



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología



Regulación estrogénica del sistema KiSS-1/KiSS-1R a través del receptor GPER-1 en células cancerosas de epitelio mamario (MCF7)

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciada en Biología

Presenta:

Pamela Reyes Ortega

Dirigido por:

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

SINODALES

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

Director

Firma

Dra. Ma. Teresa de Jesús García Gasca

Co-directora

Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Sinodal

Firma

Dr. Juan Campos Guillén

Sinodal

Firma

M. en C. Gabriel Ramiro Nava Pinto

Sinodal

Firma

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Mayo 2013

México

Resumen

Actualmente se conoce que los estrógenos juegan un papel importante en la progresión de algunos tipos de cáncer, entre los que se encuentra el cáncer de mama. El tratamiento de este tipo de cáncer ha incluido bloqueadores de la señal estrogénica como el tamoxifeno y el ICI 182,780. Sin embargo, algunos pacientes sometidos a estos tratamientos muestran o generan resistencia a los mismos. Por tal situación, se han propuesto varias hipótesis al respecto, una de las cuales postula que el efecto agonista del tamoxifeno podría ser consecuencia de la activación del receptor GPER-1. Por otra parte, diversos estudios han demostrado que el sistema KiSS-1/KiSS-1R actúa como un supresor de metástasis en numerosos tipos de cáncer en los seres humanos, inhibiendo la migración e invasión celular y afectando con ello la proliferación del cáncer. Incluso algunos estudios han señalado el posible uso de KiSS-1/KiSS-1R como un potencial biomarcador para la identificación de tumores con alto potencial metastásico y como blanco para un tratamiento eficaz para pacientes con metástasis. Debido a esto y a que se ha mostrado que los estrógenos regulan al sistema KiSS-1/KiSS-1R, en este trabajo se buscó determinar si en dicha regulación participa el receptor membranal estrogénico GPER-1. Para ello, se utilizó la respuesta de expresión de los genes KiSS-1 y KiSS-1R a la administración de 17β -estradiol en células humanas de epitelio mamario transformado (MCF7), intentando bloquearla con el compuesto G15 (antagonista del GPER-1). Los niveles de expresión de KiSS-1 y KiSS-1R se cuantificaron mediante RT-PCR. De forma esperada, se observó que el 17β -estradiol redujo aproximadamente a la mitad el nivel de expresión de ambos genes en las células MCF7. Además, se observó que los cambios en los niveles de expresión de KiSS-1 y KiSS-1R en respuesta al 17β -estradiol no fueron modificados por el co-tratamiento con tres concentraciones distintas de G15. Estos resultados sugieren que el receptor GPER-1 no participa en la regulación del sistema KiSS-1 /KiSS-1R en células MCF7.

Palabras clave: Cáncer de mama, Células MCF7, GPER-1, G15, 17β -estradiol.

Summary

Actually it is known that estrogens play an important role in the progression of some cancers, among which are breast cancer. The treatment of this cancer has included the signal blocking estrogen such as tamoxifen, and ICI 182,780. However, some patients undergoing these treatments show or generate resistance. For such a situation, several hypotheses have been generated, one of which postulates that the agonistic effect of tamoxifen may be a consequence of receptor activation GPER-1. Moreover, several studies have shown that the system KiSS-1/KiSS-1R acts as a metastasis suppressor in numerous types of human cancer, inhibiting cell migration and invasion and affecting the cancer proliferation. Even some studies have indicated the use of KiSS-1/KiSS-1R as a potential biomarker for identifying tumors with high metastatic potential, and as an effective treatment for patients with metastatic disease. Because of this and it has been shown that estrogens regulate KiSS-1/KiSS-1R system, in this paper we determine whether such regulation is involved in the membrane estrogen receptor GPER-1. For this, we used the expression of the gene KiSS-1/ KiSS-1R and the administration of 17 β -estradiol in human cells transformed mammary epithelial (MCF7), trying to lock with the compound G15 (GPER-1 antagonist). The expression levels of KiSS-1 and KiSS-1R were quantified by RT-PCR. We were observed that 17 β -estradiol reduced to approximately half the level of expression of both genes in MCF7 cells. We were also observed that changes in the expression levels of KiSS-1 and KiSS-1R in response to 17 β -estradiol was not modified by co-treatment with three different concentrations of G15. These results suggest that the GPER-1 receptor is not involved in the regulation of the KiSS-1 / KiSS-1R in MCF7 cells.

Key words: Breast cancer, MCF7 cells, GPER-1, G15, 17 β -estradiol.

Agradecimientos

Para todos aquellos que indirecta o directamente
hicieron posible la realización de esta tesis

ÍNDICE	Página
Resumen.....	i
Summary.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice.....	iv
Índice de cuadros.....	vi
Índice de figuras.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 Estrógenos.....	3
2.2 Receptores a estrógenos ER α y ER β	4
2.3 Mecanismo de acción genómica de los esteroides.....	6
2.4 Receptor GPER-1.....	7
2.5 Estrógenos y cáncer de mama.....	10
2.6 GPER-1 en cáncer de mama.....	11
2.7 Sistema KiSS-1/KiSS-1R.....	13
2.71 Sistema KiSS-1/kiSS-1R y estrógenos.....	14
2.72 Sistema KiSS-1/kiSS-1R en cáncer.....	15
2.8 Línea celular de cáncer de mama: MCF-7.....	16
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	16
5. MÉTODOS	
5.1 Cultivo celular y tratamientos.....	18
5.2 Extracción de ARN.....	19
5.3 Retrotranscripción.....	20
5.4 G15 (Antagonista de GPER-1), ER α 36 y CTGF.....	21
5.5 RT-PCR de KiSS-1 y KiSS-1R.....	22
5.6 Análisis de datos.....	24
6. RESULTADOS	
6.1 G15 (Antagonista de GPER-1), ER α 36 y CTGF.....	25
6.2 RT-PCR de KiSS-1 y KiSS-1R.....	28

7. DISCUSIONES.....	35
8. CONCLUSIONES.....	36
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

Índice de cuadros

Cuadro		Página
1.	Secuencias y tamaño de los oligonucleótidos ER α 36 y CTGF	22
2.	Secuencias y características de los oligonucleótidos β -actina, KiSS-1 y KiSS-1R	24

Índice de figuras

Figura		Página
1.	Estructura de los receptores a estrógenos alfa y beta (ER α Y ER β)	6
2.	Mecanismo de acción genómica de los esteroides	7
3.	Mecanismo de señalización mediada por los estrógenos a través de GPER-1	9
4.	Papel del GPER-1 en la resistencia al tamoxifeno	12
5.	Diagrama del producto del gen KiSS-1	13
6.	Participación de las neuronas KiSS-1 en la retroalimentación positiva y negativa de los esteroides sexuales sobre la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).	15
7.	Extracción de RNA de las células MCF7	19
8.	Amplificación del gen constitutivo β -actina	20
9.	Se muestra el método Δ Ct para calcular la cantidad relativa de RNA.	23
10.	PCR gradiente para establecer la temperatura media de hibridación del oligonucleótido de CTGF	26
11.	PCR convencional de CTGF y resultados de la densitometría	27
12.	PCR gradiente para establecer la temperatura media de hibridación de Era36	28
13.	RT-PCR de Era36	29
14.	RT-PCR de KiSS-1/KiSS-1R	32
15.	RT-PCR de KiSS-1/KiSS-1R	33
16.	RT-PCR de KiSS-1/KiSS-1R	34

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la segunda causa de muerte y el tipo de cáncer más común a nivel mundial entre mujeres de 35 a 54 años de edad (Aguas *et al.*, 2005). Se puede dividir en dos tipos de acuerdo a la presencia o ausencia de células con receptores a estrógenos (Coronato *et al.*, 2002). Actualmente se conoce que los estrógenos juegan un papel importante en la progresión de algunos tipos de cáncer entre los cuales se encuentra el cáncer de mama. El tratamiento ante este tipo de cáncer ha incluido bloqueadores de la señal estrogénica como el tamoxifeno y el ICI 182,780. Sin embargo, algunos pacientes sometidos a este tipo de tratamientos muestran resistencia a los mismos (Martínez *et al.*, 2011). Se han sugerido varias hipótesis que explican dicha resistencia, una de ellas, ha involucrado al receptor GPER-1 (anteriormente denominado GPR30) (Albanito *et al.*, 2007; Marot *et al.*, 2007; Ignatov *et al.*, 2010).

GPER-1 es un receptor a estrógenos membranal acoplado a proteínas G conocido también como GPER-1, es capaz de mediar respuestas genómicas y no genómicas inducidas por el estrógeno (Thomas *et al.*, 2005). Se encuentra tanto en la membrana plasmática como en el retículo endoplasmático y se expresa en una variedad de tejidos tanto normales como malignos (Bottino y Lanari, 2010). La resistencia al tamoxifeno esta relacionada con la sobreexpresión de EGFR y/o Her-2 ya que estos tumores son los más resistentes y agresivos a las terapias hormonales contra el cáncer de mama. Debido a que se ha observado que GPER-1 activa el factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF), que a su vez activa al factor de crecimiento epidermal (EGFR), se ha propuesto, que GPER-1 podría estar contribuyendo al crecimiento del tumor y a la resistencia a la terapia hormonal (Ignatov *et al.*, 2010). Además del receptor GPER-1, se ha realizado otros estudios con el gen KiSS-1 debido a su papel como gen supresor de metástasis (Lee *et al.*, 1996) en numerosos tipos de cáncer en los seres humanos, incluyendo el cáncer de mama (Cho *et al.*, 2012). Aunque aún no queda completamente claro el papel de KiSS-1 en contexto al cáncer (Zajac *et al.*, 2011), se ha considerado que este gen podría funcionar como un potencial

biomarcador para la identificación de tumores con alto potencial metastásico y como un tratamiento eficaz para pacientes con metástasis (Shoji *et al.* 2010).

Otros estudios como el de Marot *et al.* (2007) relacionan el sistema KiSS-1/KiSS-1R y la actividad estrogénica, demostrando que los niveles de este sistema aumentan en células MCF7 tratadas con tamoxifeno, que es un modulador selectivo de los receptores a estrógenos, y actúa como competidor de la unión a receptores de estrógenos bloqueando de esta forma sus efectos, pero como un agonista de los receptores GPER-1 (Filardo *et al.*, 2000; Revankar *et al.*, 2005). Además, en nuestro laboratorio hemos observado que el estradiol reduce la expresión del gen KiSS-1 en células MCF7 (Tamay *et al.*, resultados no publicados), con lo cual se sugiere que existe una regulación negativa entre el sistema KiSS-1/KiSS-1R y el estradiol.

Debido a la relación que se ha encontrado entre KiSS-1 y KiSS-1R y la regulación estrogénica, en este trabajo se analizó el papel de GPER-1 en la expresión del sistema KiSS-1 y KiSS-1R.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estrógenos

Los esteroides son sustancias ampliamente difundidas en la naturaleza, la mayoría juegan el papel de hormonas cumpliendo diversas funciones de regulación y modulación celular a lo largo de la vida de los individuos. Existe una gran variedad de esteroides con importantes acciones fisiológicas en animales y en el humano, entre los cuales se encuentran los estrógenos (Zárate, 1993). Estos esteroides se componen de 18 átomos de carbono y se caracterizan por tener un anillo A aromatzado con un grupo hidroxilo en el carbono 3 y un grupo hidroxilo adicional o cetónico (Tresguerres y Granados, 2000). Los principales estrógenos endógenos en el humano incluyen la estrona, el estrol y el estradiol, siendo este último el más potente de dichos esteroides (Martínez, 2007).

Los estrógenos se producen principalmente en los ovarios pero también son sintetizados en las glándulas suprarrenales, en la placenta durante el embarazo y en los testículos. En las mujeres, participan en el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales secundarias, en el control del ciclo menstrual-ovulatorio y en la modulación de algunos procesos metabólicos, mientras que en el hombre participan en la espermatogénesis (Mendoza, 2008). Aunque la acción reguladora primaria de estos esteroides se encuentra restringida principalmente a los órganos reproductivos, también participan entre otras cosas, en procesos como la síntesis y secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (Caraty et al., 1989); en la reacción inmune (Kovacs y Messingham, 2002); en el mantenimiento de huesos y sistema cardiovascular, donde tienen un efecto cardioprotector (Franco et al., 2003); además juegan un papel importante en procesos fisiológicos en el cerebro, incluyendo la cognición y el comportamiento (Srivastava et al., 2011).

2.2 Receptores a estrógenos ER α y ER β

Los receptores a estrógenos (ER) son miembros de la superfamilia de receptores nucleares. Esta superfamilia consta de 18 miembros, los cuales se dividen en clase I y II. Los receptores a hormonas esteroideas se encuentran en la clase I de receptores nucleares, entre las cuales se incluyen los receptores a estrógenos (Ellmann *et al.*, 2009). Juegan un papel importante en el desarrollo sexual y en el ciclo reproductivo de las hembras, además de estar presentes y participar en la fisiología de varios tejidos y células de ambos sexos (Ogawa *et al.*, 1998).

Las respuestas celulares a hormonas, incluyendo los esteroides son mediadas por receptores, los cuales, inician una serie de eventos celulares al unirse a su ligando, estas respuestas se dividen en dos categorías: a) Respuestas genómicas, las cuales se caracterizan por cambios en la transcripción génica y ocurren en lapsos de horas o días y b) Respuestas no genómicas o rápidas las cuales ocurren segundos o minutos después de la estimulación celular (Prossnitz y Barton, 2009).

Hasta ahora se han caracterizado dos subtipos de receptores de estrógenos nucleares, estos son: ER α y ER β y de acuerdo a la serie de eventos celulares que inician al unirse a su ligando, se encuentran dentro de la categoría de respuestas genómicas (Prossnitz y Barton, 2009). El primero en descubrirse fue el receptor a estrógenos α (ER α) en 1973 (Jensen y Desombre, 1973). Fue descrito en el útero de la rata y posteriormente clonado a partir de la línea celular de cáncer de mama en humano MCF-7 (Walter *et al.*, 1985). El RE α consiste en una proteína de 66 kDa, compuesta de dominios funcionales diferentes y 595 aminoácidos (Kumar *et al.*, 1986). Se distribuye en la hipófisis, epidídimo, riñón y glándulas suprarrenales, además de expresarse predominantemente en órganos reproductivos como útero, testículos, mama y ovario (Tresguerres y Granados, 2000). Posteriormente, en 1996, fue descubierto un segundo receptor a estrógenos β (ER β) el cual fue caracterizado y clonado a partir de próstata de rata (Kuiper *et al.*, 1996). En humanos este receptor consiste en una proteína de

530 aminoácidos y un peso molecular de 59 kDa (Zwart *et al.*, 2010). Se ha encontrado en cerebro, pulmón y vejiga, mientras que se expresa predominantemente en próstata y ovario. La expresión de ambos receptores se encuentra en hueso, testículo, ovario, útero y mama (Tresguerres y Granados, 2000).

Los dos ER se unen a secuencias de ADN en respuesta a estrógenos muy similares (Kuiper *et al.*, 1997). Estos receptores están conformados por 6 dominios que van de la A a la F y son codificados por 8-9 exones. Los dos tienen un dominio central de unión al ADN (DBD) que mediante dos dedos de zinc se unen a secuencias específicas. La región carboxilo terminal del receptor constituye el dominio de unión al ligando (LBD), el cual reconoce estrógenos como el 17 β -estradiol y antagonistas o moduladores selectivos a estrógenos (SERMs) que activan o inhiben el receptor dependiendo del contexto celular y del promotor (Kuiper *et al.*, 1998). Adicionalmente la LBD contiene una región de localización nuclear, regiones de homodimerización y un dominio de transactivación denominado AF-2 el cual es dependiente del ligando. La interacción con E2 activa al receptor promoviendo una serie de cambios conformacionales entre los que se incluye la dimerización, localización nuclear y muy importantemente una superficie sobre la región AF-2 que promueve a su interacción con coactivadores transcripcionales. Entre el DBD y el LBD existe una región variable denominada bisagra. La región amino-terminal es la más variable entre los miembros de la familia de receptores nucleares, tanto en tamaño como en secuencia de aminoácidos, y contiene una región de transactivación denominada AF-1 la cual es ligando independiente. Las regiones AF-1 y AF-2 pueden activar la transcripción de manera independiente dependiendo del contexto celular del promotor. Por último en la región N—terminal existen diversos sitios de fosforilación los cuales son regulados por una variedad de proteínas cinasas (Noriega y Langley, 2008). A comparación de ER α , ER β no tiene una región AF-1, solamente contiene la región AF-2 (Fig. 1), tal diferencia en las regiones AF modifica la actividad en el complejo estrógeno-ER resultando en el incremento o decremento de la actividad estrogénica (Teicher, 2006). ER α y ER β son codificados por genes separados,

ESR1 y ESR2, respectivamente, sin embargo, ambos genes son homólogos en el dominio de unión al ADN (97% de similitud de los aminoácidos) y en el dominio de unión al ligando (60% de similitud de los aminoácidos) (Hall *et al.*, 2001). A pesar de esta similitud, se ha sugerido que ER α y ER β tienen funciones fisiológicas diferentes, ya que en algunos órganos su actividad es completamente opuesta (Wang *et al.*, 2010).



Figura 1. Estructura de los receptores a estrógenos alfa y beta (ER α y ER β). NTD (*dominio NH₂-terminal*). DBD (*dominio central de unión al ADN*). LDB (*dominio de unión al ligando*) (Noriega y Langley, 2008).

2.3 Mecanismo de acción genómica de los esteroides

En situaciones basales, los receptores de estrógenos se encuentran unidos a proteínas como las heat shock proteins (HSP) 90, 70 y 56, éstas impiden su unión a la cromatina y los mantienen en forma inactiva, por lo que cuando encuentran a su ligando, se unen a éste con gran afinidad (Tresguerres y Granados, 2000). Cuando ocurre la interacción entre el estrógeno y su receptor, se induce un cambio conformacional del ER, que hace que éste pierda afinidad por sus proteínas reguladoras. Es en este nuevo estado cuando el ER puede interactuar con otras proteínas correguladoras formando el complejo estrógeno-ER, la formación de éste dímero es la forma activa, de ésta manera interactúa con los elementos de respuesta a estrógenos (EREs). EREs es secuencia nucleotídica específica que consiste en una secuencia palindrómica separada por tres nucleótidos que son variables (GGTCAnnnTGACC), típicamente se localiza en el extremo 5' de los genes de respuesta a estrógenos, presentes en los promotores o enhancers de los genes diana (Prossnitz *et al.*, 2008), dicha

interacción se realiza debido a que los estrógenos poseen una zona con estructura de dedos de zinc que está constituida por 4 residuos de cisteína, cada uno de estos tiene un átomo de zinc, lo que ayuda a la interacción de la hormona-receptor con las secuencias génicas EREs regulando la transcripción de genes específicos (Fig. 2) (Seredynski *et al.*,2011).

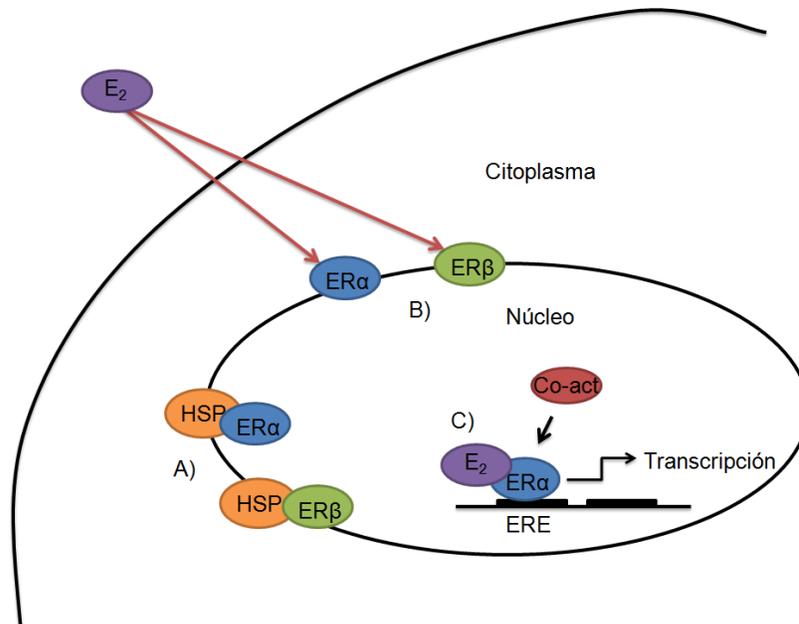


Figura 2. Mecanismo de acción genómica de los esteroides: A) Cuando los receptores se encuentran unidos a otras proteínas como las heat shock proteins (HSP) 90, 70 Y 56, éstas impiden su unión a la cromatina y los mantienen en forma inactiva. **B)** Una vez que ocurre la interacción entre el ligando y el estrógeno se induce un cambio conformacional del receptor de estrógeno (RE), **C)** así se genera un dímero que es la forma activa, posteriormente dicha forma se transloca al núcleo interaccionando con los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) regulando la transcripción de genes específicos (Prossnitz *et al.*, 2008),

2.4 Receptor GPER-1

El receptor membranal a estrógenos GPER-1 fue identificado en distintas células por cuatro laboratorios diferentes durante 1996-1998 (Owman *et al.*, 1996; Takada *et al.*, 1997; Carmenci *et al.*, 1997; O'Dowd *et al.*, 1998), sin embargo, la identificación inicial del originalmente llamado GPR30 como receptor a estrógenos ocurrió en células de cáncer de mama de la línea celular MCF-7 (Carmenci *et al.*,

1997). GPER-1 es un receptor membranal acoplado a proteínas G, miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y a diferencia de los receptores nucleares a estrógenos, responde con una alta afinidad al estradiol y muy baja para otros esteroides (Thomas *et al.*, 2005). Se encuentra tanto en la membrana plasmática como en el retículo endoplasmático y se expresa en una variedad de tejidos tanto normales como malignos, encontrando gran cantidad de éste en corazón, pulmones, intestino, ovarios y cerebro (Bottino y Lanari, 2010). En estudios de inmunohistoquímica se observó que en el ratón se expresa en el tracto reproductor masculino, en epitelio y músculo. En rata se ha detectado en cerebro, placenta, tejidos embrionarios y fetales. En tejidos humanos, se ha encontrado que el epitelio glandular mamario, al igual que la mayoría de las regiones del cerebro. El tejido adiposo y el músculo esquelético resultan moderadamente positivos y algunos linfomas también lo expresan (Prossnitz *et al.*, 2008).

GPER-1 es capaz de mediar respuestas genómicas y no genómicas inducidas por el estrógeno. Aunque la vía de señalización de GPER-1 (Fig. 3) no ha sido completamente elucidada se ha descrito la posible vía de éste receptor a estrógenos. Los estrógenos son libremente permeables a las células, accediendo de ésta manera a los receptores a estrógenos, lo que es necesario en las células que no expresan GPER-1 en la superficie de la membrana celular (Wang *et al.*, 2010). Cuando GPER-1 se une a los estrógenos, éste se activa, y también se activan proteínas G heterodiméricas que a su vez pueden activar múltiples efectores incluyendo la adenilciclase (resultando en la producción de cAMP), Src y esfingosina kinasa (SphK). Las últimas dos vías parecen estar involucradas en la activación de metaloproteinasas de matriz (MMPs), éstas se unen con pro-HB-EGF liberando al factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF) que luego puede transcribir al receptor del factor epidermal de crecimiento (EGFRs). Éste puede llevar a la activación de múltiples eventos incluyendo la fosfolipasa C (PLC), la mitogénica activación de proteínas kinasas (MAPKs), y fosfatidilinositol 3- kinasa (PI3Ks). La activación de PLC conduce a la movilización de calcio intracelular por acción de inositol trifosfato (IP3). La activación de MAPKs

y P13Ks activa a numerosas vías citosólicas, proteínas nucleares y regula factores de transcripción. Así la estimulación del estrógeno puede dar lugar a la transcripción de genes diana cuyos promotores no contienen el elemento de respuesta a estrógenos. La combinación de efectos de ésta señalización citosólica y la transcripción nuclear resulta en la proliferación celular (Prossnitz *et al.*, 2008).

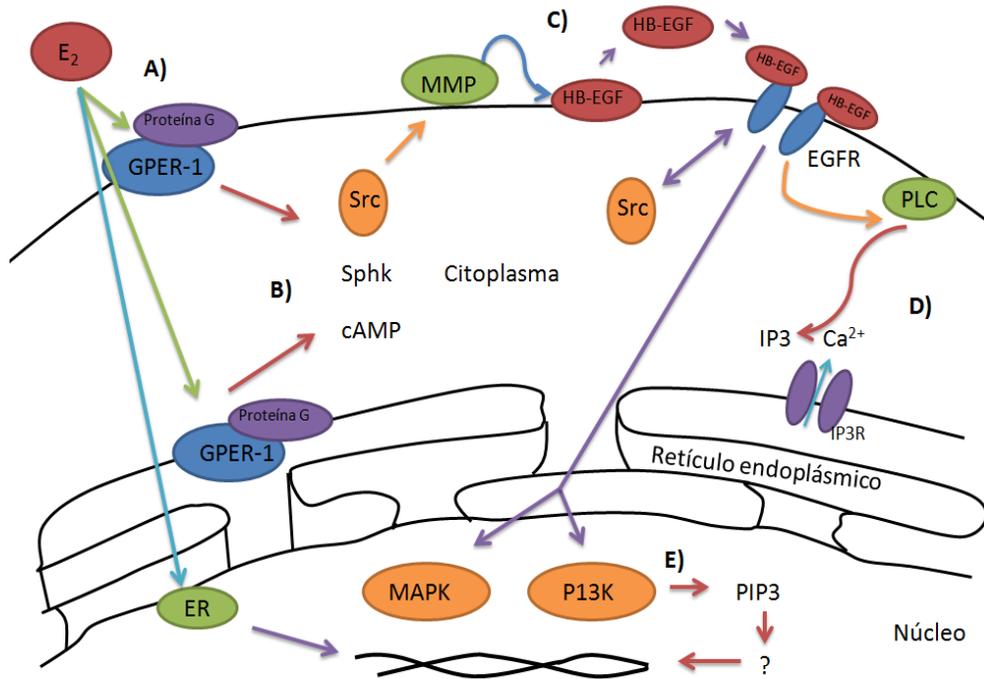


Figura 3. Mecanismo de señalización mediada por los estrógenos a través de GPER-1. A) Una vez que los estrógenos se unen a GPER-1, éste se activa. B) Cuando GPER-1 está activo, se activan también proteínas G heterodiméricas que a su vez pueden activar múltiples efectores incluyendo la adenilato ciclasa, Src y esfingosina kinasa (SphK). C) Estas dos últimas vías parecen estar involucradas en la activación de metaloproteinasas de matriz (MMPs), a su vez, éstas se unen con pro-HB-EGF liberando HB-EGF que luego puede transcribir al receptor del factor epidermal de crecimiento (EGFRs), D) este puede llevar a la activación de múltiples eventos incluyendo la activación de la fosfolipasa C (PLC), mitogénica activación de proteínas kinasas (MAPKs), y fosfatidilinositol 3- kinasa (PI3Ks). La activación del PLC conduce a la movilización de calcio intracelular por acción de inositol trifosfato (IP3). E) La activación de MAPKs y P13Ks activa a numerosas vías citosólicas, proteínas nucleares y regula factores de transcripción (Prossnitz *et al.*, 2008).

2.5 Estrógenos y cáncer de mama

El cáncer de mama es la segunda causa de muerte y el tipo de cáncer más común a nivel mundial entre mujeres de 35-54 años de edad (Aguas *et al.*, 2005). Se puede dividir en dos tipos de acuerdo a la presencia o ausencia de células con receptores a estrógenos de tal manera que algunos autores los consideran entidades diferentes (Coronato *et al.*, 2002). Esta conexión entre el cáncer de mama y los estrógenos se observó desde hace más de 100 años cuando George Beatson demostró que la ooforectomía bilateral resultaba en la remisión de cáncer de mama en mujeres premenopáusicas (Clemons y Goss, 2001), sin embargo, fue hasta 1973 cuando Engelsman describió la presencia de receptores de estrógeno en tumores de mama (Engelsman *et al.*, 1973). Ahora se conoce que dichos esteroides juegan un papel importante en el desarrollo y crecimiento del cáncer de mama, esto debido a que se ha observado que promueven el desarrollo del cáncer ejerciendo efectos proliferativos directos e indirectos en roedores y células cultivadas de cáncer de mama en humanos (Clemons y Goss, 2001).

Durante 1960 y 1970 se generaron y probaron una serie de antiestrógenos con el fin de utilizarlos como tratamientos para el cáncer de mama con receptor hormonal positivo, de entre los cuales, el tamoxifeno fue considerado uno de los más seguros para el uso clínico (Teicher, 2006). El tamoxifeno que es un modulador selectivo de los receptores a estrógenos, actúa como competidor de la unión a receptores de estrógenos nucleares bloqueando de esta forma sus efectos (Abdulkareem y Zurmi, 2012). Sin embargo, para el receptor membranal GPER-1, el tamoxifeno actúa como un agonista (Filardo *et al.*, 2000; Revankar *et al.*, 2005). Otra de las drogas utilizadas es el ICI 182780 que se considera un antiestrógeno puro ya que solo presenta actividad antagonista al estradiol (Howell *et al.*, 2000). Aproximadamente el 50% de los pacientes responden correctamente a este tipo de tratamientos, sin embargo, el otro 50% de los pacientes no lo hace, o bien, después de cierto tiempo dejan de responder a éste, ya que muchos de los tumores de cáncer de mama se vuelven o son resistentes a la terapia (Teicher,

2006). Aunque aún no se conoce la razón de tal resistencia, se han generado distintas explicaciones a tal situación.

2.6 GPER-1 en cáncer de mama

Entre las explicaciones que se le han dado a la resistencia que presentan algunos pacientes con cáncer de mama a tratamientos con tamoxifeno, se encuentra la reducción o pérdida en la expresión de receptores a estrógenos que afectan el correcto funcionamiento de ciertos agentes hormonales, así mismo se cree que el incremento en la señalización del factor de crecimiento también juega un papel importante en el desarrollo de la resistencia (Filardo *et al.*, 2000, Ignatov *et al.*, 2010). El factor de crecimiento puede estimular la actividad de los receptores a estrógenos en ausencia de un ligando denominado “ligando-independiente”. Se ha propuesto que éste fenómeno está asociado con la sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her-2) y de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) (Ignatov *et al.*, 2010). Este receptor es miembro de la familia ErbB relacionada con los receptores tirosina quinasa, está implicado en el control celular como la supervivencia, proliferación, angiogénesis y metástasis (Zajac *et al.*, 2011). Lo anterior se encuentra soportado por evidencia clínica, puesto que se ha visto que la resistencia al tamoxifeno está relacionada con la sobreexpresión de EGFR y/o Her-2 ya que estos tumores son los más resistentes y agresivos a las terapias hormonales contra el cáncer de mama. GPER-1 media los efectos proliferativos de los estrógenos en células de cáncer de mama, células de cáncer endometrial y células de cáncer de ovario. Particularmente en células de cáncer de mama GPER-1 activa el factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF), que a su vez activa al factor de crecimiento epidermal (EGFR), por tanto, GPER-1 y EGFR podrían ser considerados vehículos para la acción de los estrógenos. Sugiriendo con esto que GPER-1 podría estar contribuyendo al crecimiento del tumor y a la resistencia a la terapia hormonal (Fig. 4) (Ignatov *et al.*, 2010).

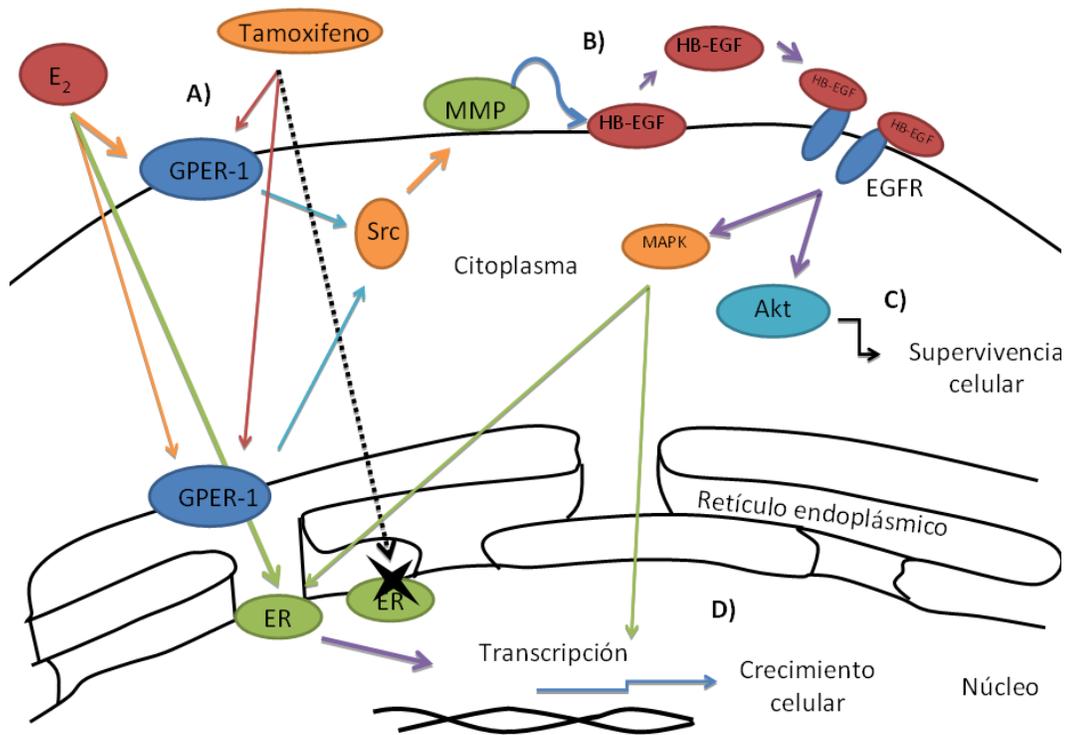


Figura 4. Papel de GPER-1 en la resistencia al tamoxifeno. A) Se ha propuesto que el tamoxifeno, que funciona como antagonista de los receptores a estrógenos funciona como un agonista de GPER-1 B) provocando la activación del factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina(HB-EGF), que a su vez activa al factor de crecimiento epidérmico (EGFR). C, D) La sobreexpresión de EGFR y/o Her-2 se relaciona con la resistencia al tamoxifeno, contribuyendo al crecimiento del cáncer de mama. La sobreexpresión de EGFR y/o Her-2 estimula a su vez la actividad de los receptores a estrógenos (Prossnitz *et al.*, 2008).

La expresión de GPER-1 se ha detectado en por lo menos cuatro tipos de cáncer de humano incluyendo el cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de tiroides y cáncer de mama (Wang *et al.*, 2010). Se ha demostrado que en muestras de pacientes con cáncer de mama el 62% de los tumores invasivos expresan GPER-1, además, se ha observado que tiene una influencia independiente de la respuesta a estrógenos. Por tanto, GPER-1 se ha considerado como un factor pronóstico negativo al cáncer de mama ya que está relacionado con el riesgo a desarrollar metástasis (Filardo *et al.* 2006).

2.7 Sistema KiSS-1/KiSS-1R

En 1996 se identificó a KiSS-1 como un gen supresor de metástasis (Lee *et al.*, 1996). Posteriormente se reconoció su papel en el desarrollo de la pubertad y algunos estudios mostraron su relación con el embarazo cuando observaron un aumento significativo de la kisspeptina circulante de hasta 7000 veces superior a la normal, aunque aún es desconocida su función ante tal situación (Seminara *et al.*, 2003). El gen KiSS-1 fue nombrado así debido a que fue clonado en Hershey, Pennsylvania, una ciudad conocida por hacer los chocolates kisses (Popa *et al.*, 2008). El producto del gen KiSS-1 es una proteína precursora de 145 aminoácidos que por procesamiento proteolítico resulta en la generación de la metastina (54 aminoácidos) y otros péptidos de menor tamaño, tales como kisspeptina-14, kisspeptina-13 y kisspeptina-10 (Fig.5), que forman la familia de las kisspeptinas (Roseweir y Millar, 2009). El receptor de KiSS-1 es GPR54 también conocido como KiSS1-R, Hot7t175 o AXOR12 (Olbrich *et al.*, 2010), fue identificado en 1999 como un receptor huérfano acoplado a proteínas G con siete dominios transmembrana y cierto grado de similitud del 45% con los receptores de Galanina (Lee *et al.*, 1999). Este receptor emplea la ruta de los inosítoles fosfato y calcio intracelular, resultando su activación en la producción de ácido araquidónico y la fosforilación de kinasas intracelulares, tales como ERK 1/2 y p38 kinasa (Kotani *et al.*, 2001).

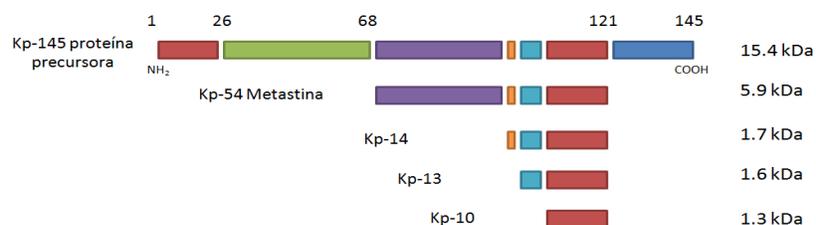


Figura 5. Diagrama del producto del gen KiSS-1. Primeramente se genera una proteína precursora de 145 aminoácidos que por procesamiento proteolítico resulta en la generación de la metastina (54 aminoácidos) y otros péptidos de menor tamaño, tales como kisspeptina-14, kisspeptina-13 y kisspeptina-10 (Roseweir y Millar, 2009).

2.71 Sistema KiSS-1/kiSS-1R y estrógenos

La evidencia sugiere que las kisspeptinas y el receptor KiSS-1R funcionan como estimulantes a las neuronas GnRHérgicas, y estos a su vez son regulados por los esteroides sexuales. Las neuronas que expresan Kisspeptina expresan el receptor a estrógenos alfa, el receptor de progesterona y el receptor de andrógenos. También expresan receptores a estrógenos beta, sin embargo, estos no juegan ningún papel como estimulantes de las neuronas GnRHérgicas (Dedes, 2012). Aunque la interacción de las neuronas KiSS-1 con la gran cantidad de circuitos excitatorios e inhibitorios implicados en el control de la secreción de la GnRH, aún no se ha definido completamente, la regulación del eje gonadotrópico parece funcionar a través de la modulación de KiSS-1, incluyendo los esteroides gonadales como el estrógeno y la testosterona. La regulación de la expresión de los esteroides parece ser específica, pues en el Núcleo Arcuato (ARC) se suprimen los niveles de KiSS-1, mientras que en el Núcleo Anteroventral Periventricular (AVPV) aumentan, proporcionando de esta manera el control de retroalimentación positiva y negativa en la secreción de gonadotropinas (Fig. 6) (Tena, 2006; Popa *et al.*, 2008). Curiosamente la gonadectomía en ratones provoca un aumento del ARNm de KiSS-1 en ARC y una disminución en el AVPV (Dedes, 2012). Además, el estado nutricional modula la expresión y función de KiSS-1 en el hipotálamo probablemente a través de la leptina, producida por el tejido adiposo (Tena, 2006).

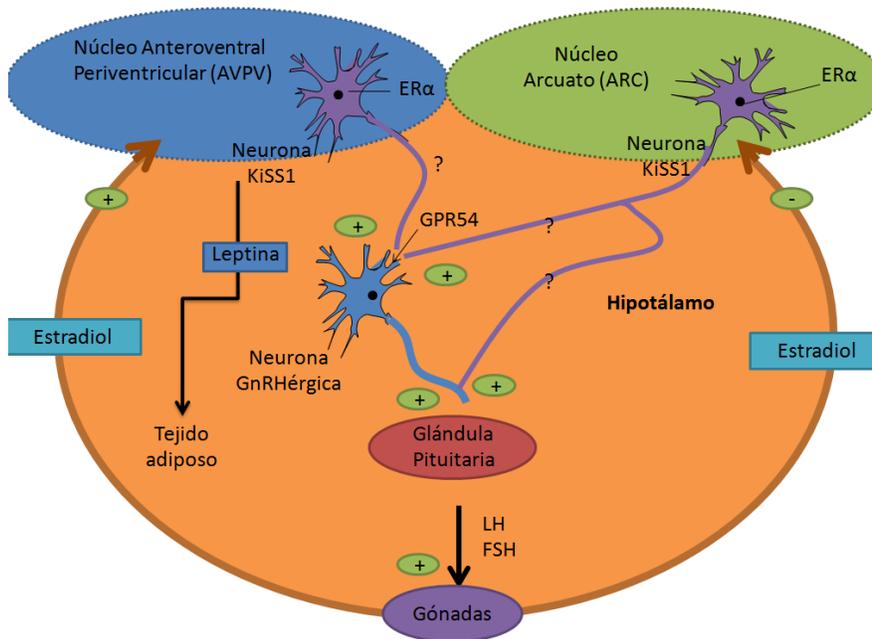


Fig. 6. Participación de las neuronas KiSS-1 en la retroalimentación positiva y negativa de los esteroides sexuales sobre la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). La Kisspeptina excita a las neuronas GnRHérgicas estimulando la liberación de GnRH a través de su receptor GPR54. Esto provoca un aumento en la secreción de gonadotropinas en la glándula pituitaria, que a su vez, estimula la síntesis de esteroides sexuales y la secreción de las gónadas. Los esteroides sexuales regulan la expresión de KiSS-1, de tal manera que en el núcleo arcuato (ARC) hay una disminución en la entrada de kiSS-1, con lo que disminuye la liberación de GnRH y de gonadotropinas, mientras que en el núcleo anteroventral periventricular (AVPV) aumenta la entrada de kisspeptina y por tanto, la liberación de GnRH (Dedes, 2012).

2.72 Sistema KiSS-1/KiSS-1R en cáncer

Aunque algunos estudios han demostrado que KiSS-1/KiSS-1R actúa como un supresor de metástasis en numerosos tipos de cáncer en los seres humanos, inhibiendo la migración e invasión celular y afectando con ello la proliferación del cáncer (Cho *et al.*, 2012), resultados contrarios a esto se han encontrado en estudios en los que se demuestra que existe un aumento en la expresión del sistema KiSS-1/KiSS-1R en tumores de mama (Martin *et al.*, 2005; Jarzabek *et al.*, 2012). Además, un aumento en la expresión de dicho sistema se ha correlacionado con mayor potencial metastásico y grados de tumor más altos.

Estudios recientes muestran que la kisspeptina-10 (Kp-10), estimula la invasión de las células del cáncer de mama en humano (Zajac *et al.*, 2011).

2.8 Línea celular de cáncer de mama: MCF-7

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 deriva en 1970 de una efusión pleural de un adenocarcinoma de mama metastático, la paciente tenía 69 años de edad y su enfermedad respondía a la terapia hormonal (Levenson y Jordan, 1997). Posteriormente, se realizaron distintas investigaciones sobre esta línea celular encontrando que el tamoxifeno inhibe el crecimiento del cáncer de mama (Lippman y Bolan, 1975), así mismo se identificaron los receptores para glucocorticoides, progestinas, andrógenos y los receptores a estrógenos (Horwitz *et al.*, 1975). Debido a sus características y a la manera en que responden a los estrógenos, son un excelente modelo *in vitro* para el estudio de los mecanismo de respuesta de tumores a terapias endócrinas (Levenson y Jordan, 1997). Además, esta línea celular expresa el receptor GPER-1 (Filardo *et al.*, 2000).

3. HIPÓTESIS

En vista de la información anterior, se planteó la hipótesis de que al menos una parte del mecanismo de regulación estrogénica de la función del epitelio mamario está mediado por el receptor membranal GPER-1.

De ser correcta esta hipótesis, implicaría que dicho efecto estrogénico podría ser bloqueado por un antagonista específico de este receptor. Dado que un antagonista con estas propiedades ha sido recientemente introducido al mercado (G15), nos propusimos examinar la expresión del gen KiSS-1 como un monitor de la acción estrogénica, y probar el efecto del antagonista G15 el cual debería inhibir o bloquear dicha acción.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la participación del receptor membranal estrogénico GPER-1 en la expresión de KiSS-1 y KiSS-1R en células MCF7.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto del 17β -estradiol sobre la expresión de KiSS-1 y KiSS-1R en células MCF7.
- Determinar la actividad de G15 a través de medir la expresión de CTGF y ER α 36.
- Determinar la capacidad del G15 para bloquear el efecto del 17β -estradiol sobre la expresión de KiSS-1 y KiSS-1R en células MCF7.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo celular y tratamientos

Para la realización del presente trabajo se utilizó la línea de células cancerosas de epitelio mamario (MCF7). Se utilizó medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco BRL, Life Technologies Corporation) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (GIBCO™), 10 µg/ml de penicilina/estreptomicina (GIBCO™) y 100 µg/ml de normocina (InvivoGen) a una dilución 1:500. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37° C y una atmósfera de 5% de CO₂ en el aire. El medio de cultivo se cambió cada tercer día y las células se subcultivaron al llegar a una confluencia del 80 al 90%. Para realizar los subcultivos se utilizó tripsina (GIBCO™), ésta se colocó durante 5 minutos hasta que las células se despegaron de la caja, enseguida se realizó una centrifugación de 1500 rpm por cinco minutos. Posteriormente el paquete celular se resuspendió en medio DMEM, sembrándolas en nuevas cajas petri a menor densidad hasta conseguir la cantidad de células necesarias para realizar el experimento. Posteriormente, con el objeto de evitar cualquier efecto debido a esteroides presentes en el medio de cultivo, éste se sustituyó 24 horas antes de los tratamientos por un medio de cultivo sin suero libre de rojo fenol (OPTI-MEM GIBCO INVITROGEN™), aplicando después de esas 24 horas, los tratamientos correspondientes.

Se realizaron cuatro grupos de tratamientos tal y como se describe a continuación, realizando 4 réplicas para cada tratamiento.

- **Grupo 1:** Se le colocó DMSO, utilizándolo como grupo control
- **Grupo 2:** A éste grupo, se le colocó G15
- **Grupo 3:** A éste grupo se le colocó 17-β-estradiol
- **Grupo 4:** A éste grupo de células se les agregó G15 y 17-β-estradiol

En el caso del grupo 4, con el fin de asegurar que G15 inhibiera a GPER-1, éste se colocó 3 horas antes de colocar el estradiol.

Se utilizaron 3 concentraciones distintas para G15: 20nM, 600 nM y 1 μ M. La primera concentración se utilizó debido a que el trabajo de Dennis *et al.* (2009) muestra que G15 se une a GPER-1 con una afinidad aproximada de 20nM. Los estudios de Dennis *et al.* (2011) han mostrado que concentraciones de G15 mayores de 1 μ M resultan en la activación débil de ERE, sugiriendo que a altas concentraciones dicho antagonista se comporta como parcial agonista de la transcripción mediada por ERs. La concentración de 600nM se utilizó con el fin de asegurar que con la concentración de 1 μ M no se estaba observando el efecto parcial agonista de G15. La concentración de 1 μ M se utilizó debido a que el trabajo de Wallacides *et al.* (2012) muestra que una concentración de 1 μ M es suficiente para observar el efecto antagonista de G15 sobre la expresión de ER α 36. Mientras tanto, para el 17- β -estradiol solo se utilizó la concentración de 10 nM, ya los estudios de Tamay *et al.* (2008, resultados no publicados) muestran que esta concentración es suficiente para observar los efectos del estradiol sobre la expresión de KiSS-1 en las células MCF7.

5.2 Extracción de ARN

A cada tratamiento se le extrajo el ARN utilizando el método de extracción fenólica con TRIZOL (ReagentinvitrogenTMLife Technologies) de Chomczynski (Chomczynski y Sacchi, 1987). El ARN extraído se cuantificó con un espectrofotómetro (NANODROP ND-1000) y con el fin de comprobar la calidad del mismo se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1% identificándolo con la incorporación de Bromuro de Etidio 10 mg/ml (INVITROGENTM) (Fig. 7).

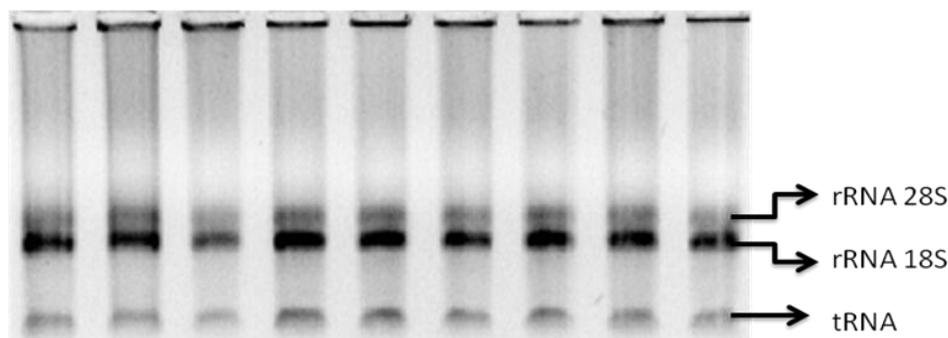


Fig.7. Extracción de RNA de las células MCF7.

5.3 Retrotranscripción

Del ARN obtenido se realizó una retrotranscripción para sintetizar la cadena complementaria de ADN (cDNA) a partir de 3 µg de ARN utilizando el kit high capacity cDNA reverse transcription kits (INVITROGEN™). El volumen total de la mezcla fue de 20 µl, la reacción se encontraba compuesta de 2µl de 10X RT Buffer, 0.8 µl de 25X dNTP Mix (100nM), 2µl de 10X RT Random Primers, 1µl de Transcriptasa reversa, 4.2 µl de Agua y 10 µl de ARN. Las condiciones de la reacción fueron: una primera fase de 10 minutos a 25°C, la segunda fase de 120 minutos a 37°C y una tercera fase de 5 minutos a 85°C. Posteriormente, para conocer la calidad de las reacciones se realizó un PCR convencional amplificando para el gen constitutivo β-actina, a cada reacción se le colocaron 5µl de Master mix (Promega), que contiene *Taq* DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y buffer, se colocaron también 0.25µl a una concentración de 4µM de cada oligonucleótido de β-actina, 1µl de cDNA y 3.5µl de agua. El total de ciclos fue de 23: la primera fase, de desnaturalización fue de 2 minutos a 94°C y 10 segundos a 94°C, la segunda fase, fase de hibridación fue de 20 segundos a 59°C, y la tercera fase, la de síntesis del complemento correspondiente a la región a amplificar fue de 30 segundos a 72°C y 5 minutos a 72°C. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% identificándolo con la incorporación de Bromuro de etidio 10 mg/ml (INVITROGEN™) (Fig. 8).

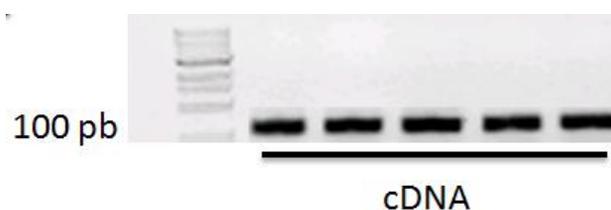


Fig. 8. Amplificación del gen constitutivo β-actina, para comprobar la calidad del cDNA obtenido de la retrotranscripción.

5.4 G15 (Antagonista de GPER-1), CTGF y ER α 36

Para conocer si G15 realmente funcionó como antagonista de GPER-1, se diseñaron oligonucleótidos para determinar la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y ER α 36 (Cuadro 1). Ambos responden a GPER-1, pues se ha reportado que CTGF se activa cuando GPER-1 también se encuentra activo (Pandey *et al.* 2009), por otra parte, se ha observado que los niveles de ER α 36 disminuyen cuando GPER-1 se encuentra bloqueado (Wallacides *et al.* 2012).

Para establecer la temperatura media de hibridación de los oligonucleótidos de CTGF y ER α 36 se realizó un PCR gradiente con las siguientes temperaturas 55.2, 56.7, 59.1, 61.7, 63.9 y 64.9 °C.

Posteriormente para CTGF se realizó una PCR convencional, utilizando los tratamientos control, tratamientos con estradiol (10nM) y tratamientos con estradiol (10nM) y G15 (1 μ M). Las condiciones del PCR fueron las siguientes: a cada reacción se le colocaron 5 μ l de Master mix (Promega), que contiene *Taq* DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y buffer, se colocaron también 0.25 μ l a una concentración de 4 μ M de cada oligonucleótido de β -actina, 1 μ l de cDNA y 3.5 μ l de agua. El total de ciclos del PCR fue de 35: la primera fase, de desnaturalización fue de 2 minutos a 94°C y 10 segundos a 94°C, la segunda fase, fase de hibridación, fue de 20 segundos a 59°C, y la tercera fase, la de síntesis del complemento correspondiente a la región a amplificar fue de 30 segundos a 72°C y 5 minutos a 72°C. Finalmente se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% identificándolo con la incorporación de Bromuro de etidio 10 mg/ml (INVITROGEN™). Los resultados obtenidos se analizaron mediante una densitometría utilizando el programa image j, posteriormente los resultados obtenidos se analizaron con el programa SAS (2006).

Para ER α 36 se realizó un RT-PCR bajo las mismas condiciones que se utilizaron para realizar el RT-PCR de KiSS-1 y KiSS-1R mostradas más adelante.

Cuadro 1. Secuencias y tamaño de los oligonucleótidos utilizados para realizar el control positivo de G15.

Gen	Secuencias (5´-3´)	Tamaño (pb)
CTGF	GCAAGTACCAGTGCACGTG CGTGTCTTCCAGTCGGTAAG	203
ER α 36	GTTCAACCACAACCTGTCTG TTTCAGCTCTGCTGTCCA	155

5.5 RT-PCR de KiSS-1 y KiSS-1R

El PCR cuantitativo para KiSS-1 y KiSS-1R se realizó usando, una molécula de bajo peso molecular que presenta afinidad por el DNA de doble cadena y al ser oxidado fluoresce. La fluorescencia emitida por el SYBR[®] Green es directamente proporcional al número de copias de DNA obtenido en cada ciclo del PCR y es monitoreada durante cada ciclo de la reacción. La fluorescencia evaluada es la que se produce durante la fase de crecimiento exponencial temprana y el ciclo de PCR en el que se produce es denominado Ct (curve threshold) o Cp (crossingpoint). Éste valor está relacionado con el número de copias blanco que posee la muestra que se está evaluando, lo cual permite que a través de la PCR en tiempo real se realice la cuantificación con una alta sensibilidad y especificidad (Innis *et al.*, 1999).

El número de copias relativas entre dos muestras se determina por los valores de Ct. Debido a que el PCR es un proceso exponencial, el número de copias relativo es equivalente a la eficiencia del PCR elevado a la potencia de la diferencia de los valores de Ct de las dos muestras a comparar. Para realizar los cálculos se supone que la eficiencia de la reacción es igual entre las muestras y que ésta es del 100 %. Por ser una reacción exponencial, una eficiencia del 100 % duplica la cantidad de productos en cada ciclo de la reacción, por lo que se le atribuye un valor de 2. Debido a que es muy difícil mantener cantidades exactas de DNA en las diferentes muestras, los resultados del gen a cuantificar se normalizan en base a una referencia, para lo cual se emplea un gen constitutivo. En base a lo anterior los cálculos se realizaron de la siguiente manera (Fig. 9): para normalizar las concentraciones de cDNA se obtuvo la diferencia entre los

valores de Ct de la muestra y los valores de Ct del gen constitutivo. El dato obtenido de esta diferencia es ΔCt . A continuación se calculó la diferencia entre ΔCt del grupo tratado y el grupo control, obteniendo el dato denominado $\Delta\Delta Ct$. Posteriormente se obtuvo la cantidad relativa de RNA elevando 2 el dato $\Delta\Delta Ct$ (Bernard y Wittwer, 2002).

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{gen constitutivo}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tratado}} - \Delta Ct_{\text{control}}$$

$$\text{Cantidad relativa} = 2^{-(-\Delta\Delta Ct)}$$

Figura 9. Se muestra el método ΔCt para calcular la cantidad relativa de RNA.

En base a lo anterior, se diseñaron los oligonucleótidos y se cuantificaron los niveles del gen KiSS-1, KiSS-1R (Cuadro 2) y ER α 36 (Cuadro1), utilizando como referencia el gen constitutivo β -actina, debido a que trabajos como el de Ehrenfeld *et al.* (2011) se muestra que dicho gen funciona como buen gen constitutivo en células MCF7. La cantidad total de la reacción fue de 10 μ l, la cual contenía 5 μ l de SYBR[®]Green con los oligonucleótidos correspondientes a una concentración de 25 μ M y 5 μ l de cDNA de cada uno de los tratamientos.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: Un ciclo de 10 minutos a 95° C para activar la enzima polimerasa mediante la desnaturalización del anticuerpo acoplado a ésta (hot start), después se sometió a 95°C por 10 segundos para la desnaturalización del cDNA, seguido de 15 segundos a la temperatura media de hibridación de cada uno de los oligonucleotidos iniciadores, para los 4 genes utilizados (ER α 36, KiSS-1, KiSS-1R y el gen constitutivo utilizado como referencia, β -actina) se utilizó una temperatura de 60°C, se continuó con 30 segundos a 72°C para el proceso de polimerización. Posteriormente, un ciclo de transición de 65°C por 5 segundos y 94°C por 5 segundos para determinar la especificidad del producto amplificado. La especificidad de la amplificación se evaluó mediante una curva de disociación. Para lo cual se realizaron mediciones continuas de la fluorescencia abarcando un rango de temperaturas que inicia a

partir de 65°C hasta 94°C. De esta manera es posible identificar la temperatura en la que se disocian las cadenas de ADN correspondientes al producto amplificado, esta temperatura es específica para cada fragmento de ADN según su tamaño y secuencia. Este dato permite identificar la presencia de dímeros, amplificaciones inespecíficas o mutaciones puesto que al graficarse se observarían varios picos de disociación. Asimismo, se presentará solamente un pico de disociación si se trata de un producto único. Finalmente, una fase de 40°C por 30 segundos. Los resultados del proceso RT-PCR se analizaron con el software del sistema LightCycler™, éste lleva a cabo automáticamente el proceso de detección construyendo una gráfica de la detección de fluorescencia en función de la temperatura.

Cuadro 2. Secuencias y características de los oligonucleótidos utilizados para realizar el RT-PCR

Gen	Secuencias (5'-3')	Tamaño (pb)
β-actina	fw:CCATCATGAAGTGTGACGTTG rw:ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA	173
KiSS-1	fw: ACTCACTGGTTTCTTGGCAGC rw: ACCTTTTCTAATGGCTCCCA	71
KiSS-1R	fw: AACTTCTACATCGCCAACCTG rw: CACCGAGACCTGCTGGATGTA	151

5.6 Análisis de datos

Los datos se analizaron en el programa SAS (2006), para conocer la normalidad de los datos, se realizaron las pruebas de normalidad de Shapiro-wilk y Kolmogorov-smirnov. Debido al comportamiento normal que presentaron todos los datos, se realizó una prueba ANOVA. En los casos en que se encontraron diferencias significativas, se realizó una prueba de Tukey para conocer entre que tratamientos se encontraban dichas diferencias.

6. RESULTADOS

6.1 G15 (Antagonista de GPER-1), CTGF y ER α 36

CTGF

Con el propósito de determinar la eficacia del compuesto G15, en particular si este funciona como antagonista del GPER-1, se buscó un indicador que permitiera examinar el funcionamiento del mismo. Debido a que los estudios de Pandey *et al.* (2009) demuestran mediante microarreglos en células SKBr3, que el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) se activa cuando GPER-1 se encuentra activo también, CTGF fue utilizado como un primer control positivo para indicar el funcionamiento del G15.

Con el fin de conocer la expresión de CTGF, primero se realizó el cultivo de la línea celular MCF7 divididas en tres grupos, con un total de 5 réplicas por grupo: al primer grupo solo se le adicionó 0.01% de DMSO que es el vehículo en el cual se disuelven los compuestos administrados a los otros dos grupos; al segundo grupo se le adicionó 17 β -estradiol a una concentración de 10nM; y al tercer grupo se le adicionó una mezcla de 17 β -estradiol a una concentración de 10nM y G15 a una concentración de 1 μ M. Los tres tratamientos se colocaron durante un periodo de 24 horas. Posteriormente, se realizó la extracción del ARN. Para verificar la calidad del mismo, se realizó una electroforesis, mientras que la cantidad se cuantificó con un espectrofotómetro. Con el ARN obtenido se realizó una retrotranscripción para sintetizar la cadena complementaria de ADN (cDNA). A continuación se realizó un PCR en gradiente con la finalidad de conocer la temperatura media de hibridación de los oligonucleótidos del CTGF. Las temperaturas utilizadas para realizar el PCR en gradiente fueron las siguientes: 55.2, 56.7, 59.1, 61.7, 63.9 y 64.9 °C. Los productos del PCR en gradiente fueron sometidos a una electroforesis, para su posterior análisis. Como resultado de dicha electroforesis, se observó que la reacción se llevó a cabo a una temperatura

media de hibridación de entre 55.2 y 61.7°C, ya que las bandas correspondientes a esas temperaturas, son las que muestran una mayor intensidad (Fig. 10). Debido a este amplio rango de temperaturas en el que se observó la hibridación de los oligonucleótidos de CTGF, se seleccionó la temperatura de 59°C para realizar el PCR convencional del CTGF.

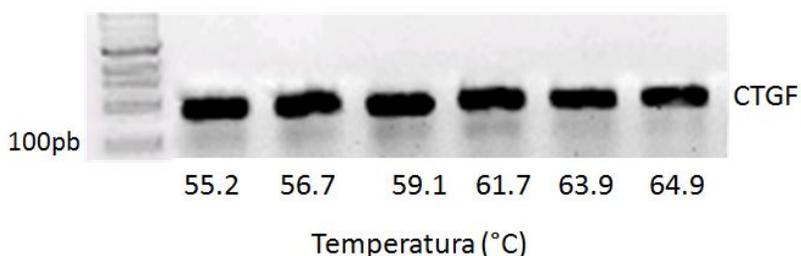


Figura 10. Electroforesis del PCR gradiente para establecer la temperatura media de hibridación de los oligonucleótidos de CTGF.

A continuación, con el fin de medir los niveles de expresión de CTGF, se realizó un PCR convencional. Los productos del PCR convencional se sometieron a una electroforesis (Fig. 11.A) y se analizaron por densitometría utilizando el programa imagej. Los resultados de la densitometría se analizaron con el programa SAS (2006), debido al comportamiento normal de los datos, se realizó una prueba de ANOVA considerando diferencias significativas cuando $p < 0.05$. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de CTGF en los tratamientos con estradiol (10nM) y G15 (1 μ M) disminuye significativamente a comparación de los tratamientos con estradiol (10nM), a su vez, los niveles de CTGF en estos tratamientos son diferentes significativamente a comparación del control (DMSO 0.01%) (Fig. 11.B).

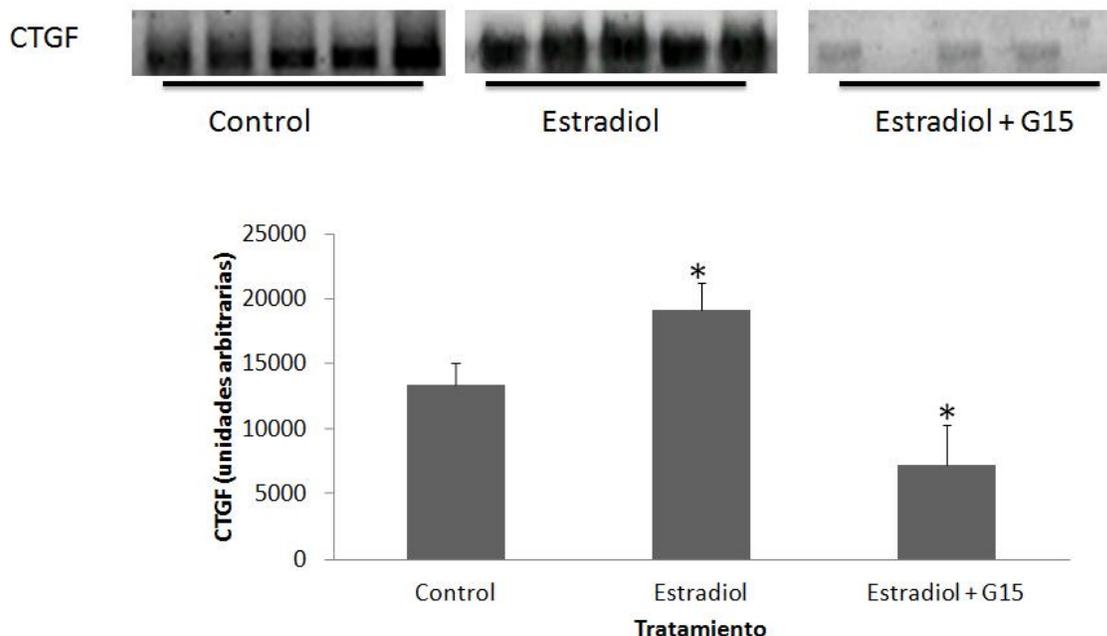


Figura 11. Electroforesis del PCR convencional de CTGF y resultados de la densitometría. A. Se muestra la electroforesis resultante del PCR convencional de CTGF. B. Muestra los resultados de la densitometría, el * indica que existen diferencias significativas con respecto al control ($P < 0.05$), las barras indican el error estándar. Entre el control y estradiol $p = 0.042$, entre las muestras con estradiol y estradiol con G15 $p = 0.024$ y entre el control y las muestras con estradiol y estradiol con G15 $p = 0.039$.

ER α 36

Debido a que los trabajos de Wallacides *et al.* (2012) muestran que en células Tcam-2 tratadas con 1nM de estradiol y 1 μ M de G15, la expresión del receptor a estrógenos ER α 36 disminuye significativamente en comparación con aquella observada en las células tratadas solamente con estradiol, empleamos también la expresión de este receptor a estrógenos como un control positivo del funcionamiento del G15.

Con el fin de conocer la expresión del ER α 36 en la línea celular MCF7, cultivamos éstas células divididas en dos grupos, obteniendo 4 réplicas para cada uno: el primer grupo se incubó en presencia de 17 β -estradiol a una concentración

de 10nM; mientras que el segundo grupo se incubó con la mezcla de 17 β -estradiol a una concentración de 10nM en combinación con G15 a una concentración de 1 μ M. Los tratamientos se colocaron durante un periodo de 24 horas. Después de las 24 horas, se realizó la extracción del ARN, y para verificar la calidad del mismo se realizó una electroforesis, mientras que la cantidad fue cuantificada con un espectrofotómetro. Con el ARN obtenido se realizó una retrotranscripción para sintetizar la cadena complementaria de ADN (cDNA). Del cDNA conseguido, se realizó primero un PCR en gradiente utilizando las siguientes temperaturas 55.2, 56.7, 59.1, 61.7, 63.9 y 64.9 °C, con el fin de conocer la temperatura media de hibridación de los oligonucleótidos del ER α 36. Los productos del PCR en gradiente fueron sometidos a una electroforesis, para su posterior análisis. Como resultado de dicha electroforesis, se observó que la reacción se llevó a cabo a una temperatura media de hibridación entre 59.1 y 61.7°C, pues estas fueron las temperaturas en las que las bandas muestran un mayor grosor. Finalmente la temperatura utilizada para realizar el RT-PCR fue de 60°C.

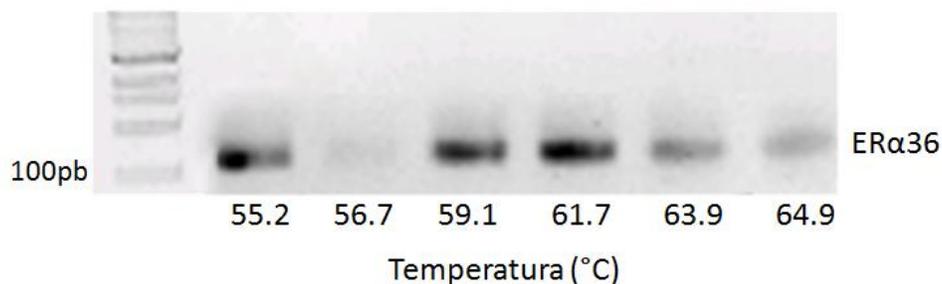


Figura 12. Electroforesis del PCR gradiente para establecer la temperatura media de hibridación de ER α 36.

Posteriormente, se realizó un RT-PCR para medir los niveles de expresión del ER α 36. Los niveles del ARNm del ER α 36 se calcularon utilizando el método para la determinación de la expresión relativa por PCR en tiempo real denominado $\Delta\Delta$ Ct. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa SAS

(2006) y debido al comportamiento normal de los datos, se realizó una prueba de ANOVA considerando diferencias significativas cuando $p < 0.05$. Como se puede observar en la figura 13, se encontró que los niveles de expresión del ER α 36 aumentan significativamente en respuesta al 17 β -estradiol (10nM), mientras que disminuyen significativamente por efecto del tratamiento combinado con 17 β -estradiol (10nM) y G15 (1 μ M).

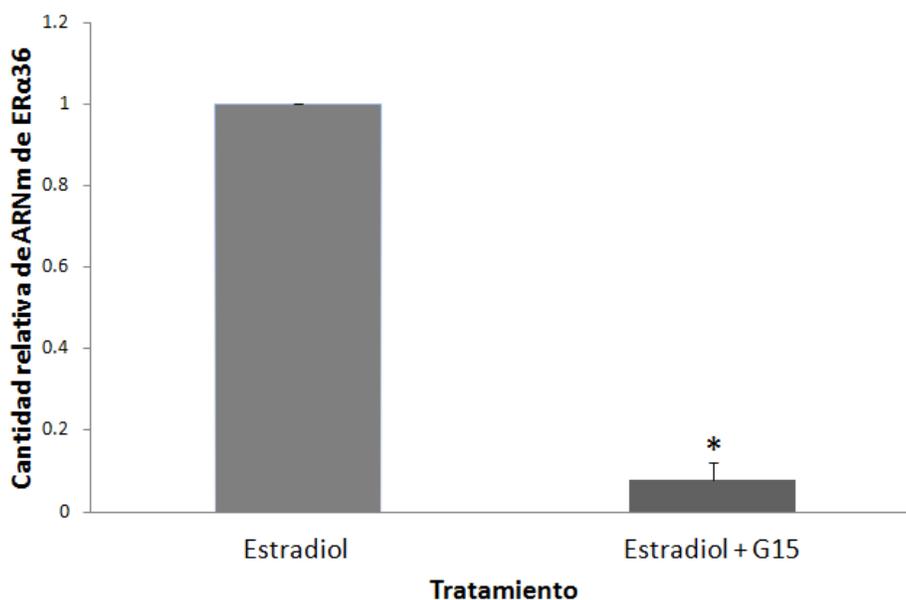


Figura 13. RT-PCR de Era36. El * muestra que existen diferencias significativas comparados con el tratamiento con estradiol, las barras indican el error estándar. El * indica que existen diferencias significativas de los tratamientos con respecto al estradiol ($p=0.006$).

6.2 RT-PCR de KiSS-1 y KiSS-1R

Con el fin de conocer si GPER-1 se encuentra involucrado en la expresión del sistema KiSS-1/KiSS-1R, se determinó el nivel de expresión de los genes KiSS-1 y KiSS-1R la línea celular MCF7 en respuesta a 17 β -estradiol, a G15, y a la combinación de ambos. El experimento incluyó cuatro grupos, con 4 réplicas para cada uno de ellos: al primer grupo solo se le adicionó 0.01% de DMSO que es el vehículo en el cual se disuelven los compuestos administrados a los otros tres grupos; al segundo grupo se le adicionó G15(20nM, 600nM o 1 μ M); al tercer grupo se le adicionó 17 β -estradiol (10 nM); y al cuarto grupo se le adicionó una

mezcla de 17 β -estradiol(10 nM) y G15(20 nM, 600 nM o 1 μ M). Dichos tratamientos se dejaron durante un periodo de 24 horas. Para el segundo y cuarto grupos, con el fin de asegurar que G15 inhibiera a GPER-1, éste se colocó tres horas antes de colocar el vehículo o el 17 β -estradiol.

Se llevaron a cabo tres experimentos independientes utilizando 3 concentraciones distintas del G15: 20nM, 600 nM y 1 μ M. La primera concentración se utilizó debido a que el trabajo de Dennis *et al.* (2009) muestra que G15 se une a GPER-1 con una afinidad aproximada a 20nM. Los estudios de Dennis *et al.* (2011) han mostrado que concentraciones de G15 mayores de 1 μ M resultan en la activación débil de ERE, sugiriendo que a altas concentraciones dicho antagonista se comporta como parcial agonista de la transcripción mediada por ERs. La concentración de 600nM se utilizó con el fin de asegurar que con la concentración de 1 μ M no se estaba observando el efecto parcial agonista de G15. La concentración de 1 μ M se utilizó debido a que el trabajo de Wallacides *et al.* (2012) muestra que una concentración de 1 μ M es eficaz para observar un efecto antagonista de G15 sobre la expresión de ER α 36. Mientras tanto, para el 17- β -estradiol solo se utilizó la concentración de 10 nM, ya que los estudios de Tamay *et al.* (2008, resultados no publicados) muestran que esta concentración es eficaz para producirlos efectos del estradiol sobre la expresión de KiSS-1 en las células MCF7.

Una vez pasado el periodo de 24 horas para cada tratamiento, se realizó la extracción del ARN. Para verificar la calidad del mismo se realizó una electroforesis del mismo, mientras que la cantidad del ARN se cuantificó con un espectrofotómetro. El ARN fue utilizado para realizar una retrotranscripción y de ésta manera sintetizar la cadena complementaria de ADN (cDNA). Del cDNA obtenido, se procedió a medir los niveles de KiSS-1 y KiSS-1R para cada tratamiento, a través de una RT-PCR en tiempo real. Los niveles de ARNm se calcularon utilizando el método para la determinación de expresión relativa por PCR en tiempo real denominado $\Delta\Delta$ Ct. Los resultados se analizaron con el programa SAS (2006), y debido al comportamiento normal de los datos se utilizó

una prueba de ANOVA considerando diferencias significativas para una $p < 0.05$. Para conocer entre que tratamientos se presentaron las diferencias significativas, se realizó una prueba de Tukey.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: con relación al gen KiSS-1, confirmamos el efecto reportado por Tamay *et al.* (2008, resultados no publicados) en el sentido de que sus niveles de expresión disminuyen significativamente en respuesta a la exposición de las células MCF7 por 24 h a una concentración de 10 nM de 17 β -estradiol (Figs. 14A, 15A y 16A). En nuestras manos, la disminución de KiSS-1 fue de un 55 a un 74%. Asimismo, encontramos que la expresión del gen KiSS-1R también es significativamente reducida por el tratamiento por 24 h con 17 β -estradiol de un 42 a un 71% (Figs. 14B, 15B y 16B). Con relación al G15 administrado en forma aislada en concentraciones de 20 nM, 600 nM y 1 μ M, ninguno de los dos genes mostró cambios significativos en sus niveles de expresión. Finalmente, observamos que la administración del G15 en todas sus concentraciones junto con 17 β -estradiol fue incapaz de alterar la inhibición de la expresión de ambos genes (Figs. 14, 15 y 16).

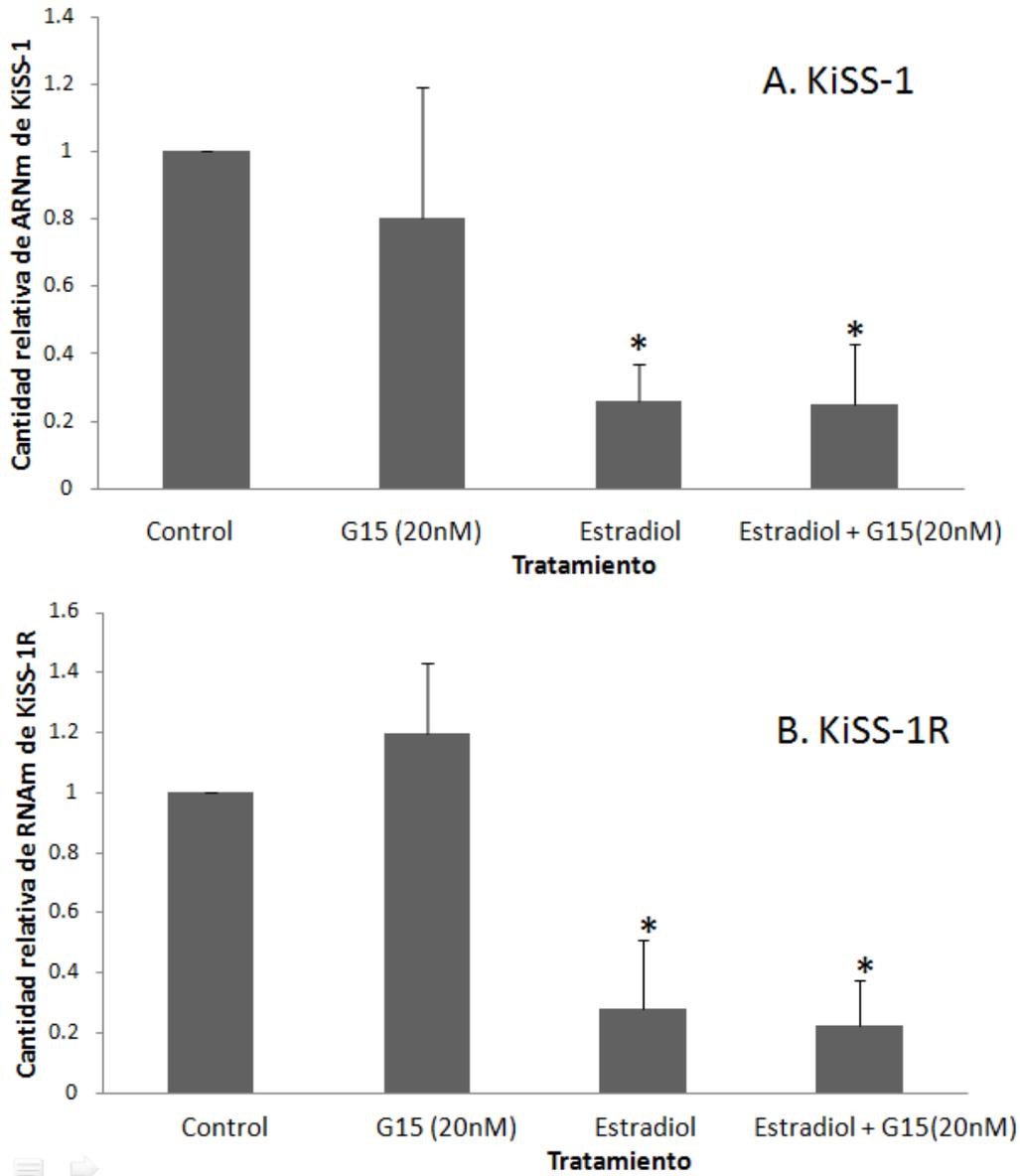


Fig. 14 RT-PCR de KiSS-1/KiSS-1R. A) Muestra la cantidad relativa de ARNm de KiSS-1. B) Muestra la cantidad relativa de ARNm de KiSS-1R. La concentración del 17 β -estradiol es de 10nM y la concentración de G15 es de 20nM. El grupo control fue tratado con DMSO (0.01%). El * indica que existen diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control ($p < 0.05$), las barras indican el error estándar. Entre el control y el tratamiento con G15 $p = 0.27$, entre el tratamiento control y el tratamiento con estradiol $p=0.005$, entre el tratamiento control y la combinación de estradiol con G15 $p=0.3$.

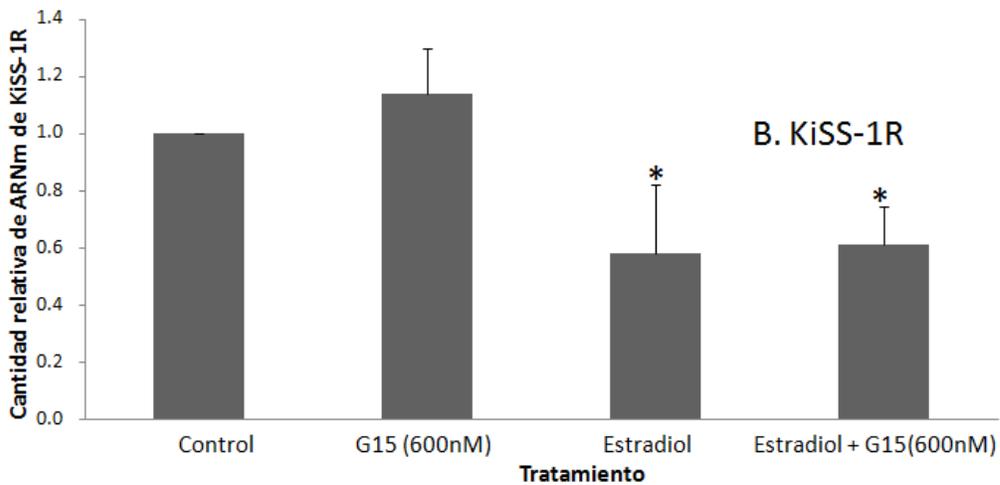
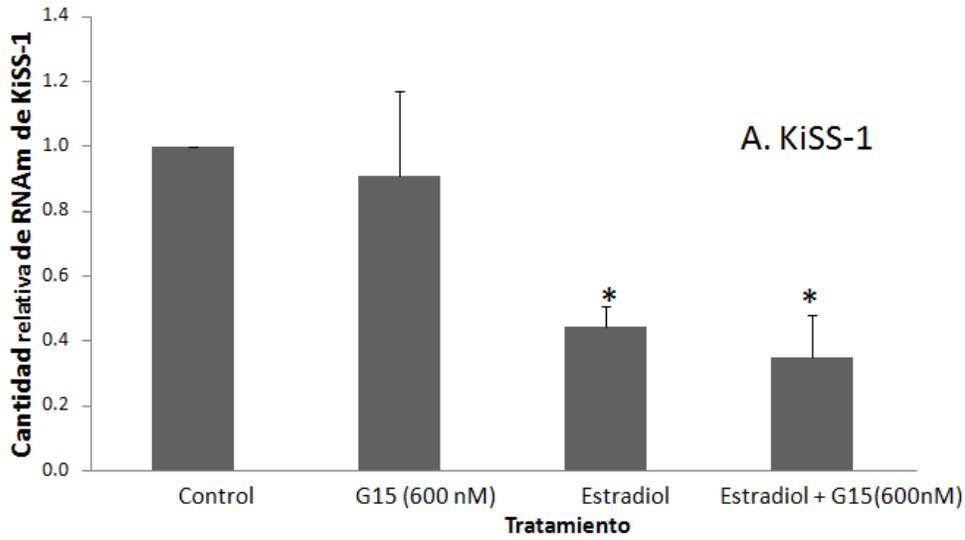


Fig. 15 RT-PCR de KiSS-1/KiSS-1R. A) Muestra la cantidad relativa de ARNm de KiSS-1. B) Muestra la cantidad relativa de ARNm de KiSS-1R. La concentración del 17β -estradiol es de 10nM y la concentración de G15 es de 600nM. El grupo control fue tratado con DMSO (0.01%). El * indica que existen diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control ($p < 0.05$), las barras indican el error estándar. Entre el control y el tratamiento con G15 $p = 0.23$, entre el tratamiento control y el tratamiento con estradiol $p=0.002$, entre el tratamiento control y la combinación de estradiol con G15 $p=0.32$.

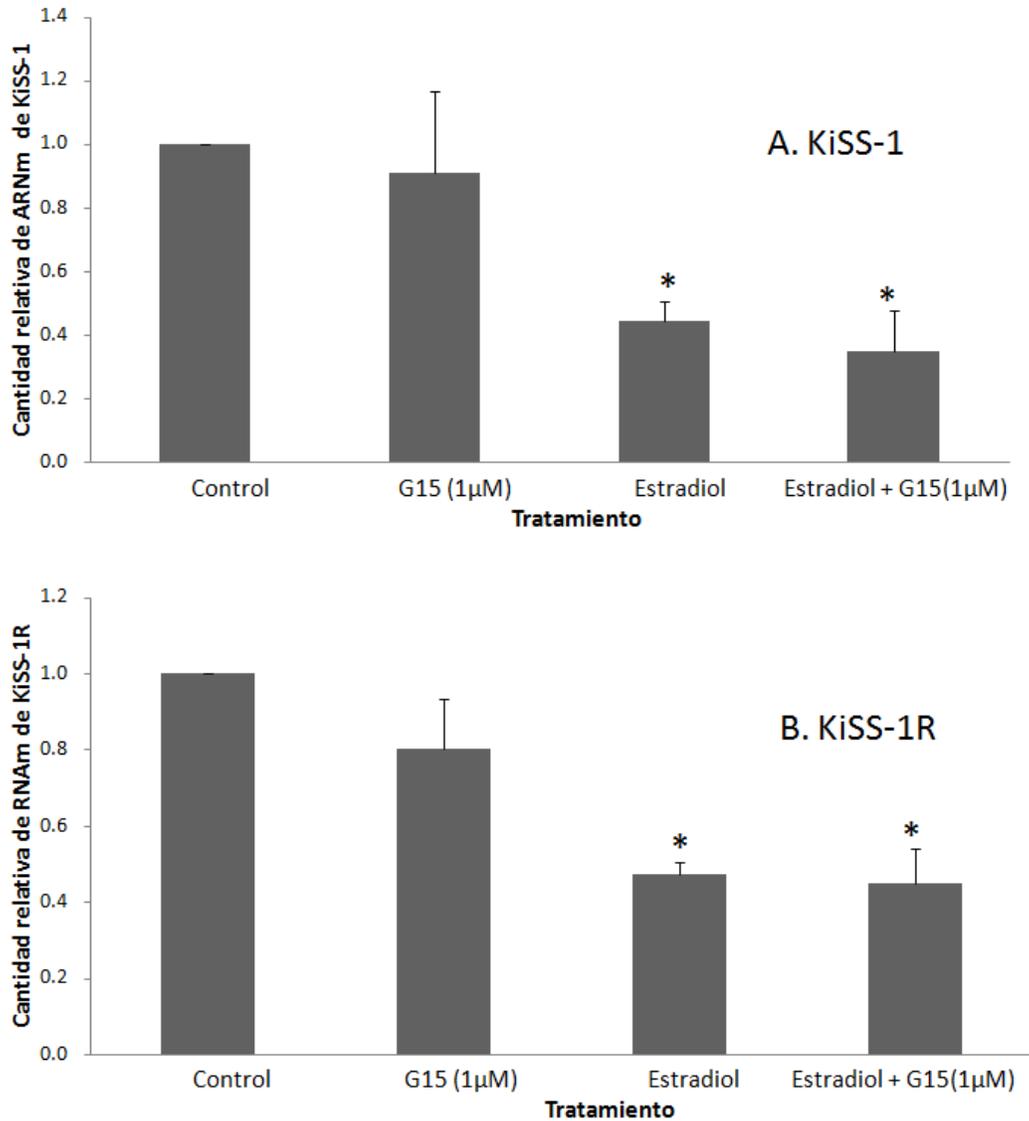


Fig. 16 RT-PCR de KiSS-1/KiSS-1R. A) Muestra la cantidad relativa de ARNm de KiSS-1. B) Muestra la cantidad relativa de ARNm de KiSS-1R. La concentración del 17β-estradiol es de 10nM y la concentración de G15 es de 1µM. El grupo control fue tratado con DMSO (0.01%). El * indica que existen diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control ($p < 0.05$), las barras indican el error estándar. Entre el control y el tratamiento con G15 $p = 0.31$, entre el tratamiento control y el tratamiento con estradiol $p=0.005$, entre el tratamiento control y la combinación de estradiol con G15 $p=0.33$.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo obtuvimos evidencia de que las células MCF7 de epitelio mamario transformado humano expresan al receptor GPER1, así como que este es funcional, ya que está involucrado en algunos de los efectos inducidos por el 17 β -estradiol. Mediante el uso del G15, que es un antagonista selectivo para el GPER1, encontramos que el efecto estimulante del 17 β -estradiol sobre la expresión del CTGF y del ER α 36 es mediada por la activación del GPER1. En contraste, el efecto inhibitorio del 17 β -estradiol sobre la expresión de los genes KiSS-1 y su receptor KiSS-1R, no involucra al receptor membranal señalado.

KISS-1/KISS-1R

Los resultados encontrados en este trabajo muestran que los niveles de expresión de los genes KiSS-1 y KiSS-1R disminuyen significativamente en respuesta a la exposición de las células MCF7 por 24 h a una concentración de 10 nM de 17 β -estradiol. Sin embargo la exposición de las células MCF7 a la combinación de una concentración de 10 nM de 17 β -estradiol junto con G15 en tres diferentes concentraciones (20 nM, 600 nM o 1 μ M) no alteró la respuesta observada a la exposición exclusiva al 17 β -estradiol, es decir que el antagonista selectivo del receptor membranal al estradiol G15 fue incapaz de alterar la respuesta de inhibición de la expresión de KiSS-1/KISS-1R. Lo anterior sugiere que el efecto del 17 β -estradiol sobre este sistema de mensajeros debe involucrar otro receptor estrogénico, muy probablemente al receptor ER α , pero no al GPER-1.

CTGF

Inicialmente con el propósito de determinar la eficacia del compuesto G15 en términos de su acción antagonista del GPER-1, medimos la expresión del CTGF, debido a que en el trabajo de Pandey *et al.* (2009), realizado en células de

cáncer de mama SKBr3, se había demostrado que el CTGF se activa cuando GPER-1 se encuentra también activo. Nuestro resultado comprueba lo anterior ahora en células MCF7, ya que observamos una disminución en los niveles de expresión del CTGF en respuesta al tratamiento combinado con 17 β -estradiol (10nM) y G15 (1 μ M), en comparación con el potente efecto estimulante en respuesta a la administración exclusiva de 17 β -estradiol (10nM). Con este hallazgo, no solamente se demuestra que el G15 en nuestras manos es funcional como antagonista del GPER-1, sino lo que es aún más relevante, que dicho receptor es funcional en las células MCF7 mediando efectos positivos del 17 β -estradiol.

ER α 36

Otro marcador que se utilizó para medir la eficacia del compuesto G15 como antagonista del GPER-1 fue el receptor estrogénico ER α 36, debido a que el trabajo de Wallacides *et al.* (2012) demuestra en células de seminoma Tcam-2 tratadas con 1nM de estradiol y 1 μ M de G15, la expresión del ER α 36 disminuye significativamente en comparación con el tratamiento exclusivo con estradiol. Los resultados encontrados en este trabajo coinciden con los de Wallacides *et al.* (2012), y los extienden a células MCF7, donde observamos que los niveles de expresión del ER α 36 disminuyen significativamente por efecto del tratamiento combinado con 17 β -estradiol (10nM) y G15 (1 μ M) en comparación con la respuesta al 17 β -estradiol (10nM). Con lo anterior se demuestra al igual que con el CTGF, que el G15 funciona correctamente como antagonista de GPER-1, y que el receptor GPER-1 es un mediador funcional de los efectos estrogénicos en las células MCF7.

GPER-1 en la resistencia a los tratamientos contra el cáncer de mama

Como el tamoxifeno es uno de los tratamientos más comunes para tratar el cáncer de mama positivo a estrógenos sin embargo, aproximadamente solo el 50% de los pacientes responden correctamente a este tipo de tratamientos, mientras que el otro 50% de los pacientes no lo hace, o bien, después de cierto

tiempo dejan de responder a éste, ya que muchos de los tumores de cáncer de mama se vuelven o son resistentes a la terapia (Teicher, 2006). Por otra parte, se ha observado que el tamoxifeno que es un modulador selectivo de los receptores a estrógenos, actúa como competidor de la unión a receptores de estrógenos nucleares bloqueando de esta forma sus efectos (Abdulkareem y Zurmi, 2012). Sin embargo, para el receptor membranal GPER-1, el tamoxifeno actúa como un agonista (Filardo *et al.*, 2000; Revankar *et al.*, 2005), por lo que se ha considerado que GPER-1 podría estar contribuyendo al crecimiento del tumor y a la resistencia a la terapia hormonal (Ignatov *et al.*, 2010). Los resultados encontrados sugieren de igual manera que GPER-1 podría estar contribuyendo a la resistencia a la terapia hormonal al encontrar mediante CTGF y ER α 36 que este receptor es funcional en las células MCF7.

KiSS-1 en el cáncer de mama

Los resultados encontrados en este trabajo muestran que KiSS-1/KiSS-1R no está regulado por el receptor GPER-1 en las células MCF7, sugiriendo con ello que su regulación está dada por una vía diferente. Por otro lado, aún no se tiene claro el papel de KiSS-1/KiSS-1R ya que existen ciertos resultados contradictorios. Por una parte algunos estudios han demostrado que KiSS-1/KiSS-1R actúa como un supresor de metástasis en numerosos tipos de cáncer en los seres humanos, inhibiendo la migración e invasión celular y afectando con ello la proliferación del cáncer (Stark *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2012). Otros estudios sugieren que KiSS-1 podría funcionar como un potencial biomarcador para la identificación de tumores con alto potencial metastásico y como un tratamiento eficaz para pacientes con metástasis (Shoji *et al.*, 2010). Sin embargo, estudios como los de Jarzabek *et al.* (2012) han reportado que la expresión de KiSS-1 se encuentra más elevada en los cánceres que son más agresivos y que están correlacionados positivamente con la mortalidad. Se propone que tal situación podría ser debida a que, Kp-10 induce un aumento en la actividad de la metaloproteasa de matriz (MMP)-9 e induce la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico(EGFR), encontrando que GPR54 interactúa directamente con EGFR, de esta manera se

sugiere que las kisspeptinas a través de GPR54 estimulan la invasividad celular en el cáncer de mama, pero el papel de las kisspeptinas en el cáncer de mama aún no está completamente claro (Zajac *et al.*, 2011).

8. CONCLUSIÓN

Se observó que el 17β -estradiol redujo aproximadamente a la mitad el nivel de expresión de KiSS-1/KiSS-1R en las células MCF7. Además, se observó que los cambios en los niveles de expresión de KiSS-1 y KiSS-1R en respuesta al 17β -estradiol no fueron modificados por el co-tratamiento con tres concentraciones distintas de G15. Estos resultados sugieren que el receptor GPER-1 no participa en la regulación del sistema KiSS-1 /KiSS-1R en células MCF7.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguas, F., A. Martins, T.P. Gomes, M. de Sousa, D.P. Silva. 2005. Prophylaxis approach to a-symptomatic post-menopausal women: breast cancer. *Maturitas*. 15; 52 Suppl 1:S23-31.
- Abdulkareem, I.H., I.B Zurmi. Review of hormonal treatment of breast cancer. 2012. *Nigerian Journal of Clinical Practice*. 15(1):9-14.
- Albanito L., A. Madeo, R. Lappano, A. Vivacqua, V. Rago, A. Carpino, T.I. Oprea, E.R. Prossnitz, A.M. Musti, S. Andó, M. Maggiolini. 2007. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Research*. 15; 67(4):1859-66.
- Bernard PS, Wittwer CT. 2002. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem*. 48, 1178-1185.
- Bottino, M. C., C. Lanari. 2010. Localización extra nuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos. *Medicina*. Buenos Aires. 70: 173-184
- Caraty, A., A. Locatelli., G.B. Martin. 1989. Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol. *Journal Endocrinology*. 123(3):375-382.
- Carmeci, C., D.A Thompson, H.Z. Ring, U. Francke, R.J. Weigel. 1997. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*. 45, 607-617.
- Chomczynski P, N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytic Biochemistry*. 162(1):156-159.
- Cho, S.G., D. Li, K. Tan K, S.K. Siwko, M. Liu. 2012. KiSS1 and its G-protein-coupled receptor GPR54 in cancer development and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*. 2012 Jun 13. [Epub ahead of print]
- Clemons, M., P. Goss. 2001. Estrogens and Risk of breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 276-280.
- Coronato, S., G. E. Iaguens, O. M. Spinelli, W. Di Girolamo. 2002. Marcadores tumorales en cancer de mama. *Medicina* (Buenos Aires). 62: 73-82.

- Dedes, I. 2012. Kisspeptins and the control of gonadotrophin secretion. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 58(3):121-128.
- Dennis MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak TK, Bologna CG, Leitao A, Brailoiu E, Deliu E, Dun NJ, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Oprea TI, Prossnitz ER. 2009. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol*. 5(6):421-427.
- Dennis MK, Field AS, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Bologna CG, Oprea TI, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Prossnitz ER. 2011. Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 127(3-5):358-66.
- Ellmann S, H. Sticht, F. Thiel, M.W. Beckmann, R. Strick, P.L. Strissel. 2009. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. 66(15):2405-2426.
- Engelsman, E., C.B. Korsten, J.P. Persijn, F.J. Cleton. 1973. Human breast cancer and estrogen receptor. *Archivum Chirurgicum Neerlandicum*. 25 (4):393-397.
- Ehrenfeld P, Conejeros I, Pavicic MF, Matus CE, Gonzalez CB, Quest AF, Bhoola KD, Poblete MT, Burgos RA, Figueroa CD. 2011. Activation of kinin B1 receptor increases the release of metalloproteases-2 and -9 from both estrogen-sensitive and -insensitive breast cancer cells. *Cancer Lett*. 301(1):106-118.
- Franco, Y., F. V. Mendoza, Lemini C. 2003. Mecanismos de acción de los efectos protectores de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM Vol.46 No.3*. 8 pp.
- Filardo, E.J., J.A Quinn, K.I. Bland, A.R. Jr. Frackelton. 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology*. 14(10):1649-60.
- Filardo E.J., Graeber C.T., Quinn J.A., Resnick M.B., Giri D., DeLellis R.A., Steinhoff M.M., Sabo E. 2006. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clinical Cancer Research*. 1;12(21):6359-66.
- Hall, J.M., J.F. Couse, K.S Korach. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(40):36869-72.

- Horwitz, K.B., M.E. Costlow, W.L. McGuire. 1975. MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids*. 26(6):785-95.
- Howell A., C.K. Osborne, C. Morris, A.E. Wakeling. 2000. ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, "pure" antiestrogen. *Cancer*. 15;89(4):817-25.
- Ignatov, A, T. Ignatov, A. Roessner, S.D. Costa, T. Kalinski. 2010. Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Research Treatment*. 123(1):87-96.
- Innis M., H. Gelfand D., J. Sinisky J. 1999. PCR applications protocols for functional genomics. Academic Press. San Diego, California. 566 pp.
- Jarząbek, K., L. Kozłowski, R. Milewski, S. Wołczyński. 2012. KiSS1/GPR54 and estrogen-related gene expression profiles in primary breast cancer. *Oncology Letters*. 1;3(4):930-934.
- Jensen, E.V., E.R. DeSombre. 1973. Estrogen-receptor interaction. *Science*. 12; 182(4108):126-34.
- Kotani, M, M. Detheux, A. Vandenbogaerde, D. Communi, J.M. Vanderwinden, E. Le Poul, S. Brézillon, R. Tyldesley, N. Suarez-Huerta, F. Vandeput, C. Blanpain, S.N. Schiffmann, G. Vassart, M. Parmentier. 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54. *The Journal Biological Chemistry*. 14;276(37):34631-6.
- Kovacs, E.J., K.A. Messingham, M.S. Gregory. 2002. Estrogen regulation of immune responses after injury. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 31; 193(1-2):129-35.
- Kuiper, G.G, E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson, J.A. Gustafsson. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academic of the United States of America*. 93(12):5925-5930.
- Kuiper, G.G., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson, J.A. Gustafsson. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 138(3):863-870.
- Kuiper, G.G., P.J. Shughrue, J. Merchenthaler, J.A. Gustafsson. 1998. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Frontiers Neuroendocrinology*. 19(4):253-86.
- Kumar V, S. Green, A. Staub, P. Chambon. 1986. Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *The EMBO Journal*. 5(9):2231-2236.

- Lee, J.H., M.E. Miele, D.J. Hicks, K.K. Phillips, J.M. Trent, B.E. Weissman, D.R. Welch. 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*. 88(23):1731-1737.
- Lee, D.K., T. Nguyen, G.P. O'Neill, R. Cheng, Y. Liu, A.D. Howard, N. Coulombe, C.P. Tan, A.T. Tang-Nguyen, S.R. George, B.F. O'Dowd. 1999. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Letters*. 5;446(1):103-107.
- Levenson, A.S., V.C. Jordan. 1997. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research*. 1; 57(15):3071-3078.
- Lippman M.E., G. Bolan. 1975. Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture. *Nature*. 1975 Aug 14;256(5518):592-593.
- Marot D., I. Bieche., C. Aumas, S. Esselin, C. Bouquet, S. Vacher, G. Lazennec, M. Perricaudet, F. Kuttann, R. Lidereau, de Roux N. 2007. High tumoral levels of KiSS1 and G-protein-coupled receptor 54 expression are correlated with poor prognosis of estrogen receptor-positive breast tumors. *Endocrine Related Cancer*. 14(3):691-702
- Martin T.A., G. Watkins, W.G. Jiang. 2005. KiSS-1 expression in human breast cancer. *Clinical and Experimental Metastasis*. 22(6):503-511.
- Martinez, O.U.E., Z. Lin., Y.H. Ko, A.F. Goldberg, N. Flomenberg, C. Wang, S. Pavlides, R.G. Pestell, A. Howell, F. Sotgia, M.P. Lisanti. 2011. Understanding the metabolic basis of drug resistance: Therapeutic induction of the Warburg effect kills cancer cells, 10(15):2521-2528.
- Martínez, S. S., Z.M Almeda. 2007. *Hormonas, estado de ánimo y función cognitiva*. 1ª ed. Impreso en Madrid, España.
- Mendoza, P. N. 2008. *Farmacología médica*. Panamericana. México D.F.
- Noriega R. M. Y., Langley M. E. 2008. Correguladores del Receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario. *Cancerología*. 3: 29-40
- O'Dowd, B.F., T. Nguyen., A. Marchese *et al.* 1998. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*. 47, 310–313.
- Ogawa, S., S. Inoue S, T. Watanabe, H. Hiroi, A. Orimo, T. Hosoi, Y. Ouchi, M. Muramatsu. 1998. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 4; 243(1):122-126.
- Olbrich, T., E. Ziegler, G. Türk, A. Schubert, G. Emons, C. Gründker. 2010. Kisspeptin-10 inhibits bone-directed migration of GPR54-positive breast cancer cells: Evidence for a dose-window effect. *Gynecologic Oncology*. 119(3):571-578.

- Owman, C., P. Blay, C. Nilsson, S.J. Lolait. 1996. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 285–292
- Pandey DP, Lappano R, Albanito L, Madeo A, Maggiolini M, Picard D. 2009. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO Journal*; 28(5):523-32.
- Popa, S.M., D.K. Clifton, R.A. Steiner. 2008. The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Annual Review Physiology*. 70:213-238.
- Prossnitz, E.R., J.B. Arterburn, H.O. Smith, T.I. Oprea, L.A. Sklar, H.J. Hathaway. 2008. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annual Review Physiology*. 70:165-190.
- Prossnitz, E.R., M. Barton. 2009. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 89(3-4):89-97.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 307(5715):1625-1630.
- Roseweir, A.K., Millar R.P. 2009. The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Human Reproduction Update*. 15(2):203-212.
- SAS Institute Inc (2006) SAS/STAT Guide For Personal Computers, Version 9.1 Raleigh, North Carolina, USA.
- Seminara, S.B., S. Messenger, E.E. Chatzidaki, R.R Threher, J.S Jr. Acierno, J.K. Shagoury. 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England Journal of Medicine*, 349(17):1614-1627.
- Seredynski, A.L., G.F. Ball, J. Balthazart, T.D. Charlier. 2011. Specific activation of estrogen receptor alpha and beta enhances male sexual behavior and neuroplasticity in male Japanese quail. *PLoS One*, 6(4): e18627.
- Shoji S, Tang XY, Sato H, Usui Y, Uchida T, Terachi T. 2010. Metastin has potential as a suitable biomarker and novel effective therapy for cancer metastasis (Review). *Oncology Letters*. 1(5):783-788.
- Srivastava, D.P., E.M. Waters, P.G. Mermelstein, E.A. Kramár, T.J. Shors, F. Liu. 2011. Rapid estrogen signaling in the brain: implications for the fine-tuning of neuronal circuitry. *The Journal of Neuroscience*. 31 (45):16056-63.
- Stark AM, Schem C, Maass N, Hugo HH, Jonat W, Mehdorn HM, Held-Feindt J. 2010. Expression of metastasis suppressor gene maspin is reduced in

breast cancer brain metastases and correlates with the estrogen receptor status. *Neurological Research*. 32(3):303-308.

- Takada, Y., C. Kato, S. Kondo, R. Korenaga, J. Ando. 1997. Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 240, 737–741.
- Teicher, B. 2006. *Cancer Drug Resistance*. Human Press, Totowa, New Jersey.
- Tena S.M. 2006. GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Human Reproduction Update*. 12(5):631-639.
- Thomas, P., Y. Pang, E.J Filardo, J. Dong J. 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 146(2):624-632.
- Tresguerres, J.A.F., B. Granados. 2000. *Tratado de endocrinología básica y clínica*. Madrid. Reverte.
- Wallacides A, A. Chesnel, H. Ajj, M. Chillet, S. Flament, H. Dumond. 2012. Estrogens promote proliferation of the seminoma-like TCam-2 cell line through a GPER-dependent ER α 36 induction. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 5; 350(1):61-71.
- Walter P, S. Green, G. Greene, A. Krust, J.M. Bornert, J.M. Jeltsch, A. Staub, E. Jensen, G. Scrace, M. Waterfield, *et al.* 1985. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proceedings National Academy of Sciences of United States of America*. 82(23):7889-93.
- Wang, D., L. Hu, G. Zhang, L. Zhang, C. Chen. 2010. G protein-coupled receptor30 in tumor development. *Endocrine*. 38(1):29-37.
- Zárate, T.A., C.V. E. Morán, V.A. Fera, G. C. Kubli. 1993. *Fundamentos de neuroendocrinología*. Fondo de cultura económica. México.
- Zajac, M., J. Law, D.D Cvetkovic, M. Pampillo, L. McColl, C. Pape, G.M. Di Guglielmo, L.M. Postovit, A.V. Babwah, M. Bhattacharya. 2011. GPR54 (KISS1R) transactivates EGFR to promote breast cancer cell invasiveness. *PLoS One*. 6(6):e21599.
- Zwart, W., R. de Leeuw, M. Rondaij, J. Neefjes, M.A. Mancini, R. Michalides. 2010. The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *Journal of Cell Science*. 15; 123(Pt 8):1253-1261.