



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**“IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS  
MEMBRANAL GPER1 EN PROCESOS DE MIGRACIÓN Y  
PROLIFERACIÓN CELULAR EN CÁNCER DE MAMA”**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:  
GUILLERMO ROBERTO BARCELÓ MÁRQUEZ**

**ASESORA DE TESIS: MARIANA SEGOVIA MENDOZA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., México  
2023**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: MARTÍNEZ BARAJAS J. ELEAZAR  
**VOCAL:** Profesor: DAVILA MANZANILLA SILVIA GRACIELA  
**SECRETARIO:** Profesor: SEGOVIA MENDOZA MARIANA  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: VÁZQUEZ MARTÍNEZ ÉDGAR RICARDO  
**2° SUPLENTE:** Profesor: MUÑOZ GÓMEZ ROSA JENIFER

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**ASESOR DEL TEMA:** DRA. MARIANA SEGOVIA MENDOZA  
(nombre y firma)

**SUSTENTANTE (S):** GUILLERMO ROBERTO BARCELÓ MÁRQUEZ  
(nombre (s) y firma (s) )

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Química por brindarme la oportunidad de crecer tanto en lo profesional como en lo personal y mostrarme todos los caminos en los cuales puedo desempeñarme y lo mucho que puedo lograr.

A la Dirección General de Cooperación e Internacionalización (DGEI) por la beca otorgada; Programa para Actividades Especiales de Cooperación Interinstitucional (PAECI) con fines de internacionalización para la profundización del conocimiento e investigación dirigida a este trabajo que me permitió compartir mi conocimiento en otro país, así como adquirir habilidades y conocimiento que nunca creí que tendría dentro de mis límites, un sueño hecho realidad.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el número de proyecto IN200222 que me permitió trabajar a lado de mi asesora la Dra. Mariana Segovia Mendoza en la Facultad de Medicina en sus múltiples tareas de investigación.

A mi Asesora de Tesis, mi última profesora y mentora de la carrera; la Dra. Mariana Segovia Mendoza, por haberme abierto un espacio en su laboratorio, haberme mostrado el mundo del cultivo celular, y haberme enseñado todo tipo de técnicas dentro de los ámbitos teórico-práctico del laboratorio. Inexplicable el decir que tan agradecido que estoy.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

### **A mi madre.**

Mireya, mi incondicional. Gracias por siempre estar para mí, por escucharme y aconsejarme, por mostrarme la vida con otros ojos, por levantarte temprano para ayudarme a prepararme para la escuela, hacer de todo por apoyarme a cumplir mis sueños y demás todos estos años, por desvelarte conmigo, por esas palabras que siempre me impulsan a no rendirme y lo más importante, gracias por todo el amor que siempre me das, el cual siempre me ha llenado de motivación. Te amo.

### **A Mike, Chava, Ricky, Popy, Viri y demás amigos que se fueron uniendo a mi vida.**

Gracias por todo el apoyo y sus consejos, parte de mi personalidad y valores se los debo a ustedes. Gracias por enseñarme a no rendirme y a ser aguerrido para bien, a disfrutar mi vida dentro y fuera de la escuela con todo el ánimo y buena actitud, me han dado la alegría y motivación para lograr todo lo que he logrado. Gracias por creer en mí, por ayudarme a lograr mis sueños y acompañarme en muchos de ellos y por todo el amor y empeño que han puesto en mi formación académica como personal. Los amo con todo mi corazón.

### **A mi compañera Laura.**

Han sido tantos ratos juntos, me llena de amor que siempre me acompañaste en mis ratos libres, ocupados, y de estrés. Eres y serás la mejor compañía para aprender, crecer, reír, amar, y compartir la vida. Me motivas y cambias mi estado de ánimo como nadie, eres mi mejor amiga y sé que nos admiramos como nadie. Te amo mucho.

### **A mi asesora de tesis y amiga la Dra. Mariana.**

Por los días de reuniones y días en el laboratorio llenos de enseñanzas y aprendizajes, por siempre escucharme y por creer en mí, por apoyarme hasta cuando no lo esperaba, así como por tener paciencia tanto para compartirme su sabiduría como para permitirme explotar la mía, gracias por tantos consejos y todo lo que me ha apoyado, sin usted no habría sido posible nada de lo que he logrado cumplir hasta ahora. Es usted para mí una mentora, un ejemplo a seguir y una increíble amiga que me dio la vida.

**¡Orgullosamente UNAM!  
“Por mi raza hablará el espíritu”**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>II. Objetivo general.....</b>	<b>10</b>
<b>III. Objetivos particulares.....</b>	<b>11</b>
<b>IV. Marco teórico.....</b>	<b>12</b>
<b>1. Generalidades del cáncer de mamá.....</b>	<b>12</b>
1.1 Origen.....	12
1.2 Diagnóstico.....	12
1.3 Morbilidad.....	14
1.4 Mortalidad.....	14
1.5 Factores de riesgo.....	14
1.6 Clasificación del CM.....	17
1.6.1 Cáncer de mama tipo luminal.....	18
1.6.2 Cáncer de mama con sobreexpresión del HER2.....	18
<b>2. Cáncer de mama TN.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Familia de receptores de crecimiento.....</b>	<b>20</b>
<b>4. Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK).....</b>	<b>21</b>
<b>5. Receptor GPER1.....</b>	<b>22</b>
5.1 Estructura.....	22
5.2 Localización.....	23
5.3 Vías de señalización activadas por el GPER1.....	24
5.4 Relación del GPER1 con los receptores de estrógeno nucleares.....	26
5.5 Participación biológica del GPER1 en los distintos tipos moleculares de cáncer de mama.....	27
<b>5.6 Efectos de agonistas y antagonistas específicos del GPER1 cáncer de mama.....</b>	<b>30</b>
<b>6 GPER1 involucrado en la respuesta a tratamientos antihormonales en CM.....</b>	<b>33</b>
7.1 Metástasis.....	34
<b>V. Discusión.....</b>	<b>35</b>
<b>VI. Perspectivas.....</b>	<b>39</b>

<b>VII. Conclusiones .....</b>	<b>40</b>
<b>VIII. Bibliografía citada .....</b>	<b>41</b>

## RESUMEN

---

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia más común en mujeres con un diagnóstico de 2.3 millones de casos nuevos en todo el mundo y representa la primera causa de incidencia y mortalidad en pacientes con cáncer. Los tumores mamarios se clasifican en tres tipos: luminal (receptor de estrógenos (RE) y receptor de progesterona (RP) positivo), el tipo enriquecido en el receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo II (HER2 positivo), y el triple negativo (TN). Por otro lado, se sabe que las hormonas esteroides como el estradiol (E2) ejercen sus acciones biológicas uniéndose a receptores específicos como los receptores de estrógeno nucleares ( $RE\alpha$  y  $RE\beta$ ), los cuales regulan procesos transcripcionales de genes blanco. Recientemente, se ha descrito que el E2 puede actuar a través del receptor de estrógenos membranal GPER1, el cual se expresa en los distintos tipos de CM. La activación del GPER1 se ha asociado con la promoción de la actividad proliferativa de células neoplásicas; y se ha descrito que al igual que en el caso de los receptores nucleares, diversos compuestos naturales y sintéticos pueden unirse y activar a este receptor. Sin embargo, hasta el momento, no existen estudios donde se haya profundizado en las acciones biológicas del GPER1 en distintos tipos de CM. El presente trabajo tiene como objetivo analizar las distintas acciones del GPER1, asociadas con la progresión tumoral como procesos de invasión, proliferación, y migración celular en los tres tipos de CM que se presentan en la clínica. Además, este trabajo busca plantear nuevas alternativas de tratamiento adyuvantes basadas en mecanismos biológicos que participan en la fisiopatogenia del CM relacionados con la estimulación del GPER1, con el objetivo de plantear perspectivas terapéuticas sobre el efecto del GPER1 en los distintos tipos de CM.



## I. INTRODUCCIÓN

---

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia más común en mujeres, se estima que anualmente se diagnostican 2,3 millones nuevos casos en todo el mundo [1]. El CM es una afección patológica que se produce en el tejido mamario. En la mayoría de los casos y de acuerdo con la región anatómica afectada, el CM puede originarse en el conducto lactífero o en los lóbulos.

Los tumores mamarios se clasifican en tres tipos, luminal (receptor de estrógenos (ER) y progesterona (PR) positivos), el tipo enriquecido en el receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo II (HER2 positivo) y el triple negativo (TN) [2].

El cáncer de mama triple negativo (TN) se considera el tipo más agresivo, ya que es el subtipo menos diferenciado; producto de la alteración o pérdida de la expresión del ER, PR y HER2; característica de la cual deriva su nombre [3].

En contraste, el tipo luminal es el de mejor pronóstico clínico y con más opciones terapéuticas [2]. A este respecto, estudios *in vitro* han demostrado la participación importante de la actividad de los receptores de estrógenos con el desarrollo y progresión del CM. Lo anterior se ha relacionado con el incremento de los niveles plasmáticos de la hormona  $17\beta$ -estradiol (E2) y la activación de genes implicados en el control de la proliferación e invasión celular [4].

El E2 y distintas moléculas sintéticas ejercen sus acciones biológicas uniéndose a receptores específicos como los receptores nucleares de estrógeno ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ), los cuales regulan procesos transcripcionales de genes blanco [5], sin embargo, el E2 puede también actuar por otro tipo de receptores, como lo es el receptor membranal GPER1, el cual se expresa en los distintos tipos de CM. El GPER1 activa diversos mecanismos no genómicos como la estimulación de la adenilato ciclasa, movilización de las reservas de calcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) y activación de vías de señalización de proteínas cinasas como la MAPK y PI3K, estas últimas debidas a la transactivación de diversos receptores de la familia de factores de crecimiento, lo que favorece la progresión y metástasis tumoral [6, 7].

En los últimos años se ha documentado la relevancia del papel de GPER1 en la metástasis tumoral, la proliferación y la migración celular [8] a través de la inducción del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF-A) o de la interleucina IL-6,

ambos considerados marcadores pro-angiogénicos [8]. A nivel clínico, una elevada expresión del GPER1 en células tumorales se ha asociado con resistencia a la terapia anti-hormonal en pacientes con CM [6]. La evidencia anterior sugiere que el estudio de GPER1 y sus interacciones moleculares deben de considerarse como blancos terapéuticos para el descubrimiento de fármacos en distintos tipos de cáncer.

## **II. Objetivo general**

---

Evaluar la participación del receptor GPER1 sobre los efectos de proliferación, metástasis y resistencia al tratamiento en distintos tipos de cáncer de mama.

### **III. Objetivos particulares**

- Investigar de manera bibliográfica los efectos proliferativos y de migración celular del GPER1 en células de cáncer de mama con distintos tipos moleculares
- Correlacionar la participación del GPER1 en mecanismos de resistencia a terapia en cáncer de mama

## IV. Marco teórico

### 1. Generalidades del cáncer de mamá

#### 1.1 Origen

El CM es una neoplasia que se origina en las células epiteliales de la glándula mamaria, esta neoplasia es causada por el crecimiento descontrolado de las células epiteliales pero con la capacidad de invadir tejidos circundantes y también órganos distantes (metástasis) [2].

#### 1.2 Diagnóstico

Las pruebas y procedimientos utilizados para diagnosticar el CM incluyen: mamografía (MG), ecografía, resonancia magnética (RM), sistema de hibridación de ácidos nucleicos (NAHS), sistema de PCR cuantitativa de fluorescencia en tiempo real (RT-qPCR), sistema de hibridación de proteínas (PHS), citometría de flujo (FCM), entre otras [9].

A continuación, se describe brevemente el uso de los principales métodos para el diagnóstico de esta enfermedad.

**Autoexploración:** No se ha demostrado eficaz para disminuir la mortalidad de la enfermedad pero es útil para identificar la enfermedad en primera instancia no detectada [9].

**Mamografía:** Es el método diagnóstico por imagen principal en la patología mamaria. Se utiliza en pacientes asintomáticos como método de screening [9].

**Ecografía:** Esta técnica es muy útil en mujeres jóvenes, debido a que evalúa la densidad del tejido mamario, no es invasiva y puede discernir entre la diferenciación de lesiones quísticas de sólidas [9].

**Resonancia Magnética:** Es una técnica indicada en la detección de la multifocalidad tumoral y en el control de las cicatrices en caso de tratamientos conservadores en pacientes con prótesis mamarias [9].

**Sistema de hibridación de ácidos nucleicos:** Las técnicas de hibridación con ácido nucleico incluyen principalmente la hibridación de fluorescencia in situ (FISH) y la hibridación por sonda aptamer (APH). Ambas técnicas están enfocadas a detectar biomarcadores tumorales [9].

**Sistema de PCR cuantitativa de fluorescencia en tiempo real:** El sistema de RT-qPCR se enfoca en detectar la amplificación de los ácidos nucleicos para predecir la condición de expresión cierto gen. Varios biomarcadores se han identificado en CM, pero su contenido es demasiado bajo para ser detectado por instrumentos ordinarios. Por lo tanto, el sistema RT-qPCR es una buena opción y puede predecir el riesgo de CM analizando el nivel de expresión de ARNm [9].

**Sistema de hibridación de proteínas:** Las células o tejidos tumorales contienen no solo los ácidos nucleicos, sino también muchas proteínas. El dogma central de la biología molecular muestra que las proteínas están estrechamente asociadas con los ácidos nucleicos. Sin embargo, si la proteína final no tiene ningún cambio, la expresión diferencial de los ácidos nucleicos puede no causar cáncer. Por lo tanto, la sobreexpresión de proteínas son otro tipo biomarcadores importantes para diagnosticar diferentes tipos de cáncer, y el análisis del estatus de expresión de proteínas puede predecir la aparición de un tipo de cáncer en particular [9].

**Citometría de flujo:** Mediante este método se pueden evaluar múltiples características de una sola célula o células en suspensión. La citometría se ha convertido en una tecnología indispensable en el diagnóstico de CM mediante la clasificación de partículas biológicas específicas para las células tumorales [9].

La tasa de supervivencia para pacientes con CM a cinco años es de hasta el 99 % si los tumores se diagnostican a tiempo, y muchos pacientes están libres de la enfermedad durante toda su vida. Sin embargo, el CM sigue causando más de 0,5 millones de muertes cada año. Más del 90 % de los pacientes con esta enfermedad mueren debido al proceso de metástasis tumoral, que se define como la diseminación de células tumorales de manera sistémica hasta llegar a la colonización en órganos distantes [10]. En el proceso metastásico se compromete

la función de órganos vitales, deteriorando la salud del paciente. Cabe resaltar que, los focos metastásicos son difíciles de extirpar quirúrgicamente y muchos pacientes desarrollan resistencia a las terapias. En consecuencia, el entendimiento y profundización del desarrollo y establecimiento del proceso metastásico tumoral es de vital importancia para generar estrategias diagnósticas y terapéuticas en contra del CM [11].

### **1.3 Morbilidad**

El CM es de origen heterogéneo y se han identificado una serie de factores que contribuyen a su aparición y desarrollo; entre los que se encuentran la edad, el inicio temprano de la menstruación (antes de los 12 años) e inicio tardío de la menopausia (después de los 55 años); antecedentes familiares de cáncer de mama o de ovario, obesidad y sobrepeso; el tabaquismo y la ingesta de alcohol, la administración prolongada de algunas terapias de reemplazo hormonal y ciertos anticonceptivos orales; así como mutaciones en genes supresores de tumores como BRCA1 y BRCA2 [12].

### **1.4 Mortalidad**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) con datos de 2020, en el mundo, cada año se registran 685 mil defunciones por CM, siendo entre los tumores malignos, la principal causa de muerte en las mujeres [13]. En México, según las cifras preliminares del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) de casos con CM, en el año 2020 se registraron 1,086,094 defunciones [14]. Por sexo, fallecieron más mujeres por CM (7,821) que hombres (58 casos); en las mujeres esto equivale a 17% del total de defunciones por tumores malignos y la ubica en primer lugar de esta clasificación [14]. Las tasas más altas de defunciones se registran en los grupos de pacientes de 45 a 59 años [14].

### **1.5 Factores de riesgo**

Los factores de riesgo asociados con el desarrollo del CM se pueden clasificar en modificables y no modificables.

La tabla enlista los principales factores de riesgo asociados al CM.

Tabla 1. Clasificación de los factores de riesgo asociados al desarrollo de CM [2]

<b>Factores de riesgo modificables</b>	<b>Factores de riesgo no modificables</b>
Índice de masa corporal	Sexo femenino
Terapia de reemplazo hormonal	Edad mayor
Actividad física	Mutaciones genéticas
Obesidad y sobrepeso	Historia familiar de cáncer de mama u ovárico
Consumo de alcohol	Embarazo y lactancia
Fumar	Periodo menstrual y menopausia
Exposición prolongada a agentes con actividad hormonal como el dietilestilbestrol u otros fármacos	Antecedentes de cáncer de mama
Ingesta de alimentos procesados	Radioterapia previa
Exposición excesiva a la luz artificial	Enfermedades mamarias no cancerosas
Suplemento vitamínico insuficiente	
Exposición a productos químicos	

A continuación, se describe la participación de los principales factores de riesgo asociados al desarrollo del CM.

### **Edad**

La incidencia de CM y las tasas de mortalidad generalmente aumentan con la edad. Durante 2008-2012, la media de edad en el momento del diagnóstico de esta enfermedad fue de 61.24 años. Esto significa que la mitad de las mujeres que desarrollaron CM tenían 61 años de edad o menos al momento del diagnóstico [3]. Desde 2020, la mayor prevalencia de CM se ha presentado en mujeres menores a los 50 años [14].



## **Origen étnico**

Las tasas de incidencia de CM son notablemente más altas en mujeres de raza blanca que en mujeres de raza negra en el rango de edad de 60 y 84 años. Sin embargo, las mujeres de raza negra tienen una mayor tasa de incidencia antes de los 45 años y tienen más probabilidades de muerte por CM en cada edad [15]. En general, la tasa de incidencia de CM sigue siendo la más alta entre las mujeres blancas no hispanas [16], donde según datos proporcionados por la OMS/Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer, hasta el 2020 hay estadísticas que muestran que la incidencia mundial del CM predomina en Europa siendo Bélgica el país con la tasa más alta de CM en mujeres, seguida de Países Bajos [17].

## **Sobrepeso y obesidad**

La obesidad y el sobrepeso aumentan el riesgo de CM, ambos factores se han asociado con el exceso de tejido adiposo que sirve como reservorio para hormonas esteroides como el E2 en las mujeres [18]. El riesgo es aproximadamente 1.5 veces más alto en las mujeres con sobrepeso y aproximadamente 2 veces más en las mujeres con obesidad en comparación con mujeres con un índice de masa corporal dentro del rango de peso saludable [19].

## **Factores químicos: humo del tabaco, alcohol**

Existe evidencia que indica que el tabaquismo puede aumentar ligeramente el riesgo de desarrollar CM, particularmente el tabaquismo intensivo a largo plazo y entre las mujeres que comienzan a fumar antes de su primer embarazo [20]. Esto sucede por efecto de los carcinógenos que se encuentran en el tabaco, mismos que se transportan al tejido mamario, lo que aumenta la probabilidad de mutaciones en diversos oncogenes y los genes supresores de tumores (p53 en particular). Por otro lado, diversos estudios han confirmado que el consumo de alcohol aumenta el riesgo de CM en las mujeres en aproximadamente el 7% - 10% por cada 10 mL de alcohol consumido por día en promedio [21]. Se ha asociado el consumo de bebidas alcohólicas con un aumento de los niveles de E2, aunque el mecanismo por el cual

aumentan está aún lejos de establecerse [22]. Aunque sí se ha elucidado que el acetaldehído producido *in situ* y acumulado en el tejido mamario podría desempeñar un papel en los eventos mutacionales y de promoción del proceso carcinogénico, así como al estrés oxidativo que se genera en consecuencia del tabaquismo, llevando a la formación de especies reactivas de oxígeno que pueden provocar CM [22]. Los altos niveles de E2 producen desequilibrio hormonal que afecta el riesgo de carcinogénesis dentro de los órganos femeninos [23]. Las mujeres que consumen de 2-3 bebidas alcohólicas por día tienen un riesgo 20% mayor de padecer CM en comparación con mujeres no bebedoras [24].

### **Factores hormonales**

El uso prolongado de compuestos sintéticos con acciones hormonales durante la menopausia, la terapia de reemplazo hormonal, ha mostrado incrementar el riesgo de desarrollar CM debido a la promoción de procesos proliferativos a través de la activación de los receptores de estrógeno nucleares [25].

### **Predisposición genética**

Las mutaciones hereditarias en los genes BRCA1 y BRCA2 son las mejor estudiadas por su relación con el desarrollo de CM, éstas representan del 5% al 10% de la incidencia de los distintos tipos de CM femeninos, y un estimado del 5% al 20% del CM masculino [26]. Por lo general, las mutaciones en estos genes son poco frecuentes y se encuentran en menos del 1% en la población general, pero ocurren con mayor frecuencia en ciertos grupos étnicos o geográficamente aislados, como los de ascendencia judía [27].

## **1.6 Clasificación del CM**

En el CM es una enfermedad heterogénea que puede clasificarse de acuerdo con su origen anatómico, histológico o génico.

La clasificación molecular comprende tres subtipos moleculares que se basan en los niveles de expresión génica del receptor de estrógenos (ER), progesterona (PR) y del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2), los cuales se describen abajo.

- Luminal: tipo A presenta sobreexpresión del receptor de estrógenos (ER) y/o receptor de progesterona (PR). tipo B cuenta con sobreexpresión del ER con ausencia o presencia del PR y/o el HER2.
- Cáncer HER2+: existe la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2)
- Cáncer de mama triple negativo (TN): tumor donde se observa la ausencia o baja expresión de ER, PR y HER2.

De acuerdo con este perfil molecular, el CM se categoriza en mejor o peor pronóstico y a su vez da pie al desarrollo de terapias dirigidas.

Cabe resaltar, que el tipo de CM de mayor prevalencia es el de tipo luminal, mientras que el de peor pronóstico es el TN.

A continuación, se describen características de cada tipo de CM.

### **1.6.1 Cáncer de mama tipo luminal**

El CM luminal representa el 70% de los casos en la clínica. Los tumores de tipo luminal se caracterizan por la presencia de los ERs y se clasifican en dos grupos; Luminal A y Luminal B. Los tipos de CM luminal tienen mejor pronóstico y mayor incidencia a nivel clínico en comparación con otros tipos de CM [28]. La diferencia entre el tipo luminal A y luminal B radica en la expresión génica del marcador de proliferación celular Ki67, el cual se considera como un biomarcador utilizado en estudios de inmunohistoquímica como un factor predictivo y pronóstico en CM [29]. Es importante mencionar, que el tipo luminal B presenta una mayor expresión de este marcador y se le ha asociado con la variación de respuesta del tratamiento antiestrogénico, Además, se ha documentado que algunos tumores de tipo luminal pueden presentar la expresión del HER2.

### **1.6.2 Cáncer de mama con sobreexpresión del HER2**

El HER2 pertenece a la familia de receptores de factores de crecimiento epidérmico o EGFR, siendo éste un receptor de membrana con actividad catalítica de tirosina

cinasa que se activa por la unión de sus ligandos al dominio extracelular. El HER2 es considerado como un proto-oncogén que se encuentra comúnmente sobreexpresado en varios tipos de tumores incluyendo el carcinoma mamario, y se le ha asociado como un factor predictivo de mal pronóstico y de comportamiento tumoral agresivo [30]. Este tipo de cáncer es menos frecuente que el cáncer de tipo luminal, y representa entre el 13-15 % de los casos de CM diagnosticados clínicamente [31].

Las proteínas como HER2 comprenden un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio transmembrana y un dominio catalítico intracelular tirosina cinasa [32]. La activación de HER2 se produce por dimerización tras la unión del ligando, aunque no se ha identificado ningún ligando específico para HER2. La señalización de HER2 activa la proliferación, la supervivencia celular, la metástasis, y la adhesión a través de diferentes vías, como la vía fosfoinositol 3-cinasa (PI3K)-proteína cinasa B (AKT) o la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK).

El tratamiento dirigido contra HER2 ha demostrado eficacia en los casos de este tipo de tumores [32]. Este tratamiento está basado en el empleo de anticuerpos monoclonales que bloqueen la señalización del HER2, así como en el uso de moléculas pequeñas inhibitoras de la actividad catalítica de este receptor [33]. Sin embargo, se ha descrito que la resistencia *de novo* o adquirida a la terapia ocurre en algunos pacientes a través de la formación de heterodímeros entre los receptores de la familia EGFR por acción de la unión del ligando con estos receptores [34]. En consecuencia, se están desarrollando nuevas terapias específicas como los inhibidores de la tirosina cinasa (TKI), que tienen como propósito bloquear las vías de señalización intracelular de los EGFR en el CM [34].

## **2. Cáncer de mama TN**

El CM TN es el más agresivo de los subtipos de tumores mamarios, la razón principal es que no se cuentan con blancos moleculares que estén sobreexpresados y por lo mismo limita el desarrollo de terapias dirigidas, lo cual dificulta su manejo y seguimiento terapéutico [35]. Los pacientes que desarrollan CM triple negativo reciben generalmente quimioterapia y radioterapia, sin embargo, más del 50% de

las pacientes son resistentes a este tipo de terapias, presentando una mayor probabilidad de recidiva, recurrencias, y metástasis. Es por ello que, diversas investigaciones se dirigen a la búsqueda de biomarcadores a los cuales se pueda dirigir alguna terapia [3].

### **3. Familia de receptores de crecimiento**

La familia EGFR comprende cuatro receptores con actividad de tirosina cinasa (EGFR o HER1, HER2, HER3 y HER4), los cuales están expresados en una amplia variedad de tejidos como el epitelial, el mesenquimal o el neuronal y tienen un papel fundamental durante el desarrollo embrionario [34]. Estas proteínas están constituidas por una región extracelular que consta de 4 dominios, una región transmembranal y una región intracelular, la cual contiene el dominio con actividad catalítica y el carboxilo terminal donde se encuentra la subunidad regulatoria [36]. Cabe resaltar que, la actividad catalítica de los receptores es primordial para que lleven a cabo sus funciones biológicas y de hecho se le ha considerado como diana molecular para la inhibición de la activación de estos receptores.

En situaciones patológicas, como en el cáncer, los receptores ErbB pueden sobreactivarse por unión de ligando (expresados de manera aberrante), sobreexpresión de receptores y alteraciones estructurales en los mismos, debido a truncamientos y mutaciones en los genes que los codifican. La familia de receptores ErbB/HER juega un papel importante en la carcinogénesis mamaria y, como resultado, esta familia en la actualidad se encuentra entre las oncoproteínas con más terapias dirigidas [37].

Además, cada vez hay más pruebas de que la formación de heterodímeros entre los receptores de los miembros del EGFR provoca una respuesta adversa a la terapia [34]. Para bloquear las vías de señalización intracelular del EGFR en el CM, se están desarrollando nuevas terapias que incluyen el uso de moléculas pequeñas inhibidoras de tirosina cinasa.

Esta familia de receptores participa de manera activa a través de una fosforilación de residuos de tirosina cinasa para desencadenar distintas vías de señalización como PI3k/Akt, MAPK/ERK1/2, modulación de canales de calcio, etc.; que serán descritas más adelante. Esta secuencia de eventos induce respuestas celulares que incluyen la proliferación, diferenciación e inhibición de la apoptosis, dando lugar a enfermedades como el cáncer [34].

A continuación, se describirán las vías que se ven más favorecidas por la activación de esta familia.

#### **4. Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)**

Las MAPK, descritas en la sección anterior, son un grupo de proteínas serina/treonina cinasas que son activas en respuesta a una variedad de estímulos extracelulares y median la transducción de señales de la superficie celular al núcleo [38]. La vía de señalización de MAPK juega un papel clave en una gran variedad de respuestas celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, y muerte celular, así como algunos cambios a corto plazo requeridos para la homeostasis y la respuesta hormonal [39].

Hasta ahora, distintas MAPK expresadas han sido identificadas en diversos tumores [40]. Los primeros miembros descubiertos y mejor caracterizados de la familia de las MAPKs son los ERKs, compuesto por al menos seis isoformas (ERK1-5 y ERK7/8), de los cuales los más estudiados son ERK1/2, que fueron los primeros miembros en ser caracterizados [41]. Las cinasas ERK1/2 son expresadas en una gran variedad de tejidos y puede ser activadas por estímulos mitogénicos como factores de crecimiento, y citoquinas [39].

Se sabe que ERK1/2 regula la proliferación, diferenciación, y meiosis celular, así como el aprendizaje y la memoria en células del sistema nervioso [42]. La activación anormal de ERK1/2 promueve la proliferación de células tumorales. Además, en células metastásicas se ha demostrado que ERK tiene una actividad

aumentada comparada con células no metastásicas. Se ha demostrado que una señalización reducida de ERK1/2 decrece la estabilidad de los microtúbulos en las células, llevando a una reducción en el desensamble de adhesiones focales que reduce la migración celular, lo que sugiere que ERK1/2 puede afectar el proceso de metástasis por la activación directa de los mecanismos intracelulares involucrados en la migración de las células neoplásicas [39].

## **5. Receptor GPER1**

El GPER1 es un receptor membranal activado por los estrógenos. Su expresión se encuentra en diversas células y rige diferentes acciones biológicas en varios sistemas, como el nervioso, reproductivo, metabólico, cardiovascular e inmunológico [4]. De manera interesante, se ha sugerido que es un regulador clave en eventos de proliferación en diversas neoplasias como el CM, cáncer pancreático, cáncer de próstata, y hepatocelular, así como en el melanoma [43].

El GPER1 induce la formación de segundos mensajeros, y con ello, evoca una diversidad de procesos celulares, sin embargo, se ha descrito que también puede interactuar con los receptores nucleares como el  $ER_{\alpha}$ , participando en la señalización de eventos genómicos [44].

### **5.1 Estructura**

El GPER1 se encuentra compuesto por siete dominios transmembranales y está acoplado a proteínas G, en particular a proteínas activadoras de la enzima adenilato ciclasa (Gs) (figura 1) [4].

Cuenta con un extremo amino terminal que está localizado en el exterior de la membrana celular y el extremo carboxilo, localizado en el citoplasma. El dominio citoplasmático juega un papel importante en la activación, desensibilización, e internalización del receptor que se logra a través de la fosforilación por parte de las cinasas que evocan vías de señalización río abajo y que están acopladas a proteínas G [45]. En general, se considera que, tras la unión de sus ligandos, el GPER1 es activado y produce una señalización que implica la fosforilación del

propio receptor con el posterior reclutamiento de arrestinas que promueven la internalización del receptor por endocitosis [46]. Cabe resaltar que, la activación del GPER1 puede promover la fosforilación (activación) de distintos tipos de receptores, incluyendo el EGFR y el HER2.

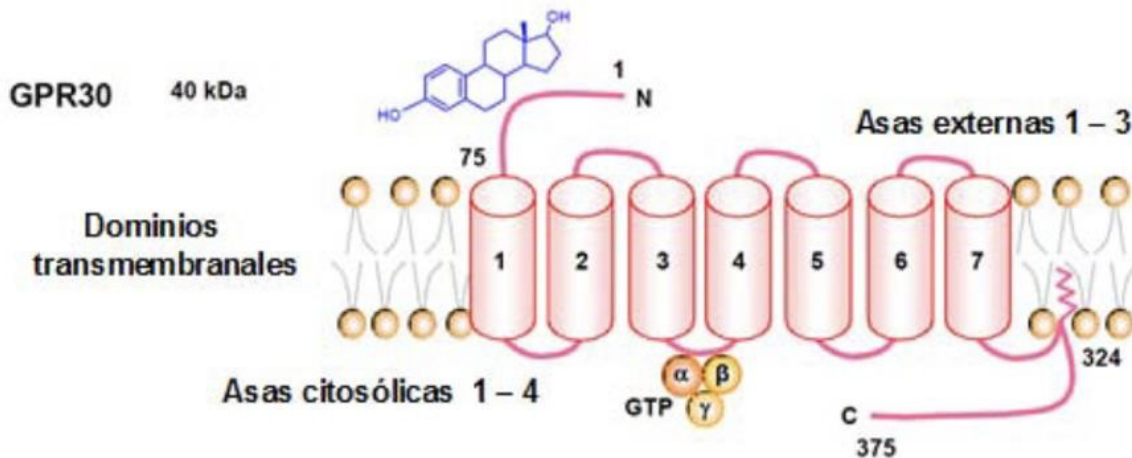


Figura 1. Estructura del receptor GPER1, un receptor acoplado a proteínas G con un extremo amino extracelular, 7 hélices  $\alpha$  transmembranales, 3 asas de unión a ligando, 3-4 asas citosólicas, las cuales participan en la unión a proteínas G. Al interior de la membrana se encuentra el dominio carboxilo terminal unido a la membrana mediante fosfolípidos, este también se ha involucrado en la unión a proteínas G [47].

## 5.2 Localización

El GPER1 se encuentra principalmente en la membrana plasmática y en la membrana del retículo endoplasmático (RE) [48] de manera ubicua, en distintos tipos de células incluyendo células del sistema óseo, tejido cardiovascular, células renales, gastrointestinales, inmunes, entre otras [49 56] ]. Sin embargo, también se ha reportado la localización celular del GPER1 en el citoplasma y núcleo, aunque sus acciones biológicas en estos sitios aún no han sido determinadas a profundidad [50].



### **5.3 Vías de señalización activadas por el GPER1**

GPER1 media efectos no genómicos por la activación de proteínas G que dan como resultado la formación de segundos mensajeros [7]. Dentro de los efectos celulares regulados por el GPER1 se encuentra la producción de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), la movilización de calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ), la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la activación de múltiples cinasas, como la fosfatidilinositol 3-cinasa/proteína cinasa B (PI3K/AKT) y cinasas de proteína activada con mitógeno ERK1/2 (MAPK) [4], lo que a menudo resulta en un aumento de la proliferación.

A continuación, se profundiza en los efectos mecanísticos del GPER1 y la activación de vías intracelulares

#### **5.3.1 Relación de la activación del GPER1 y la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), vía MAPK—ERK1/2 y PI3K/AKT**

El GPER1 puede activar cascadas de señalización río abajo del receptor del EGFR mediante la activación de la tirosina cinasa Src, la cual media la fosforilación de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  de la proteína Gs posterior a la unión del E2 al GPER1. La activación de estas subunidades impacta en la unión a la integrina  $\alpha\beta 1$  a través de una proteína adaptadora conocida como SHC, y consecutivamente promueve la estimulación de las proteínas metaloproteinasas (MMP), las cuales favorecen la liberación de diversos ligandos del EGFR, como el EGF o la heparina en el espacio extracelular. La unión del EGF al receptor EGFR conduce a la autofosforilación de este y promueve a su vez la activación de la vía miogénica de las MAPK/Erk1/2 y la vía metabólica de PI3K/AKT [42, 51, 52, 53 86] ].

Se ha documentado que la sobreexpresión y actividad del EGFR también correlaciona con múltiples tipos de tumores. Además, la vía MAPK/ERK1/2 favorece la transcripción génica del  $\text{ERR}\alpha$  (un receptor nuclear huérfano y un componente importante de las redes de señalización en las células del CM, la enzima aromatasa

[43, 57] y el Egr-1 (una fosfoproteína nuclear y factor de transcripción que puede promover la proliferación y muerte celular [7, 8]).

En contraparte, la señalización de la vía de las MAPK también promueve la actividad de diferentes cinasas como p38 y JNK. Con relación a este punto, se ha informado que la proteína p38 es un supresor de tumores que tiene un papel significativo en la supervivencia celular y la inducción de apoptosis durante el estrés celular.

De manera interesante, diversos estudios demuestran que los eventos de señalización del GPER1 por la unión del E2 desencadenan la activación de la MAPK—Erk1/2 en los diferentes tipos moleculares de CM.

Por su parte, la vía fosfatidilinositol 3 cinasa o PI3K/AKT también se activa por el receptor EGFR. Cuando PI3K es activada, fosforila al fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2), formando el fosfatidil inositol 3,4,5, trifosfato (PIP3) como segundo mensajero, este conduce a la activación de la cinasa AKT, que activa múltiples blancos moleculares [54]. La actividad de AKT es modulada por la fosfatasa homóloga a tensina homóloga (PTEN), molécula encargada de promover la conversión de PIP3 en PIP2. Además, la vía de la PI3K/AKT participa principalmente en la supervivencia y metabolismo celular [55, 56].

Se ha descrito que la activación del GPER1 puede impactar a su vez en la activación de la vía PI3K/AKT en respuesta a E2 [48]. Estudios en células de CM han reportado que existe una hiperactivación de AKT contribuyendo a la proliferación y la supervivencia celular [40].

### **5.3.2 Activación de ciclasa de adenosín monofosfato (cAMP)**

Es importante mencionar que el GPER1 está acoplado a proteínas G, en particular a la proteína Gs. Cuando el receptor es activado sufre un cambio conformacional que libera a la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gs dando como resultado la estimulación

de la enzima adenilato ciclasa (AC) en el citosol y con ello la consecuente formación de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). El AMPc es considerado un segundo mensajero que activa a la proteína cinasa A (PKA) y que como evento final promueve la actividad transcripcional de la proteína unión del elemento de respuesta al AMPc (CREB). El factor de transcripción CREB se ha relacionado con la modulación de proteínas como ciclina D1, implicada en la progresión del ciclo celular. Se ha descrito que los niveles de expresión de CREB en pacientes con CM son elevados y se han relacionado con criterios clinicopatológicos como estadio tumoral, grado, metástasis, mayor recurrencia, mal pronóstico y menor supervivencia del paciente tumoral. Las funciones de CREB se han estudiado ampliamente en CM tipo luminal donde se ha puesto de manifiesto que modula la expresión de la enzima aromatasa, enzima clave en la producción de estrógenos [48], y a su vez se ha relacionado con la resistencia al tratamiento antihormonal prescrito en este tipo de tumor, como lo es el tamoxifeno [57].

### **5.3.3 Activación de vías de calcio**

Los iones de calcio se han considerado como mensajeros intracelulares esenciales implicados en la regulación de la actividad enzimática, la contracción muscular, sinapsis o la secreción hormonal y de neurotransmisores [58]. La activación del GPER1 promueve la movilización de calcio de las reservas intracelulares. La unión de E2 a GPER1 también abre canales L de calcio en la membrana plasmática por un mecanismo aún no resuelto pero que afecta diversas vías de señalización mediante la activación directa de ERK1/2 [46].

### **5.4 Relación del GPER1 con los receptores de estrógeno nucleares**

GPER1 y los ERs nucleares tienen efectos biológicos diferenciales dentro de la fisiopatología del CM en función de la respuesta estrogénica que promueven [51]. Esto se explica porque diferentes antagonistas para el ER $\alpha$  y ER $\beta$  (por ejemplo, el tamoxifeno) pueden producir acciones agonistas en el GPER1 [59]. Se sabe incluso que, la afinidad del E2 al GPER1 es menor que a la del receptor ER $\alpha$ , sin embargo,

existen compuestos sintéticos como el ( $\pm$ )-1-[(3aR\*,4S\*,9bS\*)-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-il)-3a,4,5,9b-tetrahidro-3H-ciclopenta[c]quinolin-8-il] etanona o G-1 que tienen una afinidad muy alta y específica para el GPER1. De hecho, el G1 es considerado el principal agonista sintético para el GPER1 [60].

Los efectos biológicos y el estudio de los mecanismos de acción del GPER1 se han logrado profundizar con el desarrollo de antagonistas sintéticos para este receptor como los compuestos G15, G36 [61] y MIBE [62].

El GPER1 a diferencia de los ERs nucleares tiene efectos no genómicos que pueden también impactar en procesos proliferativos. Sin embargo, actualmente no se le considera como un blanco molecular para terapia en ningún tipo de CM a diferencia del ER $\alpha$ . Aunque diversos trabajos científicos han demostrado que el GPER1 está expresado en diferentes tipos tumorales de esta patología.

Se ha reportado entonces que, el E2 en CM tipo luminal puede unirse a los receptores nucleares ER $\alpha$  y ER $\beta$  [4], estimulando la proliferación de las células tumorales, pero que puede concomitantemente activar al GPER1, favoreciendo la transactivación del EGFR y potenciando también los procesos de proliferación celular [63].

Por su parte el tamoxifeno presenta una alta afinidad al GPER1 [64] y su activación por este fármaco se ha asociado con resistencia al tratamiento con tamoxifeno [65].

### **5.5 Participación biológica del GPER1 en los distintos tipos moleculares de cáncer de mama**

Diversos reportes han señalado que el GPER1 se encuentra expresado en más de la mitad de los casos de CM, independientemente de su tipo molecular. Su expresión se ha correlacionado con biomarcadores clínicos y patológicos de mal pronóstico, como el aumento del tamaño del tumor y la metástasis [66]. Sin embargo, las acciones biológicas del GPER1 a nivel clínico siguen siendo controversiales. En este sentido, se ha reportado que la baja expresión del GPER1 en muestras de pacientes con tumores mamarios de tipo luminal se ha asociado con un pronóstico y sobrevida desfavorables [67]. En contraste, algunos estudios

clínicos han reportado que la elevada expresión de GPER1 en CM con tipo luminal correlaciona con una supervivencia favorable y una menor progresión tumoral [68]. Con relación al punto anterior, se ha descrito que la activación de GPER1 por el E2 induce arresto de la fase G1/S y muerte celular en células de CM con tipo luminal en condiciones de hipoxia, efectos atribuidos a la activación de la cinasa p38 [69]. Aunque otros reportes mencionan que la activación de GPER1 en células de CM con este tipo tumoral conduce a la translocación nuclear del factor de transcripción FOXO3a, lo que conlleva a la regulación negativa de la caspasa 3 y 7, efectos atribuidos a la activación de la vía de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K)/AKT [70].

Por otro lado, diversa evidencia científica sugiere que el estudio de las células tumorales de manera independiente debería de ser complementado con diversas estrategias experimentales que involucren otros tipos celulares, como justificación de que otras estirpes celulares o moléculas solubles dentro del microambiente tumoral juegan un papel importante en la progresión del CM. Con relación a este punto, se ha reportado que la señalización cruzada del GPER1/EGFR media la expresión de los genes reguladores del ciclo celular en células de fibroblastos asociados a tumor derivadas de pacientes con CM luminal [71].

Además de la expresión del GPER1, la localización celular de este receptor también se ha reconocido con un importante factor biológico que determina sus acciones en células de cáncer. La localización del GPER1 en CM se ha descrito a nivel membranal o citoplasmático, y a nivel clínico se le ha asociado con diferentes características clinicopatológicas [72]. La localización citoplasmática del GPER1 se correlaciona con un estadio tumoral poco agresivo como los tumores de tipo luminal [73], mientras que su localización nuclear se ha asociado con tumores mamarios mal diferenciados como el subtipo TN. Por lo que, el estudio diferencial de la expresión de este receptor representaría una referencia con valor pronóstico a nivel clínico.

En líneas celulares de CM enriquecidas en con la expresión del HER2 se ha reportado que la activación de GPER1 promueve el crecimiento celular donde la

liberación de calcio intracelular juega un papel crucial [74]. En tumores mamarios enriquecidos en HER2 se ha reportado una significativa co-expresión del GPER1 y el HER2 [75]. Considerando que, el GPER1 puede regular positivamente las vías de señalización río abajo de la familia de receptores de crecimiento epidérmico que impactan en la proliferación y supervivencia celular, sería conveniente implementar estrategias terapéuticas que inhiban a ambos receptores de manera simultánea, las cuales podrían potenciar los efectos de la terapia dirigida contra estos receptores, como se ha sugerido en pacientes con cáncer de ovario [76]. Sin embargo, los efectos del GPER1 en tumores mamarios HER2+ aún no ha sido ampliamente explorada.

En relación con los tumores mamarios de tipo TN se ha reportado que la elevada expresión de GPER1 analizada en muestras de pacientes con este tipo de tumor está asociada con la activación de vías y focos pro-metastásicos, así como un pobre pronóstico clínico [77]. Esta información corrobora con estudios en modelos celulares, donde la activación del GPER1 produce una transactivación con el EGFR dando como resultado el aumento en la tasa proliferativa celular a través de la activación del factor de transcripción c-fos y otras proteínas involucradas en proliferación celular y apoptosis como las ciclinas A y D1 y Bcl-2, respectivamente [78, 79]. Sin embargo, existen investigaciones a nivel preclínico con información controversial del papel biológico del GPER1 en CMTN, donde se ha reportado que la activación del GPER1 inhibe el potencial invasivo de células de CMTN en modelos murinos a través de la supresión de la transformación epitelio-mesenquima [80]. Por lo tanto, el papel biológico del GPER1 en la metástasis del CMTN necesita estudios que profundicen o confirmen sus efectos. Cabe destacar que, un factor importante a considerar es que este tipo de tumor presenta diversos subtipos celulares [81], reflejando su heterogeneidad y por lo mismo se debería profundizar en la caracterización de los efectos del GPER1 en los distintos subtipos del CMTN. Por los datos anteriormente citados, diversos estudios experimentales han planteado la posibilidad de que el GPER1 pueda ser incluido como un biomarcador candidato y un blanco terapéutico potencial en CM [7, 82].

## 5.6 Efectos de agonistas y antagonistas específicos del GPER1 cáncer de mama

El empleo de moléculas agonistas y antagonistas de receptores en diferentes estudios permite evaluar la participación de moléculas biológicas de manera específica y pone de manifiesto su relevancia biológica. Con relación a lo anterior, se ha reportado que el G1, un agonista del GPER1, tiene efectos controversiales en la supervivencia y la proliferación de células tumorales. Sus efectos diferenciales en modelos celulares se han atribuido principalmente a la concentración del ligando empleada, y la consecuente activación del mismo receptor. Trabajos experimentales sugieren que la concentración del G1 en el microambiente tumoral define su función; demostrado que el G1 estimula la proliferación de células de CM con diferentes tipos moleculares de manera dosis-dependiente en el rango de 10 nM a 1  $\mu$ M [83], mientras que concentraciones más elevadas de 1  $\mu$ M suprimen potencialmente el crecimiento celular [84]. Estos efectos se han corroborado en estudios *in vitro*, donde se ha demostrado que el G1 en concentraciones micromolares inhibe el crecimiento celular e induce apoptosis en líneas celulares de CM de tipo luminal y HER2 [85], efectos asociados con la activación de las proteínas p53 y p21 [86-81]. Además, la activación del GPER1 por la unión del G1 en concentraciones de 100 nM y hasta 1  $\mu$ M ha mostrado reducir la expresión de marcadores pro-metastásicos como IL-6 y VEGF-A, suprimiendo la angiogénesis y metástasis tumoral en líneas de CMTN [87].

Por su parte, el pre-tratamiento de G-15 y G-36, antagonistas del GPER1 en células de CM de tipo luminal ha mostrado inhibir la activación de las vías MAPK (ERK1/2) y de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), así como la movilización de calcio intracelular posterior a la exposición de E2 o G1, sin mostrar efectos sobre la activación de ERK1/2 posterior a la unión del factor de crecimiento epidérmico, ligando del EGFR [4].

En CMTN se ha reportado la sobreexpresión proteica del EGFR se asocia con un mal pronóstico clínico [88]. En líneas celulares de CMTN se demostró que el agonista G1 de GPER1 aumenta la supervivencia de las células tumorales en concentraciones de 10 nM- 1 $\mu$ M a través de la activación de la vía EGFR / MAPK/

ERK, lo cual se ha explicado por la participación de distintos factores de transcripción como c-fos [86]. Estos datos sugieren que la identificación de antagonistas del GPER1 como el G36 y el G15 es un paso importante hacia el desarrollo de nuevas terapias que puedan emplearse en CM [89].

A continuación, se describen las principales vías de señalización activadas por el GPER1 en CM.

Tras la unión del E2 o G1 a GPER1 se activan varias vías de señalización en el citosol. La unión del ligando a GPER1 conduce al desprendimiento de la subunidad  $\beta\gamma$  de las proteínas G heterotriméricas. La vía EGF-receptor comienza con la activación de la cinasa Src por la subunidad  $\beta\gamma$  que activa las metaloproteinasas (MMP), liberando al factor de crecimiento (EGF) o a la heparina. La unión del EGF al receptor EGFR conduce a la autofosforilación del receptor que por una serie de fosforilaciones consecutivas culmina con la activación de la vía de las MAPK--Erk1/2 y la PI3K/AKT. La activación de Erk1/2 induce la traslocación nuclear del factor de transcripción c-fos, Egr-1,  $ERR\alpha$  y la aromatasa. La vía PI3K/AKT también es activada por el EGFR, por esta vía se ha reportado la traslocación nuclear del factor de transcripción FOXO3a, el cual es responsable de la transcripción de distintos genes blanco. Por otro lado, se ha reportado que la activación del GPER1 por E2, G1 o tamoxifeno promueve la liberación de calcio promovida por la subunidad  $\alpha$  liberada de las proteínas G heterotriméricas, la cual activa a la fosfolipasa C (PLC). La PLC escinde el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato en diacilglicerol e IP3. El IP3 libera iones de calcio de las reservas citosólicas de calcio. La unión de E2 a GPER1 también abre canales L de calcio en la membrana plasmática por un mecanismo aún no resuelto. La subunidad  $\alpha$  liberada de la proteína G heterotrimérica también activa la enzima adenilato ciclasa (AC) en el citosol. El AMPc generado por la AC activa la proteína cinasa A (PKA) que fosforila la proteína de unión del elemento de respuesta al AMPc (CREB). La CREB fosforilada se une como factor de transcripción a los promotores de genes que contienen un elemento de respuesta al AMPc, por ejemplo, la ciclinaD1, que favorece el progreso del ciclo celular. La interacción de GPER1/EGFR media la



expresión de los genes reguladores del ciclo celular en células de fibroblastos asociados a tumor derivados de pacientes con CM luminal, Figura 2.

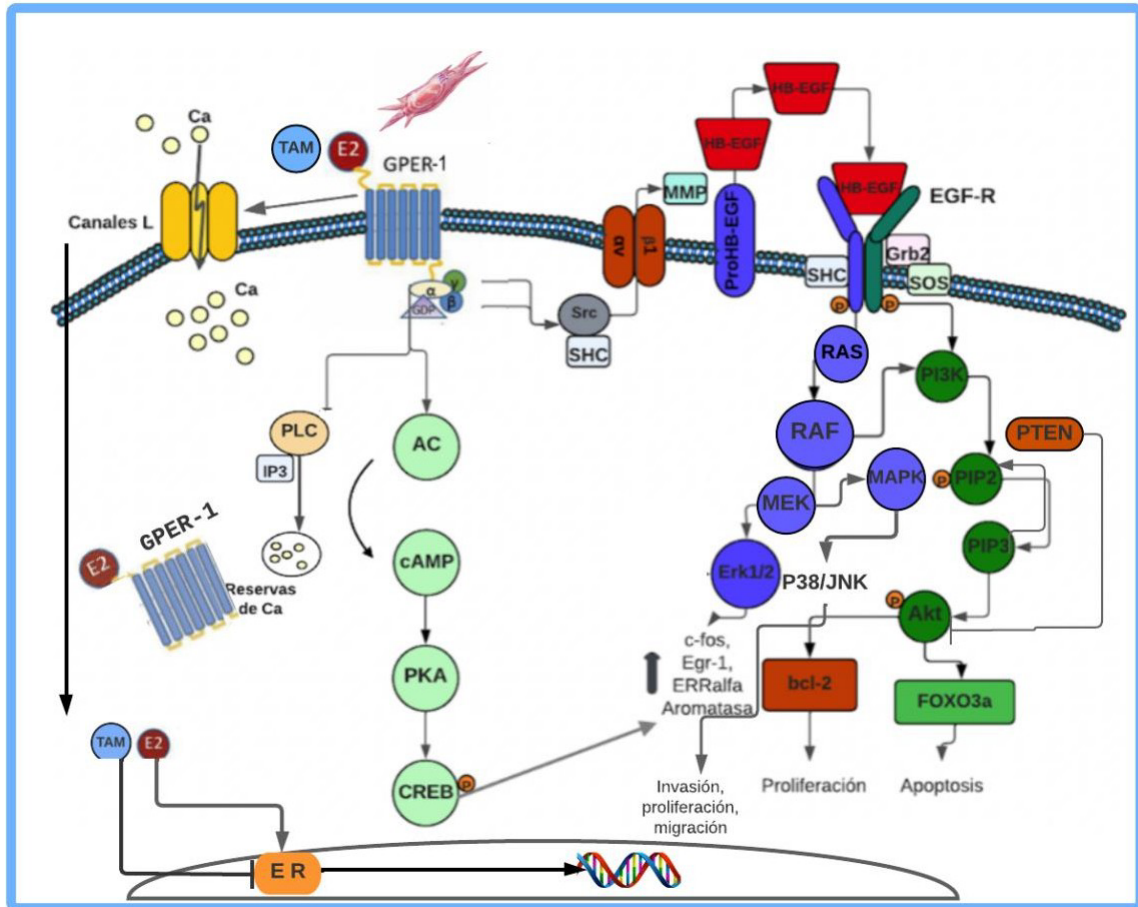


Figura 2. Vías de señalización mostrando participación del receptor GPER1 en células deCM

## **6 GPER1 involucrado en la respuesta a tratamientos antihormonales en CM**

El tamoxifeno se define como un modulador selectivo de los receptores de estrógenos (SERM) aprobado para el tratamiento del CM tipo luminal [90]. El tratamiento con tamoxifeno en pacientes con CM ha logrado reducir la recurrencia y mortalidad en un 40% durante los primeros 5 años de tratamiento. Sin embargo, la resistencia primaria o adquirida de este fármaco surge con frecuencia y se convierte en el principal obstáculo en la terapia antihormonal.

Es importante mencionar que sólo entre el 50-70% de los tumores positivos al RE responden al tratamiento, y la resistencia es un fenómeno frecuente en la práctica clínica que dificulta su administración en condiciones metastáticas [65, 91]. Recientemente, estudios clínicos donde se ha evaluado la expresión del GPER1 en pacientes con CM tipo luminal han sugerido que no se recomiendan tratamientos prolongados con el tamoxifeno en pacientes que tengan una elevada expresión de este receptor, ya que este fármaco actúa como agonista del GPER1 y se ha asociado con la posterior generación de resistencia al tratamiento [74, 90]. Las acciones del tamoxifeno son a través de la activación cruzada del EGFR y el GPER1 con la consecuente activación de las vías ERK1/2, PI3K/AKT y /cAMP/PKA [63, 91, 93]. Es importante mencionar que la activación de la vía de las MAPK por tamoxifeno en células de CM con tipo luminal puede bloquearse por la administración del antagonista del GPER1, el G36 [63], lo anterior sugiere que convendría realizar estudios donde se evalué la coadministración de terapia antihormonal con agonistas del GPER1 como el G36.

Por otro lado, se ha reportado que la localización celular del GPER1 en células tumorales puede modularse por la acción de distintos compuestos con actividad hormonal o antihormonal [6], lo cual resulta en otro campo de estudio interesante para evaluación del factor pronóstico de los pacientes con CM.

Como se comento en secciones anteriores, las acciones del GPER1 en otros tipos de terapias en CM HER2+ o TN no se ha explorado ampliamente. Sin embargo, sería conveniente realizar estudios de combinaciones de agentes antagonistas con

otros fármacos empleados en terapia dirigida para dilucidar los efectos biológicos del GPER1 y sus efectos con otros tipos de terapia.

## **7. GPER1 y metástasis en cáncer de mama**

### **7.1 Metástasis**

La metástasis se produce cuando las células cancerosas genéticamente inestables se adaptan a un microambiente tisular que está distante del tumor primario. Este proceso implica la generación de nuevos vasos sanguíneos por los cuales las células tumorales además de recibir nutrientes pueden migrar [10].

En estudios clínicos con pacientes tratados con tamoxifeno se ha demostrado que la expresión de GPER1 aumenta en las metástasis [94]. De manera interesante, aplicando análisis bioinformáticos se ha documentado que la expresión del GPER1 también se correlaciona con la expresión génica de biomarcadores implicados en vías prometastáticas, principalmente en CMTN [95].

Evidencia preclínica sobre el papel del GPER1 en la tumorigénesis de mama y metástasis se ha dado a conocer por el empleo de ratones knockout para el GPER1, donde queda de manifiesto que este receptor favorece la metástasis del CM y el crecimiento tumoral [51, 96]. Estos efectos han sido estudiados tanto en modelos celulares como murinos con ligandos como el E2 y otros compuestos con actividad hormonal como el bisfenol A por su unión al GPER1 [97].

Los datos anteriores resultan importantes, ya que aproximadamente un tercio de las pacientes tratadas por CM desarrollan enfermedad metastásica [91]. Las metástasis de tejidos blandos, óseas y viscerales representan aproximadamente un tercio de las recidivas iniciales [6, 91].

## V. Discusión

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia más común en mujeres, con un diagnóstico de más de 2,3 millones nuevos casos en todo el mundo [2]. Según los informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el CM ocupa el segundo lugar en la lista de enfermedades comunes en todo el mundo. En México según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) ocupa el primer lugar en defunciones en mujeres en edad reproductiva y constituye un problema importante de salud pública [14].

Tradicionalmente el CM se clasifica en distintos tipos moleculares, de acuerdo con la expresión proteica del RE, RP y el HER2, los cuales son considerados blancos terapéuticos que han servido para el desarrollo de fármacos como tratamiento dirigido del CM.

Es importante mencionar que estudios recientes sitúan al GPER1 como un importante blanco molecular que puede tener implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas en los distintos tipos de CM [63]. A este respecto, se ha reportado que el 60% de las pacientes con tumores mamarios expresan el GPER1 [98]. La presencia de este receptor se ha asociado con el crecimiento tumoral, la metástasis y la resistencia a tratamientos antihormonales [6].

El GPER1 puede activar distintas vías de señalización que favorecen el crecimiento tumoral en distintos tipos de CM, aunque los hallazgos sobre su participación aún son controversiales (Tabla 2). Es por lo que, este trabajo se enfocó en hacer una compilación de la literatura sobre el papel del GPER1 en los tres tipos de CM que se encuentran en la clínica.

Los resultados indicaron que el papel del GPER1 en CM va a depender del tipo tumoral, de su localización, de la duración de estimulación con ligandos específicos, de la concentración del ligando y de los receptores que estén co-expresados en las células neoplásicas.

Para el caso de los tumores luminales, la presencia membranal o citoplasmática del GPER1 se asocia con buen pronóstico clínico, con estadios tempranos de la enfermedad y mejor diferenciación histológica [98]. Sin embargo, se ha descrito que

en pacientes con este tipo de CM que han recibido terapia antihormonal con tamoxifeno que la presencia del GPER1 puede incluso participar en la generación de resistencia hacia este fármaco [99]. Contrariamente, la expresión nuclear del GPER1 se asocia con acciones pro-tumorales y un peor pronóstico clínico, siendo más común en el CMTN [3]. Esto indica que el GPER1 puede funciones celulares diferenciales dependiendo de su ubicación celular e influir en el desarrollo y el pronóstico de la enfermedad [73].

En el desarrollo del trabajo también encontramos que diversa literatura científica sustenta el hecho que diferentes agonistas como el E2, el G1 o el mismo tamoxifeno activan al GPER1 y pueden entonces promover acciones pro-tumorales importantes en diversos tipos tumorales [100 66, 90] , 101], efectos que pueden contrarrestarse con el uso de antagonistas para este receptor [102 113] ].

Es importante mencionar que la activación del GPER1 independientemente del tipo tumoral de CM activa vías mitogénicas y de metabolismo celular comunes, como lo son la vía de las MAPK y la vía PI3K/AKT [4, 103], efectos celulares atribuidos a la señalización cruzada y sostenida con la familia de receptores de crecimiento epidérmico como EGFR y HER2 [63, 103].

A este respecto, se sugeriría el empleo de terapias que puedan inhibir la activación tanto al GPER1 como la activación de los receptores de factores de crecimiento desde su fosforilación temprana. Lo anterior, debido a que existen reportes donde se ha estudiado el bloqueo de la cinasa PI3K posterior a la estimulación con E2 o G1 en células de CM y no se ha observado una disminución significativa de los procesos proliferativos inducidos [100]. Cabe destacar que, aunado a lo anterior, también tendría que hacerse un estudio personalizado para descartar mutaciones en las distintas cinasas como PI3K/AKT como se ha reportado en tumores HER2+ [90].

En CMTN se ha descrito que la cinasa Src tiene un papel importante en la activación concomitante del GPER1 y el EGFR [103]. A este respecto quizá convendría utilizar inhibidores de Src.

Con relación a la concentración del ligando, los reportes experimentales encontrados indicaron que la concentración de G1 en el rango de 10 nM a 1  $\mu$ M

puede tener acciones anti o pro-tumorales en líneas celulares de CM [83, 84]. En este sentido sería también importante determinar o estimar la concentración de diferentes ligandos que pueda estar presente en el microambiente tumoral, ya que esto determinaría los efectos diferenciales del GPER1 en CM.

Con relación a los efectos pro-apoptóticos del GPER1 existen pocos reportes. Sin embargo, existe evidencia que el G1 induce un aumento de las concentraciones de calcio a nivel intracelular que conducen a la inhibición de la proliferación y la inducción de apoptosis [104].

Tabla 2. Efecto biológico y factor pronóstico relacionado con la expresión del GPER1 en pacientes con CM

Tipo de tumor	Porcentaje de casos a nivel clínico	Pronóstico clínico	Efecto biológico del GPER1	Respuesta al tratamiento
Luminal	60-70%	Mayor supervivencia, buen pronóstico.	<p>La localización citoplasmática del GPER1 se ha asociado con los tipos luminales [45].</p> <p>Aumento de la supervivencia libre de enfermedad [69, 105].</p> <p>GPER1 induce la inhibición de la proliferación celular</p> <p>La activación de GPER1 por el E2 induce arresto de la fase G1/S y muerte celular en células de CM con tipo luminal en condiciones de hipoxia, efectos atribuidos a la activación de la cinasa p38 [69].</p>	<p>Los pacientes presentan mayor respuesta a terapias dirigidas, sin embargo, la presencia del GPER1 en algunos casos se asocia con la resistencia a la terapia antihormonal por tamoxifeno [75].</p>

HER2	13-15%	Mal pronóstico, peor índice de supervivencia, comportamiento tumoral agresivo.	<p>GPER1 se asocia con aumento en la proliferación celular, metástasis, progresión del tumor, migración y diferenciación de tumores enriquecidos en el receptor HER2 [34, 74].</p> <p>Mayor tamaño del tumor [106].</p>	Aun no se ha evaluado el papel del GPER1 en combinación con terapias dirigidas para este tipo tumoral
TN	10-15%	Mal pronóstico, peor supervivencia, comportamiento tumoral agresivo.	<p>La presencia del GPER1 se asocia con mayor recurrencia, menor índice de supervivencia y presencia de focos metastásicos en CMTN [3, 77].</p> <p>Aumento de la proliferación al unirse con E<sub>2</sub> y activación cruzada del EGFR, lo que desencadena vías de señalización que llevan a proliferación celular y la activación de c-fos, ciclinas A y D1 y Bcl-2, [78, 79, 82].</p> <p>Localización del GPER1 en núcleo [4].</p>	Aun no se ha evaluado el papel del GPER1 en combinación con terapias dirigidas para este tipo tumoral

## **VI. Perspectivas**

La expresión de GPER1 y la respuesta a tratamientos dirigidos debe de compararse entre los distintos tumores de CM a nivel clínico para generar conclusiones más robustas de sus efectos biológicos.

Un abordaje conveniente sería realizar estudios sobre el uso de antagonistas del GPER1 con distintas terapias dirigidas en CM y evaluar sus efectos farmacológicos en los distintos tipos tumorales.

Por otra parte, la implementación de modelos experimentales que puedan asemejar distintos estadios de la enfermedad (tempranos y metastásicos) para tratar de correlacionar los efectos y las variables clínico-patológicas del GPER1 con los estudios clínicos proporcionará información relevante para el manejo clínico de estos padecimientos.



## **VII. Conclusiones**

El GPER1 puede ser un importante blanco molecular con implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas en los distintos tipos de CM.

El papel del GPER1 en CM va a depender del tipo tumoral, de su localización, de la duración de estimulación con ligandos específicos, de la concentración del ligando y de los receptores que estén co-expresados en las células neoplásicas.

## VIII. Bibliografía citada

---

1. Łukasiewicz, S., et al., *Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review*. *Cancers* (Basel), 2021. **1**(17).
2. Łukasiewicz, S., et al., *Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review*. *Cancers* (Basel), 2021. **13**(17).
3. Almansour, N.M., *Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence*. *Front Mol Biosci*, 2022. **9**: p. 836417.
4. Prossnitz, E.R. and J.B. Arterburn, *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XC VII. G Protein-Coupled Estrogen Receptor and Its Pharmacologic Modulators*. *Pharmacol Rev*, 2015. **67**(3): p. 505-40.
5. Russo, J. and I.H. Russo, *The role of estrogen in the initiation of breast cancer*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006. **102**(1-5): p. 89-96.
6. Albanito, L., et al., *G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(4): p. 1859-66.
7. Girgert, R., G. Emons, and C. Gründker, *Estrogen Signaling in ER $\alpha$ -Negative Breast Cancer: ER $\beta$  and GPER*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 781.
8. Rigracciolo, D.C., et al., *Copper activates HIF-1 $\alpha$ /GPER/VEGF signalling in cancer cells*. *Oncotarget*, 2015. **6**(33): p. 34158-77.
9. Mariangela, E.R.r., *CANCER DE MAMA*. 2018, Revista Médica Sinergia: Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED). San José- Costa Rica. p. pp:8 - 12.
10. Gupta, G.P. and J. Massagué, *Cancer metastasis: building a framework*. *Cell*, 2006. **127**(4): p. 679-95.
11. Moy, L., et al., *ACR Appropriateness Criteria Stage I Breast Cancer: Initial Workup and Surveillance for Local Recurrence and Distant Metastases in Asymptomatic Women*. *J Am Coll Radiol*, 2016. **13**(11S): p. e43-e52.
12. *¿Cuáles son los factores de riesgo del cáncer de mama?* 2020, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.
13. *Cáncer de mama*. 2021, Organización Mundial de la Salud.
14. (INEGI)., I.N.d.E.y.G. *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer*. 2022; Available from: [www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/estadisticas/2011/cancer.doc](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/estadisticas/2011/cancer.doc).
15. Howlader, M., N. Heaton, and M. Relu, *Resection of liver metastases from breast cancer: towards a management guideline*. *Int J Surg*, 2011. **9**(4): p. 285-91.
16. Hill, D.A., et al., *Temporal trends in breast cancer survival by race and ethnicity: A population-based cohort study*. *PLoS One*, 2019. **14**(10): p. e0224064.
17. international, W.C.R.f. *Breast cancer statistics*. 2022 [cited 2023 9 de Febrero].
18. Marmot, M. and C.o.S.D.o. Health, *Achieving health equity: from root causes to fair outcomes*. *Lancet*, 2007. **370**(9593): p. 1153-63.
19. La Vecchia, C., et al., *Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle*. *Oncologist*, 2011. **16**(6): p. 726-9.
20. Secretan, B., et al., *A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish*. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(11): p. 1033-4.

21. Hamajima, N., et al., *Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease*. Br J Cancer, 2002. **87**(11): p. 1234-45.
22. Castro, G.D. and J.A. Castro, *Alcohol drinking and mammary cancer: Pathogenesis and potential dietary preventive alternatives*. World J Clin Oncol, 2014. **5**(4): p. 713-29.
23. Erol, A., et al., *Sex hormones in alcohol consumption: a systematic review of evidence*. Addict Biol, 2019. **24**(2): p. 157-169.
24. Singletary, K.W. and S.M. Gapstur, *Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms*. JAMA, 2001. **286**(17): p. 2143-51.
25. Chlebowski, R.T., et al., *Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(8): p. 526-35.
26. Turnbull, C. and N. Rahman, *Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 321-45.
27. Schwartz, G.F., et al., *Proceedings of the international consensus conference on breast cancer risk, genetics, & risk management, April, 2007*. Cancer, 2008. **113**(10): p. 2627-37.
28. Howlader, N., et al., *US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status*. J Natl Cancer Inst, 2014. **106**(5).
29. Rivenbark, A.G., S.M. O'Connor, and W.B. Coleman, *Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine*. Am J Pathol, 2013. **183**(4): p. 1113-1124.
30. Beral, V., et al., *Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(4): p. 296-305.
31. Prat, A., et al., *Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2014. **106**(8).
32. Harbeck, N., et al., *Breast cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2019. **5**(1): p. 66.
33. Raj-Kumar, P.K., et al., *PCA-PAM50 improves consistency between breast cancer intrinsic and clinical subtyping reclassifying a subset of luminal A tumors as luminal B*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 7956.
34. Segovia-Mendoza, M., et al., *Efficacy and mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitors gefitinib, lapatinib and neratinib in the treatment of HER2-positive breast cancer: preclinical and clinical evidence*. Am J Cancer Res, 2015. **5**(9): p. 2531-61.
35. Bou Zerdan, M., et al., *Triple Negative Breast Cancer: Updates on Classification and Treatment in 2021*. Cancers (Basel), 2022. **14**(5).
36. Roepstorff, K., et al., *Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer*. Histochem Cell Biol, 2008. **129**(5): p. 563-78.
37. Maennling, A.E., et al., *Molecular Targeting Therapy against EGFR Family in Breast Cancer: Progress and Future Potentials*. Cancers (Basel), 2019. **11**(12).
38. Castoria, G., et al., *Integrating signals between cAMP and MAPK pathways in breast cancer*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 1318-27.
39. Chen, Z., et al., *MAP kinases*. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2449-76.
40. Guerrero-Zotano, A., I.A. Mayer, and C.L. Arteaga, *PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment*. Cancer Metastasis Rev, 2016. **35**(4): p. 515-524.
41. McCubrey, J.A., et al., *Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance*. Adv Enzyme Regul, 2006. **46**: p. 249-79.

42. Filardo, E.J., et al., *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): p. 1649-60.
43. Chan, Y.T., et al., *GPER-induced signaling is essential for the survival of breast cancer stem cells*. *Int J Cancer*, 2020. **146**(6): p. 1674-1685.
44. Alexander, S.P., A. Mathie, and J.A. Peters, *Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition*. *Br J Pharmacol*, 2011. **164 Suppl 1**: p. S1-324.
45. Gurevich, E.V., et al., *G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs*. *Pharmacol Ther*, 2012. **133**(1): p. 40-69.
46. Filardo, E.J. and P. Thomas, *Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology*. *Endocrinology*, 2012. **153**(7): p. 2953-62.
47. Khalil, R.A., *Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **86**(12): p. 1627-42.
48. Revankar, C.M., et al., *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling*. *Science*, 2005. **307**(5715): p. 1625-30.
49. Lappano, R., A. Pisano, and M. Maggiolini, *GPER Function in Breast Cancer: An Overview*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014. **5**: p. 66.
50. Samartzis, E.P., et al., *The G protein-coupled estrogen receptor (GPER) is expressed in two different subcellular localizations reflecting distinct tumor properties in breast cancer*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e83296.
51. Hsu, L.H., et al., *G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(2).
52. Castoria, G., et al., *Integrating signals between cAMP and MAPK pathways in breast cancer*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 1318-27.
53. Filardo, E.J., et al., *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): p. 1649-60.
54. Segovia-Mendoza, M., et al., *Calcitriol and its analogues enhance the antiproliferative activity of gefitinib in breast cancer cells*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015. **148**: p. 122-31.
55. Vander Broek, R., et al., *The PI3K/Akt/mTOR axis in head and neck cancer: functions, aberrations, cross-talk, and therapies*. *Oral Dis*, 2015. **21**(7): p. 815-25.
56. Shen, M., et al., *Tinagl1 Suppresses Triple-Negative Breast Cancer Progression and Metastasis by Simultaneously Inhibiting Integrin/FAK and EGFR Signaling*. *Cancer Cell*, 2019. **35**(1): p. 64-80.e7.
57. Phuong, N.T., et al., *Aromatase induction in tamoxifen-resistant breast cancer: Role of phosphoinositide 3-kinase-dependent CREB activation*. *Cancer Lett*, 2014. **351**(1): p. 91-9.
58. Hofmann, F., et al., *L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function*. *Physiol Rev*, 2014. **94**(1): p. 303-26.
59. Meyer, M.R., et al., *Dilation of epicardial coronary arteries by the G protein-coupled estrogen receptor agonists G-1 and ICI 182,780*. *Pharmacology*, 2010. **86**(1): p. 58-64.
60. Bologa, C.G., et al., *Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30*. *Nat Chem Biol*, 2006. **2**(4): p. 207-12.
61. Dennis, M.K., et al., *Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2011. **127**(3-5): p. 358-66.
62. Lappano, R., et al., *MIBE acts as antagonist ligand of both estrogen receptor  $\alpha$  and GPER in breast cancer cells*. *Breast Cancer Res*, 2012. **14**(1): p. R12.

63. Mo, Z., et al., *GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer*. Breast Cancer Res, 2013. **15**(6): p. R114.
64. Filardo, E.J., et al., *Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(1): p. 70-84.
65. Ignatov, A., et al., *Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **123**(1): p. 87-96.
66. Filardo, E.J., et al., *Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(21): p. 6359-66.
67. Ignatov, T., et al., *GPER-1 expression decreases during breast cancer tumorigenesis*. Cancer Invest, 2013. **31**(5): p. 309-15.
68. Vo, D.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).
69. Sathya, S., S. Sudhagar, and B.S. Lakshmi, *Estrogen suppresses breast cancer proliferation through GPER / p38 MAPK axis during hypoxia*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2015. **417**: p. 200-210.
70. Zekas, E. and E.R. Prossnitz, *Estrogen-mediated inactivation of FOXO3a by the G protein-coupled estrogen receptor GPER*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 702.
71. Pisano, A., et al., *GPER, IGF-IR, and EGFR transduction signaling are involved in stimulatory effects of zinc in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts*. Mol Carcinog, 2017. **56**(2): p. 580-593.
72. Cheng, S.B., et al., *Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus*. Steroids, 2011. **76**(9): p. 892-6.
73. Ignatov, A., et al., *G-protein-coupled estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **128**(2): p. 466-69.
74. Ariazi, E.A., et al., *The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells*. Cancer Res, 2010. **70**(3): p. 1184-94.
75. Hsu, L.-H., et al., *G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer*. 2019. **20**(2): p. 306.
76. Fujiwara, S., et al., *GPR30 regulates the EGFR-Akt cascade and predicts lower survival in patients with ovarian cancer*. J Ovarian Res, 2012. **5**(1): p. 35.
77. Xu, T., 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): p. 100.
78. Girgert, R., G. Emons, and C. Grundker, *Inactivation of GPR30 reduces growth of triple-negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **134**(1): p. 199-205.
79. Yu, T., 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**: p. 392-403.
80. Chen, Z.J., et al., *Activation of GPER suppresses epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells via NF-kappaB signals*. Mol Oncol, 2016. **10**(6): p. 775-88.
81. Yin, L., et al., *Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress*. Breast Cancer Research, 2020. **22**(1): p. 61.
82. Lappano, R., A. Pisano, and M. Maggiolini, *GPER Function in Breast Cancer: An Overview*. Front Endocrinol (Lausanne), 2014. **5**: p. 66.
83. Gao, J.J. and S.M. Swain, *Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review*. Oncologist, 2018. **23**(5): p. 556-565.

84. Lv, X., et al., *G-1 Inhibits Breast Cancer Cell Growth via Targeting Colchicine-Binding Site of Tubulin to Interfere with Microtubule Assembly*. *Mol Cancer Ther*, 2017. **16**(6): p. 1080-1091.
85. Ariazi, E.A., et al., *The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2010. **70**(3): p. 1184-94.
86. Chan, Q.K., et al., *Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G(2) cell-cycle arrest*. *Cell Death Differ*, 2010. **17**(9): p. 1511-23.
87. Liang, S., et al., *Activation of GPER suppresses migration and angiogenesis of triple negative breast cancer via inhibition of NF- $\kappa$ B/IL-6 signals*. *Cancer Lett*, 2017. **386**: p. 12-23.
88. Prossnitz, E.R., J.B. Arterburn, and L.A. Sklar, *GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen*. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **265-266**: p. 138-42.
89. Rouhimoghadam, M., et al., *Therapeutic Perspectives on the Modulation of G-Protein Coupled Estrogen Receptor, GPER, Function*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020. **11**: p. 591217.
90. Guerrero-Zotano, A., I.A. Mayer, and C.L. Arteaga, *PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment*. *Cancer Metastasis Rev*, 2016. **35**(4): p. 524-530.
91. Molina, L., et al., *GPER-1/GPR30 a novel estrogen receptor sited in the cell membrane: therapeutic coupling to breast cancer*. *Expert Opin Ther Targets*, 2017. **21**(8): p. 755-766.
92. Yu, T., et al., *Cytoplasmic GPER translocation in cancer-associated fibroblasts mediates cAMP/PKA/CREB/glycolytic axis to confer tumor cells with multidrug resistance*. *Oncogene*, 2017. **36**(15): p. 2131-2145.
93. Wang, L.J., et al., *Dose-dependent effect of tamoxifen in tamoxifen-resistant breast cancer cells via stimulation by the ERK1/2 and AKT signaling pathways*. *Oncol Rep*, 2013. **29**(4): p. 1563-9.
94. Chimento, A., et al., *Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/ GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR3 breast cancer cells*. *Mol Nutr Food Res*, 2014. **58**(3): p. 478-89.
95. Xu, T., 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): p. 100.
96. Marjon, N.A., et al., *G protein-coupled estrogen receptor regulates mammary tumorigenesis and metastasis*. *Mol Cancer Res*, 2014. **12**(11): p. 1644-1654.
97. Bianchini, G., et al., *Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016. **13**(11): p. 674-690.
98. Sjöström, M., et al., *Lack of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in the plasma membrane is associated with excellent long-term prognosis in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. **145**(1): p. 61-71.
99. De Marco, P., et al., *Novel Aspects Concerning the Functional Cross-Talk between the Insulin/IGF-I System and Estrogen Signaling in Cancer Cells*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015. **6**: p. 30.
100. Shi, D., et al., *Inhibition of PI3K/AKT molecular pathway mediated by membrane estrogen receptor GPER accounts for cryptotanshinone induced antiproliferative effect on breast cancer SKBR-3 cells*. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2020. **21**(1): p. 32.
101. Vo, D.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. **7**(7).
102. He, Y., et al., *Tanshinone IIA Inhibits Triple-Negative Breast Cancer Cells MDA-MB-231 via G Protein-Coupled Estrogen Receptor- (GPER-) Dependent Signaling Pathway*. *Dis Markers*, 2023. **2023**: p. 8371623.

103. Faber, A.C., et al., *Differential induction of apoptosis in HER2 and EGFR addicted cancers following PI3K inhibition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(46): p. 19503-8.
104. Hernández-Silva, C.D., J.C. Villegas-Pineda, and A.L. Pereira-Suárez, *Expression and Role of the G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPR30/GPER) in the Development and Immune Response in Female Reproductive Cancers*. Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 544.
105. Broselid, S., et al., *G protein-coupled estrogen receptor is apoptotic and correlates with increased distant disease-free survival of estrogen receptor-positive breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(7): p. 1681-92.
106. Jang, Y., et al., *Clinicopathologic characteristics of HER2-positive pure mucinous carcinoma of the breast*. J Pathol Transl Med, 2020. **54**(1): p. 95-102.