wang S, Ali N. *Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis*. Front Pharmacol. 2020;11: 632079.
4. Segovia-Mendoza M, Mirzaei E, Prado-Garcia H, Miranda LD, Figueroa A, Lemini C. et al. *The Interplay of GPER1 with 17beta-Aminoestrogens in the Regulation of the Proliferation of Cervical and Breast Cancer Cells: A Pharmacological Approach*. Int J Environ Res Public Health, 2022; 19(19):12361
5. Yang H, Wang C, Liao H, Wang Q. *Activation of GPER by E2 promotes proliferation, invasion and migration of breast cancer cells by regulating the miR-124/CD151 pathway*. Oncol Lett, 2021; 21(6): p. 432.
6. Vinogradova Y, Coupland C, Hippisley-Cox J. *Use of hormone replacement therapy and risk of breast cancer: nested case-control studies using the QResearch and CPRD databases*. BMJ. 2020; 371: m3873.
7. Lobo RA. *Hormone-replacement therapy: current thinking*. Nat Rev Endocrinol. 2017.;13(4): 220-231.
8. Lemini C, Canchola E. *Effects of 17beta-aminoestrogens on the sexual behavior of female rats*. Physiol Behav. 2009; 96(4-5): 662-6.
9. Lemini C, et al. *Differential effect of the 17beta-aminoestrogens prolame, butolame and pentolame in anxiety and depression models in rats*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2016; 64: 102-8.
10. Qiu Y, Su M, Liu L, Tang Y, Pan Y, Sun J. *Clinical Application of Cytokines in Cancer Immunotherapy*. Drug Des Devel Ther. 2021; 15: 2269-2287.
11. Jafari SH, Saadatpour Z, Salmaninejad A et al. *Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers*. J Cell Physiol. 2018; 233(7): 5200-5213.
12. Fernandez-Tortolero A, Reigosa-Yaniz A. *Subtypes of luminal breast carcinoma according to the Saint Gallen Consensus in a group of Venezuelan patients*. Biomedica. 2021; 41(3): 531-540.
13. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, et al. *Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection*. PLoS One. 2016.;11(6): e0157368.
14. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, et al. *Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer*. Clin Cancer Res. 2015; 21(7): 1688-98.
15. Liu YR, Jiang YZ, Xu XE, et al. *Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer*. Breast Cancer Res. 2016; 18(1): 33.
16. Maqbool M, Bekele F, Fekadu G. *Treatment Strategies Against Triple-Negative Breast Cancer: An Updated Review*. Breast Cancer (Dove Med Press). 2022; 14: 15-24.

17. Fuentes N, Silveyra P. *Estrogen receptor signaling mechanisms*. Adv Protein Chem Struct Biol. 2019; 116: 135-170.
18. *Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer*. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Lancet. 1997; 350(9084): 1047-59.
19. Lemini C, Avila M, Medina M, et al. *Proliferative Properties of 17beta-aminoestrogens in MCF-7 Human Breast Cancer Cells*. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2017;120(3): 235-242.
20. Lemini C. *Sub-acute effects of the 17beta-aminoestrogen pentolame and estradiol on hemostasis in the rat*. Proc West Pharmacol Soc. 2009; 52: 57-60.
21. Hsu LH, Chu NM, Lin YF, Kao SH. *G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer*. Int J Mol Sci. 2019; 20(2):306
22. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO. *Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30*. Annu Rev Physiol. 2008;70: 165-90.
23. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. *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*. Mol Endocrinol. 2000; 14(10): 1649-60.
24. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. *Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells*. Endocrinology. 2005; 146(2): 624-32.
25. Maggiolini M, Picard D. *The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor*. J Endocrinol. 2010; 204(2): 105-14.
26. Deng Q, Jiang G, Wu Y, et al. *GPER/Hippo-YAP signal is involved in Bisphenol S induced migration of triple negative breast cancer (TNBC) cells*. J Hazard Mater. 2018; 355: 1-9.
27. Zhou X, Wang S, Wang Z, et al. *Estrogen regulates Hippo signaling via GPER in breast cancer*. J Clin Invest. 2015;125(5):2123-2135
28. Prossnitz ER, Maggiolini M. *Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30*. Mol Cell Endocrinol, 2009; 308(1-2): 32-8.
29. Kanda N, Watanabe S. *17beta-estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression*. J Invest Dermatol. 2003; 121(6): 1500-9.
30. Huang R, Li J, Pan F, Zhang B, Yao Y. *The activation of GPER inhibits cells proliferation, invasion and EMT of triple-negative breast cancer via CD151/miR-199a-3p bio-axis*. Am J Transl Res. 2020; 12(1): 32-44.
31. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling*. Science. 2005; 307(5715): 1625-30.
32. Hojnik M, Sinreih M, Anko M, et al. *Co-Expression of Estrogen Receptors ERalpha, ERbeta, and GPER in Endometrial Cancer*. Int J Mol Sci, 2023. 24(3):3009
33. Bonkhoff H. *Estrogen receptor signaling in prostate cancer: Implications for carcinogenesis and tumor progression*. Prostate, 2018. 78(1): 2-10.
34. Kolkova Z, Casslén V, Henic E, et al. *The G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER/GPR30) does not predict survival in patients with ovarian cancer*. J Ovarian Res, 2012. 5: 9.
35. Liu C, Liao Y, Fan S, et al., *G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Antagonist G15 Decreases Estrogen-Induced Development of Non-Small Cell Lung Cancer*. Oncol Res. 2019; 27(3): 283-292.
36. Yu T, Liu M, Luo H, et al. *GPER mediates enhanced cell viability and motility via non-genomic signaling induced by 17beta-estradiol in triple-negative breast cancer cells*. J Steroid Biochem Mol Biol. 2014;143: 392-403.

37. Pandey DP, Lappano R, Albanito L, et al. *Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF*. EMBO J. 2009; 28(5):523-32.
38. Tao, S., H. He, and Q. Chen, *Estradiol induces HOTAIR levels via GPER-mediated miR-148a inhibition in breast cancer*. J Transl Med. 2015; 13: 131.
39. Li Y. *4-Hydroxytamoxifen-stimulated processing of cyclin E is mediated via G protein-coupled receptor 30 (GPR30) and accompanied by enhanced migration in MCF-7 breast cancer cells*. Toxicology. 2013; 309: 61-5.
40. Niu D, Wang G, Wang X. *Up-regulation of cyclin E in breast cancer via estrogen receptor pathway*. Int J Clin Exp Med. 201; 8(1): 910-5.
41. Mawson A, Lai A, Carroll JS, et al. *Estrogen and insulin/IGF-1 cooperatively stimulate cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of c-Myc and cyclin D1*. Mol Cell Endocrinol. 2005; 229(1-2): 161-73.
42. Pupo p Pisano A, Abonante S, Maggiolini M, Musti AM. *GPER activates Notch signaling in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs)*. Int J Biochem Cell Biol. 2014; 46:56-67.
43. Yin J. *GPER-regulated lncRNA-Glu promotes glutamate secretion to enhance cellular invasion and metastasis in triple-negative breast cancer*. FASEB J.2020;34(3): 4557-4572.
44. Ren J, Guo H, Wu H, et al. *GPER in CAFs regulates hypoxia-driven breast cancer invasion in a CTGF-dependent manner*. Oncol Rep. 2015; 33(4): 1929-37.
45. Mo Z, Liu M, Yang F, et al. *GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer*. Breast Cancer Res. 2013; 15(6): R114.
46. De Francesco EM, Lappano R, Santolla MF, et al. *HIF-1alpha/GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs)*. Breast Cancer Res. 2013; 15(4): R64.
47. Vo DKH ,Hartig R, Weinert S, Nass H, et al. *G-Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER)-Specific Agonist G1 Induces ER Stress Leading to Cell Death in MCF-7 Cells*. Biomolecules.2019; 9(9):503
48. Wei W, Chen ZJ, Zhang KS, et al. *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, 2014. 5(10): e1428.
49. Weissenborn C, Ignatov T, Ochel HJ, et al. *GPER functions as a tumor suppressor in triple-negative breast cancer cells*. J Cancer Res Clin Oncol. 2014; 140(5): 713-23.
50. Weissenborn C, Ignatov T, Poehlmann A, et al. *GPER functions as a tumor suppressor in MCF-7 and SK-BR-3 breast cancer cells*. J Cancer Res Clin Oncol. 2014; 140(4): 663-71.
51. Molina L, Bustamante F, Ortloff A, Ramos I, Ehrenfeld P, Figueroa CD. *Continuous Exposure of Breast Cancer Cells to Tamoxifen Upregulates GPER-1 and Increases Cell Proliferation*. Front Endocrinol (Lausanne), 2020. 11: p. 563165.
52. Segovia-Mendoza M, Gómez de León CT, García-Becerra R, Ambrosio J, Nava-Castro KE, Morales-Montor J. *The chemical environmental pollutants BPA and BPS induce alterations of the proteomic profile of different phenotypes of human breast cancer cells: A proposed interactome*. Environmental Research. 2020; 191: g109960.
53. Dennis MK, Burai R, Ramesh C, et al. *In vivo effects of a GPR30 antagonist*. Nat Chem Biol. 2009; 5(6): 421-7.
54. Bai LY, Weng JR, Hu JL, Wang D, Sargeant AM, Chiu CF. *G15, a GPR30 antagonist, induces apoptosis and autophagy in human oral squamous carcinoma cells*. Chem Biol Interact. 2013; 206(2): 375-84.

55. Liu, Y., et al., *G15 sensitizes epithelial breast cancer cells to doxorubicin by preventing epithelial-mesenchymal transition through inhibition of GPR30*. Am J Transl Res, 2015. 7(5): p. 967-75.
56. Segovia-Mendoza M, Morales-Montor J. *Immune Tumor Microenvironment in Breast Cancer and the Participation of Estrogen and Its Receptors in Cancer Physiopathology*. Front Immunol, 2019. 10: p. 348.
57. Kartikasari AER, Huertas CS, Mitchell A, Plebanski M. *Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis*. Front Oncol, 2021. 11: p. 692142.
58. Berraondo P, Sanmamed MF, Ochoa M, et al., *Cytokines in clinical cancer immunotherapy*. Br J Cancer. 2019; 120(1): 6-15.
59. Mendez-Garcia LA, , Nava-Castro KE, Ochoa-Mercado TL, et al. *Breast Cancer Metastasis: Are Cytokines Important Players During Its Development and Progression?* J Interferon Cytokine Res. 2019; 39(1): 39-55.
60. Soria G, Ofri-Shahak M, Haas I, et al. *Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNFalpha & IL-1beta with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition*. BMC Cancer. 2011; 11: 130.
61. Autenshlyus AI, Arkhipov SA, Kunts TA, et al. *Cytokine profiles of tumor supernatants in invasive ductal cancer and fibroadenoma of the breast and its relationship with VEGF-A expression in the tumors*. Int J Immunopathol Pharmacol. 2017; 30(1): 83-88.
62. Pantschenko AG, Pushkar I, Anderson KH, et al. *The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression*. Int J Oncol. 2003; 23(2): 269-84.
63. Tulotta C, Lefley DV, Freeman K, et al. *Endogenous Production of IL1B by Breast Cancer Cells Drives Metastasis and Colonization of the Bone Microenvironment*. Clin Cancer Res. 2019; 25(9): 2769-2782.
64. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. *Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies?* Int J Mol Sci. 2018; 19(8):2155
65. Gelfo V, Romaniello D, Mazzeschi M, et al. *Roles of IL-1 in Cancer: From Tumor Progression to Resistance to Targeted Therapies*. Int J Mol Sci. 2020; 21(17):6009
66. Diep S, Maddukuri M, Yamauchi S, Geshow G, Delk NA. et al. *Interleukin-1 and Nuclear Factor Kappa B Signaling Promote Breast Cancer Progression and Treatment Resistance*. Cells. 2022; 11(10):1673
67. Lu L, Wang P, Zou Y, et al. *IL-1beta Promotes Stemness of Tumor Cells by Activating Smad/ID1 Signaling Pathway*. Int J Med Sci. 2020; 17(9): 1257-1268.
68. Conze D, Weiss L, Regen PS, et al. *Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells*. Cancer Res. 2001; 61(24): 8851-8.
69. Danforth DN, Sgagias MK. *Interleukin-1 alpha and interleukin-6 act additively to inhibit growth of MCF-7 breast cancer cells in vitro*. Cancer Res. 1993; 53(7): 1538-45.
70. Chiu JJ, Sgagias MK, Cowan KH. *Interleukin 6 acts as a paracrine growth factor in human mammary carcinoma cell lines*. Clin Cancer Res. 1996; 2(1): 215-21.
71. Badache A, Hynes NE. *Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop, increases migration of T47D breast cancer cells*. Cancer Res. 2001; 61(1): 383-91.
72. Sasser AK, Sullivan NJ, Studebaker AW, Hendey LF, Axel AE, Hall BM. *Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-alpha-positive human breast cancer*. FASEB J. 2007; 21(13): 3763-70.
73. Ahmad N, Ammar A, Storr SJ. *IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients*. Cancer Immunol Immunother. 2018; 67(4): 537-549.

74. Sanguinetti A, Santini D, Bonafè M, Taffurelli M, Avenia N. *Interleukin-6 and pro inflammatory status in the breast tumor microenvironment*. World J Surg Oncol. 2015; 13: 129.
75. Autenshlyus A, Davletova K, Varaksin N, Marinkin I, Lyakhovich V. *Cytokines in various molecular subtypes of breast cancer*. Int J Immunopathol Pharmacol. 2021; 35: 20587384211034089.
76. Jiang XP, Yang DC, Elliott RL, Head JF. *Down-regulation of expression of interleukin-6 and its receptor results in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells*. Anticancer Res. 2011; 31(9): 2899-906.
77. Siersbaek R, Scabia V, Nagarajan S, et al. *IL6/STAT3 Signaling Hijacks Estrogen Receptor alpha Enhancers to Drive Breast Cancer Metastasis*. Cancer Cell. 2020; 38(3): 412-423 e9.
78. Manore SG, Doheny DL, Wong GL, Lo HW. *IL-6/JAK/STAT3 Signaling in Breast Cancer Metastasis: Biology and Treatment*. Front Oncol. 2022; 12: 866014.
79. Liu Q, Li A, Tian Y, et al. *The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer*. Cytokine Growth Factor Rev. 2016; 31: 61-71.
80. Hartman ZC, Poage GM, den Hollander P, et al. *Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8*. Cancer Res. 2013; 73(11): 3470-80.
81. Deng f, Weng Y, Li X, Wang T, Fan M, Shi Q. *Overexpression of IL-8 promotes cell migration via PI3K-Akt signaling pathway and EMT in triple-negative breast cancer*. Pathol Res Pract. 2021; 223: 152824.
82. Ma Y, Ren Y, Dai ZJ, Wu CJ, Ji YH, Xu J. *IL-6, IL-8 and TNF-alpha levels correlate with disease stage in breast cancer patients*. Adv Clin Exp Med. 2017; 26(3): 421-426.
83. Du JW, Xu KY, Fang LY, Qi XL. *Interleukin-17, produced by lymphocytes, promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of breast cancer*. Mol Med Rep. 2012; 6(5): 1099-102.
84. Chang CM, Lam HYP, Hsu HJ, Jiang SJ. *Interleukin-10: A double-edged sword in breast cancer*. Tzu Chi Med J. 2021; 33(3): 203-211.
85. Heckel MC, Wolfson A, Slachta CA, et al. *Human breast tumor cells express IL-10 and IL-12p40 transcripts and proteins, but do not produce IL-12p70*. Cell Immunol. 2011; 266(2): 143-53.
86. Sheikhpour E, Noorbakhsh P, Foroughi E, Farahnak S, Nasiri R, Neamatzadeh H. *A Survey on the Role of Interleukin-10 in Breast Cancer: A Narrative*. Rep Biochem Mol Biol. 2018; 7(1): 30-37.
87. Ma T, Kong M. *Interleukin-18 and -10 may be associated with lymph node metastasis in breast cancer*. Oncol Lett. 2021; 21(4): 253.
88. Karpishev V, Ahmadi M, Abbaszadeh-Goudarzi K, et al., *The role of Th17 cells in the pathogenesis and treatment of breast cancer*. Cancer Cell Int. 2022; 22(1): 108.
89. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, et al. *IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis*. Nature. 2015; 522(7556): 345-348.
90. Zhao J, Chen X, Herjan T, Li X. *The role of interleukin-17 in tumor development and progression*. J Exp Med. 2020; 217(1): e20190297
91. Kim , Khanal P, Lim SC, et al., *Interleukin-17 induces AP-1 activity and cellular transformation via upregulation of tumor progression locus 2 activity*. Carcinogenesis. 2013; 34(2): 341-50.
92. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. *Roles of IFN-gamma in tumor progression and regression: a review*. Biomark Res. 2020; 8: 49.

93. Gocher AM, Workman CJ, Vignali DA. *Interferon-gamma: teammate or opponent in the tumour microenvironment?* Nat Rev Immunol. 2022; 22(3): 158-172.
94. Mercogliano MF, Bruni S, Elizalde PV, Schillaci R. *Tumor Necrosis Factor alpha Blockade: An Opportunity to Tackle Breast Cancer.* Front Oncol. 2020; 10: 584.
95. Cai X, Cao C, Li J, et al. *Inflammatory factor TNF-alpha promotes the growth of breast cancer via the positive feedback loop of TNFR1/NF-kappaB (and/or p38)/p-STAT3/HBXIP/TNFR1.* Oncotarget. 2017; 8(35): 58338-58352.
96. Martinez-Reza I, Díaz L, García-Becerra R. *Preclinical and clinical aspects of TNF-alpha and its receptors TNFR1 and TNFR2 in breast cancer.* J Biomed Sci. 2017; 24(1): 90.
97. Zhang Z, Lin G, Yan Y, et al. *Transmembrane TNF-alpha promotes chemoresistance in breast cancer cells.* Oncogene. 2018; 37(25): 3456-3470.
98. Peng D, Fu M, Wang M, Wei Y, Wei X. *Targeting TGF-beta signal transduction for fibrosis and cancer therapy.* Mol Cancer. 2022; 21(1): 104.
99. Zarzynska JM. *Two faces of TGF-beta1 in breast cancer.* Mediators Inflamm. 2014; 2014: 141747.
100. SenGupta S, Hein LE, Xu Y, et al. *Triple-Negative Breast Cancer Cells Recruit Neutrophils by Secreting TGF-beta and CXCR2 Ligands.* Front Immunol. 2021; 12: 659996.
101. Drabsch Y, Dijke P. *TGF-beta signaling in breast cancer cell invasion and bone metastasis.* J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2011; 16(2): 97-108.
102. Ungefroren H. *Autocrine TGF-beta in Cancer: Review of the Literature and Caveats in Experimental Analysis.* Int J Mol Sci. 2021; 22(2): 977
103. Lemini C, Rubio-Póo C, Silva G, et al. *Anticoagulant and estrogenic effects of two new 17 beta-aminoestrogens, butolame [17 beta-(4-hydroxy-1-butylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol] and pentolame [17 beta-(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol].* Steroids. 1993; 58(10): 457-61.
104. Orellana EA, Kasinski AL. *Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation.* Bio Protoc. 2016; 6(21).
105. Wu CH, Chuang HY, Wang CL, et al. *Estradiol induces cell proliferation in MCF-7 mammospheres through HER2/COX-2.* Mol Med Rep. 2019; 19(3): 2341-2349.
106. Prossnitz ER, Barton M. *The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease.* Nature Reviews Endocrinology. 2011; 7(12): 715-726.
107. Chen ZJ. *Activation of GPER suppresses epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells via NF-kappaB signals.* Mol Oncol. 2016; 10(6): 775-88.
108. Lappano R, Pisano A, Maggiolini M. *GPER Function in Breast Cancer: An Overview.* Front Endocrinol (Lausanne). 2014; 5: 66.
109. Maharjan CK, Mo J, Wang L, et al., *Natural and Synthetic Estrogens in Chronic Inflammation and Breast Cancer.* Cancers (Basel). 2021; 14(1): 206
110. Sathya S, Sudhagar S, Lakshmi BS. *Estrogen suppresses breast cancer proliferation through GPER / p38 MAPK axis during hypoxia.* Mol Cell Endocrinol. 2015; 417: 200-10.
111. Xu T, Ma D, Chen S, et al. *High GPER expression in triple-negative breast cancer is linked to pro-metastatic pathways and predicts poor patient outcomes.* NPJ Breast Cancer. 2022; 8(1): 100.
112. Habanjar O, Bingula R, Decombat C, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. *Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast Tumor Microenvironment.* Int J Mol Sci, 2023. 24(4): 4002
113. Liang S, Chen Z, Jiang G, et al. *Activation of GPER suppresses migration and angiogenesis of triple negative breast cancer via inhibition of NF-kappaB/IL-6 signals.* Cancer Lett. 2017; 386: 12-23.

114. Cimmino I, Oriente F, D'Esposito V, et al. *Low-dose Bisphenol-A regulates inflammatory cytokines through GPR30 in mammary adipose cells. J Journal of Molecular Endocrinology.* 2019; 63(4): 273-283.