



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL CÁNCER**

**Análisis de la participación del receptor de estrógenos
ER α /Er β y GPR30 en la translocación nuclear de Rac1
en la línea celular HaCaT**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

Q.B.P. Nestor José López Martínez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Daniel Hernández Sotelo

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo



Chilpancingo, Gro. Julio del 2021

**Análisis de la participación del receptor de estrógenos
ER α /Er β y GPR30 en la translocación nuclear de Rac1 en
la línea celular HaCaT**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS


ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 11 días del mes de mayo de dos mil veintiuno, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Análisis de la participación del receptor de estrógenos ER α /Er β y GPR30 en la translocación nuclear de Rac1 en la línea celular HaCaT", presentada por el alumno Néstor José López Martínez, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dr. Daniel Hernández Sotelo
Dirección de tesis


Dr. Eduardo Castañeda Saucedo
Codirección de tesis



Dr. Napoleón Navarro Tito


Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres


Dr. Rosalío Ramos Payán

Vo. Bo


Daniel Hernández Sotelo
Dirección de la Maestría en Ciencias Biomédicas


Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas



Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología celular del Cáncer de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas en Chilpancingo de los Bravo Gro.

Bajo la dirección del:

Dr. Daniel Hernández Sotelo

La codirección del:

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Y la asesoría de:

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdenares

Dr. Napoleón Navarro Tito

Dr. Rosalio Ramos Payán

Durante el periodo que cursó la maestría, el **C. Nestor José López Martínez** recibió la beca del 01 de septiembre de 2018 al 31 de agosto de 2020 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a los programas del Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) con número de CVU 923151.

Agradecimientos

A Dios:

Por permitirme seguir adelante en este paso y muchos más, espero no se olvide de mí y me siga fortaleciendo.

A los Drs. y amigos:

Dr. Eduardo Catañeda, Dr. Daniel Hernández, Dra. Olga Garibay, Dr. Napoleón Navarro y Dr. Rosalio Ramos; Por la confianza brindada para realizar este importante proyecto, consejos, enseñanzas, paciencia, correcciones y sin duda una buena amistad las cuales fueron muy importante para poder culminar esta etapa profesional. Muchas gracias estoy muy agradecido.

Con estimación y respeto Nestor López

Dedicatorias

A mis abuelos:

A quienes amo y extraño todos los días desde su partida, ellos quienes durante toda mi vida han sido pieza fundamental en mi persona inculcando valores y enseñanzas, el salir adelante y que sin duda alguna siempre recordaré y tendré presentes, gracias por siempre escucharme donde quiera que estén y no dejarme solo, les mando un beso y abrazo donde quiera que estén sé que algún día nos volveremos a ver doña tocha y don joaco.

A mi madre:

Luchadora inalcanzable y una muestra de una madre ejemplar que a pesar de las adversidades con trabajo, amor, esfuerzo y sacrificio siempre me han sabido conducir por un camino de entrega y sacrificio, espero no decepcionarla y siempre contar con usted, gracias por estar siempre apoyándome.

A mis hermanos:

Ese par, Ossiell y Jacqueline (chapa y chico) que sin pensarlo mi vida no sería la misma sin ustedes, gracias porque tengo a los mejores hermanos, aunque no se los diga seguido jajaa saben que siempre podrán contar conmigo cuando necesiten.

A mi familia:

A mi tía **Norma** quien se ha convertido en alguien muy importante para mi familia y su apoyo en momentos tan difíciles, igual a mis primos **ale, joaco, Luis, julio mayonesa, cesar, el migue** muchas gracias.

A mis amigos:

A los malditos de Cristian, Bolo, Obed, jhony, Pedro y Pablito con los cuales compartí muchos momentos especiales durante la licenciatura y maestría sin duda grandes amistades que siempre llevo presente y que cuentan y cuento con ellos.

Al QBFDs y amigo **José Almazán**, por el apoyo y la buena amistad sabe que cuenta con el Gavin siempre muchas gracias, al negro más guapo y corriente de iguala **Oscar Bahena**, sin duda una nueva y gran amistad sabes que te aprecio y quiero mucho.

Al trío **Sara, Rey y Huri** gracias por su amistad, buenos amigos, borrachos pero buenos muchachos sin duda. A **Manuel, Gema, Yu, Miriam y Monse**, quienes hicieron una estadía mucho muy buena en el LBCC además de siempre brindarme

su apoyo cuando le necesitaba son parte importante en este proyecto y también por brindarme su amistad. Así como a la maldita de linda muchas gracias porque el hecho de no frecuentarse no quiere decir que una amistad no pueda ser buena.

Con cariño y afecto Nestor López

ÍNDICE

| | |
|---------------------------------|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 5 |
| RESULTADOS | 8 |
| DISCUSIÓN | 11 |
| CONCLUSIONES | 14 |
| ANEXOS | 15 |
| REFERENCIAS | 17 |

RESUMEN

La GTPasa Rac1 desempeña un papel fundamental en diversos procesos celulares a nivel citoplasmático como la migración, invasión, adhesión celular y polimerización de los filamentos de actina. En cáncer, Rac1 participa en la transición epitelio-mesenquimal, angiogénesis e invasión celular. A pesar de que las diversas funciones de Rac1 a nivel citoplasmático han sido ampliamente estudiadas, poco se sabe del papel de esta GTPasa en otros compartimentos celulares. En particular, existen pocas evidencias del mecanismo de translocación nuclear y se desconoce su participación dentro del núcleo. Existe evidencia de que Rac1 puede translocarse del citoplasma al núcleo, a través de la interacción con proteínas como la importina karioferina $\alpha 2$ y de estímulos como el factor de crecimiento epidérmico. Por otra parte, se conoce que los estrógenos inducen la translocación nuclear de Rac1, sin embargo, se desconoce cuál de los tres receptores de estrógenos es necesario para dicho proceso. **Objetivo:** Evaluar la participación de los receptores de estrógenos ER α y ER β en la translocación de Rac1 al núcleo en células HaCaT. **Metodología:** Las células HaCaT fueron transfectadas con un plásmido de expresión de la proteína Rac1 fusionada a GFP (GFP-Rac1), posteriormente fueron estimuladas con estrógenos, en presencia o no de un inhibidor químico para los receptores ER α y ER β . La localización subcelular de Rac1 se determinó mediante microscopía de fluorescencia y fraccionamiento celular. **Resultados:** Los resultados sugieren que la translocación nuclear de Rac1 en respuesta a estrógenos en células HaCaT, no depende de los receptores ER α y ER β , y que probablemente está mediada por el receptor GPR30. **Conclusiones:** Rac1 se transloca al núcleo en células HaCaT estimuladas con estrógenos. Los receptores ER α y ER β no participan en la translocación de Rac1 al núcleo en respuesta a estrógenos en células HaCaT.

Palabras clave: Rac1, estrógenos, translocación nuclear, receptores de estrógenos.

ABSTRACT

The GTPase Rac1 is a member of the Rho family, which plays a fundamental role in various cellular processes such as cell migration and invasion, cell adhesion, polymerization of actin filaments. In cancer, Rac1 participates in epithelial-mesenchymal transition, angiogenesis and promoting the invasive capacity of cells. Rac1 functions at the cytoplasmic level have been widely studied, but its participation in other cellular compartments has been poorly investigated. Several studies demonstrated that Rac1 can be translocated to the nucleus; however, little is known about the mechanism of Rac1 nuclear-cytoplasm shuttling and its function in the nucleus. Rac1 nuclear import is dependent on its interaction with proteins such as the importin karyopherin $\alpha 2$ and can be induced in response to stimuli such as epidermal growth factor. On the other hand, it is known that estrogens induce the nuclear translocation of Rac1; however, it is unknown which of the three estrogen receptors is necessary for this process. **Objective:** To evaluate the participation of the estrogen receptors ER α and ER β in the translocation of Rac1 to the nucleus in HaCaT cells. **Methodology:** HaCaT cells were transfected with a GFP-Rac1 expression plasmid and stimulated with estrogens in the presence or not of a chemical inhibitor for ER α and ER β . The subcellular localization of Rac1 was determined by fluorescence microscopy and cellular fractionation. **Results:** Our results indicate that the nuclear translocation of Rac1 in response to estrogens in HaCaT cells, is not dependent on ER α or ER β , and suggest that it may be depend on GPR30 receptor. **Conclusions:** Rac1 translocates to the nucleus in estrogen-stimulated HaCaT cells. The estrogen receptors ER α or ER β , do not participate in the translocation of Rac1 to the nucleus in response to estrogens.

Keywords: Rac1, Estrogens, Nuclear translocation, Estrogen Receptors.

INTRODUCCIÓN

Las GTPasas de la familia Rho son proteínas G pequeñas pertenecientes a la super familia Ras, la cual se divide en cinco familias principales: Ras, Rho, Arf/Sar, Ran y Rab. Los miembros de la familia Ras funcionan como nodos de señalización que se activan por diversos estímulos extracelulares y que regulan la señalización intracelular (Rojas *et al.*, 2012). Las GTPasas de la familia Rho están implicadas en diversos procesos biológicos tales como la mitosis, citocinesis, polimerización de los filamentos de actina, la dinámica de los microtúbulos y migración celular (Zou *et al.*, 2014; Wojnacki *et al.*, 2014; Sadok and Marshall, 2014).

La GTPasa Rac1 es un miembro de la familia Rho que ha sido ampliamente estudiado, Rac1 desempeña un papel fundamental en diversos procesos como la polimerización de los filamentos de actina, migración, invasión y adhesión celular (Bustelo *et al.*, 2012; Marei and Malliri, 2016). Además, se ha demostrado que Rac1 puede contribuir al desarrollo de diversas enfermedades, incluido el cáncer, contribuyendo al fenotipo de células troncales tumorales, transición epitelio mesenquimal (EMT), invasión y angiogénesis (Hudson *et al.*, 2018). La sobreexpresión de esta GTPasa en diversos tipos de cáncer tales como testicular, colorrectal, y de ovario entre otros (Kamai *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2017; Hudson *et al.*, 2018).

Las funciones de Rac1 mejor caracterizadas son las que se llevan a cabo nivel citoplasmático, sin embargo, existe evidencia de que Rac1 es traslocada al núcleo en respuesta a diversos estímulos, donde podría desempeñar funciones diferentes. La translocación al núcleo de Rac1 depende de diversos factores, entre ellos la presencia de una señal de localización nuclear (NSL) en su región hipervariable funcional (Lanning *et al.*, 2004), la cual interactúa directamente con la importina karioferina $\alpha 2$, siendo un requisito clave para su importación nuclear (Sandrock *et al.*, 2010). Otro mecanismo que se ha descrito para la acumulación de Rac1 en el núcleo, es la fosforilación de la treonina 108 de Rac1 mediada por la cinasa ERK (Tong *et al.*, 2013).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que los estrógenos pueden inducir la translocación de Rac1 al núcleo, en células de epitelio cervical de ratones hembra (Mendoza-Catalán *et al.*, 2009), y que, por otra parte, la translocación nuclear de Rac1 inducida por estrógenos, observada en la línea celular HaCaT, era dependiente de la importina karioferina $\alpha 2$ y la activación de ERK. No obstante, no se ha establecido un mecanismo de como los estrógenos inducen la acumulación de Rac1 en el núcleo (Hernández & De la cruz, 2015; Garibo and Ojeda 2017) (datos no publicados).

Los estrógenos ejercen su función a través de dos grandes vías de señalización intracelulares la vía no genómica y la vía genómica (Hewitt *et al.*, 2016). La vía genómica está mediada por dos receptores intracelulares pertenecientes a la familia de receptores nucleares, el receptor de estrógenos alfa (ER α) y el receptor de estrógenos beta (ER β) (Levin, 2015), los cuales se translocan al núcleo actuando como factores de transcripción (Evans *et al.*, 2016).

La vía no genómica está mediada por el receptor GPR30, el cual, en respuesta a estrógenos activa múltiples vías de señalización intracelular tales como: MAPK/ERK y PI3K-AKt, aumentando la producción de cAMP, la síntesis de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato y en la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Nilsson and Gustafsson, 2011; Feldman and lee, 2017; Sharma *et al.*, 2018).

Sin embargo, se desconoce cuál de los receptores a estrógenos es o son necesarios para que Rac1 se transloque al núcleo. Por lo anterior, la finalidad de este estudio fue evaluar la participación de los receptores a estrógenos en la translocación de Rac1 al núcleo en células HaCaT.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

El 17 β -estradiol y el Fulvestrant (ICI 182, 780) fueron adquiridos de Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA), el anticuerpo policlonal anti-GPR30 se adquirió de Abcam (Cambridge, Reino Unido).

Cultivo celular

La línea celular de queratinocitos inmortalizados (HaCaT) fue mantenida en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient mixture F-12 Ham (DMEM) (Sigma Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Byproducts, Guadalajara, Mexico) y 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina (Sigma Aldrich) en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.

Tratamiento farmacológico y transfección de plásmidos

Para el tratamiento con estrógenos, las células HaCaT fueron puestas en supresión de SFB por 16 h previas al tratamiento, seguido de ello se adicionó 17- β estradiol 10 μ M durante 8 h. Para las células que son expuestas a fulvestrant se les adicionó 10mM de fulvestrant por 8 h. Las células fueron transfectadas con los plásmidos pEGFP-RAC1^{WT} pEGFP-RAC1^{V12} y pEGFP-RAC1^{T17N}. Los plásmidos fueron proporcionados por la Dra. Sonia Castillo Lluva de la Universidad Complutense de Madrid. La mutante constitutivamente activa Rac1V12 contiene un cambio de una Glicina por una Valina en la posición 12 de la proteína, lo cual provoca que Rac1 sea incapaz de hidrolizar el GTP y por lo tanto se mantiene siempre activa. La mutante dominante negativa Rac1N17 contiene un cambio de una Treonina por una Asparagina en la posición 17 de la proteína, lo que provoca que no se pueda liberar el GDP de la GTPasa y por lo tanto no puede ser activada. Las transfecciones se realizaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuantificación de la intensidad de fluorescencia

Para determinar la intensidad de fluorescencia en el citoplasma y núcleo de las células transfectadas con los diferentes plásmidos, se realizó análisis densitométrico con el programa ImageJ. Para ello, se tomaron en cuenta células que mantuvieran su morfología, células que no estuvieran ocupando el mismo lugar con otras células y con señal fluorescente en citoplasma y núcleo. Para cada célula, se dibujó un cuadro de aproximadamente 16x16 dentro del núcleo y se midió la intensidad de fluorescencia en el área del cuadro. Posteriormente, el mismo cuadro se posicionó sobre el citoplasma de la misma célula y se cuantificó la fluorescencia citoplasmática, todo esto en un área representativa para cada célula así mismo se compararon los pixeles obtenidos entre ambos compartimientos, considerando un valor de $P < 0.05$ como significativo.

Fraccionamiento celular

Una vez terminado el tratamiento con los agentes farmacológicos y los estrógenos, las células son lavadas con PBS 1X. Para obtener las proteínas citoplasmáticas, las células fueron resuspendidas en una solución A (0.01% digitonin, 50mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1mM EDTA) posteriormente se centrifugaron a 16000 g, por 1 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante. Para obtener las proteínas nucleares, el botón celular fue resuspendido en solución B (Tris-HCL 50mM pH7.5, NaCl 50mM, Tritón 1%, Glicerol 10%, EDTA 1mM, deoxicolato de sodio 1%, SDS 1%) seguido de 1 h en agitación constante a 4°C, para después centrifugarlo a 12,000 rpm por 15 min a 4°C y obtener el sobrenadante.

Western blot

Se mezclaron 40 μ L de extracto de proteína con tampón de carga y se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min, posteriormente las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12%, transferidas a membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con 5% de leche durante 2 h. Posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-GPR30 (1:1000), durante

toda la noche a 4°C. Después se realizaron 3 lavados durante 10 minutos con TBS-Tween al 0.05 % y posteriormente se incubaron durante 2 h con el anticuerpo secundario anti-conejo (1:3000) a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó la inmunodetección usando un sistema de quimioluminiscencia (GE Health care) y placas autoradiográficas Medical X-ray Green/MXG, (Carestream Health, Inc., Rochester, NY, USA).

Análisis estadístico

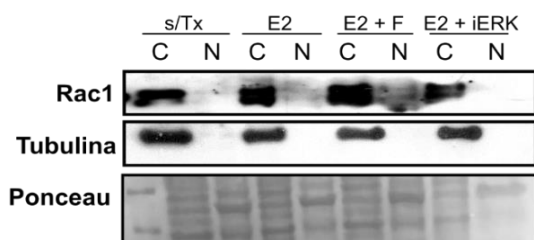
Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar. Los datos son comparados entre los grupos utilizando análisis de varianza (ANOVA) y las comparaciones entre pares, fueron realizadas con la prueba de Dunnett. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

RESULTADOS

Efecto de la inhibición química de ER α y ER β sobre la translocación nuclear de Rac1 en células HaCat, en respuesta a estrógenos.

Datos previos de nuestro grupo de trabajo muestran que los estrógenos inducen la acumulación nuclear de Rac1 endógena en células HaCat. Para determinar si la acumulación nuclear de Rac1 en respuesta a estrógenos depende de los receptores a estrógenos ER α y ER β , las células HaCat fueron tratadas con estrógenos, en presencia o no de fulvestrant, un inhibidor químico de ER α /ER β . La localización subcelular de Rac1 se analizó mediante ensayos de fraccionamiento celular seguido de ensayos de western blot. Como se muestra en la Figura 1, en las células tratadas con vehículo se detectó a Rac1 en la fracción citoplasmática pero no en la fracción nuclear. Sin embargo, en células tratadas con estrógenos, se logra detectar un incremento (+3 veces) de Rac1 en la fracción nuclear, en las células tratadas con estrógenos y fulvestrant. Como control se utilizaron células tratadas con estrógenos y un inhibidor químico de ERK, el cual puede inhibir la acumulación nuclear de Rac1 en respuestas a estrógenos.

A.



B.

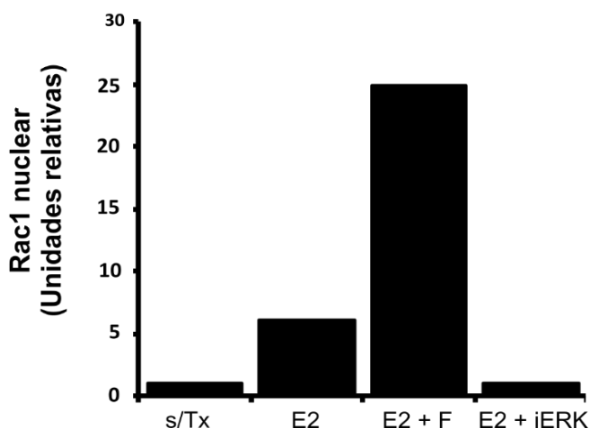


Figura 1. Efecto de la inhibición de ER α /ER β en la translocación de Rac1 en células HaCaT tratadas con estrógenos. A) Se muestra el western blot representativo del fraccionamiento celular para determinar la presencia de Rac1 en el compartimiento citoplasmático (C) y nuclear (N) en células HaCaT bajo diferentes condiciones; Sin tratamiento (s/Tx), estrógenos (E2), estrógenos y fulvestrant (E2+F) y estrógenos más el inhibidor de ERK (E2+iERK). **B)** Análisis densitométrico de las bandas del WB de Rac1 nuclear.

Efecto de los estrógenos en la localización nuclear de la proteína de fusión GFP-Rac1^{WT} y de las mutantes GFP-Rac1^{V12} y GFP-Rac1^{N17} en células HaCaT.

Para conocer si la acumulación nuclear de Rac1 depende de su estado de activación, las células HaCaT fueron transfectadas con los plásmidos de expresión de las proteínas GFP-RAC1^{WT} (wild type), GFP-RAC1^{V12} (mutante constitutivamente activa) y GFP-RAC1^{N17} (mutante constitutivamente inactiva). Seguido de la transfección las células HaCaT se estimularon con 10 μ M de estrógenos por 8 h, y la localización subcelular de Rac1 se determinó mediante microscopía de fluorescencia. Como se observa en la Figura 2, tanto la proteína GFP-Rac1^{WT} como la GFP-Rac1^{V12} se detectaron tanto en citoplasma como en núcleo en las células no tratadas, y el tratamiento con estrógenos provocó un incremento en la intensidad de la señal nuclear para ambas proteínas, el cual es más evidente en las células que expresan GFP-Rac1^{V12}.

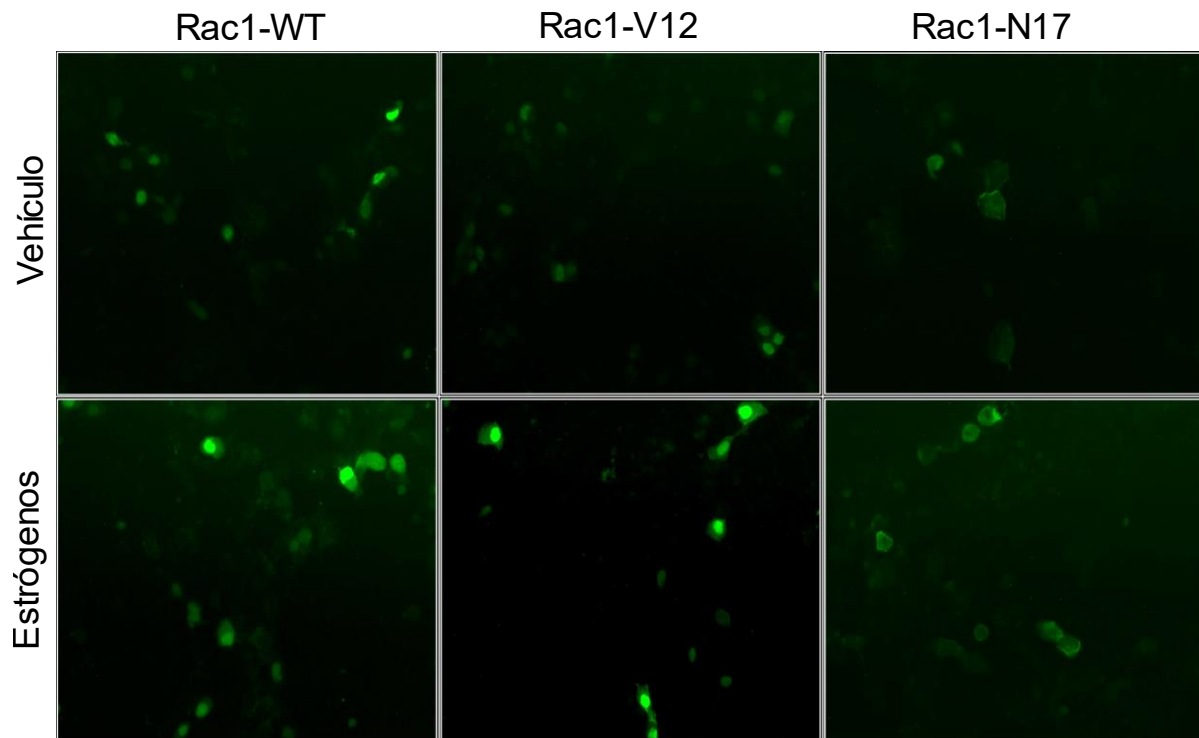
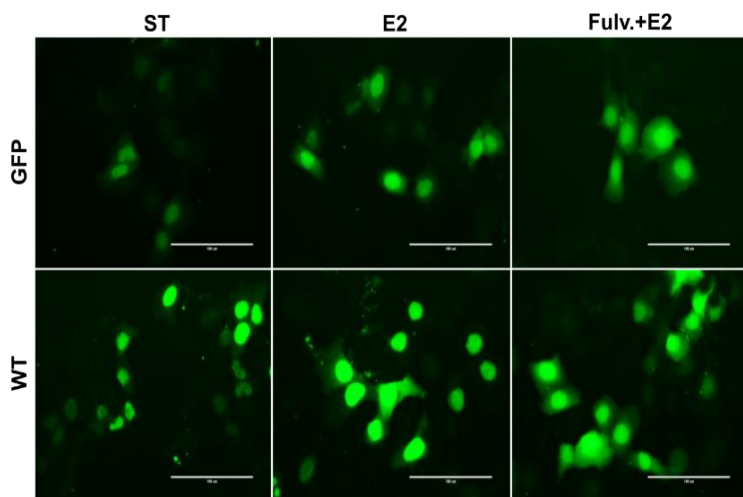


Figura 2. Efecto de los estrógenos en la translocación nuclear de las proteínas RAC1^{WT}, Rac1^{V12} y Rac1^{N17} en células HaCaT. Imágenes representativas de la localización subcelular de las proteínas después del estímulo de 8 horas con estrógenos. Imágenes obtenidas con objetivo de 20x.

Efecto de la inhibición de ER α y ER β sobre la localización nuclear de la proteína GFP-Rac1^{WT} en células HaCaT tratadas con estrógenos.

Para determinar si los receptores ER α /ER β participan en la translocación nuclear de la proteína GFP-Rac1^{WT} en respuesta a estrógenos, las células fueron transfectadas con el plásmido de expresión de la proteína GFP sola, o de la proteína GFP-Rac1^{WT}, posteriormente, se estimularon con estrógenos por 8 horas en presencia o no de 10mM del inhibidor químico de ER α /ER β . La localización subcelular de las proteínas GFP y GFP-Rac1^{WT} se visualizó en un microscopio de fluorescencia y se determinó la intensidad de fluorescencia nuclear y citoplásmica de cada célula. Para determinar si los estrógenos inducen un incremento en la localización nuclear de Rac1, se calculó la relación Núcleo/citoplasma (N/C) para cada célula. Como se muestra en la Figura 3, en las células que expresan la proteína GFP, la intensidad de la señal nuclear de Rac1 (N/C) entre las células control y las células tratadas con estrógenos se mantuvo sin diferencias, siendo esta igual a 5.

A.



B.

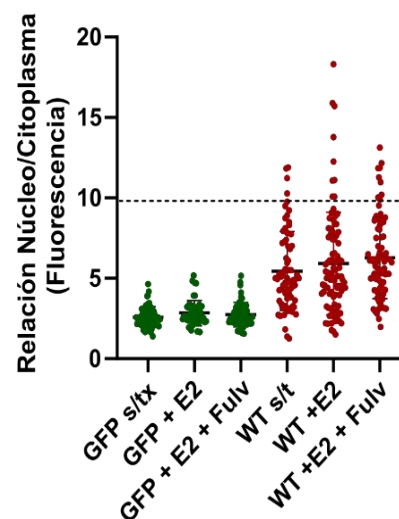


Figura 3. Efecto de los estrógenos en la translocación nuclear de Rac1 en GFP y WT en células HaCaT tratadas con fulvestrant.

A) Imágenes representativas de la localización subcelular de GFP y WT tratadas con fulvestrant y estimuladas con estrógenos durante 8h. Imágenes obtenidas con objetivo de 40x. **B)** Gráfica representativa del análisis densitométrico de la intensidad de señal nuclear de células HaCaT transfectadas con los plásmidos GFP y WT bajo diferentes condiciones **ST** (sin tratamiento), **E2** (Estrógenos) y **Fulv.+E2** (fulvestrant más estrógenos).

Por otro lado, en las células que expresan la proteína GFP-Rac1^{WT}, se observó que en presencia de estrógenos se observa un ligero incremento de hasta dos veces más en el número de células que tienen señal intensa de Rac1 en el núcleo en comparación con las células no tratadas. El mismo efecto se observó en las células tratadas con estrógenos y fulvestrant siendo esta condición un incremento más notorio de hasta 3 veces con respecto al control.

Las células que expresan la proteína GFP sola, mostraron una relación N/C de 2.1-2.5, independientemente de si fueron tratadas o no. En las células que expresan la proteína GFP-Rac1^{WT} sin tratamiento presentaron en promedio una relación N/C de 5, mientras que en las tratadas con estrógenos la relación N/C fue de 6 y en las tratadas con estrógenos más fulvestrant la relación N/C fue de 6.8 (Figura 4 A). Como se observa en la Figura 4B, los estrógenos inducen un incremento en el porcentaje de células con señal nuclear intensa de la proteína GFP-Rac1^{WT}, en las células no tratadas sólo se observaron menos de 5% de las células con señal nuclear intensa, mientras que en las tratadas con estrógenos o con estrógenos más fulvestrant, se observó un 10% de células con señal nuclear intensa.

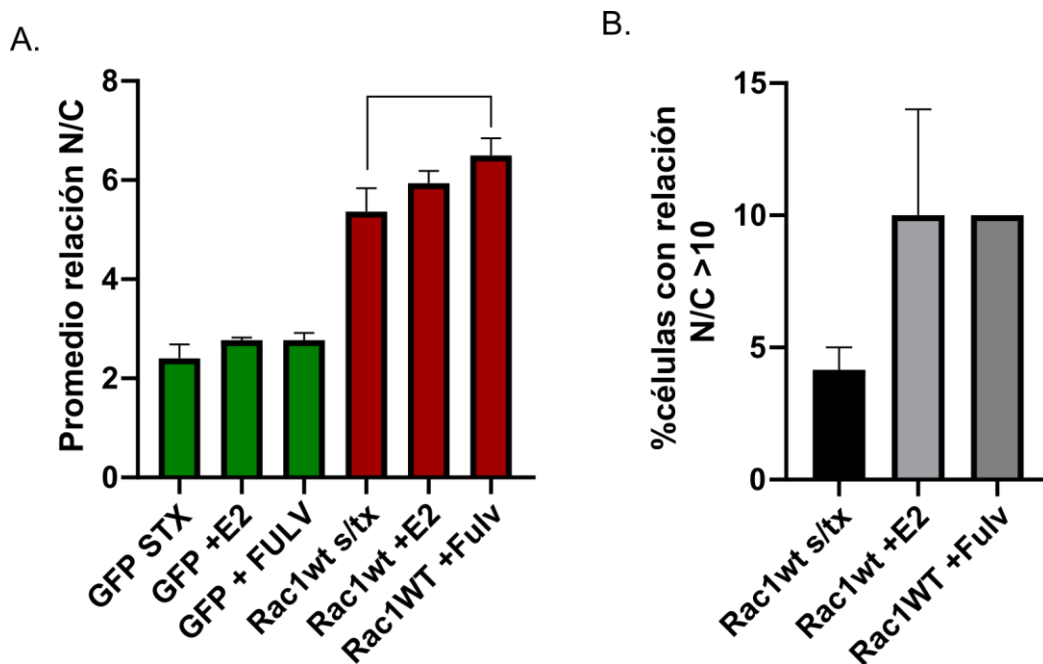


Figura 4. Los estrógenos aumentan la acumulación nuclear de GFP-Rac1^{WT} en células HaCat. A) Se calculó el promedio de la relación N/C de dos experimentos independientes. **B)** Se calculó el porcentaje de células que presentan señal nuclear de GFP-Rac1^{WT} intensa (relación N/C mayor a 10).

DISCUSIÓN

Rac1 es una de las GTPasas más estudiadas de la familia Rho, la cual desempeña un papel fundamental en diversos procesos celulares tales como migración, adhesión e invasión celular (Marei and Malliri, 2016), fagocitosis y polimerización de los filamentos de actina (Bustelo *et al.*, 2012).

También se ha descrito la participación de esta GTPasa en diversos tipos de cáncer (Kamai *et al.*, 2004; Mendoza-Catalán *et al.*, 2009; Navarro-Lérida *et al.*, 2015). La mayoría de las funciones de Rac1 las realiza a nivel citoplasmático, sin embargo, se ha identificado que esta proteína puede translocarse al núcleo a través de su secuencia de localización nuclear o mediante estímulos como la fosforilación mediada la cinasa ERK (Lanning *et al.*, 2004; Michaelson *et al.*, 2008; Tong *et al.*, 2013).

Nuestros resultados muestran que los estrógenos favorecen la translocación de Rac1 al núcleo, tanto de la proteína endógena como de la proteína GFP-Rac1^{WT}, como se había demostrado previamente por parte de nuestro grupo de trabajo. Sin embargo, aún con la inhibición farmacológica de los receptores citoplasmáticos ER α y ER β , identificamos que Rac1 sigue translocándose al núcleo en presencia de estrógenos, lo que nos hace suponer que los receptores α y β no participan en la translocación nuclear de Rac1.

Además, como puede verse en las Figuras 1 y Figura 4 A, el tratamiento con estrógenos más fulvestrant induce mayor acumulación de Rac1 que los estrógenos solos. Este comportamiento sugiere que el fulvestrant tiene un efecto dual como antagonista para ER α /ER β pero también tiene un efecto agonista para el receptor GPR30. Por lo anterior, sugerimos que los estrógenos inducen la acumulación de Rac1 a través del receptor GPR30. Se sabe que la activación de GPR30 conduce a la activación de diversas vías de señalización como la vía MAPK/ERK (Nilsson and Gustafsson, 2011; Feldman and lee, 2017), y se descrito que ERK puede fosforilar a Rac1 en la treonina 108, favoreciendo su acumulación nuclear (Tong *et al.*, 2013; François *et al.*, 2015). En nuestro laboratorio se ha

demostrado que la inhibición de GPR30 mediante siRNA, provoca una disminución en la acumulación nuclear de GFP-Rac1V12 en respuesta a estrógenos en células HeLa (Figura S1, A). Con la finalidad de demostrar la participación de GPR30 en la translocación nuclear de Rac1 en células HaCat, realizamos ensayos preliminares para la disminución de GPR30 mediante el uso de siRNAs (Figura S1, B), el cual podrá ser utilizado en el futuro para reducir los niveles de GPR30 en estas células y determinar si su disminución tiene un efecto en la acumulación nuclear de Rac1 en respuesta a estrógenos.

Finalmente, no se descarta la posibilidad de que los receptores de estrógenos citoplasmáticos ER α y ER β estén participando en el mecanismo de translocación nuclear de Rac1. Por lo que sería interesante evaluar la participación de estos receptores más a fondo empleando otras técnicas que nos permitan descartar su participación en dicho proceso.

CONCLUSIONES

Rac1 se transloca al núcleo en células HaCaT estimuladas con estrógenos.

Los resultados sugieren que la translocación nuclear de Rac1 en respuesta a estrógenos en células HaCat, no depende de los receptores ER α y ER β , y que probablemente está mediada por el receptor GPR30.

ANEXOS

Figura S1 A. Efecto de la disminución (siRNA) de GPR30 en la acumulación nuclear de Rac1 en células HeLa tratadas con estrógenos.

Las células HeLa fueron transfectadas con el plásmido de expresión GFP-Rac1^{V12} y fueron tratadas por 8 horas con estrógenos, en presencia de un siRNA control o del siRNA contra la proteína GPR30. Mediante microscopía de fluorescencia se determinó el porcentaje de células que tenían una localización de la proteína GFP-Rac1^{V12} predominantemente nuclear (poca o nula señal citoplásmica e intensa señal nuclear). Como se observa en el panel (B), las células control muestran aproximadamente 40% de células con señal nuclear intensa, el tratamiento con estrógenos induce un incremento del porcentaje de células con señal nuclear intensa hasta 80%, resultados similares se observan cuando las células fueron transfectadas con el siRNA control. De manera interesante, en las células transfectadas con el siRNA para GPR30, los estrógenos no inducen un incremento en la acumulación nuclear de Rac1 (Martínez-López *et al.*, Manuscrito en preparación).

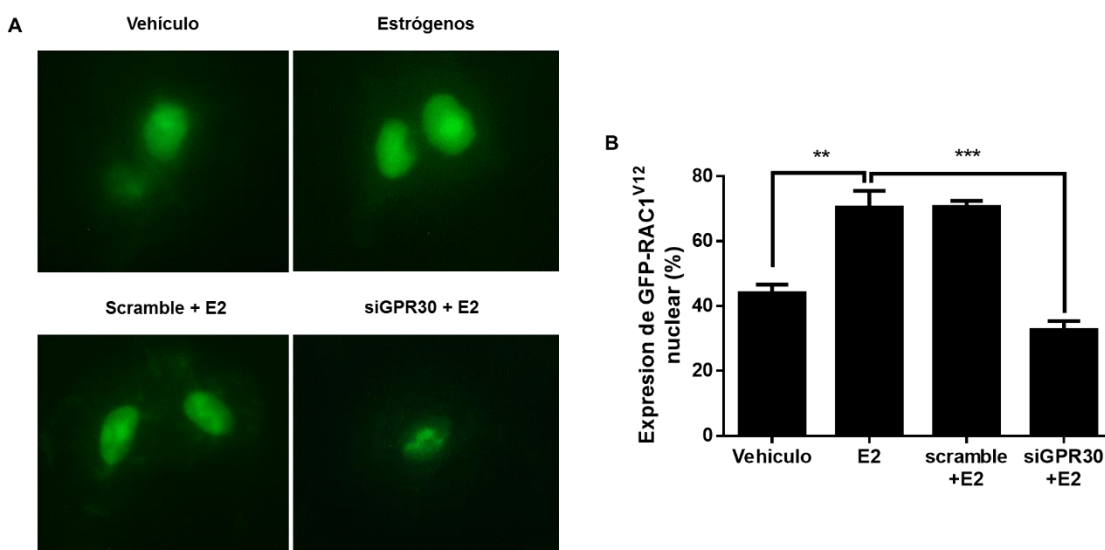
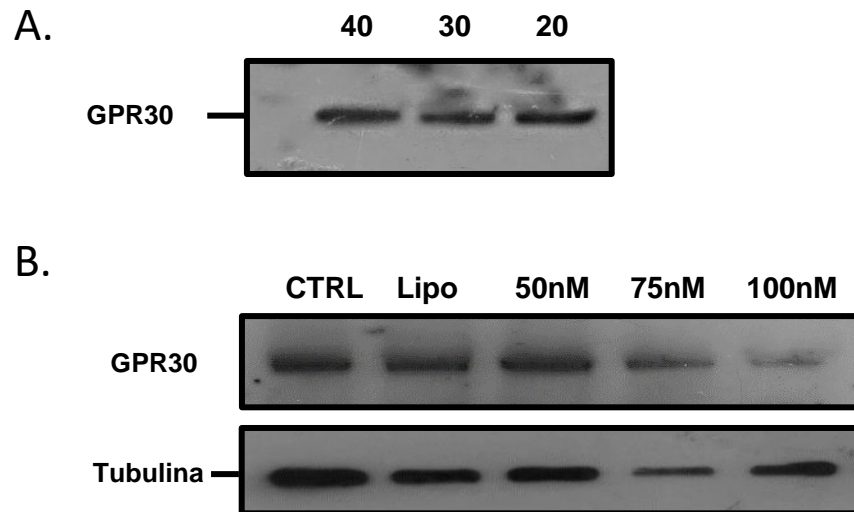


Figura S2. Disminución de la expresión del receptor de estrógenos GPR30 en células HaCaT mediante siRNA.

Se estandarizaron las condiciones para detectar a la proteína GPR30 mediante WB, se incubaron diferentes cantidades de extracto total de proteínas de células HaCaT con el anticuerpo anti-GPR30 (A). Las células HaCaT fueron transfectadas con el siRNA para el receptor GPR30 a una concentración 50, 75 y 100 nM, por 24 h usando como control a tubulina, donde se puede observar una mayor disminución en el nivel de proteína a una concentración de 75 y 100 nM (B).



REFERENCIAS

- Bustelo, X.R. *et al.*, (2012). Rac-ing to the plasma membrane: The long and complex work commute of Rac1 during cell signaling. *Small GTPases*, 3(1), 60–66.
- Evans, N.J., Bayliss, A. L., Reale, V., & Evans, P. D. (2016). Characterisation of signalling by the Endogenous GPER1 (GPR30) Receptor in an Embryonic Mouse Hippocampal Cell Lines (mHippoE-18). *PLOS ONE*. 11(3), 1-15.
- Feldman, R.D. and Limbird, L.E. (2017). GPER (GPR30): A Nongenomic Receptor (GPCR) for Steroid Hormones with Implications for Cardiovascular Disease and Cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 6(57), 567-584.
- Hewitt, S.C., Winuthayanon, W., Korach, K.S. (2016). What's new in estrogen receptor action in the female reproductive tract. *J Mol Endocrinol*. 58, 55-71.
- Hudson, L. G., Gillette, J. M., Kang, H., Rivera, M. R., & Wandinger-Ness, A. (2018). Ovarian Tumor Microenvironment Signaling: Convergence on the Rac1 GTPase. *Cancers*. 10(10), 358.
- Kamai, T., Yamanishi T., Shirataki, H., Takagi, K., Asami, H., Ito, Y., Yoshida, K. (2004). Overexpression of RhoA, Rac1 and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clin Cancer Res*. 10(14): 4799-4805.
- Lanning, C.C., Daddona, J.L., Ruiz-Velasco, R., Shafer, S.H., Williams, C.L., (2004). The Rac1 C-Terminal polybasic region regulates the nuclear localization and protein degradation of Rac1. *J Biol Chem*. 279(42), 4417-210.
- Levin, E.R. (2015). Extranuclear Steroid Receptors Are Essential for Steroid Hormone Actions. *Annu Rev Med*. (66), 271-280.
- Marei, H. and Malliri, A. (2016). GEFs: Dual regulation of Rac1 signaling. *Small GTPases*, 8(2), 90-99.
- Mendoza-Catalán, *et al.*, (2012). Nuclear expression of Rac1 in cervical premalignant lesions and cervical cancer cells. *BMC Cancer*, 12(116). 1-9.
- Michaelson, D., Abidi, W., Guardavaccaro, D., Zhou, M., Ahearn, I., Pagano, M., Philips, M.R. (2008). Rac1 accumulates in the nucleus during the G2 phase of the cell cycle and promotes cell division. *J Cell Biol*. 181(3), 485-496.
- Navarro-Lérida, I. *et al.*, (2015). Rac1 Nucleocytoplasmic Shuttling Drives Nuclear Shape Changes and Tumor Invasion. *Dev Cell*. 32(3), 318-334.

Rojas, A.M., Fuentes, G., Rausell, A., & Valencia, A. (2012). The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J Cell Biol.* 196(2), 189-201.

Sadok, A., and Marshall C. J. (2014). Rho GTPases: Masters of cell migration. *Small GTPases.* 5, 1-7.

Sandrock, K., Bielek, H., Schradi, K., Schmidt, G., Klugbauer, N. (2010). The nuclear import of the small GTPases Rac1 is mediated by the direct interaction with karyopherin alpha2. *Traffic.* 11(2): 198-209.

Sharma, G., Mauvais-Jarvis F., Prossnitz, E.R. (2018). Roles of G protein-coupled estrogen receptor GPER in metabolic regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 176:31-37.

Tong, J., Li, L., Ballermann, B., Wang Z. (2013). Phosphorylation of Rac1 T108 by extracellular signal-regulated kinase in response to epidermal growth factor: a novel mechanism to regulate Rac1 function. *Mol Cell Biol.* 33(22), 4538-51.

Woinacki, J., Quassollo, G., Marzolo, M.P., and Cáceres, A. (2014). Rho GTPases at the crossroad of signaling networks in mammals: impact of Rho-GTPases on microtubule organization and dynamics. *Small GTPases,* 5, 1-9.

Zou, Y., Oh, and Frost, J. A. (2014). Controlling the switches: Rho GTPases regulation during animal cell mitosis. *Cell Signal.* 26(12), 2998-3006.