



**PROBIOL**  
PROGRAMA DE POSGRADO  
EN BIOLOGÍA



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO

I M B E C U

## **TESIS DOCTORAL**

# **REGULACIÓN EXTRA-GONADAL DE GONADOTROPINAS: BASES MOLECULARES DE LA INVASIÓN Y METÁSTASIS EN CÁNCER DE MAMA**

**Lic. Mondaca Josefina Magali**

**Director: Dr. Angel Matias Sanchez**

**Co-Directora: Dra. Flamini Marina Inés**

**LABORATORIO DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y MOVIMIENTO CELULAR**

INSTITUTO DE MEDICINA Y BIOLOGÍA EXPERIMENTAL DE CUYO  
CENTRO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO - CONICET MENDOZA

## **AGRADECIMIENTOS**

- *A mi hermosa familia, por darme el amor y las herramientas que impulsan mis logros. Gracias por apoyarme en cada etapa de mi vida.*
- *A mis padres por darme siempre su apoyo y los medios para ir detrás de mis sueños y poder conquistarlos.*
- *A mis hermanos y cuñados quienes me han apoyado durante todo este tiempo, y me alentaron a terminar la tesis.*
- *A mi director, Matias Sanchez, por ser mí gran referente y mentor. Gracias por apoyarme, contagiarme su entusiasmo por la ciencia.*
- *A Marina Flamini, mi codirectora por sus palabras de aliento y enseñanzas durante mi formación.*
- *A Ivonne Uzair, mi bella amiga que me regaló esta profesión. Gracias por ser mi sostén incondicional y ser esencial en cada etapa transcurrida.*
- *A Evelyn Córdoba, por ser esa personita tan esencial para mí. Agradezco tu amistad inquebrantable, tu disposición para escucharme y tu apoyo constante en cada situación.*
- *A José Germano y Belén Deblasis, quienes han sido mi soporte desde la universidad, y han estado a mi lado durante esta etapa tan desafiante, acompañándome en cada una de mis crisis.*
- *A mis valiosas compañeras de laboratorio 2: Carla y Fiorella por ser mis compañeras y amigas de todos los días. Gracias por compartir charlas, risas y salidas.*
- *Al laboratorio 3: Maripi y Niubys por brindarme un lugarcito de contención y cariño. Gracias por estar siempre a mi lado durante todas las circunstancias que he enfrentado.*
- *A Juan Manuel Fernandez por estar dispuesto a ayudarme cada vez que lo necesité. Por contribuir con sus conocimientos en el desarrollo de mi objetivo de trabajo.*
- *A María José, autoridades y a todo el personal del IMBECU por lograr hacerme sentir ésta Institución como mi segundo hogar.*

**ÍNDICE**

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>11</b>

**CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**

<b>1.1</b>	<b>Cáncer .....</b>	<b>12</b>
1.1.1	Descripción general .....	12
1.1.2	Tipos de cáncer e Incidencia .....	13
<b>1.2</b>	<b>Cáncer de mama .....</b>	<b>14</b>
1.2.1	Subtipos moleculares .....	15
1.2.2	Factores de riesgo .....	17
<b>1.3</b>	<b>Transición hacia la menopausia .....</b>	<b>17</b>
<b>1.4</b>	<b>Gonadotropinas .....</b>	<b>19</b>
1.4.1	Estructura de las gonadotropinas .....	20
1.4.2	Regulación de la liberación y secreción de las gonadotropinas .....	21
1.4.3	Mecanismo de acción de los agonistas y antagonistas de GnRH .....	22
1.4.3.1	Agonista: Acetato de Leuprorelina .....	24
1.4.3.2	Antagonista: Degarelix .....	25
1.4.4	Receptores de la hormona luteinizante .....	25
1.4.5	Expresión extra-gonadal del LHR .....	27
<b>1.5</b>	<b>Movimiento celular .....</b>	<b>28</b>
1.5.1	Remodelamiento del citoesqueleto actínico .....	29
<b>1.6</b>	<b>Rol de la hormona luteinizante en los procesos migratorios .....</b>	<b>31</b>
1.6.1	Integradores de señales: paxilina .....	33
1.6.2	Cortactina y su participación en el movimiento celular .....	33
1.6.3	Ramificación actínica: Rol de N-WASP .....	35
<b>1.7</b>	<b>Nucleación actínica .....</b>	<b>37</b>

**CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

<b>2.1</b>	<b>Fundamentación del problema de investigación.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2</b>	<b>Hipótesis .....</b>	<b>39</b>

<b>2.3</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>40</b>
2.3.1	Objetivo General .....	40
2.2.2	Objetivos específicos principal.....	40
 <b>CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS</b>		
<b>3.1</b>	<b>Metodologías empleadas para los estudios en líneas celulares</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Cultivo de línea celular tumoral de mama</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Tratamientos</b> .....	<b>42</b>
3.1.2.1	Uso de inhibidores específicos de las vías de señalización .....	43
3.1.2.2	Silenciamiento genético con RNA de interferencia .....	43
3.1.2.3	Transfección con plásmidos .....	44
<b>3.1.3</b>	<b>Inmunodetección de proteínas en membranas de PVDF</b> .....	<b>46</b>
3.1.3.1	Extracción de proteínas .....	46
3.1.3.2	Cuantificación de proteínas .....	46
3.2.3.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	47
3.2.3.4	Western Blot (WB) .....	47
3.2.3.5	Cuantificación relativa de los niveles de fosforilación de las proteínas .....	49
<b>3.1.4</b>	<b>Inmunofluorescencia</b> .....	<b>49</b>
3.1.4.1	Análisis semicuantitativo de localización de las proteínas en estudio .....	50
<b>3.1.5</b>	<b>Inmunoprecipatación (IP)</b> .....	<b>50</b>
3.1.5.1	Obtención de lisados celulares .....	50
3.1.5.2	Incubación con anticuerpos .....	51
3.1.5.3	Lavados de las muestras .....	51
<b>3.1.6</b>	<b>Ensayo de adhesión celular</b> .....	<b>51</b>
3.1.6.1	Cuantificación del ensayo de adhesión celular .....	52
<b>3.1.7</b>	<b>Ensayo de migración celular</b> .....	<b>52</b>
3.1.7.1	Cuantificación del ensayo de migración celular .....	52
<b>3.1.8</b>	<b>Ensayo de invasión celular</b> .....	<b>53</b>
3.1.8.1	Cuantificación del ensayo de invasión celular .....	53
3.1.9	Análisis estadística .....	54
<b>3.2</b>	<b>Metodologías empleadas para los estudios <i>In silico</i></b> .....	<b>54</b>
3.2.1	Bioinformática- Análisis de expresión génica .....	54
3.2.2	Estudios de expresión génica basal entre subtipos celulares de cáncer de mama .....	54

3.2.3	Construcción de mapa de calor .....	55
3.2.4	Análisis de expresión génica diferencial (GED) .....	55
3.2.5	Tratamiento con LH en líneas celulares de cáncer de mama. Gráfico radar .....	56
3.2.3	Expresión basal de FSHR, LHCGR, SRC y PTK2. Diagrama de cajas .....	57
<b>3.3</b>	<b>Metodología para los estudios en tumores mamarios en ratones BALB/c .....</b>	<b>57</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Cultivo celular de línea murinas .....</b>	<b>57</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Tratamientos <i>in vitro</i> .....</b>	<b>58</b>
3.3.2.1	Inmunodetección de proteínas .....	58
<b>3.3.3</b>	<b>Tratamientos <i>in vivo</i> .....</b>	<b>58</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Uso de animales .....</b>	<b>59</b>
<b>3.3.5</b>	<b>Crecimiento tumoral ortotópico .....</b>	<b>59</b>
<b>3.3.6</b>	<b>Inmunohistoquímica .....</b>	<b>61</b>
<b>3.3.6.1</b>	<b>Análisis de la histología tumoral .....</b>	<b>62</b>
<b>3.3.7</b>	<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>62</b>

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

<b>4.1</b>	<b>Primer objetivo específico .....</b>	<b>63</b>
4.1.1	LH induce la remodelamiento actínica, a través de la rápida activación de la proteína reguladora de actina, N-WASP .....	63
4.1.2	LH induce una reorganización dinámica del citoesqueleto de actina a través de Src/FAK/paxilina en células de cáncer de mama .....	65
4.1.3	Cortactina participa en la reorganización del citoesqueleto actínico, inducido por LH, a través de una vía dependiente de paxilina .....	67
4.1.4	LH disocia la interacción entre FAK, cortactina y la subunidad Arp3 al promover la fosforilación del complejo Arp2/3 .....	69
4.1.5	LH controla el complejo Arp2/3 a través de la vía de señalización dependiente de Src/FAK/paxilina/cortactina y N-WASP.....	71
4.1.6	LH promueve los procesos adhesivos, migratorios e invasivos a través de la cascada Src/FAK/paxilina/cortactina/N-WASP/complejo Arp2-3 en células tumorales de mama .....	74
4.1.7	Esquemática vía de señalización desencadenada por LH. LH promueve la adhesión, migración e invasión de células de CM .....	76
<b>4.2</b>	<b>Segundo objetivo específico .....</b>	<b>78</b>
4.2.1	Análisis transcriptómico de diferentes subtipos de cáncer de mama .....	78

4.2.1.1	Análisis de Expresión Génica Diferencial y perfil de genes de interés en diferentes subtipos de cáncer de mama .....	81
4.2.2	Análisis de genes vinculados a la progresión del carcinoma mamario, y regulados tras los tratamientos con diversas dosis de gonadotropina .....	83
<b>4.3</b>	<b>Tercer objetivo específico .....</b>	<b>86</b>
4.3.1	Expresión de receptores de LH, FSH y proteínas quinasas claves en la regulación de la migración celular en líneas de cáncer de mama .....	86
4.3.2	Efectos de agonistas y antagonistas de GnRH sobre la regulación de Src y FAK .....	88
4.3.3	Acción de agonistas/antagonistas de GnRH e inhibidores quinasas en la progresión celular .....	89
4.3.4	Efecto de la combinación del agonista/antagonista de GnRH más PP2 y/o FAKi sobre el crecimiento tumoral en líneas celulares murinas LM3 .....	91
4.3.5	Efecto de leuprorelina y degarelix sobre el crecimiento tumoral en células murinas LM05 (ER+/PR+) .....	95

## **CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN**

5.1	Discusión .....	99
-----	-----------------	----

## **CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES**

6.1	Conclusiones .....	106
-----	--------------------	-----

## **CAPÍTULO 7: REFERENCIAS**

7.1	Referencias .....	107
-----	-------------------	-----

## **CAPÍTULO 8: ANEXO**

8.1	Anexo .....	116
-----	-------------	-----

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Capacidades adquiridas de las células tumorales .....	14
<b>Figura 2.</b> Incidencia de cáncer en varones y mujeres estimadas por la IARC para Argentina en 2020 .....	16
<b>Figura 3.</b> Etapas del ciclo reproductivo en la mujer .....	20
<b>Figura 4.</b> Eje hipotálamo-hipófisis-gónada .....	22
<b>Figura 5.</b> Estructuras de las hormonas gonadotropinas .....	22
<b>Figura 6.</b> Regulación de la liberación y secreción de las gonadotropinas.....	24
<b>Figura 7.</b> Modo de acción de agonistas y antagonista de GnRH/GnRH-R .....	26
<b>Figura 8.</b> Conformación de LHR .....	28
<b>Figura 9.</b> Mecanismo de acción hormonal .....	29
<b>Figura 10.</b> La migración celular depende de diferentes estructuras de filamentos de actina .....	32
<b>Figura 11.</b> Complejos Focales .....	34
<b>Figura 12.</b> Formación de complejos de adhesión focal .....	35
<b>Figura 13.</b> Estructura de los dominios de cortactina .....	37
<b>Figura 14.</b> Modelo de sinergismo entre los NPFs tipo I y II .....	38
<b>Figura 15.</b> Estructura y regulación de la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich...	39
<b>Figura 16.</b> Nucleación actínica .....	40
<b>Figura 17.</b> Protocolo empleado para la obtención de plásmidos .....	49
<b>Figura 18.</b> Esquema del protocolo para estimar la concentración proteica .....	51
<b>Figura 19.</b> Esquema del tratamiento de animales para la inducción de crecimiento tumoral ortotópico .....	61
<b>Figura 20.</b> LH promueve a través de LHR la fosforilación de N-WASP .....	65
<b>Figura 21.</b> LH promueve la fosforilación de FAK y paxilina a través de LHR .....	67
<b>Figura 22.</b> LH regula a cortactina a través de una vía de señalización dependiente de paxilina .....	69
<b>Figura 23.</b> LH regula la interacción entre FAK, cortactina y el complejo Arp2/3 .....	71
<b>Figura 24.</b> LH promueve la fosforilación de Src/FAK/paxilina/cortactina/N-WASP y el complejo Arp2/3 .....	73

<b>Figura 25.</b> Efecto de LH sobre la adhesión, migración e invasión en células de carcinoma mamario.....	76
<b>Figura 26.</b> Esquema de la vía de señalización desencadenada por LH .....	77
<b>Figura 27.</b> Expresión de genes implicados en el proceso de metástasis en un panel de células de cáncer de mama .....	82
<b>Figura 28.</b> Expresión de genes relacionados con la tumorigénesis, tras los tratamientos con LH a distintas concentraciones .....	84
<b>Figura 29.</b> Expresión de LHR, FSHR, Src y FAK en líneas celulares de cáncer de mama .....	86
<b>Figura 30.</b> Efecto de Leuprorelina y degarelix sobre la expresión y fosforilación de Src y FAK ....	88
<b>Figura 31.</b> Efecto de Leuprorelina/degarelix y PP2/FAKi en la progresión tumoral .....	90
<b>Figura 32.</b> Combinación de Leu y DEGA, junto con la combinación de PP2 y/o FAKi en el crecimiento del tumor .....	92
<b>Figura 33.</b> Efecto del agonista y antagonista de GnRH sobre el crecimiento tumoral de las LM05 .....	96

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Categorías principales de cáncer .....	15
<b>Tabla 2.</b> Niveles hormonales de las gonadotropinas .....	21
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos primarios .....	52
<b>Tabla 4.</b> Anticuerpos secundarios .....	53
<b>Tabla 5.</b> Genes involucrados en procesos celulares relacionados con la progresión tumoral .....	79

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AC: Adenilato ciclasa

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ARA-C: Clorhidrato de Citosina  $\beta$ -D-arabinofuranosido

Arp: Proteína relacionada a la actina

ARPC1-5: proteínas del complejo Arp2/3, subunidades de la 1 a la 5

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: albumina sérica bovina

CK-666: inhibidor de CK-666

CM: Cáncer de mama

Cdc42: Cell división control proteín 42, GTPasa de la de proteínas familia Rho

DAPI: 4'-6-diamidino-2-fenilindol

DEGA: Degarelix

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

E2: Estrógeno

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ER: Receptor de Estrógeno

ErbB-2 o HER2: Receptor de factor de crecimiento Epidérmico Humano 2

FAK: Quinasa de adhesión focal

FAKi: Inhibidor específico de FAK quinasa

FAs: Adhesiones Focales

FDA: Administración de alimentos y medicamentos

FSH: Hormona folículo estimulante

GED: Expresión diferencial de genes

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

GnRH-R: Receptor de la hormona liberadora de gonadotropina

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

GTP: guanosina trifosfato

hCG: Hormona Gonadotropina Coriónica humana

HRP: peroxidasa del rábano

Hs: Hora

IARC: Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer

LEU: Leuprorelina

LH: Hormona Luteinizante

LHR: Receptor de la hormona luteinizante

LM3: Líneas murinas 3

LM05: Líneas murinas 05

MEM: Minimum Essential Medium

Min: minutos

NK: Células asesinas naturales

NPF: Factor promotor de la nucleación actínica

N-WASP: Proteína WASP neural

ON: Toda la noche o Over night

P4: Progesterona

PBS: Buffer fosfato salino

PKA: Proteína quinasa A

PEI: Polietilenimina

PFA: paraformaldehído

PMSF: fenilmetilsulfonilo

PP2: 4-Amino-5-(4-chlorofenil)-7-(dimetiletil) pirazolo[3,4-d]pirimidina, inhibidor de Src

PR: Receptor de Progesterona

PVDF: fluoruro de polivinilideno

Rpm: revoluciones por minuto

RNA: ácido ribonucleico

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

SFB: Suero fetal bovino

TA: Temperatura ambiente

TBS: Buffer tris salino

TBST: Buffer tris salino con Tween20®

TM: Transición menopáusica

TRH: Terapia de Reemplazo Hormonal

TSHR: Receptor de la hormona estimulante de la tiroides

Src: Tirosina quinasa relacionada con el virus del sarcoma

SH2: dominio homólogo a Src, secuencia específica de aminoácidos que reconocen residuos de tirosina fosforilados.

WASP: proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich

WAVE1: proteína *Wiskott-Aldrich syndrome Verprolin Homologue-1*

WISK: Wiskostastin

**RESUMEN**

El cáncer de mama (CM) es un importante problema de salud pública que afecta a las mujeres en todo el mundo, siendo aproximadamente el 80% de los casos diagnosticados, son cánceres de mama dependientes de hormonas. Estudios previos sugieren que la hormona luteinizante (LH) puede desempeñar un papel en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama. Su progresión depende totalmente de la capacidad de invadir y metastatizar a sitios distantes, siendo fundamental en este proceso la migración celular. En este contexto, hemos demostrado que la LH también desempeña un papel en los tumores de células de cáncer de mama que expresan receptores funcionales de LH (LHR). Esta hormona regula la migración e invasión celular al controlar varias quinasas que activan las proteínas del citoesqueleto de actina. En nuestro estudio, hemos demostrado que LH induce la fosforilación de paxilina y su translocación hacia la membrana plasmática, donde se ensamblan los complejos de adhesión focal. Este proceso se desencadena a través de una señalización LHR extragonadal rápida a Src/FAK/paxilina, lo que da como resultado la fosforilación/activación de los factores promotores de la nucleación, como cortactina y N-WASP. Como resultado, los complejos Arp2/3 inducen la polimerización de actina, esencial para promover la adhesión, migración e invasión celular, mejorando así la diseminación metastásica de las células tumorales. Además, hemos analizado la expresión de un conjunto de genes implicados en el desarrollo y progresión tumoral en diferentes subtipos moleculares de CM. Evaluamos el papel de Src y FAK in vitro e in vivo, junto con el uso de agonistas/antagonistas de GnRH, en la migración, invasión y metástasis en líneas celulares, y en el crecimiento tumoral en un modelo murino. Mediante análisis bioinformático, observamos cambios aberrantes en los niveles de expresión en un amplio conjunto de genes involucrados en la biología del cáncer en varias líneas celulares de CM. También evaluamos el efecto de la LH a diferentes concentraciones (5, 50 mUI/ml) sobre un conjunto de genes implicados en el desarrollo y progresión tumoral, donde se observó un patrón diferente de genes regulados hacia arriba/abajo. Mediante el ensayo de crecimiento tumoral ortotópico en ratones, determinamos que degarelix disminuye el crecimiento tumoral, mientras que la leuprorelina aumenta el volumen tumoral. Paralelamente, observamos que el uso de inhibidores específicos de SRC (PP2) y FAK (FAKi) reduce el crecimiento tumoral, pero la combinación de PP2 y/o FAKi junto con degarelix potencia la acción inhibidora tumoral. Nuestros hallazgos proporcionan información relevante sobre cómo las gonadotropinas juegan un papel regulador importante en los genes involucrados en los procesos que promueven la metástasis de las células CM y los tumores mamarios en ratones hembras. A pesar de la complejidad de la señalización de LH en CM, el enfoque basado en análogos de GnRH administrados en combinación con PP2 o FAKi puede ser una estrategia eficaz para el tratamiento de pacientes metastásicos. Estos hallazgos podrían ser útiles para desarrollar nuevos fármacos que interfieran con la agresividad de los tumores de mama en mujeres posmenopáusicas.

## **CAPÍTULO 1**

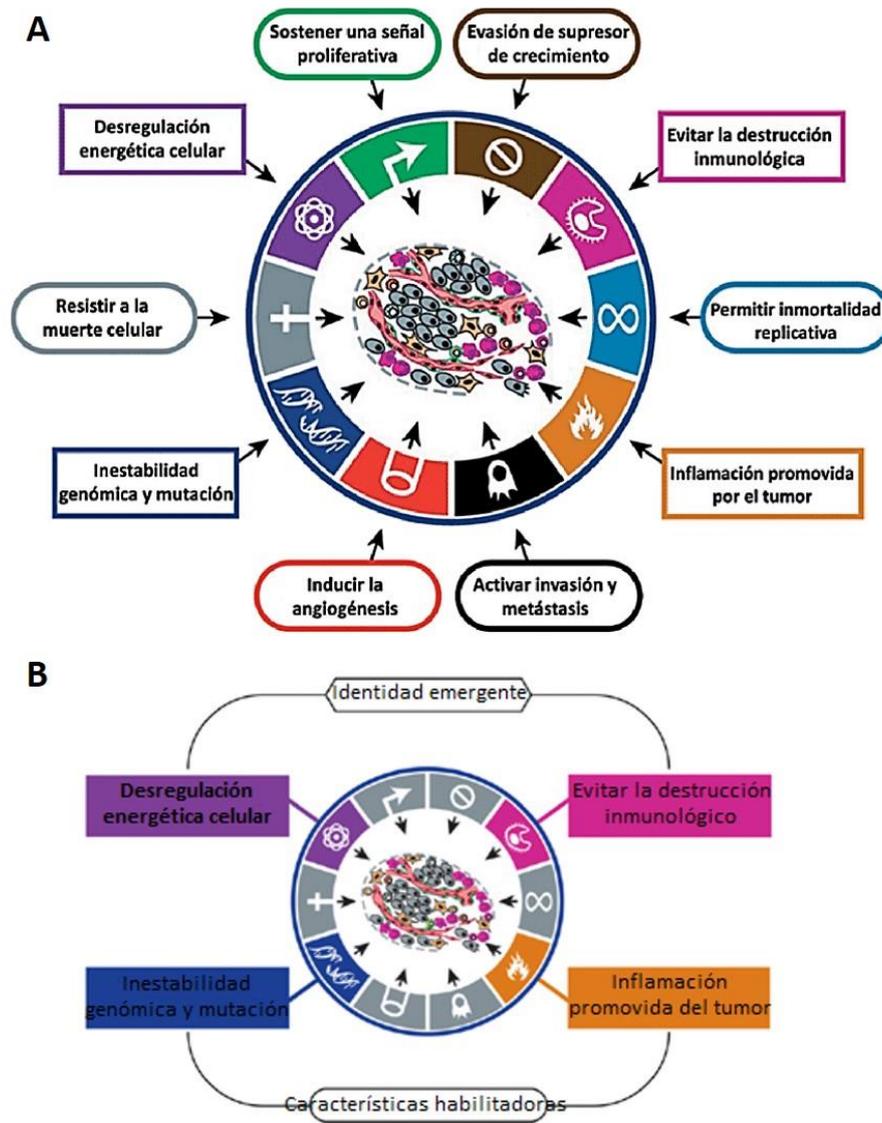
### **INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 Cancer**

##### **1.1.1. Descripción general**

El cuerpo humano produce células nuevas constantemente para reemplazar a las células envejecidas que mueren. Sin embargo, en algunas ocasiones, este proceso no funciona como debería y células innecesarias empiezan a crecer sin control, mientras que las células envejecidas no mueren como es debido. Este crecimiento descontrolado puede dar lugar a la formación de masas conocidas como tumores o neoplasias, que pueden llegar a destruir y reemplazar los tejidos normales. Dependiendo de su comportamiento, se clasifican en dos tipos: benignos o malignos [1]. Los tumores benignos no son considerados cancerosos, ya que no crecen en forma desproporcionada ni agresivamente; no invaden tejidos adyacentes y no hacen metástasis a tejidos u órganos distantes. Por lo contrario, los tumores malignos son considerados células cancerígenas, ya que adquieren nuevas capacidades distintivas. Los mismos, poseen la capacidad de proliferar sin requerir una señal inductora externa, evaden las señales supresoras del crecimiento, resisten la muerte celular programada (apoptosis), permiten la inmortalidad replicativa, inducen la angiogénesis (vascularización) y finalmente adquieren la capacidad de migrar e invadir a tejidos distantes, mediante un proceso llamado metástasis (*Figura 1A*).

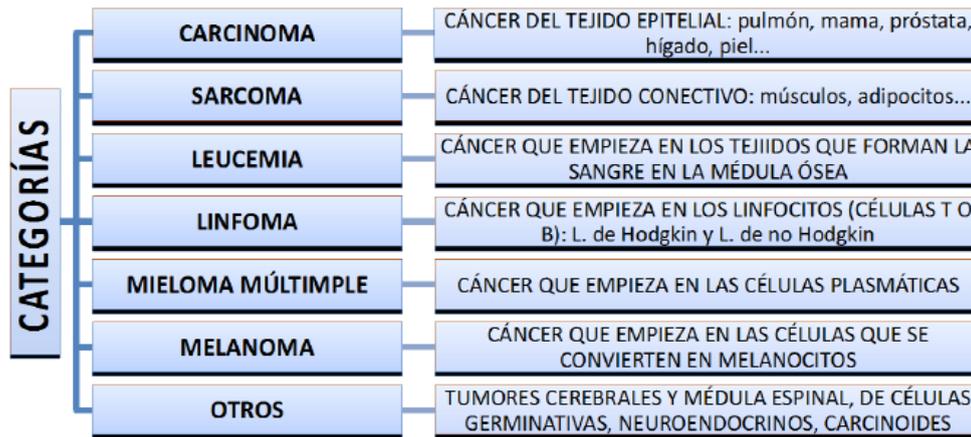
Tales características del cáncer han sido mencionadas como capacidades funcionales adquiridas que permiten que las células tumorales sobrevivan, proliferen y se diseminen. Sin embargo, las dos características principales que hacen posible la formación de un microambiente tumoral son la inestabilidad del genoma y la inflamación promovida por el tumor. Además, en esta última década, se han añadido dos características distintivas emergentes: la reprogramación del metabolismo energético de la célula tumoral y el hecho de evitar la destrucción por el sistema inmune, al evadir en particular a los linfocitos T y B, macrófagos y células asesinas naturales (NK) [2] (*Figura 1B*).



**Figura 1. Capacidades adquiridas de las células tumorales. A)** Las 10 características distintivas de una célula tumoral. **B)** Dos características adicionales que están involucradas en las células tumorales, las cuales aún no se han generalizado por lo que se las considera emergentes: la inestabilidad genómica y, por tanto, la mutabilidad, impulsan la progresión tumoral y la respuesta inflamatoria promovida por el tumor. Fuente: Hallmarks of cancer: the next generation [2].

### 1.1.2. Tipos de cáncer e Incidencia

El cáncer es una enfermedad compleja que se clasifica según el tipo celular y el tejido en el que se origina. Los cinco tipos principales de cáncer son carcinomas, sarcomas, linfomas, mielomas y otros. Los carcinomas son los más comunes, representando alrededor del 90% de todos los casos de cáncer. Los sarcomas se originan en los tejidos conectivos, como los huesos y los músculos, mientras que los linfomas y los mielomas se originan en las células del sistema inmunológico y la médula ósea, respectivamente. En la siguiente tabla se presenta un resumen de los distintos tipos de cáncer según su origen (INC, 2022)



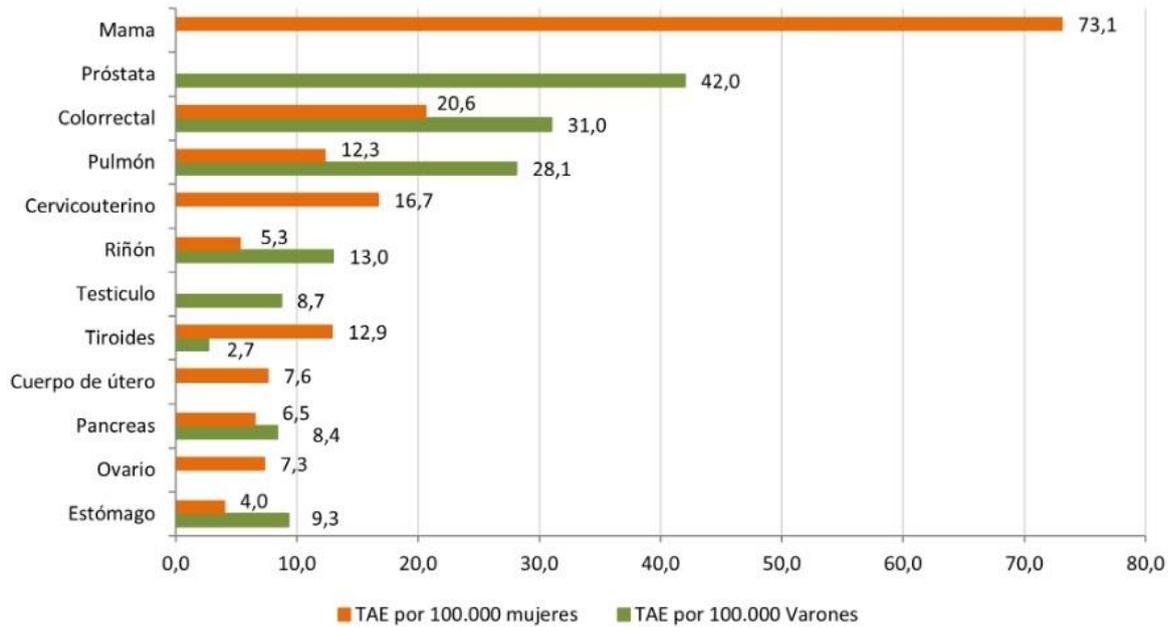
**Tabla 1. Categorías principales de cáncer.**

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la rápida y descontrolada proliferación y diseminación celular. A pesar de los importantes avances logrados en los últimos 50 años en su comprensión y tratamiento, sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, sin distinción geográfica o racial. Según el informe de Globocan, se estima que durante el 2022 se registraron 18,1 millones de nuevos casos de cáncer y casi 9,9 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad [1]. En las mujeres, el carcinoma mamario es actualmente el más frecuente a nivel mundial, con un estimado de 2,3 millones de nuevos casos (11,7%), seguido del cáncer de pulmón (11,4%), cáncer colon-rectal (10,0%), cáncer de próstata (7,3%) y cáncer de estómago (5,6%) [1]

En Argentina, según las últimas estimaciones de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), la tasa de incidencia de cáncer es de 212 casos por cada 100.000 habitantes, lo que equivale a más de 125.000 nuevos casos de cáncer en ambos sexos cada año, con un porcentaje similar en hombres y mujeres. En 2022, la mortalidad por cáncer en Argentina fue de 118 y 87 defunciones por cada 100.000 habitantes, en mujeres y hombres respectivamente, lo que representa el 19,2% del total de defunciones en la población. Esto sitúa al cáncer como la segunda causa de muerte en Argentina, después de las enfermedades cardiovasculares (28,5%) y las enfermedades respiratorias (19%) (Figura 2).

## **1.2 Cáncer de mama**

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea que se caracteriza por la proliferación incontrolada de células epiteliales mamarias. Estas células anormales pueden diseminarse a través del sistema linfático y/o sanguíneo y propagarse a diferentes partes del cuerpo lo que se conoce como metástasis. El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte en mujeres en todo el mundo, con una alta incidencia en Argentina, donde se registran aproximadamente 22.000 nuevos casos cada año. Esto representa el 17,2% de todos los tumores



**Figura 2. Incidencia de cáncer en hombres y mujeres, estimada por la IARC, para el año 2022 en Argentina.** Las tasas están ajustadas por edad con referencia a la población mundial, y se expresan por cada 100.000 habitantes. Fuente: trabajo realizado por SIVER/INC, basado en los datos recopilados por *Globocan 2020* [1]. Argentina 2021 (INC, 2023).

malignos y cerca de un tercio de los cánceres femeninos. Aunque esta enfermedad también puede afectar a los hombres, es mucho más común en mujeres. A pesar de que se han logrado importantes avances en su detección temprana y tratamiento, el cáncer de mama sigue siendo un gran desafío para la salud pública y la investigación médica. Por esta razón, es fundamental seguir promoviendo la conciencia sobre esta enfermedad y continuar trabajando en su prevención y tratamiento [3] [INC, 2022].

### 1.2.1. Subtipos moleculares

Durante el siglo XXI, se inició la aplicación de análisis inmunohistoquímicos y genéticos en las biopsias tumorales, lo que permitió establecer una nueva clasificación de los carcinomas de tejido mamario basada en sus características genéticas [4]. A pesar de que generalmente se considera el cáncer de mama como una enfermedad única, existen al menos cuatro subtipos moleculares diferentes que varían biológicamente en su composición, en la respuesta al tratamiento y en los resultados. Para identificar estos subtipos, se utilizan marcadores biológicos como la presencia o ausencia de receptores hormonales, como estrógenos (RE) y/o progesterona (RP), niveles de expresión del receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (ErbB-2 o HER-2) y el marcador de la proliferación celular, llamado Ki-67

El tejido mamario está constantemente influenciado por hormonas, especialmente estrógenos (E2) y progesterona (P4), que desempeñan un papel fundamental en la regulación de los ciclos menstruales de la mujer [5]. Por ello, un tumor que presente receptores para E2 y P4 será un tumor

que puede ser tratado con terapia hormonal y, por lo tanto, se asocia con un pronóstico más favorable tras el tratamiento. Por otro lado, un tumor que carece de estos receptores no se ve afectado por estas hormonas, lo que implica que será menos diferenciado y, por lo tanto, tendrá un peor pronóstico [6]. Cuando hablamos de un *tumor diferenciado*, nos referimos a aquel en el que las células cancerígenas y la organización del tejido se asemejan a las células y tejidos normales, lo que generalmente indica un mejor pronóstico. Por el contrario, los *tumores indiferenciados* tienen células anormales y estructuras de tejido que faltan, lo que los hace más resistentes al tratamiento y de peor pronóstico en general [7].

El *gen HER-2 (ERBB-2)* se encuentra de forma natural en el tejido mamario normal y su proteína regula la división y reparación de daño celular [8]. Los tumores que presenten una amplificación en *HER-2* disponen de diversos fármacos que actúan directamente contra la proteína, lo que permite un enfoque terapéutico más preciso. Por otro lado, si un tumor no tiene una amplificación de *HER-2*, puede tener menos opciones de tratamiento específico y, por lo tanto, un pronóstico más desfavorable [8]. Además de *HER-2*, otro criterio de clasificación importante es *Ki-67*, una proteína nuclear relacionada con la replicación celular que se puede detectar mediante inmunohistoquímica en biopsias. La combinación de estos marcadores ha permitido la definición de cuatro subtipos moleculares diferentes de tumores mamarios.

- *Luminal A*: Este subtipo de cáncer de mama abarca alrededor del 50% de todos los casos y se caracteriza por la expresión de receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP), ausencia de *HER-2* (RE+/RP+/HER-2-), y por tener un *Ki-67* menor al 15%. Debido a su baja expresión de *HER-2* y *Ki-67* hace que sea un subtipo de crecimiento lento, menos agresivo y se asocia con un mejor pronóstico. El tratamiento habitual para estos tumores es la terapia hormonal [9, 10]
- *Luminal B*: Los tumores luminales B expresan receptores de estrógeno y progesterona, así como *HER-2* (RE+/RP+/HER-2+), y suelen tener niveles elevados de *Ki-67* (>15%). Representan alrededor del 14% de los cánceres de mama [10, 11]. Este subtipo tiende a ser más agresivo que el luminal A, y puede ser tratados con terapia hormonal, fármacos específicos contra *HER-2* y quimioterapia [6, 12]
- *Sobreexpresión de HER-2*: este subtipo de carcinoma no presenta receptores para E2 ni P4. Se define por una sobreexpresión de *HER-2* (RE-/RP-/HER-2+) y es independiente de *Ki-67*, que tenderá a estar elevado. Representa el 10% de los tumores de mama y se asocia con un crecimiento y propagación más agresivos, así como con un pronóstico menos favorable en comparación con los subtipos que expresan RE+/RP+ [13]. Podrá ser tratado con agentes específicos anti-Her-2 (Trastuzumab, Pertuzumab).
- *Triple Negativo*: este subtipo representa el 16% del cáncer de mama, se caracteriza por no presentar receptores de estrógenos ni progesterona y no sobreexpresar *HER-2* (RE-/RP-/HER-2-).

Es independiente de Ki-67, aunque suele estar elevado [7]. Se expresan típicamente en las células basales del epitelio de la glándula mamaria normal, y presenta una expresión elevada de genes asociados a la proliferación celular. Es el subtipo más agresivo y se asocia con un mal pronóstico. No es susceptible a terapias hormonales, ni terapias dirigidas contra HER-2.

### 1.2.2. Factores de riesgo

Los factores de riesgo son condiciones que aumentan la probabilidad de una persona a desarrollar una enfermedad, como el cáncer. En el caso del cáncer de mama, se han identificado factores de riesgo que se pueden dividir en dos grupos: *intrínsecos* y *extrínsecos*. El primer grupo, conocido como factores *inherentes* o *intrínsecos*, engloba elementos como el género, edad, raza, antecedentes familiares, inicio temprano de menstruación y menopausia tardía. Estos dos últimos factores, afectan el tiempo de exposición del tejido mamario a hormonas reproductivas. Cabe destacar que estos parámetros son independientes y no se someten a modificaciones simples en el transcurso de la vida de un individuo [14, 15]. Por otro lado, el segundo grupo comprende los factores *extrínsecos* vinculados con el estilo de vida de la persona. Estos factores, a diferencia de los intrínsecos, son dependientes y pueden ser modificados a través de elecciones individuales. Incluyen elementos como la dieta, como la obesidad postmenopáusica, el uso prolongado de terapia hormonal para tratar los síntomas de la menopausia (THR), el hábito de fumar, y el consumo de alcohol [15].

## 1.3 Transición hacia la menopausia

La función reproductiva femenina implica ciclos repetitivos de desarrollo de folículos, ovulación, desarrollo del cuerpo lúteo y regresión lútea. Este sistema de ciclos ovulatorios se logra mediante la integración funcional y temporal precisa de la función hipotalámica, pituitaria y ovárica [16]. Tras el inicio de ciclos irregulares que experimenta la mujer a partir de su cuarta década, cambios biológicos y endocrinos, tales como variaciones en la longitud del ciclo menstrual y hormonal, la mujer entra en una etapa de *transición menopáusica (TM)* o *perimenopausia*. La perimenopausia puede durar tan solo unos meses o hasta 8 años. En promedio dura entre 4 y 5 años. Durante esta transición, los niveles hormonales varían y después disminuyen, dando paso a nuevas sensaciones, síntomas y cambios. Pasado este periodo de cambios, la mujer experimenta una nueva etapa llamada menopausia [17].

La menopausia es un proceso biológico que se define como el cese permanente del periodo menstrual debido a la pérdida de la actividad del folículo ovárico, marcando el final de la vida reproductiva de la mujer [18]. Una de las características principales de la menopausia es la amenorrea, que se produce tras un aumento en los niveles de gonadotropinas (LH y FSH) y, por el

cual, provoca una disminución de los niveles de producción de las hormonas sexuales, tales como estrógeno y progesterona [19] (Figura 3).

Durante las últimas décadas, el aumento de la longevidad humana en nuestra sociedad ha provocado un incremento considerable en el número de mujeres que vivirán un tercio o más de su vida en la etapa menopáusica, es decir, que van a convivir con niveles bajos de estrógeno y progesterona, y elevados niveles de gonadotropinas [20]. Estos cambios hormonales conllevan una serie de síntomas que podrían ser tratados mediante una Terapia de Reemplazo Hormonal (TRH). La TRH es un tratamiento que los médicos pueden recomendar para aliviar los síntomas comunes de la menopausia, además de proporcionar protección contra la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas [21]. Sin embargo, una de las principales controversias del uso de la TRH es el aumento sobre la incidencia de cáncer de mama y otras enfermedades. Este efecto adverso limita en cierta medida el uso clínico de TRH durante períodos prolongados para la prevención de la osteoporosis, como también enfermedades cardiovasculares [22]. En el contexto del carcinoma mamario, múltiples investigaciones han demostrado que la exposición prolongada a estrógenos, durante la TRH, se relaciona con una menor propensión a la diseminación. Curiosamente la TRH no reduce la tasa de incidencia de cáncer de mama, bajo ésta terapia los tumores pueden surgir y desarrollarse en el sitio inicial del tumor pero tienen una menor probabilidad de propagarse y formar metástasis en sitios distantes [23].

Último periodo menstrual (PMF)								
↓								
Etapas	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2
Terminología	Reproductivo			Menopáusico/Transición		Postmenopáusico		
	Temprano	Pico	Tardío	Temprano	Tardío*		Temprano*	Tardío
				Perimenopausia				
Duración de las etapas	Variable			Variable		a 1 yr	b 4 yr	Hasta la muerte
Ciclo Mestrua	Variable a regular	Regular		Duración del ciclo variable (> 7 días diferentes de lo normal)	> 2 Ciclos omitidos y un intervalo de amenorrea (> 60 días)	Amen ~12 mo	Ninguno	
Endocrino	FSH normal		↑ FSH	↑ FSH			↑ FSH	

**FIGURA 3. ETAPAS DEL CICLO REPRODUCTIVO EN LA MUJER.** ETAPA 0: PERÍODO DE LA MENSTRUACIÓN FINAL. ETAPA -5 A -3: ETAPA REPRODUCTIVA TEMPRANA, PICO DE LA ETAPA REPRODUCTIVA Y FASE TARDÍA. ETAPA -2 Y -1: TRANSICIÓN MENOPÁUSICA TEMPRANA Y TARDÍA. ETAPA +1A: PRIMER AÑO TRÁS EL PERÍODO MENSTRUAL FINAL. ETAPA +1B: 2 A 5 AÑOS LUEGO DE LA MENOPAUSIA. ETAPA +2: AÑOS POST MENOPÁUSICOS POSTERIORES. FUENTE: THE MENOPAUSAL TRANSITION [24].

### 1.4 Gonadotropinas

El cáncer de mama es una de las principales causas de mortalidad en mujeres a nivel mundial. La mayoría de los casos de este tipo de cáncer son hormono-dependientes, lo que significa que expresan receptores de estrógenos (RE) y se ven afectados por tratamientos que reducen los niveles de estas hormonas o interfieren con sus receptores [25]. Aunque estos tratamientos son efectivos en muchos casos, todavía hay un porcentaje significativo de pacientes que no responden a ellos o que desarrollan resistencia.

En estos últimos años diversos grupos de investigación, incluido el nuestro, se han abocado a estudiar el accionar de las gonadotropinas en el cáncer de mama. Las gonadotropinas son hormonas que regulan las funciones ováricas y testiculares, y son esenciales para el crecimiento, desarrollo sexual y la reproducción. Aunque actualmente la evidencia disponible es escasa y contradictoria, hay indicios cada vez más notorios de que estas hormonas pueden desempeñar un papel regulatorio en la mama, así como también en el cáncer de mama [26].

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es la responsable en estimular la secreción de las gonadotropinas, tanto de la hormona folículo estimulante (FSH) como la hormona luteinizante (LH) en la glándula pituitaria anterior [27-29]. Tanto en el hombre como en la mujer, los niveles de LH y FSH varían en el suero según la etapa en que se encuentran. Antes de la pubertad, los niveles plasmáticos de LH y FSH son bajos o indetectables. En las mujeres, los niveles de gonadotropinas oscilan con la edad y las fases del ciclo menstrual [30] (*Tabla 2*). Por lo tanto, los niveles de LH y FSH son normalmente bajos durante la infancia en las mujeres, pero a medida que comienza la etapa menopáusica comienzan a aumentar los niveles, por lo tanto, la secreción de LH y FSH se mantiene elevada durante la postmenopausia [18].

Tabla 2. Niveles de LH y FSH					
	LH			FSH	
<b>Mujeres</b>					
<i>Niñez</i>	< 5UI/ml			< 5UI/ml	
<i>Edad Reproductiva (fértil)</i>	Fase folicular: 16 UI/ml	Ovulación: 40-152 UI/ml	Fase Luteal: 5-15 UI/ml	Fase Folicular: 7-25 UI/ml	Fase Luteal: 5-15 UI/ml
<i>Postmenopausia /Castración</i>	48-96 UI/ml			40- 250 UI/ml	
<b>Hombres</b>					
<i>Niñez</i>	< 5UI/ml			< 5UI/ml	
<i>Adulto</i>	5-25,5 UI/ml			5-25 UI/ml	
<i>Castración</i>	48-96 UI/ml			> 30 UI/ml	

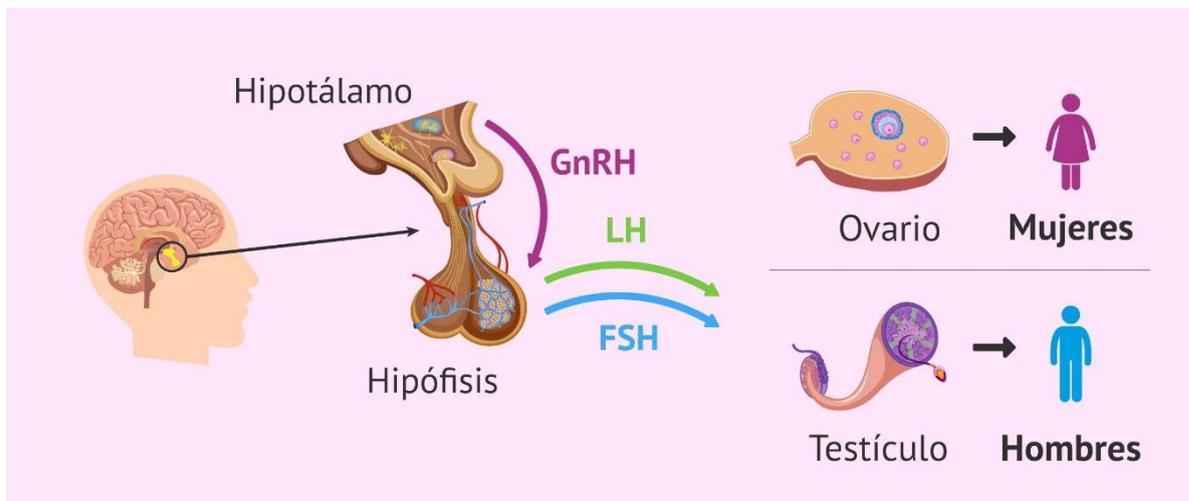
**Tabla 2. Niveles hormonales de las gonadotropinas.** Los niveles de LH y FSH en el suero varían según en la etapa en que se encuentra la mujer como también el hombre. Se diferencian en tres etapas: la niñez (<10 años); edad reproductiva y la postmenopausia (>45 años). Fuente: Measurement of Human Luteinizing Hormone in Plasma by Radioimmunoassay [30].

Aunque aún no se comprende el papel de las gonadotropinas en el carcinoma mamario, hay evidencias que sugieren que estas hormonas pueden ser un factor importante en el desarrollo,

progresión y respuesta al tratamiento de esta enfermedad. Se ha demostrado que niveles elevados de LH y FSH en situaciones como la postmenopausia, menopausia tardía, síndrome de ovario poliquístico y pacientes sometidos a inducción de la ovulación, son factores de riesgo para desarrollar cáncer de ovario y cáncer de mama [31, 32]. Por lo contrario, situaciones que mantienen normales o reducidos los niveles de las gonadotropinas, como embarazos múltiples, ligaduras de trompas, lactancia materna y el uso de anticonceptivos orales, han demostrado presentar un menor riesgo de contraer cáncer [33, 34].

#### 1.4.1 Estructura de las gonadotropinas

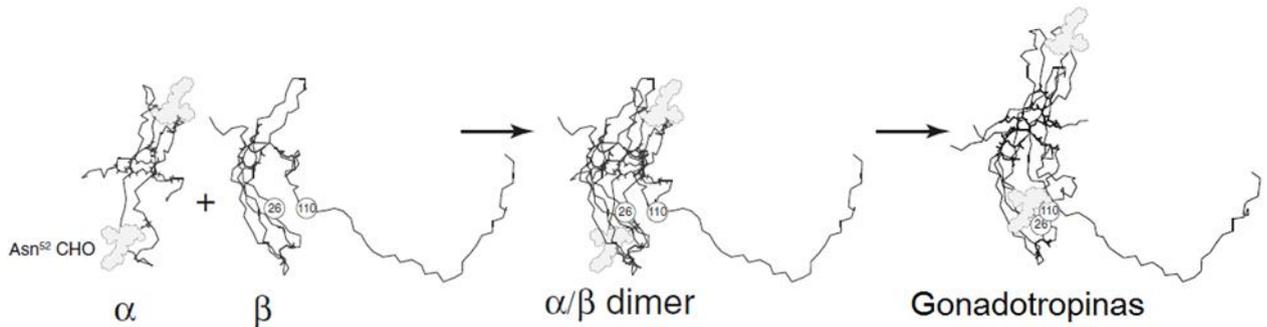
Las gonadotropinas, también conocidas como gonadotrofinas, son un grupo de hormonas formado por LH, FSH, y la gonadotropina coriónica humana (hCG). Tanto FSH como LH, se sintetizan en la hipófisis en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH. La GnRH es producida en el hipotálamo de manera pulsátil y estimula la liberación de las gonadotropinas FSH y LH por la hipófisis. Por este motivo, la regulación hormonal de los procesos reproductivos la lleva a cabo el llamado eje hipotálamo-hipófisis-gónada [35]. Dichas hormonas van a ejercer su función principal en las gónadas, es decir, en los ovarios y en los testículos, por lo tanto, son importantes para la regulación y el buen funcionamiento de procesos relacionados con la reproducción femenina y masculina (*Figura 4*).



**Figura 4. Eje hipotálamo-hipófisis-gónada**

En cuanto a su estructura, las gonadotropinas son glicoproteínas heterodímeras, caracterizadas por su riqueza en puentes disulfuro. Estas hormonas están compuestas por dos subunidades proteicas que se asocian de manera no covalente. Cada variante de gonadotropina (FSH, LH y hCG) comparten subunidades alfa ( $\alpha$ ) con una secuencia aminoacídica común, mientras que la subunidad beta ( $\beta$ ) le confiere a cada una de estas hormonas una actividad biológica específica [26, 36, 37]. En términos de estructura, muestran una notoria homología y comparten un mecanismo de acción

similar. Esto se manifiesta al interactuar con receptores específicos pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G, caracterizados por tener siete dominios transmembrana (Figura 5).

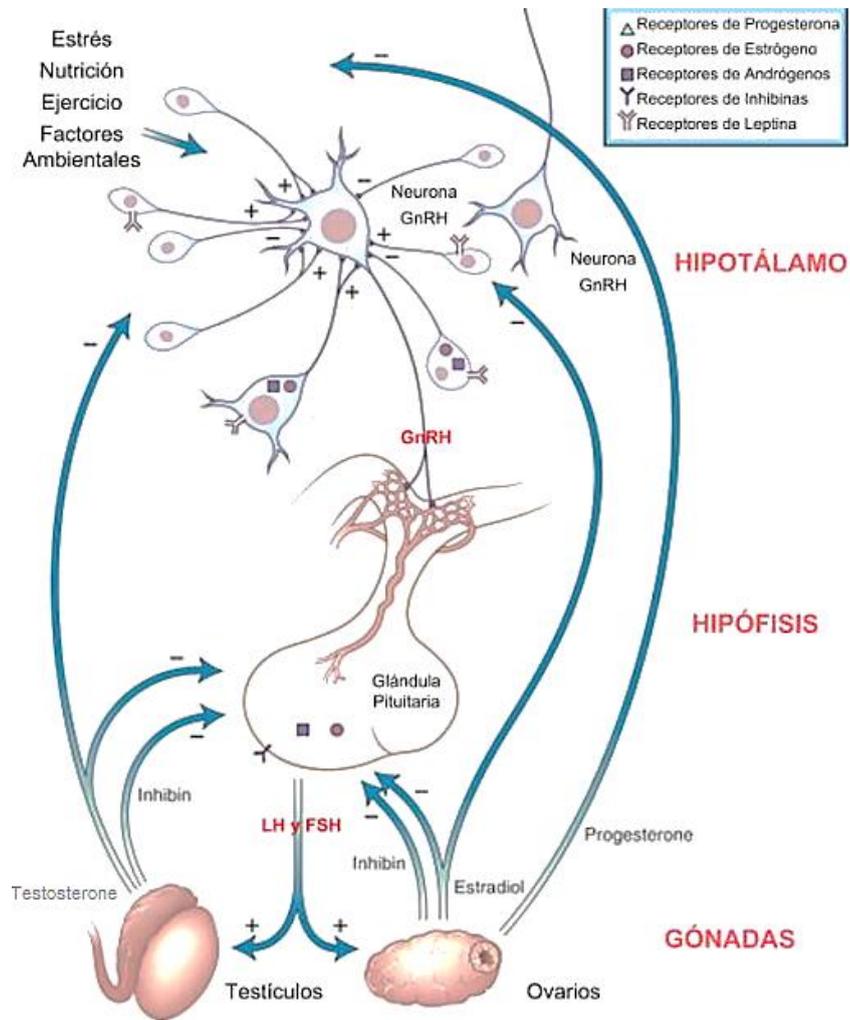


**Figura 5. Estructuras de las hormonas gonadotropinas.** Las gonadotropinas están constituidas por dos subunidades proteicas asociadas de forma no covalente. Todas poseen una subunidad de secuencia aminoacídica común, denominada  $\alpha$ , y la subunidad  $\beta$  es la que confiere actividad biológica específica a cada una de ellas. Fuente: Synthesis and secretion of gonadotropins including structure-function correlates [38].

#### 1.4.2 Regulación de la liberación y secreción de las gonadotropinas

La síntesis y secreción de LH y FSH está controlada principalmente por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que es un decapeptido neuroendocrino hipotalámico [39]. La GnRH es sintetizada en neuronas hipotalámicas y secretada de forma pulsátil en la circulación portal, donde actúa principalmente en la hipófisis anterior. Se une a su receptor acoplado a la proteína G, el receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH-R), que se encuentran en las células gonadotropinas en la glándula pituitaria anterior, permitiendo estimular la producción de las gonadotropinas [40]. Estas hormonas, a su vez, ingresan a la circulación periférica, actuando en los ovarios y en los testículos para regular la foliculogénesis, esteroidogénesis, ovulación y espermatogénesis respectivamente [41]. Las concentraciones de LH y FSH secretadas varían de acuerdo a la amplitud y la frecuencia del pulso de GnRH [42]. La secreción de LH se estimula preferentemente a frecuencias altas del pulso de GnRH, mientras que la FSH se estimula a frecuencias bajas. En las mujeres, el patrón de liberación de GnRH y de las gonadotropinas varía a lo largo del ciclo menstrual. En la fase folicular y lútea temprana, FSH predomina más que LH, mientras que, en la fase folicular tardía, LH es más dominante que FSH [39, 43]. Las hormonas esteroideas sexuales de las gónadas, tales como el andrógeno, estrógeno y progesterona, también son importantes para la regulación de la función reproductiva. Estas hormonas, cuya síntesis está controlada por las gonadotropinas, presentan diversos efectos sobre la biosíntesis y secreción de LH y FSH. Las hormonas sexuales regulan de manera negativa las concentraciones séricas y pituitarias de las gonadotropinas [37]. Paradójicamente, además de su efecto regulador negativo, los estrógenos también son capaces de aumentar (regulador positivo) la secreción de LH desde la hipófisis. Por otra parte, se han descubierto otros factores que influyen en la liberación de las gonadotropinas por la glándula pituitaria anterior. Se han identificado varios péptidos de origen

gonadal (inhibina y activina) que pueden regular la secreción de FSH, tanto de forma positiva como también negativa e independientemente de la regulación de LH [37] (Figura 6).



**Figura 6. Regulación de la liberación y secreción de las gonadotropinas**

### 1.4.3 Mecanismo de acción de los agonistas y antagonistas de GnRH

En las últimas décadas, el estudio profundizado del funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, ha permitido comprobar que la expresión de GnRH y su receptor se ha establecido claramente en varios tejidos, ya sea relacionados (ovarios, mama y endometrio) o no (pulmón, corazón, glándulas suprarrenales, estomago, piel e intestino) con el sistema reproductivo [42, 44-46]. La expresión de GnRH y su receptor en estos tejidos ha ganado mucha atención, y varios grupos de investigación han establecido su papel durante la proliferación y motilidad celular. Actualmente, GnRH-R y GnRH son objetivos moleculares de tratamientos farmacológicos para patologías dependientes de esteroides, incluyendo tumores dependientes de hormonas. Es por ello, que se han desarrollado drogas que alteran la síntesis y liberación de las hormonas involucradas en el funcionamiento reproductivo o no [26, 47].

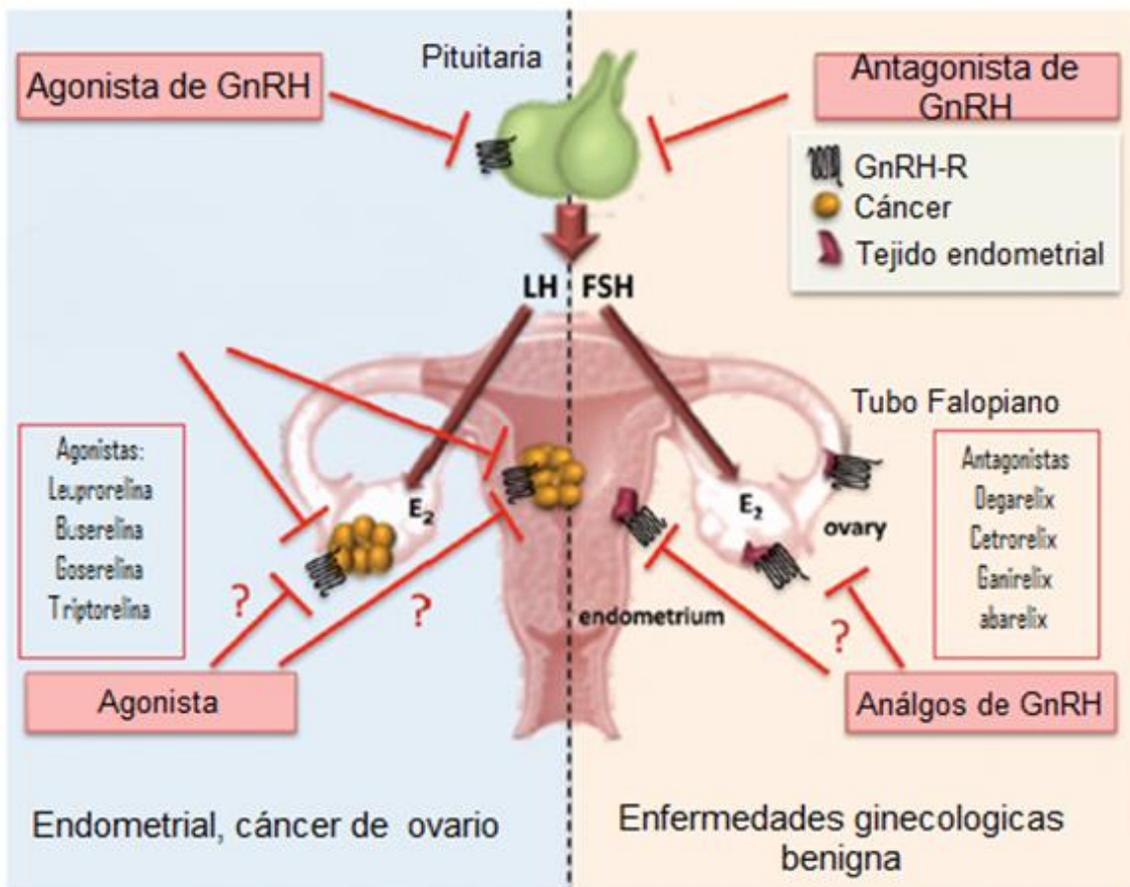
Un ejemplo de esto, es el *uso de agonistas y antagonistas de GnRH*. Los agonistas y antagonistas de GnRH son fármacos que actúan directamente sobre los receptores de la hormona liberadora de gonadotropina en la hipófisis. Los *agonistas de GnRH*, también conocidos como análogos de GnRH, son un tipo de terapia hormonal que actúa sobre el sistema endocrino para reducir los niveles de las gonadotropinas, y, por ende, de las hormonas sexuales. Aunque inicialmente provocan un aumento transitorio en la producción de LH y FSH, después de su uso prolongado, reducen su producción a niveles muy bajos debido a la desensibilización de los receptores de GnRH. Esto conduce a una disminución en la producción de testosterona y estrógeno en hombres y mujeres, respectivamente. Los *antagonistas de GnRH*, por otro lado, se unen competitivamente a los receptores de GnRH, evitando la acción de los pulsos de GnRH endógenos en la glándula pituitaria, provocando una disminución en la secreción de las gonadotropinas (*Figura 7*). Debido a que la producción de LH y FSH se interrumpe rápidamente, los niveles de estrógeno y testosterona disminuyen en las mujeres y los hombres [48, 49]. *Los análogos de GnRH se utilizan clínicamente* en los tratamientos de fertilidad asistida para prevenir picos prematuros de LH durante la hiperestimulación ovárica controlada [50-52]. Además, son utilizados para tratamientos como la endometriosis, fibromas uterinos, como así también para aliviar los síntomas de la menopausia (sofocos y pérdida ósea) [53, 54].

*El uso de agonistas y antagonistas de GnRH* también ha demostrado ser efectivo como terapia adyuvante en tratamientos neoplásicos de tumores hormono-dependientes, como el cáncer de mama, ovario y próstata. En el caso del cáncer de mama, esta enfermedad depende en gran medida de las hormonas sexuales para su crecimiento y propagación, por lo que los agonistas y antagonistas de GnRH se han convertido en potentes dianas terapéuticas para disminuir los efectos adversos de estas patologías dependientes de esteroides [45, 55]. *La administración de dosis elevadas y/o sostenidas de agonistas de GnRH*, contrariamente a la estimulación pulsátil natural de GnRH (pulsos cortos e intervalos de 60 a 90 min), induce la desensibilización de GnRH-R y, a su vez, reduce la secreción de gonadotropinas, lo que resulta en la inhibición de la producción de hormonas sexuales [56]. Este proceso es lento, siendo precedido por el llamado fenómeno de “llamarada o brote”, es decir, una estimulación inicial del eje pituitario gonadal que podría ser responsable de un aumento de LH y FSH, como también sus receptores que inducen una aceleración inicial de la actividad del cáncer. Por el contrario, *los antagonistas de GnRH se dirigen competitivamente al GnRH-R*, provocando una inhibición directa e inmediata de la liberación de las gonadotropinas y, en consecuencia, las hormonas sexuales [45, 49, 57]. Estos tratamientos representan una alternativa efectiva para reducir los niveles de hormonas sexuales y gonadotropinas en pacientes con cáncer de mama, lo que disminuye el crecimiento y propagación de la enfermedad y mejora la calidad de vida de los pacientes.

1.4.3.1 Agonista: Acetato de Leuporelina

El acetato de leuporelina, también conocido como leuporelina, es un análogo sintético no peptídico de la hormona liberadora de gonadotropina. A diferencia de la GnRH de origen natural, la leuporelina posee una considerable potencia en la inducción de la liberación de las gonadotropinas. Al unirse a los receptores hipofisarios de GnRH, provoca un aumento inicial en los niveles circulantes de las hormonas luteinizante y folículo estimulante, lo que resulta en un incremento en los niveles de las hormonas sexuales [58]. Sin embargo, cuando se administra de manera continua, no pulsátil, el agonista de GnRH induce la inhibición de la síntesis y secreción de las gonadotropinas, además de suprimir la producción de hormonas esteroideas [59, 60].

Gran parte de los casos de cáncer de mama son hormono-dependientes, los cuales expresan receptores de estrógeno, y se ven afectados por tratamientos que reducen los niveles de esta hormona, como los inhibidores de aromatasa o antagonistas del receptor de estrógeno, como el tamoxifeno. Actualmente, diversos estudios han demostrado la efectividad de la combinación de



**Figura 7. Modo de acción de agonistas y antagonista de GnRH/GnRH-R.** Ambos disminuyen los niveles de LH y FSH uniéndose a los receptores de GnRH en la glándula pituitaria. No obstante, los agonistas inducen la liberación de elevadas concentraciones de las gonadotropinas, sin embargo, después de su uso prolongado, se produce la desensibilización de dicho receptor, como también de las gonadotropinas. Mientras que los antagonistas bloquean el receptor no produciéndose el estímulo. Fuente: GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system [56].

agonistas de GnRH, como la leuprorelina, junto con inhibidores del receptor de estrógeno en el tratamiento del cáncer de mama en mujeres premenopáusicas [61, 62]. Actualmente, leuprorelina no cuenta con la aprobación de la FDA para el tratamiento del cáncer de mama. Su principal aplicación está asociada al tratamiento de otras patologías, como el cáncer de próstata avanzado, la endometriosis, los trastornos de la pubertad precoz y miomatosis uterina. Se ha demostrado que este agonista disminuye los síntomas de dolor pélvico y sangrado menstrual en la endometriosis, además de estimular la ovulación en situaciones de infertilidad. Por lo tanto, leuprorelina es considerada un fármaco efectivo para diversas condiciones, y su uso está aplicado en el tratamiento de diversas enfermedades.

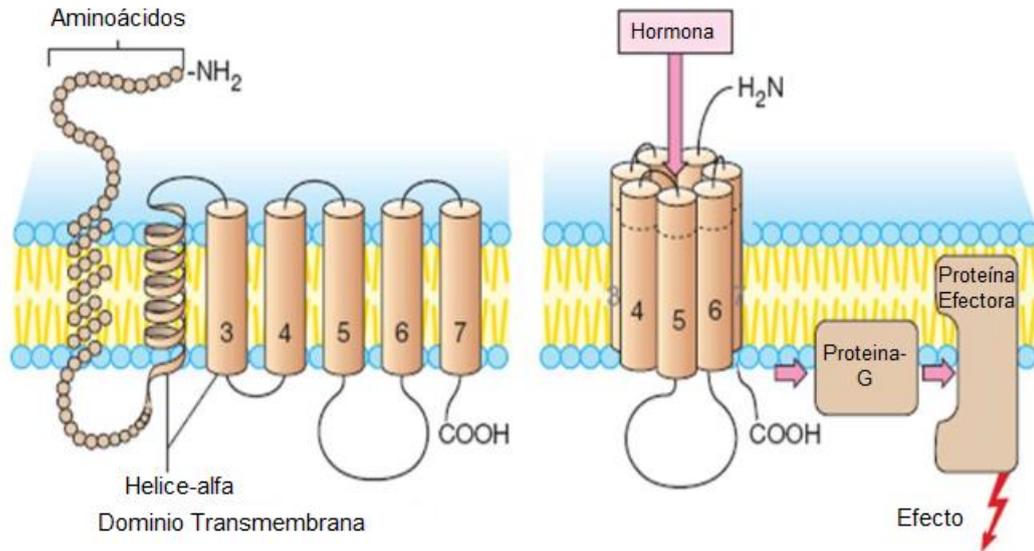
#### 1.4.3.2 Antagonista: Degarelix

Degarelix es un antagonista selectivo de la GnRH que se une competitiva y reversiblemente a los receptores pituitarios de GnRH, reduciendo rápidamente la secreción y liberación de gonadotropinas y, por lo tanto, la síntesis de hormonas sexuales [63, 64]. Estudios clínicos han demostrado que Degarelix es tan eficaz como la leuprorelina en la supresión de hormonas sexuales en pacientes con cáncer de hormono-dependiente [65]. Además, es el antagonista más estudiado y ampliamente disponible en todo el mundo, ya que estudios comparativos han demostrado que su efecto resulta más duradero que otros antagonistas de GnRH, como *abarelix*, *cetorelix*, *ganirelix* y *azaline B*. Degarelix es actualmente utilizado exclusivamente en el tratamiento del cáncer de próstata avanzado, pero se está investigando su potencial en otras áreas, como el tratamiento de otros tipos de cáncer, enfermedades autoinmunitarias y trastornos endocrinos. Sin embargo, debido a la falta de información sobre el uso de Degarelix en pacientes con cáncer de mama [66], es fundamental continuar profundizando su investigación para determinar los efectos de Degarelix en tejidos tumorales y líneas celulares de cáncer de mama.

#### 1.4.4 Receptor de la hormona luteinizante

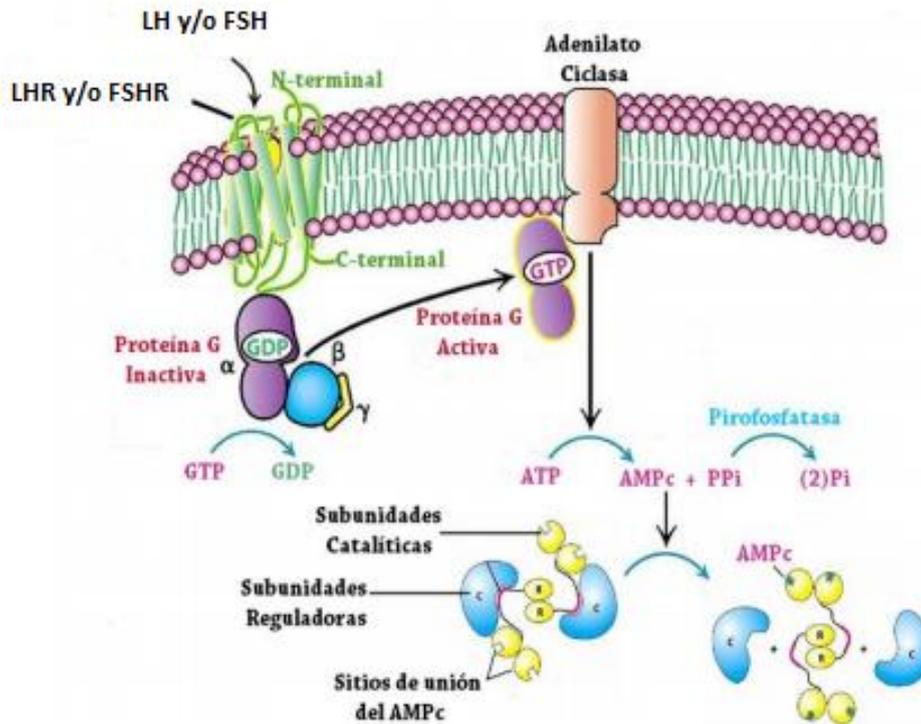
El receptor de la hormona luteinizante (LHR) es un receptor acoplado a proteína G (GPCR) y forma parte de la superfamilia de receptores, que también incluyen otros receptores como el receptor de la hormona folículo estimulante (FSHR) y el receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSHR) [67] (*Figura 8*). LHR se une a dos gonadotropinas homologas y estructuralmente similares, la hormona luteinizante y la gonadotropina coriónica humana [68]. Este receptor es expresado en tejidos gonadales, como en las células de Leydig en los testículos [69], y en las células granulosas y tecales en ovarios [70]. En los testículos, LHR regula la producción y secreción de andrógenos en respuesta a LH [68, 71], mientras que FSHR ejerce su función en las células de Sertoli, donde induce el crecimiento y maduración celular y, por lo tanto, la espermatogénesis de manera indirecta [72, 73].

Por otro lado, en los ovarios, LHR promueve el desarrollo folicular y regula la producción de estrógenos en respuesta a LH, mientras que FSHR se expresa en las células granulosas donde la estimulación de la FSH regula el crecimiento y maduración de los folículos ovarios y la producción de estrógenos [29, 74].



**Figura 8. Conformación de LHR.** El receptor está compuesto por siete dominios transmembrana altamente conservados (I a VII), un gran dominio extracelular con un sitio de unión a las hormonas.

LH actúa mediante la unión e interacción con LHR. Tras la activación, los receptores sufren cambios conformacionales que conducen a la transducción de señales intracelulares, incluida la disgregación de la proteína G en 2 partes, una subunidad  $G\beta\gamma$ , que puede ejercer funciones biológicas como la apertura de canales; y otra subunidad  $G\alpha$ , que activa cascadas de señalización celular [68, 75]. La subunidad  $G\alpha$  unida a GTP activa a la enzima adenilato ciclasa (AC) unida a la membrana, y conduce a una elevación en los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Este segundo mensajero activa los canales de  $Ca^{2+}$  y a la proteína quinasa A (PKA). Luego de su activación, PKA se disocia, y su subunidad catalítica C activa a otras proteínas involucradas en la vía de señalización mediante procesos de fosforilación. Además, se trasloca al núcleo donde activa a factores de transcripción, provocando la síntesis de ARN mensajero (ARNm) de los genes que responden a dicho efecto en las gónadas [67, 75, 76] (Figura 9). Actualmente, se sabe que esta cascada de señalización no es la única vía activada por estas hormonas. Las gonadotropinas activan varias vías adicionales que están involucradas en diferentes procesos celulares como, la supervivencia, proliferación, motilidad y/o diferenciación celular [28, 77].



**Figura 9. Mecanismo de acción hormonal.** Luego de la unión de las hormonas a sus respectivos receptores, la subunidad  $G_{\alpha}$  unida a GTP activa a la enzima adenilato-ciclasa para la síntesis de AMPc. Este segundo mensajero activa canales de calcio y a PKA. Luego de su activación PKA, se disocia su subunidad catalítica (C) activa a otras proteínas.

#### 1.4.5 Expresión extragonadal del LHR

Durante muchos años se pensó que LHR solamente estaba presente en las gónadas, sin embargo, durante la última década varios estudios, tanto en animales como humanos, y a través de diversas técnicas moleculares, han demostrado que los receptores de gonadotropinas también se encuentran expresados en diversos tejidos extragonadales normales y tumorales, incluida en la mama [78-82]. En los últimos años, diversos grupos han determinado la expresión extragonadal de LHR y FSHR en varios tejidos incluyendo la glándula mamaria y carcinoma mamario [79, 80], así como también en diferentes subtipos de líneas celulares de cáncer de mama [82-84], por lo que existen indicios de que las gonadotropinas podrían desempeñar un papel regulador en todos ellos [26].

Paralelamente, varios trabajos han encontrado niveles incrementados de expresión de LHR en tumores invasivos vs. los pre-invasivos, lo que sugiere que la regulación positiva de LH podría desempeñar un papel clave en la carcinogénesis de mama [85]. Ilpo Huhtaniemi y colaboradores postulan dos alternativas sobre el posible rol de las gonadotropinas en tumores extragonadales [26]. *En primer lugar*, las gonadotropinas estimulan indirectamente la producción de hormonas sexuales, las cuales poseen acciones tumorigénicas en tumores (benignos y malignos) dependientes de hormonas. *En segundo lugar*, LH y FSH ejercerían una acción directa, a través de sus receptores, presentes en tejidos tanto gonadales como extragonadales. En cuanto a estos posibles mecanismos

de control, varios grupos de investigación, incluido nuestro grupo de investigación se encuentran enfocados a estudiar y profundizar dicho accionar en líneas celulares de cáncer de mama [26, 82, 86]. En uno de nuestros recientes estudios hemos demostrado cómo LH modula la expresión de un amplio conjunto de genes relacionados en la tumorigénesis en células CM, y que los niveles circulantes de gonadotropinas están directamente correlacionados con el crecimiento tumoral en un modelo in vivo de CM [84]. Por estas razones, y de acuerdo con los hallazgos de otros grupos, sugerimos la existencia de un mecanismo de acción desencadenado por LH que podría afectar el desarrollo y progresión tumoral, incluyendo los procesos migratorios, invasivos y metastásicos en el carcinoma mamario [54, 80, 82, 84, 85].

### **1.5 Movimiento celular**

Los peores pronósticos del cáncer de mama están estrechamente relacionados con la capacidad de los tumores para generar metástasis en sitios distantes. Alrededor del 90% de las muertes en pacientes con cáncer de mama se deben al desarrollo de metástasis [87-89]. Este proceso ocurre a través de pasos específicos que se debe a alteraciones en las propiedades migratorias e invasivas en las células tumorales, lo que finalmente desencadena en la diseminación metastásica [90]. La progresión del carcinoma mamario depende en gran medida del proceso de motilidad celular. Dicho evento depende en gran medida en cómo la célula adquiere la capacidad en reorganizar su citoesqueleto actínico, y promover su plasticidad celular.

La migración celular involucra múltiples pasos que están regulados por varias moléculas de señalización. Estos eventos son conducidos en forma secuencial, mediante un *remodelamiento dinámico del citoesqueleto actínico* [91], *formación de complejos de adhesión focal* para finalmente desencadenar la *nucleación actínica*, lo que determina la migración celular. El citoesqueleto de actina y sus proteínas reguladoras son cruciales para impulsar la adhesión, migración e invasión celular, donde su dinámico remodelamiento y reorganización actínica generan la fuerza necesaria para promover el movimiento de la célula [90, 91].

El citoesqueleto es una red tridimensional proteica que se despliega en toda la célula, proporcionando la capacidad de adoptar distintas formas y llevar a cabo movimientos direccionales y coordinados. La característica principal que le permite formar parte de procesos tan diversos es su dinámica. La dinámica está definida por los procesos de polimerización y despolimerización de las diferentes subunidades que conforman sus tres sistemas principales [92, 93], el cual está compuesto por microtúbulos (mantienen la distribución tridimensional de las organelas y dirigen el tráfico intracelular), filamentos intermedios (que otorgan fuerza y resistencia al estrés mecánico) y filamentos de actina (forman parte de procesos celulares y determinan la forma celular). En nuestro estudio, evaluamos el rol de los filamentos actínicos responsables de impulsar el desarrollo de estructuras en el borde de la membrana, responsables de promover la motilidad celular.

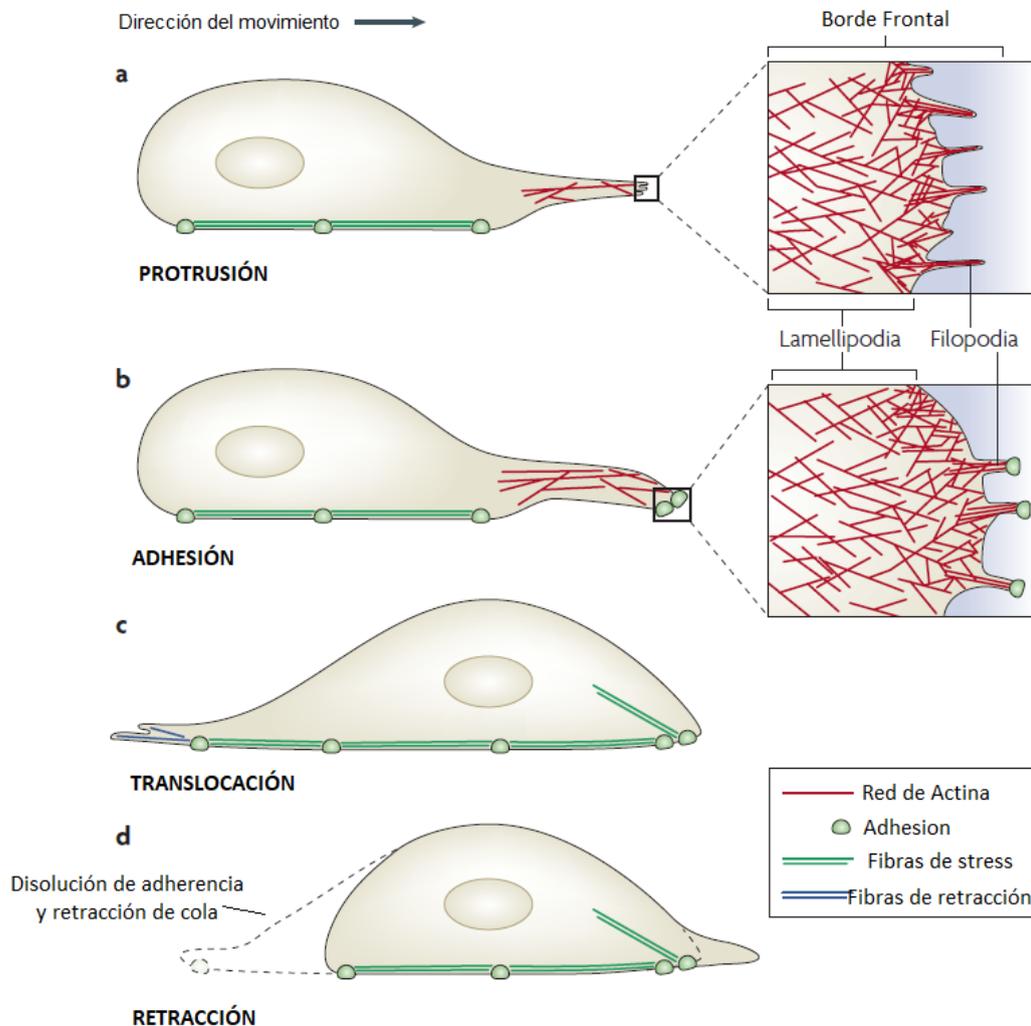
Los filamentos de actina están formados por dos cadenas de polímeros de la proteína actina entrelazados de forma helicoidal y se concentran principalmente debajo de la membrana plasmática, formando lo que se denomina *cortex* [93, 94], fundamental en el proceso de migración. Es por ello, que el citoesqueleto es el motor celular que desencadena la motilidad a través de una cascada de moléculas que promueven diversas vías de transducción de señales [94]. Por lo tanto, estudiar los mecanismos que gatillan el movimiento celular en las células cancerosas aclararía algunos de los eventos clave que influyen en la metástasis en el cáncer de mama. Por esta razón, este trabajo de tesis se enfoca en investigar las vías de señalización inducidas por gonadotropinas que impactan en la reorganización del citoesqueleto de actina en células tumorales de mama. Una de nuestras principales inquietudes es elucidar la vinculación entre las proteínas que disparan el inicio y el recambio de estructuras ricas en actina, como sucede en el remodelamiento del citoesqueleto actínico, la formación de los complejos de adhesión focal y la nucleación actínica [82].

### 1.5.1 Remodelamiento del citoesqueleto actínico

La generación del movimiento de las células cancerosas en el entorno circundante es el primer paso para inducir metástasis. Un paso crítico está representado por el remodelamiento del citoesqueleto actínico hacia la membrana celular [93]. Para que la metástasis sea eficaz, los componentes del citoesqueleto actínico tales como actina, miosina, filamentos intermedios y sus proteínas asociadas deben coordinarse de manera ordenada, para impulsar la formación de estructuras especializadas de membrana esenciales para el movimiento, permitiéndole generar una fuerza intracelular necesaria para inducir la migración celular [95-97]. La dirección de la migración celular es determinada por señales extracelulares y se inicia al establecerse una polarización en un extremo de la célula caracterizado por la presencia de estructuras como lamelipodios, ruffles o filopodios. A continuación, la célula se extiende mediante la protrusión del frente, gracias a la polimerización actínica. Durante este proceso, la célula se adhiere al sustrato y a medida que avanza retrae su parte trasera. Repitiendo éstos pasos de manera sucesiva, la célula avanza en su trayectoria [94] (*Figura 10*).

Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado la expresión y funcionalidad del receptor de LH en varios subtipos de líneas celulares de cáncer de mama. Además, pudimos observar como el efecto específico de LH, a través de su receptor, estimula los procesos migratorios e invasivos mediante de una rápida vía de señalización dependiente de proteína G en la membrana celular. La activación de la remodelación dinámica del citoesqueleto actínico y las propiedades adhesivas de la membrana celular son fundamentales para impulsar la motilidad celular [82]. Además, se demostró cómo en presencia de LH, la proteína de unión a actina *moesin* (referente del remodelamiento actínico), y la proteína reguladora de los complejos de adhesión focal, llamada *FAK*, incrementaron sus niveles de fosforilación/activación, y por consecuencia se relocalizaron

hacia la periferia de la membrana celular promoviendo los procesos adhesivos, migratorios e invasivos. Por lo tanto, en este trabajo nos hemos enfocado en dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales las hormonas regulan los procesos claves que inducen la adhesión, migración e invasión celular en células de cáncer de mama.

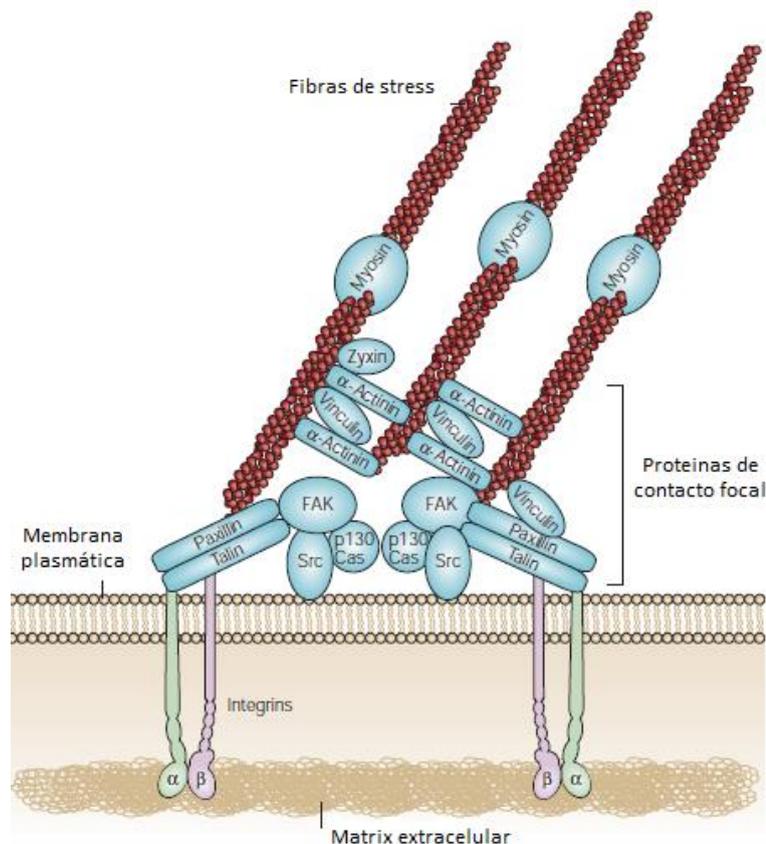


**Figura 10. La migración celular depende de diferentes estructuras de filamentos de actina.** La migración celular consiste en los siguientes cuatro procesos sucesivos. **A) Protrusión:** la motilidad se inicia cuando las células se polarizan en respuesta a estímulos extracelulares, lo cual desencadena una protrusión dependiente de la actina al borde frontal. Esta protrusión, está compuesta por estructuras especializadas de membrana que contienen filamentos de actina, llamados lamelipodios y filopodios. Estos filamentos de actina presentan extremos barbados que se elongan en dirección a la membrana plasmática, impulsando así el proceso protrusivo. **B) Adhesión:** se desencadena cuando las membranas en proyección entran en contacto con el sustrato, generando nuevas conexiones con la superficie celular gracias a la participación de las integrinas. Estas uniones adhesivas recién formadas evolucionan a lo largo del tiempo, madurando y estabilizándose en estructuras conocidas como adherencias focales. **C) Translocación:** el núcleo y el cuerpo celular se desplazan hacia adelante a través de las fuerzas de contracción basadas en actomiosina que podrían ser mediadas por fibras de estrés ligadas a las adherencias focales, que también median la fijación al sustrato. **D) Retracción:** las adhesiones celulares en el borde de salida se desmontan, llevando al retraimiento de este borde. Las fibras de retracción, al tirar de la parte posterior de la célula hacia adelante, desensamblan las adherencias en la parte trasera y provocan el retraimiento del borde posterior. Modificación de la imagen original. Fuente: *Filopodia: molecular architecture and cellular functions* [98].

## 1.6 Rol de la hormona luteinizante en los procesos migratorios

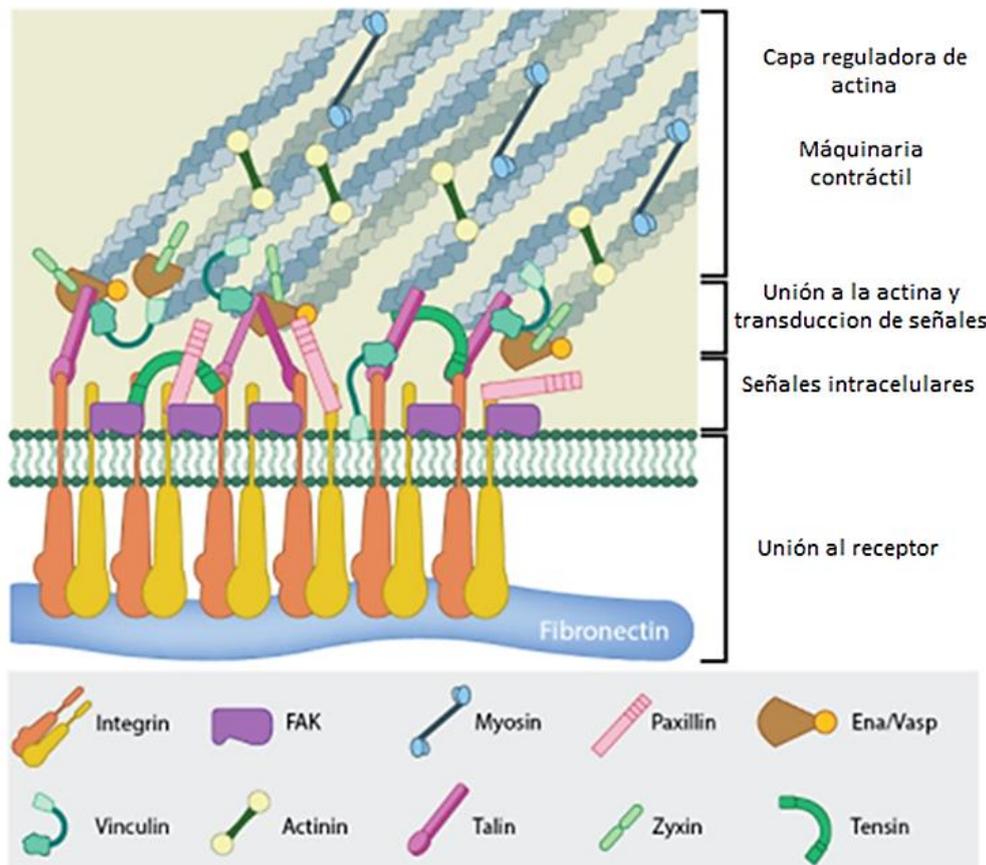
Las gonadotropinas, son importantes moduladores de la morfología y motilidad celular en diversas líneas celulares, incluidas cáncer de mama. Tanto la hormona luteinizante como la hormona folículo estimulante, provocan rápidos cambios en la morfología de la membrana celular, estimulando los diversos pasos que conducen a promover la motilidad celular [99-102].

Tras la unión de LH a su receptor, LHR sufre cambios conformacionales que conduce a la transducción de señales intracelulares mediadas por específicas proteínas G. La subunidad alfa ( $G\alpha$ ) activa una cascada de señalización celular que promueve la activación de la quinasa de adhesión focal, llamada FAK [84, 99, 102, 103]. FAK es una proteína tirosina quinasa intracelular no receptora, que se localiza en sitios de contacto celular [104]. FAK desempeña un papel esencial en la regulación de la adhesión, migración, invasión y propagación celular, procesos que están todos implicados en el desarrollo del cáncer [105, 106]. Fundamentalmente, FAK regula la formación de complejos focales que le permiten a la célula contactarse con su sustrato. Estos complejos están constituidos por un grupo de proteínas estructurales y moléculas de señalización, incluyendo la tirosina quinasa Src, proteínas de unión a la actina y proteínas adaptadoras [107, 108] (Figura 11).



**Figura 11. Complejos Focales.** A través de estos complejos, el citoesqueleto celular interactúa con las proteínas transmembrana (integrinas) y la matriz extracelular. Esto le permite a la célula transducir señales externas al interior de la célula, y viceversa. Modificación de la imagen original. Fuente: The role of focal-adhesion kinase in cancer a new therapeutic opportunity [107].

Ambas proteínas se encuentran en una conformación tridimensional *cerrada* dada por interacciones intermoleculares que ocultan el dominio quinasa regulando de esta manera su actividad. Por ello, la activación de las mismas consiste en *abrir* dichas conformaciones y exponer los dominios quinasas [109, 110]. Dos eventos permiten la activación de Src y FAK en respuesta a estímulos extracelulares. *En primer lugar*, tras la acción de un estímulo, FAK cambia su conformación (una desplegada) y expone sus sitios de fosforilación permitiéndole autofosforilarse en un residuo específico de Tirosina (Tyr<sup>397</sup>). Esta activación parcial permite reclutar a Src que se une a FAK mediante un dominio SH2 (que reconoce y permite la unión a residuos de Tyr fosforilados). Esta interacción provoca un cambio conformacional en Src, seguido de su autofosforilación en Tyr<sup>416</sup>. De esta manera, Src es reclutada y activada, y posteriormente fosforila nuevamente a FAK en 2 sitios específicos, Tyr<sup>576/577</sup> en su dominio quinasa, lo que provoca la activación total de FAK. Por lo tanto, Src y FAK trabajan estrechamente para formar un complejo molecular que regula numerosas vías de señalización, que, junto con otras proteínas adaptadoras, como paxilina, talina y vinculina modulan orquestadamente la motilidad celular [106, 111] (Figura 12).



**Figura 12. Formación de complejos de adhesión focal.** FAK tiene un rol clave modulando la invasión y la migración, ya que es el principal componente de los complejos de adhesión focal, induciendo el desensamblaje y ensamblaje de estos complejos en la dirección de la migración. Éstos complejos multiproteicos están controlados por diversas proteínas, como Src/FAK/paxilina, las cuales activan vías de señalización intracelulares y regulan la interacción con el citoesqueleto de actina. Modificación de la imagen original. Fuente: Focal adhesions: what's new inside[120]

La sobreexpresión y la aumentada actividad de Src y FAK se han observado en varias malignidades humanas que se asocian a un fenotipo más invasivo y metastásico [112-115]. De hecho, ya se han desarrollado varios inhibidores de quinasas vs. Src y FAK por diferentes compañías farmacéuticas para ensayos preclínicos, como Dasatinib y AZD0530 (inhibidores de Src), y BI 853520; PF-573,228 (inhibidores de FAK) [105, 115-119]. El diseño de estas novedosas drogas indica que tales agentes dirigidos a Src y FAK podrían utilizarse, solos o en combinación, con otras terapias potenciales.

#### 1.6.1. Integradores de señales: paxilina

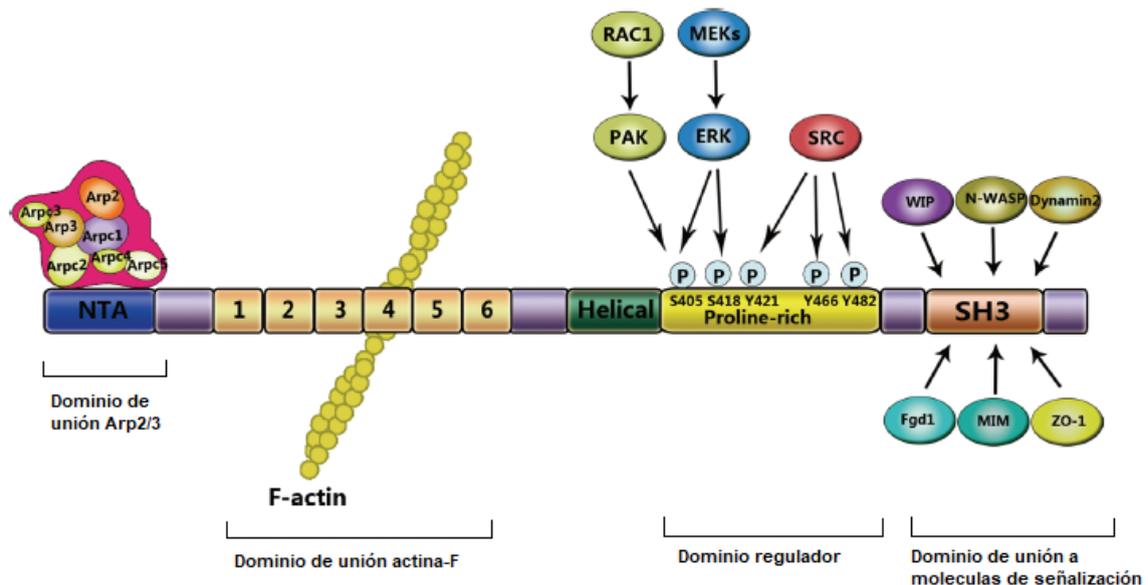
La formación del complejo Src/FAK interactúa y recluta otras proteínas reguladoras, adaptadoras y quinasas responsables del control de las adhesiones focales, entre ellas paxilina. Dicho complejo induce el reclutamiento, interacción, fosforilación y consecuente activación de paxilina en su residuo específico Tyr<sup>118</sup> [121]. Paxilina se encuentra conformada por múltiples dominios conservados entre diferentes especies (mamíferos, aves e insectos), y posee un rol fundamental en la regulación del citoesqueleto de actina [122]. Además, paxilina sirve como eslabón para el reclutamiento de varias proteínas reguladoras y estructurales que modulan los cambios dinámicos en la adhesión celular, controlando el ensamblaje y desensamblaje de los sitios de adhesión focal, la reorganización del citoesqueleto actínico y la expresión génica, resultando procesos esenciales para promover la migración e invasión celular [111, 113, 123]. Recientemente, se ha descubierto que paxilina también puede actuar como un modulador clave del microambiente tumoral y promover la progresión del cáncer de mama. Se ha demostrado que la sobreexpresión de paxilina en las células tumorales de mama puede estimular la liberación de factores de crecimiento que actúan sobre las células estromales circundantes, y fomentan su activación y secreción de moléculas pro-inflamatorias y pro-migratorias. Estas moléculas a su vez promueven la angiogénesis y la invasión tumoral, lo que sugiere que paxilina puede ser un importante modulador del microambiente tumoral en el carcinoma mamario [124].

#### 1.6.2 Cortactina y su participación en el movimiento celular

Los procesos de migración e invasión celular requieren una regulación dinámica del citoesqueleto actínico cortical, utilizando una red de proteínas que coordinan de forma secuencial cambios en la arquitectura actínica. Una de las principales moléculas involucradas es la proteína adaptadora, cortactina. Cortactina es una proteína con múltiples dominios permitiéndole actuar como una proteína andamio (scaffold), reclutando diferentes proteínas hacia el sitio de polimerización de la actina [125, 126]. Esto conlleva a poseer un rol preferencial, actuando como nexo entre la formación de complejos de adhesión focal y la nucleación actínica. De esta manera, regula los procesos de adhesión, migración e invasión de células tumorales, promoviendo la metástasis en cáncer [127, 128]. Además, se ha observado que el gen de cortactina (*CTTN*) se encuentra amplificado en cánceres de mama metastásicos, y la sobreexpresión de la misma, tanto en líneas

celulares tumorigénicas como no tumorigénicas, actúa como un fuerte promotor de la motilidad e invasión celular [129-131].

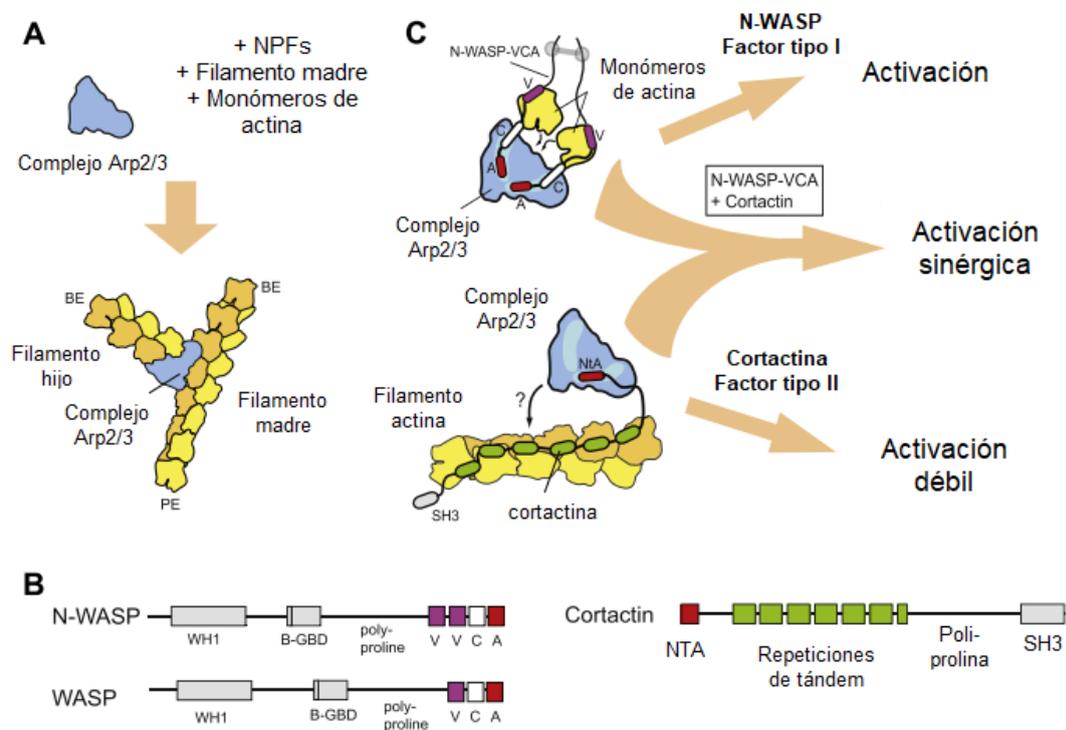
Basado en su estructura, cortactina contiene un dominio de aminoácidos ácidos en el extremo N-terminal (región NTA), que es fundamental para regular el ensamblaje de la ramificación de actina mediante interacciones conservadas con el complejo Arp2/3. Le sigue una secuencia de seis repeticiones de tándem, que son responsables de la unión a los filamentos de actina (actina-F) [131-133]. Además, cuenta con una región rica en prolina que posee tres residuos de tirosina (421/466/482), los cuales son sustrato directo de la proteína quinasa Src [126, 128]. En su extremo C-terminal, posee un dominio SH3 que le permite interactuar con diversas proteínas que modulan la velocidad de polimerización de actina, entre ellas, FAK y N-WASP, claves en la generación de adhesiones focales y la activación de la nucleación o ramificación actínica mediante el complejo Arp2/3 (Figura 13) [125, 134]. En células cancerígenas, se encuentran sobreexpresadas, y parece ser un fuerte promotor de la invasividad incrementando la polimerización de la actina y regulando la formación de invadopodios [125, 128]. En respuesta a señales extracelulares, cortactina es fosforilada por Src provocando su translocación hacia los sitios de adhesión focal, incrementando el patrón migratorio e invasivo en CM [135]. Recientemente Wang W. et. al., 2011, han descrito cómo cortactina es reclutada por el complejo Src-FAK hacia las adhesiones focales a través de su interacción con FAK [136]. Una vez allí, cortactina podría actuar, de forma conjunta y paralelamente, con N-WASP provocando una activación sinérgica hacia el complejo Arp2/3 [137].



**Figura 13. Estructura de los dominios de cortactina.** Modificación de la imagen original. Fuente: Cortactin in cancer cell migration and invasion [138]

Curiosamente, tanto cortactina como N-WASP pueden unirse al complejo Arp 2/3 e iniciar la polimerización de actina, y esto se debe a que cortactina recluta al complejo Arp2/3 hacia un

filamento de actina preexistente para estimular la nucleación actínica, aunque la activación de Arp2/3 por cortactina es débil. Sin embargo, en presencia de la proteína andamio N-WASP, la activación de Arp2/3 por cortactina se potencia, lo que sugiere que ambos tipos de factores promotores de la nucleación actínica (NPFs) actúan sinérgicamente sobre Arp2/3 para formar estructuras de actina ramificadas [139]. Para lograrlo, es crucial la interacción entre estos factores. La región NTA de cortactina se une a la subunidad 3 (Arp3) del complejo Arp 2/3, mientras que las proteínas N-WASP, a través de su dominio VCA, se unen a Arp3, Arp2 y ARPC1/p40. En algunas circunstancias, cortactina y N-WASP pueden unirse simultáneamente a Arp2/3, a través de la interacción de ambas con la subunidad Arp3 [137], mejorando así la formación de estructuras protrusivas basadas en actina que se encuentran involucradas en la migración e invasión celular (Figura 14)[133, 137, 140, 141].

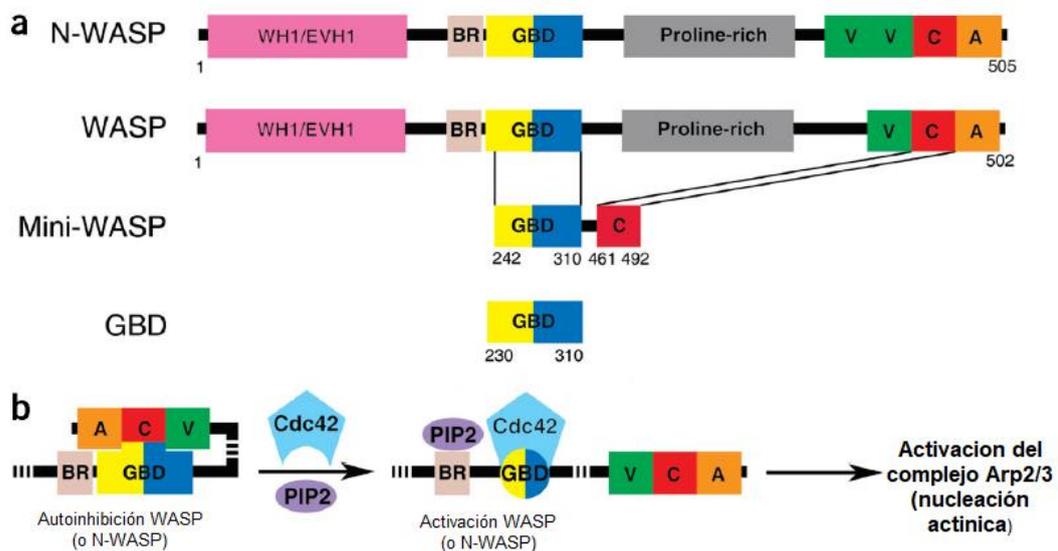


**Figura 14. Modelo de sinergismo entre los NPFs tipo I y II.** A) Los componentes necesarios para la ramificación actínica constan del complejo Arp2/3, filamentos preexistentes, monómeros de actina y NPFs. La interacción de todos ellos, dan como resultado ramificaciones actínicas en forma de Y. (BE: extremos barbudos, PE: extremos puntiagudos). B) NPFs tipo I (a la izquierda), se muestra la estructura de N-WASP y WASP con sus respectivos dominios; y tipo II (a la derecha), se muestra cortactina con sus dominios NtA (rojo); de unión a filamentos de actina (verde) y SH3 (gris). C) Activación del complejo Arp2/3 por ambos tipos de factores. En el caso de N-WASP se propone que dos moléculas son necesarias para la activación del complejo. En el caso de Cortactina, esta proteína une los filamentos preexistentes a través de su región de repeticiones (en verde) y con su región NtA recluta al complejo Arp2/3. Estos dos tipos de activación combinados dan como resultado una nucleación actínica potenciada. Modificación de la imagen original. Fuente: Mechanism of synergistic activation of Arp2/3 complex by cortactin and N-WASP [137].

### 1.6.3 Ramificación actínica: Rol de N-WASP

La identificación de los miembros de la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP), como WASP, neural-WASP (N-WASP) y proteínas con un dominio de homología verprolina

(VCA) de la familia WASP (WAVE), ha sido un gran avance en la comprensión de las bases moleculares del movimiento celular [89, 142]. La estructura de estas proteínas incluye varios dominios funcionales que les permiten interactuar con otras proteínas y componentes celulares para regular la polimerización de actina. N-WASP comparte varios dominios multifuncionales con WASP, como el dominio de homología WASP. La región N-terminal de N-WASP contiene un dominio de unión a la membrana (GBD) que le permite interactuar con otras proteínas de la membrana celular, mientras que el dominio VCA se une directamente al complejo Arp2/3 para estimular la nucleación y ramificación de la actina (Figura 15). Además, N-WASP tiene un dominio GTPasa activador de proteínas (GAP) que regula la actividad de la proteína Rho. Estas proteínas promueven la nucleación de nuevos filamentos de actina mediante la activación del complejo Arp2/3 [142], lo que las convierte en un vínculo clave entre las GTPasas y el citoesqueleto actínico.



**Figura 15. Estructura y regulación de la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich.** (a) Estructura de dominios de N-WASP, WASP y los constructos WASP utilizados en este estudio. Se indican los siguientes dominios funcionales: WH1 (homología WASP 1) o EVH1 (proteína fosfopéptida estimulada por vasodilatador o VASP-homología 1); una región altamente básica (BR); el dominio de unión a GTPasa (GBD); una región rica en prolina; y una región VCA C-terminal (homología verprolina, región central hidrofóbica, región ácida). WASP y N-WASP comparten aproximadamente el 70% de identidad de secuencia sobre los residuos incluidos en mini-WASP. (b) La activación de las proteínas WASP por Cdc42 y PIP2 requiere la disociación de una interacción autoinhibitoria intramolecular entre los elementos GBD y VCA, lo que permite que el elemento VCA active el complejo Arp2/3. Modificación de la imagen original. Fuente Chemical inhibition of N-WASP by stabilization of a native autoinhibited conformation [143]

En particular, N-WASP actúa como un complejo de andamiaje, que se encuentra regulada por pequeñas GTPasas como Cdc42, jugando un papel en la inducción de la polimerización de la actina y la formación de protrusiones de membrana [144]. Después de unirse con Cdc42, N-WASP produce un cambio conformacional que conduce a la liberación del extremo C-terminal, lo que le permite interactuar y activar al complejo Arp2/3. La activación de N-WASP es controlada por un proceso de

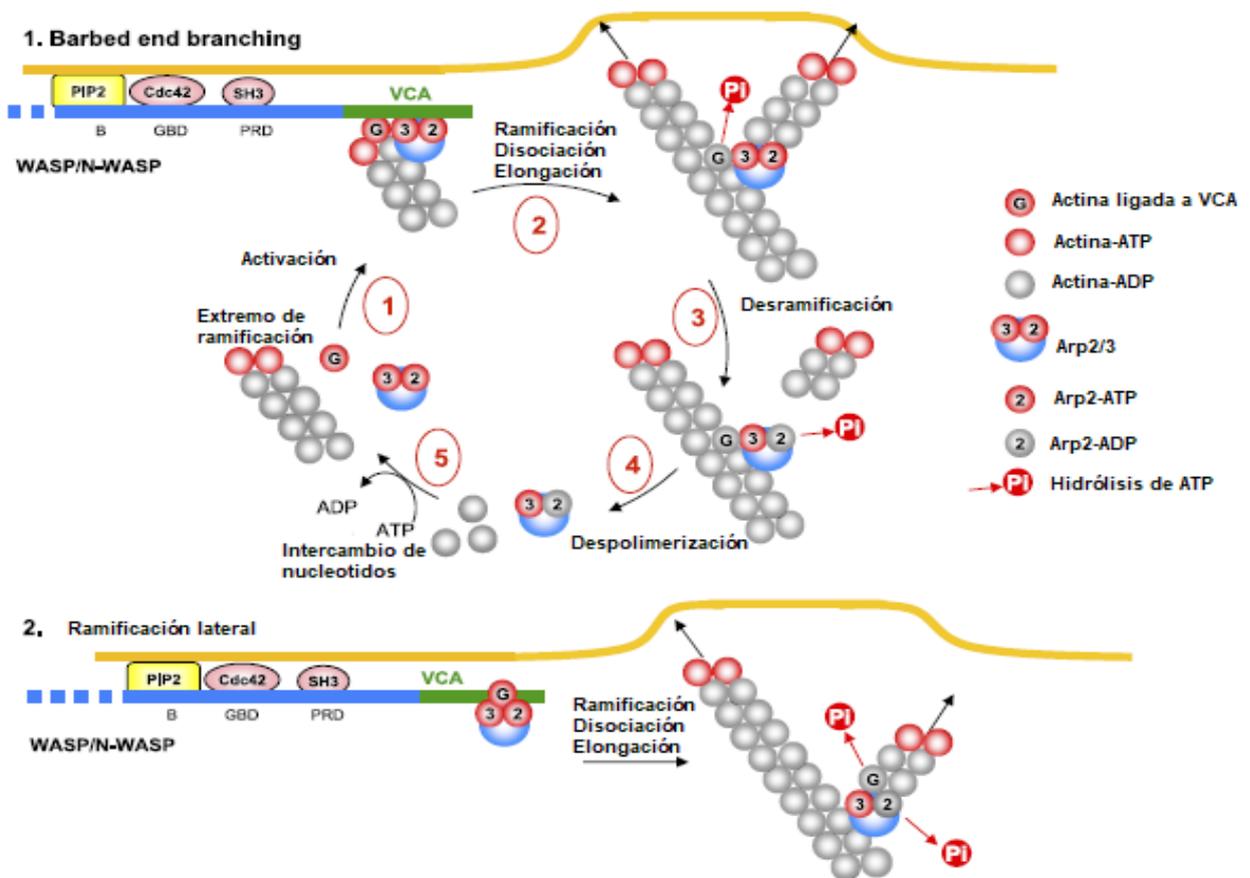
fosforilación y desfosforilación [99, 102, 135, 145], el cual es regulado por una región rica en prolina que media la interacción con proteínas adaptadoras y tirosinas quinasas que presentan dominios SH3 [146].

Desde hace tiempo, N-WASP ha sido descrito por su implicancia en procesos vinculados a la invasión y metástasis, incluyendo en carcinoma mamario [101, 135, 145, 147]. Se ha demostrado que su sobreexpresión y desregulación se correlaciona con un incremento en los procesos invasivos y metastásicos en diversos subtipos moleculares de cáncer de mama, tanto en modelos *in vitro* como en modelos animales [148]. Paralelamente, se ha demostrado que la expresión de N-WASP se correlaciona con la agresividad tumoral en pacientes con cáncer de mama, y que se sobreexpresa en tumores de mama de alto grado [149]. En los últimos años se ha estudiado su mecanismo de acción en la ramificación o nucleación actínica celular. Por ello que se ha sugerido que la sobreexpresión de N-WASP podría resultar fundamental en la conducción hacia los procesos migratorios e invasivos en cáncer de mama, mediante su modulación/activación del complejo Arp2/3 [150].

### **1.7 Nucleación actínica**

El proceso de *ramificación o nucleación actínica* es catalizado por complejos multiproteicos llamados nucleadores de filamentos de actina (NPFs). Los NPFs se unen a los filamentos de actina preexistentes y estabilizan su unión para favorecer la nucleación de nuevos filamentos de actina ramificados [151]. Uno de los nucleadores más predominantes es el complejo Arp2/3, ya que es el responsable de impulsar el paso final hacia la formación de nuevas ramificaciones conformando una red actínica. La nucleación también puede ser regulada por diversas proteínas accesorias que modulan la actividad de los nucleadores de filamentos de actina, lo que permite una regulación fina y compleja del citoesqueleto. Este paso clave proporciona la fuerza necesaria para desencadenar el movimiento celular (*Figura 16*).

El complejo Arp 2/3 es un complejo multiproteico que consta de siete subunidades, de las cuales Arp2 y Arp3 son las más predominantes y únicas proteínas del complejo que están relacionadas con la actina. El complejo Arp2/3 desempeña un papel central en la dinámica del citoesqueleto al controlar la nucleación de filamentos (Zheng, 2023). Esta estructura asimétrica nuclea nuevos filamentos desde la región lateral de los filamentos existentes, lo que induce la nucleación de nuevos filamentos de actina perpendiculares a los ya existentes, creando así ramificaciones y construyendo una red tridimensional de filamentos esenciales para la motilidad e invasión celular [153-155]. Por lo tanto, el complejo Arp2/3 y sus NPF asociados son esenciales para la motilidad celular, ya que permiten la formación y mantenimiento de una red tridimensional de filamentos de actina, fundamentales para regular la maquinaria motriz celular.



**Figura 16. Nucleación actínica.** 1) El complejo ramificado conformado por actina G, Arp2/3, y el dominio VCA de N-WASP (o isoformas WAVE, se une al extremo de ramificación del filamento madre. 2) El complejo Arp2/3 induce la nucleación en una rama lateral. La hidrólisis de ATP sobre actina disocia la unión ramificada del activador unido a la membrana. El crecimiento de los filamentos madre e hija impulsa la protuberancia de la membrana. 3) La hidrólisis de ATP en Arp2 induce la desramificación. 4) Después de la despolimerización del filamento ramificado, se liberan Arp2/3 y actina. 5) Se requiere intercambio de nucleótidos para reciclar actina y el complejo. Imagen 2, el modelo de ramificación lateral. Este modelo propone que Arp2/3 activado por el dominio C-terminal de N-WASP (o isoformas WAVE) se une al lado de un filamento de actina. En este estado activado, Arp2-Arp3-actina-G imita un núcleo de actina para iniciar una rama lateral. Fuente: Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. Modificación de la imagen original. Fuente: Phosphorylation of the Arp2/3 complex is necessary to nucleate actin filaments [152]

## CAPÍTULO 2

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### **2.1 Fundamentación del problema de investigación**

Hasta la fecha no existen antecedentes ni estudios que involucren el accionar de gonadotropinas en los procesos motrices en cáncer de mama. Debido a ello, y nuestros estudios previos, nos hemos abocado a determinar un posible efecto mediado por LH, a través de su receptor, y la posible modulación de proteínas claves que promueven el movimiento de la célula. Por lo tanto, el poder dilucidar un mecanismo de control modulado por gonadotropinas nos resultará una herramienta sumamente útil en el estudio de proteínas reguladoras de la migración, invasión y metástasis celular. Entre ellas pretendemos estudiar proteínas adaptadoras, quinasas y andamios (sobreexpresadas y/o sobreactivadas), las cuales promueven de manera descontrolada los procesos invasivos y metastásicos en diversos tipos de cáncer, incluido mama. *Nuestros resultados podrían ayudar al conocimiento de posibles mecanismos involucrados en los efectos de las gonadotropinas en el carcinoma mamario, fortaleciendo el concepto de que las gonadotropinas podrían regular el CM, particularmente en las mujeres posmenopáusicas, donde los niveles de FSH y LH se encuentran elevados, y la tasa de incidencia de cáncer se encuentra más elevada. Además, nos proporcionará información para la prevención y/o tratamiento mediante el uso de agonistas y/o antagonistas de la GnRH, con el fin de reducir los niveles de gonadotropinas, interfiriendo o disminuyendo la aparición y/o progresión de metástasis a nivel mamario. Paralelamente, el conocimiento más profundo de los pasos claves que promueven la invasión y/o metástasis celular, nos ayudará aún más al estudio para el desarrollo de posibles nuevos blancos, sobre proteínas quinasas, para intervenciones terapéuticas en dicha patología.*

#### **2.2 Hipótesis**

Durante décadas se ha estudiado el efecto de las gonadotropinas, LH y FSH, en el sistema reproductor femenino y masculino. Sin embargo, desde que se demostró la expresión de los receptores LHR y FSHR en diversos tejidos, incluso la glándula mamaria [156], nos hemos propuesto investigar la posible acción extragonadal de las gonadotropinas a través de sus receptores. Específicamente, nos interesa explorar si estas hormonas podrían modular los procesos que promueven la motilidad en células tumorales de mama.

Nuestra "**hipótesis central**" postula que la influencia extragonadal de LH y/o FSH desempeña un rol esencial en la regulación de la morfología y la motilidad de las células mamarias normales. En un contexto tumoral, surge una desregulación, donde proteínas clave podrían estimular de manera exacerbada la capacidad de las células para moverse, impulsando así los procesos característicos de migración, invasión y formación de metástasis.

En este contexto, nuestra hipótesis de tesis propone: “*La existencia de un rápido efecto de las gonadotropinas, incrementa el remodelamiento actínico, la formación de los complejos de adhesiones focales y, consecuentemente la ramificación actínica a través de proteínas quinasas claves*”.

## **2.3 Objetivos**

### **2.3.1 Objetivo General:**

Determinar el mecanismo de control regulado por las gonadotropinas (LH y/o FSH), y como estas podrían estar controlando la morfología y movimiento en células tumorales a partir de proteínas claves que impulsarían la motilidad celular, promoviendo sin control los pasos que impulsan los mecanismos de migración, invasión y metástasis.

### **2.3.2 Objetivos Específicos Principal**

Investigar el impacto de las gonadotropinas LH y/o FSH en la regulación de proteínas claves que promueven la motilidad celular en células de cáncer de mama

PROPONEMOS TRES (3) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

#### ***Objetivos #1: Determinación del efecto de LH y/o FSH en la morfología y movilidad celular.***

- A) Determinar el efecto de LH y/o FSH en la regulación de la morfología en células de cáncer de mama, mediante el estudio de proteínas vinculadas en la formación de complejos de adhesión focal (Src/FAK/Paxillin) y nucleación actínica (Cortactin y N-WASP/Arp2/3).
- B) Identificar y caracterizar los mecanismos moleculares mediante los cuales LH y/o FSH regulan o modulan, a través de fosforilaciones específicas, la actividad de Src/FAK/Paxillin/Cortactin; Cortactin/N-WASP, y los mecanismos de regulación de FAK/Cortactin/N-WASP hacia el control del complejo Arp2/3.
- C) Investigar y analizar los procesos de adhesión, migración e invasión celular mediante el control de FAK/Paxillin/Cortactin/Cdc42/N-WASP/Complejo Arp2/3, inducido por LH y/o FSH.

#### ***Objetivos #2: Análisis in silico y Ensayos con microarreglos para la evaluación de la expresión génica.***

- A) Mediante Análisis in Sílico proponemos evidenciar cambios aberrantes en un amplio conjunto de genes, principalmente andamios, quinasas y fosfatasa, relacionadas con los procesos migratorios, invasivos y metastásicos en distintos subtipos moleculares de cáncer de mama.
- B) Investigar mediante ensayos con Microarrays, posibles cambios en los niveles de expresión de

genes claves vinculados en la progresión tumoral, tras el tratamiento con LH y/o FSH.

**Objetivos #3: Regulación extragonadal de LH/FSH en modelos celulares y murinos de carcinoma mamario.**

- A) Identificar y comparar los niveles de expresión del receptor de LH y/o FSH, así como de proteínas clave implicadas en la progresión tumoral, en líneas celulares normales y tumorales de diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama y grados de agresividad tumoral.
- B) Determinar, a través de un modelo “*in vitro*” de carcinoma mamario, la modulación genética o inhibición persistente de Src, FAK, agonista y antagonista de GnRH, y el rol de los mismos sobre proteínas claves que participan en la progresión tumoral.
- C) Investigar, a través de un modelo “*in vivo*” de carcinoma mamario, la modulación genética o inhibición persistente de Src, FAK, agonista y antagonista de GnRH, y el rol de los mismos sobre la carga tumoral y las metástasis en el modelo murino de trasplante ortotópico de células LM3 (ER-/PR-/HER-2+) y las células LM05 (ER+/PR+/HER-2-).
- D) Analizar la expresión de moléculas relacionadas con los procesos de proliferación celular en tejidos tumorales a través de técnicas de inmunohistoquímica.

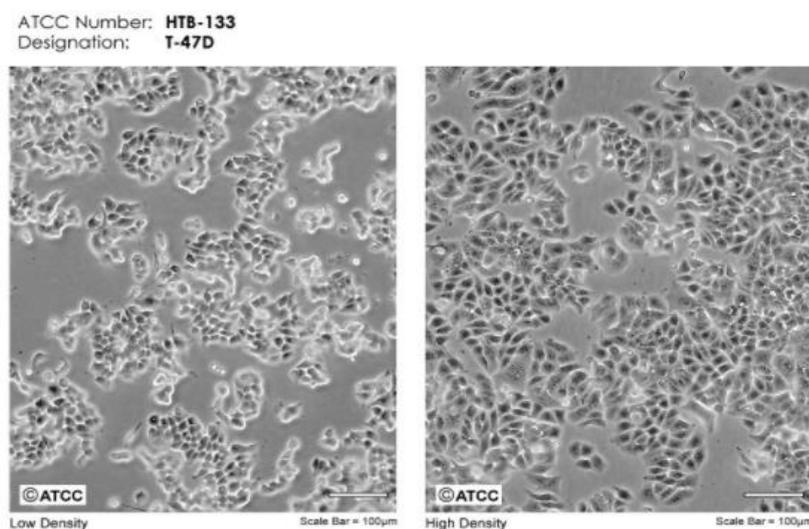
## **CAPÍTULO 3**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Metodologías empleadas para los estudios en líneas celulares**

##### **3.1.1 Cultivo de línea celular tumoral de mama**

Para el cultivo de células tumorales de mama humana T-47D, se utilizó medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (10mg/ml) y L-glutamina (2mM). La línea celular T-47D fue obtenida de *American Type Culture Collection* (ATCC, [www.atcc.org](http://www.atcc.org)).



Las células se mantuvieron a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Esta línea celular proviene de un carcinoma ductal infiltrante de una paciente de 54 años diagnosticada con carcinoma ductal infiltrante en la glándula mamaria, y se aisló a partir de una efusión pleural. Las células T-47D son células epiteliales adherentes, y expresan tanto RE+ como RP+. Antes de los experimentos, las células se mantuvieron durante 12-24 horas en un medio privado de esteroides, sin FBS, y fueron utilizadas con una confluencia del 70-80% para los experimentos planteados.

##### **3.1.2 Tratamientos**

Para el estudio de los tratamientos rápidos o no-genómicos, las células fueron tratadas con la hormona luteinizante (LH, Luveris - Merck Serono) a una concentración final de 5mUI/ml, durante un periodo de tiempo entre 0 y 60 minutos. Estos parámetros han sido específicamente seleccionados gracias a nuestros estudios previos donde se demostró una respuesta efectiva a esta concentración, especialmente en términos de la fosforilación/activación de proteínas referentes a nuestro estudio [82, 84].

###### **3.1.2.1 Uso de Inhibidores específicos de las vías de señalización.**

Mediante el uso de específicos inhibidores químicos, se logra identificar y especificar el rol de proteínas de interés en la vía propuesta. Esto se logra a través de la inhibición enzimática, la cual altera la actividad proteica. Esta estrategia, implica modificar la función enzimática con compuestos químicos particulares, y es altamente valiosa debido a su capacidad para investigar con precisión el rol puntual y específico de una proteína de interés involucrada en nuestra vía de señalización. En este contexto, se utilizaron diversos inhibidores de proteínas blanco con el fin de identificar si las mismas se encuentran reclutadas en las cascadas influenciadas por LH.

Los inhibidores empleados fueron: 4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil)-pirazolo-(3,4-d) pirimidina (PP2; 10 $\mu$ M – *inhibidor específico de Src quinasa*) obtenido de Calbiochem; *FAK inhibitor* (FAKi, 1 $\mu$ M, sc-203950A); Wiskostatin (*inhibidor de N-WASP - Wisk*, 10 $\mu$ M, sc-204399) y el *inhibidor del complejo Arp2/3* (CK-666, 4 $\mu$ M, sc-361151), obtenidos de Santa Cruz Biotechnology. Cada vez que se utilizó un inhibidor, se añadió el compuesto 60-90 minutos antes de comenzar los tratamientos activos. PP2, FAKi, Wiskostatin y CK-666 fueron disueltos en DMSO. Las concentraciones inhibitorias indicadas (IC<sub>50</sub>), corresponden a las concentraciones finales utilizadas las cuales fueron usadas en una dilución de 1/1000.

### 3.1.2.2 Silenciamiento genético con RNA de interferencia

Existen diversas estrategias para interrumpir la expresión de proteínas implicadas en nuestras vías de señalización. Una de ellas consiste en el uso de pequeños RNA de interferencia (RNAi o siRNA por sus siglas en inglés, small interfering RNA). Los siRNA son altamente específicos para la secuencia de nucleótidos del RNA mensajero (mRNA) de la proteína que se desea bloquear o silenciar, lo que conlleva a una reducción en la expresión del gen correspondiente. Estos agentes inhiben la traducción del mRNA diana uniéndose a él y provocando su degradación. En este estudio, se utilizaron siRNAs para silenciar la expresión de varios genes, como el receptor de LH (LHR, Sure Silencing shRNA Plasmid Human LHGR de SuperArray Bioscience), paxillina (siRNAs vs. paxillina de Santa Cruz Biotechnology) y Cdc42 (siRNAs vs. Cdc42 de Santa Cruz Biotechnology), además usamos los respectivos controles positivos en cada uno de nuestros silenciamientos, los cuales contaban con una secuencia de nucleótidos aleatoria.

#### Protocolo de transfección con siRNA.

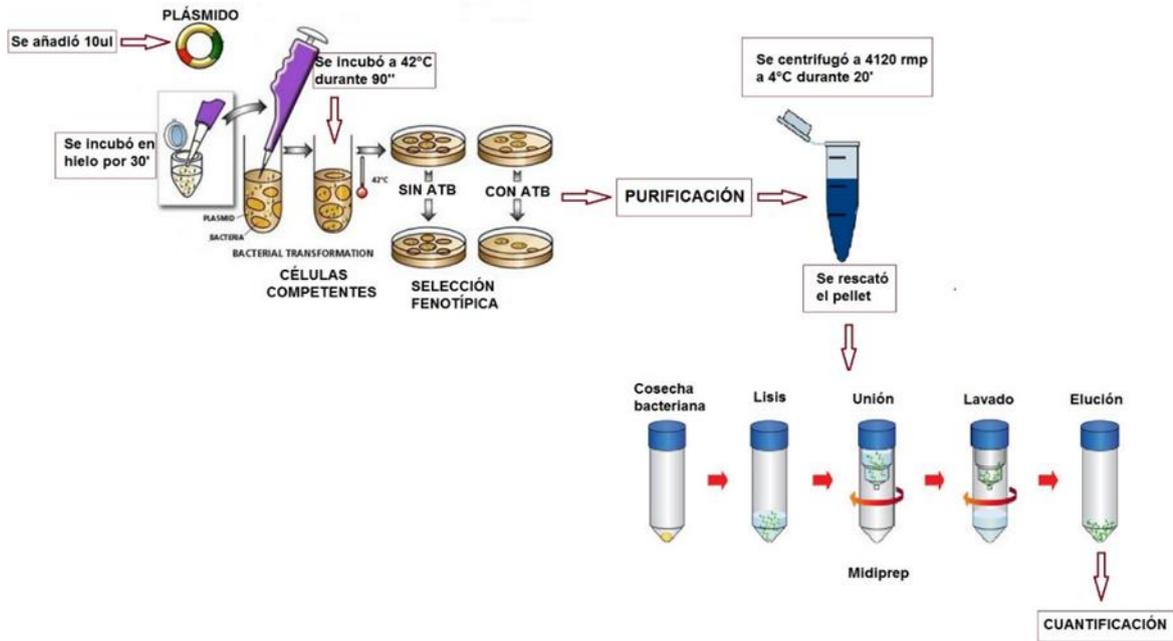
Para llevar a cabo la transfección con siRNA, se cultivaron células T-47D en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 80-85%. La introducción de los siRNA en las células se llevó a cabo mediante transfección celular mediada por lípidos catiónicos, utilizando Lipofectamina 2000® (Invitrogen, catálogo 11668-019). Estos lípidos forman complejos con los pequeños RNAs de interferencia, lo que les confieren una fuerte afinidad por la membrana plasmática, permitiéndoles atravesarla e ingresar su contenido al núcleo celular.

Se prepararon dos soluciones A y B, en tubos estériles de 1,5 ml. La solución A contenía una concentración de 50-75 nM de siRNA específico para cada transfección, mientras que en la solución B se agregaron 3-5  $\mu$ l de Lipofectamina en 200  $\mu$ l de medio Optimen. Ambas soluciones se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 45 minutos para su estabilización, y luego de su estabilización se mezclaron. A continuación, se agregó la solución de siRNA/Lipofectamina/medio Optimen a cada pocillo de la placa a tratar y se incubaron las células a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 24-48 horas. Luego, se renovó el medio y se estimuló a las células con LH (5 mIU/ml) durante 20 minutos. Finalmente, las células fueron extraídas con buffer de lisis y luego los diversos tratamientos fueron analizados mediante Western blot e Inmunofluorescencia. La eficacia del silenciamiento génico se evaluó mediante Western Blot, validando así los resultados obtenidos.

### 3.1.2.3 Transfección con plásmidos

Para analizar el rol específico de ciertas proteínas, basadas en su funcionalidad, utilizamos diversos plásmidos, con modificaciones en su composición, que afectan su funcionalidad. Estos plásmidos son pequeñas moléculas de DNA circular que contienen la secuencia que codifica a la proteína modificada junto con sitios de reconocimiento para la maquinaria de transcripción, lo que permite su expresión en las células empleadas. La entrada de los plásmidos en las células se realiza mediante transfección celular mediada por lípidos catiónicos (Lipofectamina 2000®). Este mismo proceso se utiliza para la introducción de pequeños RNAs de interferencia, tal y como se mencionó anteriormente.

En este trabajo de tesis, se utilizó un plásmido para la proteína cortactina, el cual presenta una triple mutación en los aminoácidos 421, 466 y 482, donde se modificaron los residuos de Tirosina (Y) por Fenilalanina (F) (pcDNA 2AB Flag-Cortactin 3YF). El mismo fue proporcionado por el *Dr. John Cooper* (Universidad de Washington, EE. UU) [157]. Por otro lado, utilizamos un plásmido modificado para la proteína N-WASP, que presenta un dominio N-WASP/*región VCA truncada (Lentilox pLL5.0 N-WASP  $\Delta$ VCA)*. Esta modificación carece del dominio carboxi-terminal necesaria para la activación del complejo Arp2/3. El plásmido fue otorgado por el *Dr. Alpha Yap* (Universidad de Queensland, Australia) [158]. En ambos casos, los insertos de cada plásmido estaban clonados en un vector pcDNA3.1+. Posteriormente, los plásmidos se amplificaron y purificaron, a partir de bacterias competentes (Invitrogen), utilizando el protocolo que se muestra en la *Figura 17*.



**Figura 17. Protocolo empleado para la obtención de plásmidos.** Para obtener los plásmidos de expresión recombinante se siguió un protocolo estándar. En primer lugar, se descongelaron las bacterias transformantes colocando los crioviales en hielo. A continuación, se añadió 10 µl de plásmido en cada criovial, se agitó suavemente y se dejó reposar durante 30 minutos en hielo. Después, se incubaron los crioviales a 42°C durante 90 minutos y se enfriaron en hielo durante 2-10 minutos. Posteriormente, se agregaron todas las bacterias con el plásmido en un medio de cultivo que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Para seleccionar correctamente las bacterias, se prepararon placas de Petri con/sin antibióticos, y se escogieron aquellas que fueron resistentes al mismo. A continuación, se seleccionaron y replicaron dichas bacterias con el plásmido y se agregaron en un Erlenmeyer con medio de cultivo para continuar con su amplificación. El medio que contenía bacteria y plásmidos se distribuyó en tubos de falcón de 50 ml para precipitar las bacterias, que luego se centrifugaron a 4120 rpm durante 20 minutos a 4°C. Una vez eliminado el sobrenadante, se rescató el pellet y se procedió a la extracción de los plásmidos utilizando un kit comercial de purificación de ADN (PureLink™ Plasmid Purification Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez purificados los plásmidos, se utilizaron para llevar a cabo la transfección en células de cáncer de mama T-47D, que previamente se habían cultivado hasta alcanzar la confluencia en una placa de 6 pocillos. Para la transfección, se preparó una solución que contenía una concentración de 10 mg de plásmidos específicos (cortactina (3YF) y/o N-WASP (WASP-ΔVCA)) junto con 3 µl de lipofectamina en 300 µl de medio Optimen. Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos para su estabilización, y luego se agregó a cada uno de los pocillos tratados, llevando el volumen final a 1 ml en cada uno de ellos. Las células se mantuvieron en incubación durante 24-48 horas antes de renovar el medio y estimularlas con LH (5 mUI/ml) durante 20 minutos. Posteriormente, se determinaron los niveles de fosforilación/expresión de las proteínas Cortactina y/o N-WASP, respectivamente mediante Western blot para confirmar la eficacia de la transfección y la regulación de dichas proteínas en la vía de señalización posiblemente involucrada. El análisis de Western blot demostró una óptima eficacia de la transfección a las 24 horas.

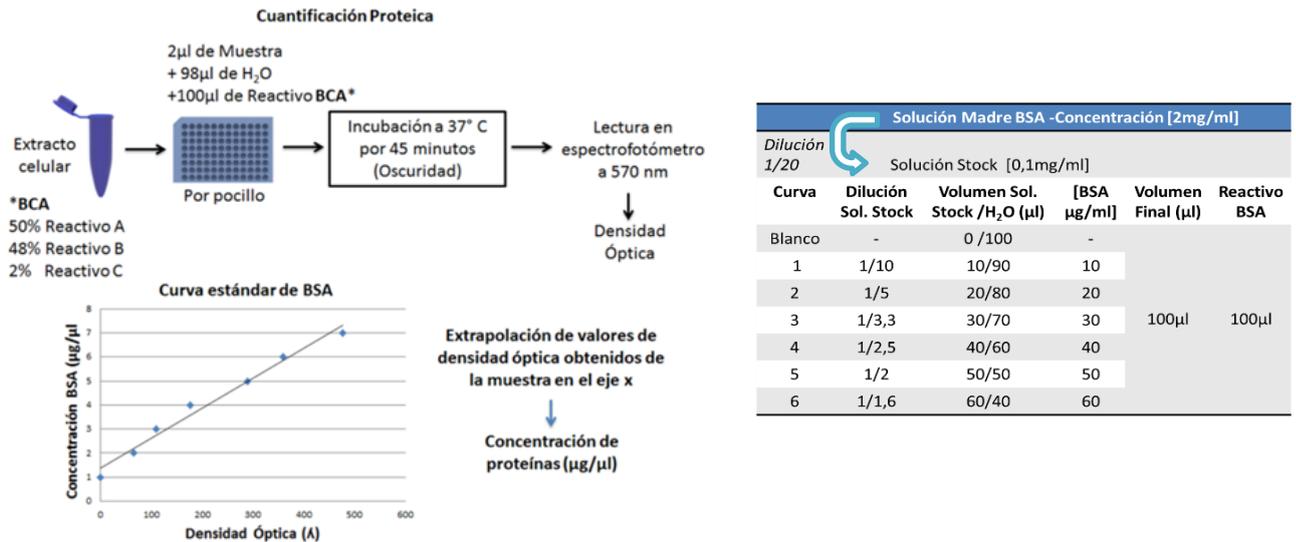
### 3.1.3 Inmunodetección de proteínas en membranas de PVDF

#### 3.1.3.1 Extracción de proteínas

Tras finalizar los diversos tratamientos, descartamos el medio de cultivo de las placas, lavamos las células con PBS 1X frío, y recolectamos las células mediante un raspado (scrape) en un volumen de 200 - 300  $\mu$ L de buffer de lisis (100 mM Tris-HCL, pH 6,8; 20% v/v glicerol, 4% p/v dodecil sulfato de sodio, SDS; H<sub>2</sub>O MiliQ) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF; 1mM ortovanadato de sodio, 1mM fluoruro de sodio; cocktail de inhibidores de proteasas 1X; y cocktail de inhibidores de fosfatasa 1X). El cocktail de inhibidores de proteasas (P8340, Sigma-Aldrich) se encuentra compuesto por leupeptina, aprotinina y pepstatina A, mientras que el cocktail de inhibidores de fosfatasa (P5726, Sigma-Aldrich) contiene ortovanadato de sodio, molibdato de sodio, tartrato de sodio e imidazol. El homogenato se preservó a -20°C hasta el momento de la determinación proteica.

#### 3.1.3.2 Cuantificación de proteínas

El método utilizado para determinar la concentración de proteínas en las muestras fue el ácido bicinonínico, utilizando el kit micro-BCA de Pierce (#23235, Thermo Fisher Scientific, USA). Este método se basa en la detección colorimétrica de una reacción química para cuantificar las proteínas presentes en el lisado celular. Para la cuantificación proteica, se preparó una curva estándar mediante diluciones seriadas de albúmina de suero bovino (BSA) en un rango de 0 a 100  $\mu$ g/ml. En una placa de 96 pocillos, se cargaron 100  $\mu$ l de cada concentración de la curva por duplicado, y para cada muestra se cargaron por duplicado 2  $\mu$ l y se adicionaron 98  $\mu$ l de agua. Luego se añadieron 100  $\mu$ l de la solución de reactivo de BCA (50% reactivo A, 48% reactivo B y 2% reactivo C) a cada pocillo. La placa se incubó a 37°C durante 40 minutos en la oscuridad, y luego se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas MULTISKAN EX de Thermo Scientific (Lafayette, CO, USA). Se graficó una curva de absorbancia/concentración para BSA y se trazó la recta de regresión lineal. La ecuación de la recta fue empleada para los cálculos de la concentración de proteínas en cada muestra (*Figura 18*).



**Figura 18. Esquema del protocolo para estimar la concentración proteica.**

### 3.1.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La técnica utilizada consiste en la separación de las proteínas presentes en la muestra mediante el ensayo de electroforesis en gel de poliacrilamida, conocida como SDS-PAGE. Esta técnica se basa en la separación de proteínas según su peso molecular, forma y carga eléctrica (electroforesis nativa), o exclusivamente en función de su tamaño (electroforesis desnaturalizante). Para este fin, se prepararon geles de SDS-PAGE con diferentes porcentajes de poliacrilamida (8%, 10% y 12%) según el peso molecular de las proteínas a separar, utilizando el sistema *MiniProtean* de Bio-Rad. Las muestras se desnaturalizan a 95°C durante 5 minutos y se sembraron 20-40 µg de muestras diluidas previamente con buffer de muestra 5X (0,2 M Tris-HCl, pH 6,8; 20% v/v glicerol, 10% SDS; 0,5% azul de bromofenol, 10 mM DTT, H<sub>2</sub>O miliQ) en cada calle. En la primera calle del gel se colocó un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, cat. 1610374 - Bio-Rad). Los geles se sumergieron en un buffer de corrida (25 mM Tris-base; 192 mM glicina; 0,1% SDS; pH 8,6) dentro de la cuba electroforética, y se sometieron a 80 V durante la migración de las proteínas en el gel de apilamiento y a 120 V en el gel de resolución.

### 3.1.3.4 Western Blot (WB)

La técnica se basa en la detección de proteínas, que se transfieren a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) o nitrocelulosa, utilizando anticuerpos específicos. Las proteínas son separadas en el gel de poliacrilamida según su peso molecular, y luego transferidas a la membrana de PVDF. Esta membrana se activa previamente con metanol, y se humedece con buffer de transferencia. A continuación, se forma un sándwich compuesto por dos esponjas plásticas, dos láminas gruesas de papel (papel de blotting), una lámina de PVDF con poro de 0,45 µm (cat. # 88518, Thermo Scientific, Lafayette, USA), y el gel resolutivo de poliacrilamida-SDS, todo ello depositado dentro de dos soportes plásticos perforados. El sándwich se colocó dentro de una cuba de

transferencia, con la membrana orientada hacia el ánodo y el gel hacia el cátodo, sumergido en el buffer de transferencia (20 mM Tris base; 150 mM glicina; 0,1% SDS; 10% metanol; pH 8,4), y se llevó a cabo la transferencia durante 70 min a 100 V constantes a 4°C.

Una vez finalizada la transferencia, se lavan las membranas con buffer TBS-Tween-20 1X (137 mM NaCl; 20 mM Tris; 0,1% Tween-20) durante 10-15 min, y fueron bloqueadas con 1% BSA en TBS-T durante 30 min a temperatura ambiente (TA). Luego se incubaron con los respectivos anticuerpos (Ac) primarios durante toda la noche, en rotación a 4°C (ON). Los Ac primarios se diluyeron en buffer de dilución de Ac (1% BSA; 0,1% timerosal; 149 mM NaCl; 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O) según las concentraciones específicas en la *Tabla 3*. Posteriormente, se lavaron las membranas 3 veces con buffer TBS-T 1X durante 10 min, en cada lavado, y se incuban con el Ac secundario correspondiente durante 90 min a TA (*ver Tabla 4*). Los Ac secundarios se diluyeron en buffer de bloqueo. Finalmente, se lavaron las membranas, 2 veces durante 10 min con TBS-T, antes de revelar con los reactivos quimioluminiscentes (Sigma-Aldrich). Para el revelado se adicionó a la membrana de PVDF una mezcla de la solución A (100mM Tris, pH 8,5; 2,5mM luminol; 0,5mM de ácido cumárico) con la solución B (0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 100mM Tris, pH 8,5), preparadas inmediatamente antes de usar. Las imágenes fueron capturadas con un equipo de detección quimioluminiscente ChemiDoc™ XRS, provisto del software Image Lab™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Anticuerpos primarios			
Antígeno	Anticuerpos	Dilución	Origen
<b>p-N-WASP (ser484/485)</b>	Policlonal (conejo)	WB: 1: 1000 IF: 1:100	Chemicon International/ab1964
<b>N-WASP</b>	Monoclonal (ratón)	WB: 1: 1000	Santa Cruz Biotech/ sc-13139
<b>LHR</b>	Policlonal (conejo)	WB: 1: 1000	Santa Cruz Biotech/ sc-25828
<b>FSHR (N-20)</b>	Policlonal (cabra)	WB: 1: 1000	Santa Cruz Biotech/sc-7798
<b>p-Src (Tyr 418)</b>	Policlonal (conejo)	WB: 1: 1000	Abcam/ab4816
<b>Src</b>	Monoclonal (ratón)	WB: 1: 1000	Santa Cruz Biotech/ sc-5266
<b>p-FAK (Tyr 397)</b>	Monoclonal (ratón)	WB: 1: 1000	BD Transduction Lab/ 611807
<b>FAK</b>	Monoclonal (ratón)	WB: 1: 1000 IP: 1:500	BD Transduction Lab/ 611807
<b>p-paxillina (Tyr 118)</b>	Monoclonal (ratón)	WB: 1: 1000 IF: 1:100	Santa Cruz Biotech/ sc-365020
<b>paxillina</b>	Policlonal (cabra)	WB: 1: 1000	Santa Cruz Biotech/ sc-31010
<b>p-Cortactina (Tyr 466)</b>	Policlonal (conejo)	WB: 1: 500 IF: 1:50	Santa Cruz Biotech/ sc-101661
<b>Cortactina</b>	Policlonal (conejo)	WB: 1: 1000 IP: 1:500	Santa Cruz Biotech/ sc-11408
<b>p-Arp2 (Thr237)</b>	Policlonal (conejo)	WB: 1: 1000	Biorbyt/ orb155730
<b>Arp2</b>	Policlonal (conejo)	WB: 1: 1000 IP: 1:500	Santa Cruz Biotech/ sc-15389
<b>Arp3</b>	Monoclonal (ratón)	WB: 1: 1000	BD Transduction Lab/ 612135
<b>p-Try</b>	Monoclonal (ratón)	WB: 1: 1000	Santa Cruz Biotech/ sc-7020
<b>MMP-2 (2C1)</b>	Monoclonal (ratón)	WB: 1: 1000	Santa Cruz Biotech/ sc-13594
<b>MMP-9 (2C3)</b>	Monoclonal (ratón)	WB: 1: 1000	Santa Cruz Biotech/ sc-21733
<b>Actin</b>	Policlonal (cabra)	WB: 1: 1000	Santa Cruz Biotech/ sc-1615

**Tabla 3. Anticuerpos primarios.** WB: western blot, IF: inmunofluorescencia, IP: inmunoprecipitación.

Anticuerpos secundarios			
Antígeno	Anticuerpos	Dilución	Origen
Conejo	Monoclonal (ratón)/HRP	WB: 1: 2000	Santa Cruz Biotech/ sc-2357
Ratón	Policlonal (conejo)/HRP	WB: 1: 2000	Santa Cruz Biotech/ sc-358914
Cabra	Policlonal (conejo)/HRP	WB: 1: 2000	Santa Cruz Biotech/ sc-2768

**Tabla 4. Anticuerpos secundarios.** HRP: horseradish peroxidase.

### 3.1.3.5 Cuantificación relativa de los niveles de fosforilación de las proteínas.

Se evaluaron los cambios en los niveles de fosforilación de las proteínas estudiadas mediante el análisis densitométrico de las bandas obtenidas en los ensayos de WB. Para cuantificar estas bandas, se utilizaron los programas *Image J* (NIH, MD, USA) e *Image Lab<sup>TM</sup>* del equipo ChemiDoc<sup>TM</sup>, los cuales asignaron a cada banda del inmunoblot un valor en unidades de intensidad de imagen (píxeles/cm<sup>2</sup>). La intensidad de cada banda de las proteínas fosforiladas en estudio se normalizó con la intensidad de las bandas de sus proteínas totales (tipo salvaje) obtenidas en la misma membrana. En casos en los que la determinación proteica presentó dificultades, por ejemplo, cuando los anticuerpos primarios, fosforilados y totales de una proteína de interés estuvieron hechos en la misma especie (Ac 2rio), se normalizó la intensidad de cada banda con la correspondiente a las proteínas control de carga (*housekeeping*) como  $\beta$ -actina y/o tubulina, obtenidas en la misma membrana. Para verificar estos resultados, se corroboró en membranas duplicadas de nuestras proteínas en estudio.

### 3.1.4 Inmunofluorescencia

Se utilizó una técnica de inmunomarcación que consiste en unir anticuerpos específicos a una sustancia fluorescente con el objetivo de demostrar la presencia y localización de proteínas de interés. En este experimento, células T-47D fueron cultivadas sobre cubreobjetos en placas de 6 wells y fueron sometidas a diferentes tratamientos, con y/o sin inhibidores específicos de proteínas involucradas en las vías de señalización propuestas, tras la estimulación con pulsos de LH (5 mIU/ml, por 20 minutos). Tras los tratamientos, las células fueron fijadas con p-formaldehído (PFA) al 4% en buffer PBS (1X) durante 30 min a TA, y permeabilizadas con tritón (X-100) al 0,1% en PBS 1X durante 5 min. A continuación, se bloquearon los sitios inespecíficos con una solución de albúmina de suero bovino al 3% en PBS y 0,1% de Tween-20 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Antes de cada paso, las células se lavaron dos veces con PBS 1X. Luego, se incubaron las células con Ac primarios, como p-N-WASP<sup>S484/485</sup> (1:1000, #ab1964 Chemicon International), p-paxillin<sup>Y118</sup> (1:1000, sc-365020) y p-cortactin<sup>Y466</sup> (1:500, sc-101661), obtenidos de Santa Cruz Biotechnology), diluidos en buffer TBS-T en cámara húmeda a 4°C ON. Al día siguiente, se lavaron las células con PBS 1X para remover el exceso de Ac primarios, e incubaron con Ac secundarios conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC 1/150, Vector Laboratories) y/o DyLight<sup>594</sup> (1:200, Invitrogen) durante 2 horas

a TA en cámara húmeda y en oscuridad. Después, se lavaron las células dos veces con PBS 1X, y se incubaron con Texas Red-faloidina (marcador de fibras de actina, dilución 1:150) en buffer TBS-T durante 40 minutos a TA. Posteriormente, se tiñeron los núcleos de las células con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich, dilución 1:10.000) por 10 minutos a TA. Previo a cada uno de estos pasos, las células se lavaron cuidadosamente dos veces con TBS 1X. Finalmente, los cubreobjetos se montaron con medio Vectashield (catálogo H1000, Vector laboratorios) y almacenados a 4°C en la oscuridad hasta su análisis.

#### 3.1.4.1. Análisis semicuantitativo de localización de las proteínas en estudio

La observación de la inmunofluorescencia y la morfología celular se llevó a cabo mediante microscopía de epifluorescencia, utilizando un equipo compuesto por el microscopio Nikon Eclipse E200 y una cámara digital Olympus DP70 de alta resolución. Las imágenes se capturaron con objetivos de lente 100X. Para garantizar la especificidad de la tinción observada, se incluyeron controles negativos en cada experimento.

La cuantificación de la fluorescencia se realizó mediante el análisis de las imágenes capturadas con el software FIJI, utilizando máscaras binarias creadas a partir de la tinción completa de las células con Texas-Red-Phalloidin (y/o con tinción nuclear con DAPI). Se definieron las regiones de interés en cada imagen y se midió la intensidad de la señal de fluorescencia en cada región utilizando el software ImageJ.

Este proceso de cuantificación de la fluorescencia se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en Kelley y Paschal et. Al., 2019 [159]. En resumen, la cuantificación de la fluorescencia permite obtener datos precisos y reproducibles de la actividad celular y la intensidad de la señal de fluorescencia, lo que permite una mejor comprensión de los procesos celulares que se están estudiando.

### 3.1.5 Inmunoprecipitación (IP)

#### 3.1.5.1. Obtención de lisados celulares

Se empleó la técnica para identificar interacciones proteína-proteína, basada en la separación de una proteína diana ligada a un anticuerpo de otras proteínas independientes. Para ello, se cultivaron células T-47D en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (BD Falcon), y se trataron según el protocolo experimental [147]. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS 1X estéril y lisadas con un buffer de lisis no desnaturizante (Tris-HCl 20mM; pH 7.4; EDTA 10mM; NaCl 100mM; IGEPAL al 0,5%; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM; NaF 50 mM; PMSF 0,1 mg/L; aprotinina 0,3 mg/L, 0,01% de cocktail inhibidor de proteasas de Sigma-Aldrich, P8340; y 3,3 µl de cocktail inhibidor de fosfatasa (Sigma-Aldrich, P0044). Este procedimiento permitió mantener nativas las estructuras de las proteínas.

Las muestras obtenidas fueron cuantificadas mediante la técnica de BCA (detallada anteriormente, sección 3.2.3.2) y se utilizó una cantidad de 500 µg de proteínas por cada tratamiento, las cuales se colocaron en tubos de eppendorf de 1,5ml. Los volúmenes se ajustaron a 500 µl utilizando el mismo buffer de lisis.

### 3.1.5.2 Incubación con anticuerpos

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación, se utilizaron Ac primarios versus FAK, cortactina y/o Arp2, los cuales se describen en la Tabla 3. A cada tubo de las muestras, se le adicionó el Ac en una concentración de 1-2 µg/500 µg de muestra. Las muestras con los Ac se colocaron en un rotor y se incubaron suavemente durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se agregó a cada tubo, 40µl de proteína A-agarosa (proporción 1:10, Santa Cruz Biotechnology), y se incubaron suavemente en el agitador por 2h a 4°C. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm durante 5 min a 4°C, y se preservaron los pellets a -20°C.

### 3.1.5.3 Lavados de las muestras

Después de descartar los sobrenadantes, los pellets fueron lavados tres veces con 500µl de *buffer de lavado para IP* (Tris-HCl 20 mM, pH 7.4; EDTA 10 mM; NaCl 150 mM; Igepal al 1%; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM; NaF 50 mM; PMSF 0,1 mg/L; aprotinina 0,3 mg/L; 0,01% de cocktail inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, #P8340), y 3,3 µl de cocktail inhibidor de fosfatasa (Sigma-Aldrich, #P0044). Después de cada lavado, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm por 5 min a 4°C. Posteriormente, se descartó el último sobrenadante y se agregaron 30 µl de sample buffer (SB). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de la electroforesis. Luego las muestras fueron calentadas durante 5 min a 95°C, para romper la unión del Ac con las partículas de agarosa. Posteriormente, se sembraron las muestras en geles de poliacrilamida y se realizó el ensayo de WB, descrita anteriormente. Para verificar la efectividad de la IP y evaluar las interacciones proteicas, las membranas se incubaron con anticuerpos anti-FAK, anti-cortactina, anti-Arp2, anti-Arp3 y p-Tyr.

## 3.1.6 Ensayo de adhesión celular

La adhesión celular es un proceso crucial para mantener la estructura tisular, promover la migración y transmitir información del microambiente celular a través de la membrana plasmática. La capacidad de cuantificar la adhesión ha demostrado ser extremadamente valiosa para aquellos investigadores que estudian los mecanismos moleculares subyacentes a estos procesos. Para evaluar la adhesión celular, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos, previamente plaqueadas con laminina o gelatina al 0,1% (10 µl/ml), a 4°C durante toda la noche, lo que facilitó una mejor adhesión celular. Se añadieron 5x10<sup>4</sup> células por pocillo, y las mismas fueron tratadas con los inhibidores y/o silenciadores (descritos anteriormente) durante 24 h, seguido por la estimulación con LH (5 mIU/ml) durante 90 min. Después, se retiró el medio de cultivo y se

realizaron dos lavados con PBS 1X para eliminar las células no adherentes. A continuación, se fijaron con p-formaldehído (PFA) al 4% durante 20-25 min, se lavaron inmediatamente y se añadió 100  $\mu$ l de Cristal Violeta (CV) en cada pocillo por 10 min para su coloración. Finalmente, se realizaron dos lavados con PBS 1X para eliminar los restos del colorante, dejando las células finalmente en 100  $\mu$ l de agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) para ser contabilizadas.

#### 3.1.6.1 Cuantificación del ensayo de adhesión celular

Los cambios en la adhesión celular de las proteínas estudiadas fueron evaluados mediante absorbancia a 570 nm, utilizando el lector de placa (MULTISKAN EX; Thermo Scientific, Lafayette, USA). Se tomaron fotografías digitales de las células adheridas con un microscopio Nikon Eclipse E200 acoplado a una cámara digital 590CU 5.0M CCD de alta resolución, con el fin de contar el número de células adheridas. La adhesión celular se calculó como un porcentaje de células tratadas unidas en comparación con las células no tratadas.

#### 3.1.7 Ensayo de migración celular

Se llevó a cabo una técnica basada en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de células, con el fin de evaluar su capacidad de migración y cierre de herida.

El procedimiento se realizó en placas de cultivo de 6 pocillos, donde se colocaron  $5 \times 10^5$  células de la línea celular T-47D y se cultivaron hasta que alcanzaron una confluencia celular del 70-80% aproximadamente. A continuación, se realizó una brecha en la monocapa de células mediante la presión vertical de una punta de plástico estéril (tips amarillos) en el pocillo correspondiente.

Tras la creación de la herida, se lavaron las células con PBS 1X y se agregaron los tratamientos correspondientes en 2 ml del medio sin SFB (privación de esteroides). Previamente a la adición de LH se incluyó un inhibidor selectivo de la síntesis de ADN el cual nos permite diferenciar un proceso proliferativo al migratorio, sin inhibir la síntesis de ARN, denominado clorhidrato de Citosina  $\beta$ -D-arabinofuranosido (10  $\mu$ M). Se llevó a cabo un seguimiento del patrón de migración durante 48 horas, tiempo en el cual se tomaron fotografías digitales de cada tratamiento utilizando el microscopio Nikon Eclipse E200 acoplado a una cámara digital 590CU 5.0M CCD de alta resolución. El objetivo de esta técnica fue evaluar la capacidad de las células para cerrar la herida a través de la migración y establecimiento de nuevos contactos con otras células.

##### 3.1.7.1 Cuantificación del ensayo de migración celular

Para determinar el efecto de los diferentes tratamientos en la migración celular, cuantificamos los cambios en la distancia de migración celular después de 48 horas utilizando microscopía de contraste de fase y el software ImageJ. Para ello, primero se midió la distancia de migración al tiempo 0 y a las 48 horas. Luego, se utilizó el software ImageJ para cuantificar el área cerrada por las células en cada tratamiento, tanto a las 0 horas como a las 48 horas. Y finalmente, se normalizó

el área de cada tratamiento con el área de su respectivo control, para comparar los efectos de los tratamientos. La normalización de las áreas es importante para tener en cuenta las variaciones en la densidad celular y las diferencias en el tamaño de las áreas cerradas.

Este enfoque de cuantificación de la migración celular puede proporcionarnos información útil sobre cómo los diferentes tratamientos afectan la capacidad de las células para migrar y puede ayudar a identificar los tratamientos que tienen un efecto significativo en la migración celular, en comparación con el tratamiento control de las muestras.

### **3.1.8 Ensayo de invasión celular**

El ensayo de invasión celular es un sistema *in vitro* que permite estudiar el proceso invasivo de las células. En este tipo de ensayo, se utilizan cámaras de invasión recubiertas con Matrigel®, una matriz que actúa como membrana basal reconstituida *in vitro*, permitiendo la oclusión de los poros de la membrana y el bloqueo de la migración de las células no invasivas a través de la membrana. En cambio, las células invasoras secretan proteasas que degradan enzimáticamente el Matrigel y permiten la invasión a través de los poros de la membrana.

En nuestro estudio, utilizamos el protocolo de BD BioCoatGrowth Factor Reduced Matrigel™ Invasion Chamber (BD Bioscience, USA). Previamente a la evaluación, las células fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Posteriormente, se trataron las células con inhibidores y/o silenciadores (*anteriormente descritos*) durante 24 h antes de ser sub-cultivadas en la cámara de invasión de 24 pocillos. Para la preparación de la cámara, se realizó la rehidratación de las cubas de Matrigel, y se preparó un número igual de insertos de control (sin recubrimiento de Matrigel GFR). Luego, se añadió a los insertos 0,5 ml de suspensión celular ( $2,5 \times 10^4$  células) en cada pocillo de la cámara. Para prevenir la proliferación celular, se utilizó hidrocloreuro de citosina b-D-arabinofuranósido (10  $\mu$ M), una hora antes de agregar LH. A continuación, se agregó 0,75 ml del agente quimio-atrayente en los pocillos de la placa, a través del puerto de acceso, evitando la formación de burbujas de aire en el pocillo. Se incubó las células durante toda la noche a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células que no invadieron fueron retiradas utilizando un hisopo de algodón humedecido con medio en la parte superior de la cámara de invasión. Finalmente, las células invasivas se tiñeron utilizando el kit Diff-Quik (contiene un fijador y dos soluciones de tinción), y se enjuagó la membrana, para eliminar el exceso de colorante.

#### **3.1.8.1 Cuantificación del ensayo de invasión celular**

El recuento de las células invasoras se realizó mediante la captura de imágenes a través del microscopio Nikon Eclipse E200 acoplado a una cámara digital Olympus DP70 de alta resolución, con el fin de contar el número de células invasoras. Las células se contaron en varias regiones del campo de membrana en lugar de solo en el campo central. Además, se estableció un umbral de intensidad de imagen para segmentar las células invasoras de las que no lo son. La invasión celular

se calculó como un porcentaje de células tratadas, en comparación con las células no tratadas (control). Para garantizar la representatividad de los resultados, las mediciones se realizaron por triplicado en varios campos de membrana, y se utilizó un tamaño de muestra estadísticamente significativo. Para una mayor precisión, se utilizó una técnica de tinción específica para identificar células invasoras, como la tinción con cristal violeta.

### 3.1.9 Análisis estadístico

Para expresar los valores obtenidos se utilizó la media  $\pm$  desviación estándar. Para realizar el análisis estadístico y crear los gráficos se empleó el software GraphPad PRISM versión 5.03 (San Diego, CA, USA). Se determinaron las diferencias estadísticas entre los valores medios mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. En caso de que las varianzas no fueran homogéneas, se aplicó una transformación logarítmica de los datos para homogenizarlas. Si, a pesar de la transformación, las varianzas seguían sin ser homogéneas, se utilizó el test de Mann-Whitney. Se estableció un intervalo de confianza del 95%. Por lo tanto, se consideró estadísticamente significativo un valor de  $P < 0,05$ .

## 3.2 Metodologías empleadas para los estudios *In Silico*

### 3.2.1 Bioinformática - Análisis de expresión génica.

*Todos los análisis se realizaron utilizando el programa R studio, versión 4.1.3 (<http://www.r-project.org/>) en un entorno Windows con una computadora Intel Core i7 con 32 GB de RAM.*

### 3.2.2 Estudio de expresión génica basal entre subtipos celulares de cáncer de mama

Para realizar este estudio, se llevó a cabo utilizando dos conjuntos de datos de expresión génica de microarrays (GSE70884 y GSE68651), descargados de la base de datos Gene Expression Omnibus, la cual se encuentra disponible públicamente en línea (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE70884>), y (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE68651>), respectivamente. La adquisición de estos datos se llevó a cabo mediante la utilización del paquete R GEOquery [160, 161].

Estas bases de datos cuentan con información de varias líneas celulares de CM tratadas con diferentes drogas y medios condicionados. Para nuestro análisis sólo se seleccionaron los *grupos control*, sin tratamiento y sin medios condicionados, correspondientes a siete líneas celulares de cáncer de mama de interés (MCF-7, T-47D, ZR75.1, BT-474, SK-BR3, MDA-MB-468 y MDA-MB-231). Respecto a la segunda base de datos, el análisis fue determinado de manera similar, donde fue seleccionada la línea celular normal de mama (MCF-10A), sin tratamiento previo. La comparación entre las diversas líneas celulares, fueron realizadas entre sus respectivos grupos control versus la línea normal de mama MCF-10A. Con el propósito de incrementar nuestro número de datos, se

analizó tres réplicas de cada línea celular de cáncer de mama. Estas líneas fueron seleccionadas con el fin de representar los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama; *Luminal A* (ER+/PR+/HER2-; T-47D y MCF-7), *Luminal B* (ER+/PR+/HER2+; BT-474), *HER2+* (ER-/PR-/HER2+; SK-BR3), *Triples Negativas* (ER-/PR-/HER2-; MDA-MB-231 y MDA-MB-468), y células normales (MCF-10A). Para combinar los conjuntos de datos y realizar correcciones en los valores de expresión, se utilizó el método Combat del paquete SVA [162, 163].

Para realizar el perfil de expresión y el análisis de expresión diferencial de genes (GED), se filtraron los recuentos de baja expresión, y se aplicó la transformación log 2 de los valores de expresión. Esto permitió el modelado lineal de los recuentos de ARN para obtener un perfil de expresión diferencial entre los subtipos celulares de cáncer de mama.

### 3.2.3 Construcción de mapa de calor

Para la construcción de mapa de calor (*heatmap*) y el análisis de clusters, se analizó la matriz de expresión génica obtenida previamente, donde se utilizaron las ocho líneas celulares de cáncer de mama (MCF-10A, T-47D, MCF-7, ZR75.1, BT-474, SK-BR3, MDA-MB-231 y MDA-MB-468). Antes de realizar el análisis, se realizó un pre-procesamiento de los datos para normalizarlos y eliminar los efectos de la variabilidad técnica. Luego, se seleccionaron 50 genes relevantes en diferentes procesos celulares involucrados en la progresión del cáncer de mama como, proliferación, matriz extracelular (MEC), transición epitelial-mesénquima (TEM), apoptosis, anti-apoptótico, motilidad celular y angiogénesis. Además, se realizó un análisis de calidad de los datos para detectar y eliminar valores faltantes o datos aberrantes.

Para visualizar las diferencias en los patrones de expresión génica entre cada línea celular, se analizó el z-score de cada gen. Se utilizó un algoritmo de agrupación jerárquica vinculación promedio y distancia de correlación de Pearson's para ordenar los genes en grupos. Para garantizar la replicabilidad de los resultados, se utilizó la validación cruzada y se probaron diferentes algoritmos, como análisis de componentes principales (PCA) y la agrupación K-means. También se consideró el tamaño de las muestras para garantizar la precisión del análisis. Dentro de cada proceso celular, los genes se agruparon según los dendogramas de Silhouette. Este enfoque permitió una identificación más clara de los patrones de expresión génica asociados con los diferentes procesos celulares relevantes para la progresión del cáncer de mama

### 3.2.4 Análisis de expresión génica diferencial (GED)

Con el objetivo de analizar la expresión génica diferencial entre los subtipos de cáncer de mama, se realizó un análisis comparativo de expresión génica diferencial entre las diversas variantes moleculares, en comparación con la línea normal. Para este propósito, utilizamos la plataforma de microarrays *Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0*, que nos permite medir la múltiple expresión de genes simultáneamente. En primer lugar, se procesó los datos brutos, obtenidos de las

mediciones utilizando el paquete estadístico Bioconductor [164], permitiéndonos normalizar y filtrar los datos, facilitando su posterior análisis. Es importante considerar que existe variabilidad técnica que puede afectar las mediciones y que no está relacionada con las diferencias genuinas entre los datos de células tumorales y normales. Para abordar este aspecto, empleamos el método ComBat [162], que nos ayudó a eliminar esta variabilidad no deseada y asegurarnos de que nuestros resultados fueran precisos.

Luego, para llevar a cabo el análisis de expresión génica diferencial se empleó el paquete *limma R* [165], que nos permite comparar los niveles de expresión de los genes entre las células de CM y las células normales. De esta manera, se obtuvo información acerca de qué genes presentaban una mayor o menor expresión en las células cancerosas en comparación con las células normales. Asimismo, se determinó qué diferencias eran lo suficientemente notables como para tener significancia estadística. Para asegurarnos de que nuestros resultados fueran confiables, se empleó el método de Benjamini-Hochberg [166]. Este método ajusta los valores de probabilidad ( $p$ -valores) y nos permitió identificar con mayor precisión los genes que mostraban diferencias genuinas, minimizando la posibilidad de resultados incorrectos. En particular, se compararon los perfiles de expresión de cada línea de carcinoma mamario versus la línea normal (*MCF-10A*), obteniendo los valores de cambio en  $\log_2$  (Fold change, FC), junto con los valores de significancia estadística (valor  $p$ ), y los valores de  $p$  ajustados (valor  $p$ -ajustado) mediante el método mencionado [166], el cual corrige los falsos positivos. Es importante destacar que este análisis nos permitió identificar los genes cuya expresión varía entre las líneas celulares tumorales de mama y la línea celular normal, proporcionando información crucial para comprender las bases moleculares subyacentes a esta enfermedad.

### 3.2.5 Tratamiento con LH en líneas celulares de carcinoma mamario.

Mediante un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, se evaluaron los niveles de expresión de los ARNm en líneas celulares tumorales de mama T-47D, tras los tratamientos con LH a diferentes concentraciones 5 mUI/ml (simula los niveles hormonales pre-pubertad) y 50 mUI/ml (imitar los niveles hormonales postmenopáusicas en mujeres) [84]. Los datos de expresión génica, sin tratamiento (Control), fueron analizados para obtener un perfil de expresión de genes relacionados con procesos relevantes en cáncer de mama. Para ello, se aplicó  $\log_2$  a los datos de expresión para estandarizar los valores, y posteriormente se realizó una normalización por cuartiles para poder comparar las diferentes dosis de los tratamientos de las T-47D. Finalmente, se seleccionó el control, y las condiciones con las concentraciones de 5 mUI/ml y 50 mUI/ml para representar los valores de expresión génica de interés en un gráfico circular de barras.

### 3.2.6 Expresión basal de FSHR, LHCGR, SRC y PTK2.

Luego de analizar minuciosamente el mapa de calor donde destaca las diferencias entre las diversas líneas celulares, nos resultó interesante profundizar la expresión de cuatro genes de interés, tales como: receptores de gonadotropinas, LHCGR y FSHR, y proteínas quinasas, como SRC y PTK2. La selección de estos genes fue basada gracias a investigaciones previas que subrayan su relevancia en el desarrollo del CM.

Para llevar a cabo este estudio, se utilizó dos conjuntos de datos de expresión génica provenientes de microarrays (GSE70884 y GSE68651), descargados de la base de datos de GEO, previamente empleada en el análisis del mapa de calor. Con el fin de evaluar los niveles de expresión de nuestros genes de interés, empleamos un gráfico conocido como *diagrama de caja (boxplot)*, el cual generamos mediante el uso de un software estadístico especializado llamado *Studio R*. Este enfoque metodológico nos permitió obtener una visualización clara de la distribución de los datos, facilitando la identificación de posibles valores atípicos y la comparación entre las diversas líneas celulares de CM.

## 3.3 Metodologías para los estudios en tumores mamarios en ratones BALB/c

### 3.3.1 Cultivo celular de líneas murinas

Las líneas murinas de células mamarias LM3 y LM05 fueron amablemente proporcionadas por el Instituto de Oncología Ángel H. Roffo (*Dra. Laura Todaro y Alejandro Urtreger*). Estas células se derivan de adenocarcinomas mamarios espontáneos de ratones BALB/c, que exhiben capacidad tumorigénicas y metastásicas en ratones BALB/c. *La línea celular LM3, es positiva para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2 o ErbB2), y negativa para los receptores de estrógenos (ER) y progesterona (PR)*. Las células LM3 fueron cultivadas en medio de cultivo MEM (Minimum Essential Medium), suplementada con suero fetal bovino al 10% (FBS, Internegocio, Buenos Aires, Argentina) y 80 mg/ml de gentamicina. Por otro lado, *la línea LM05 también es un adenocarcinoma mamario de ratón, pero es positivo para RE y RP, y negativo para HER-2*. Las células LM05 se mantuvieron en un medio de crecimiento consistente en DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Sigma-Aldrich), suplementado con 10% de Suero fetal bovino y 80 mg/ml gentamicina. Ambas líneas celulares se incubaron a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se utilizaron las células con una confluencia del 70-80% para los experimentos *in vitro* e *in vivo*. Antes de los experimentos, las células se mantuvieron durante 12-24 horas en un medio privado de esteroides, sin FBS.



*Líneas murinas LM05*



*Líneas murinas LM3*

### 3.3.2 Tratamientos “*in vitro*”

Para los ensayos *in vitro*, se seleccionó la línea celular murina LM3 debido a su característica fenotípica altamente invasivo y metastásico, así como la ausencia de RE y PR. Estas características hacen que la línea LM3 sea una elección pertinente para evaluar los efectos de los tratamientos. En este estudio, las células fueron expuestas a la hormona leutinizante (LH; Luveris 75 UI) obtenida del laboratorio Merck Serono. La concentración utilizada fue de 50 mUI/ml, con un periodo de tiempo de 48 horas. Asimismo, se utilizó un agonista (*Leuprorelina*; 0,1 – 1  $\mu$ M) y el antagonista selectivo (*Degarelix*; 10  $\mu$ M) de GnRH durante el mismo intervalo de tiempo. Estos compuestos se emplearon para comprender cómo las células responden a la modulación de las señales de GnRH en términos de migración e invasión. Para un análisis más detallado, se utilizaron dos inhibidores químicos específicos de las proteínas de interés. Uno de ellos es el inhibidor 4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(*t*-butil)-pirazolo-(3,4-d) pirimidina, inhibidor específico de Src (PP2, 10 $\mu$ M, Calbiochem). El segundo inhibidor es específico de la quinasa FAK (FAKi, 1 $\mu$ M, Santa Cruz Biotechnology). Ambos inhibidores se administraron durante 48 horas para evaluar cómo la inhibición de estas proteínas afecta la capacidad migratoria e invasiva celular en presencia de la hormona LH y los compuestos de GnRH. Este enfoque experimental permite comprender mejor la interacción de los tratamientos hormonales y los inhibidores químicos con las respuestas celulares en la línea murina LM3, en términos de migración e invasión, promoviendo posibles mecanismos subyacentes en estos procesos.

#### 3.3.2.1 Inmunodetección de proteínas

Una vez finalizados los tratamientos con leuprorelina, degarelix, PP2 y FAKi, en presencia o ausencia del pulso con LH<sub>50</sub>, se retiró el medio de cultivo presente en las placas de 6 wells. Luego, se repitió el mismo procedimiento detallado, sección *Inmunodetección de proteínas en membrana de PVDF*, utilizando las líneas celulares LM3.

### 3.3.3 Tratamientos “*in vivo*”

Para llevar a cabo los tratamientos *in vivo*, se emplearon las líneas celulares murinas LM3 y LM05. Estas células fueron sometidas a tratamientos con el inhibidor específico de Src (PP2, 10 $\mu$ M) y con

el inhibidor selectivo de FAK (FAKi, 1 $\mu$ M) durante un periodo de 5-7 días. Durante este lapso, se realizaron cambios de medio y se administraron los tratamientos cada 24 horas, con el objetivo de lograr una inhibición persistente. Esto involucró la exposición constante de las células a los inhibidores durante dicho intervalo.

Al aplicar estos inhibidores a las células murinas LM3 y LM05, se generó una modulación prolongada de la actividad de proteínas clave involucradas en la migración celular y la progresión tumoral. Src y FAK son proteínas de señalización claves en estos procesos, y su inhibición persistente puede alterar significativamente la capacidad de las células para adherirse a los tejidos circundantes y establecer tumores. Cabe resaltar que, al inyectar las células previamente inhibidas en los ratones, la duración de la inhibición pudo haber variado. Esta variabilidad se debe a la interacción entre el entorno in vivo y los procesos metabólicos propios de los ratones, que podrían influir en las respuestas celulares. No obstante, el objetivo principal de esta etapa fue observar cómo las células con inhibición previa podrían afectar la adhesión, migración y otros aspectos de la progresión tumoral en el contexto de los ratones.

Este enfoque nos podría brindar la oportunidad de explorar los efectos a largo plazo de la inhibición en las células y su comportamiento en un entorno vivo. Aunque la duración exacta de la inhibición puede haber variado, los resultados obtenidos proporcionan información valiosa sobre los efectos sostenidos de la inhibición persistente en la progresión tumoral. Durante este estudio, se registraron los datos de supervivencia en cada caso. Cada vez que se realizó una inoculación celular, se verificó que la viabilidad celular fuera superior al 95%, mediante la prueba de exclusión con *Trypan blue*. Con el fin de eliminar cualquier posible sesgo en los resultados, se asignó al azar el orden de inoculación de las líneas murinas de los distintos grupos.

En relación a este estudio, se optó por no emplear las líneas celulares T-47D para inyectar en los ratones debido a que, el uso de la misma requiere inocular una excesiva cantidad de células (entre 10 y 12 millones por ratón) para generar un tumor o una metástasis experimental. Por consiguiente, se optó por utilizar las líneas mamarias murinas LM3 y LM05, que se derivan de tumores espontáneos surgidos en estos ratones y permiten realizar ensayos in vivo con mayor facilidad.

### **3.3.4 Uso de animales**

Las prácticas que implicaron el uso de animales de experimentación fueron llevadas a cabo siguiendo los lineamientos de la Guía del NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH publicación N° 86-23, revisada en 1985 y 1991), así como los requerimientos éticos establecidos por el Reino Unido para la experimentación con animales (Animal Scientific Procedures, Act 1986). Todas las prácticas contaron con la debida autorización del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), perteneciente a la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo (FCM-UNCuyo) (CICUAL Aval N° 182/2020).

Para llevar a cabo los experimentos, se emplearon ratones hembras de la cepa BALB/c de entre 2-4 meses de edad, con un peso inicial de entre 20 a 30 gr. Estos animales fueron adquiridos del Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU, Mendoza, Argentina), donde se mantuvieron en condiciones controladas de luz, oscuridad (luz desde las 6:00h hasta las 20:00h) y temperatura (22°C a 24 °C). Asimismo, se les proporcionó alimento balanceado (Cargill, Córdoba) y agua de bebida ad libitum.

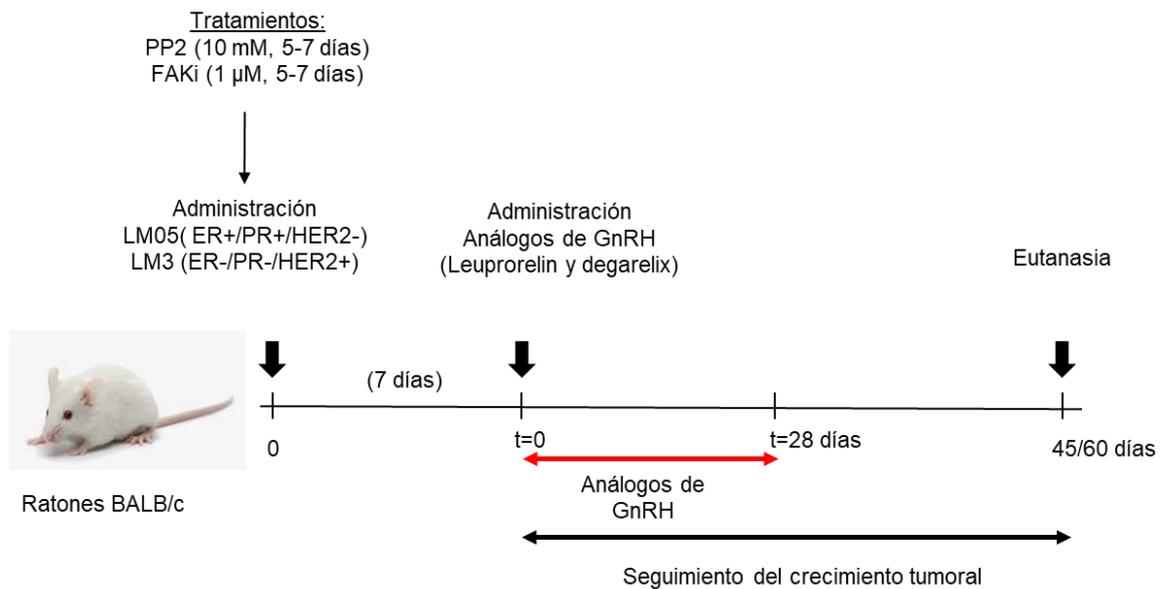
Al finalizar el experimento, o al notarse signos de sufrimiento, se llevó a cabo la eutanasia de los ratones mediante dislocación cervical. Se consideraron indicadores de malestar tales como: volumen tumoral superior a 1000 mm<sup>3</sup>, pérdida de peso superior al 20% respecto al peso inicial del animal, presencia de necrosis tumoral (incluso sangrado y/o ulceración), hipotermia (temperatura corporal inferior a 34 °C), disnea, falta de apetito y sed, pérdida del equilibrio y una marcada sedación. En situaciones donde estos signos se presentaron, se procedió al sacrificio de los animales.

### 3.3.5 Crecimiento tumoral ortotópico

Para llevar a cabo el estudio, ratones Balb/c fueron se inyectados por vía subcutánea, en la cuarta glándula mamaria, 3x10<sup>5</sup> células de LM3 y/o 5x10<sup>5</sup> de LM05, previamente tratadas o no con PP2 (10 µM durante 5-7 días) o FAKi (1 µM durante 5-7 días). Cuando los tumores fueron palpados, aproximadamente 7 días después de la inoculación, los ratones recibieron una única dosis por vía intramuscular o subcutánea del agonista de GnRH Enantone (Leuprorelina Acetato, 0,1 mg/Kg) y del antagonista de GnRH Degarelix (2 mg/Kg) para evaluar la eficacia de la terapia hormonal (*Figura 19*). Los diámetros de los tumores se midieron dos veces por semana con un calibre deslizante, y se calculó el volumen del tumor con la fórmula  $Dxd^2/2$  (donde "d" es el diámetro más pequeño y "D" es el más grande) para evaluar la tasa de crecimiento. Después de 60 días de la inoculación de las células murinas, los ratones fueron sacrificados y sometidos a necropsia para extraer los tumores. Estos tumores fueron fijados e incluidos en parafina para posteriores estudios histopatológicos. Se dividieron ratones de cada línea celular murina en grupos de cinco individuos, y se alojaron en jaulas específicas en una habitación con clima controlado. En total, se formaron siete y nueve grupos para las líneas murinas LM3 y LM05, respectivamente. Los grupos se conformaron de la siguiente manera:

- 1)- Control: ratones que fueron inoculados con células LM3 o LM05, sin tratamientos.
- 2)- Leuprorelina (LEU): ratones que fueron inoculados con células LM3 o LM05, inyectados subcutáneamente con Leuprorelina.
- 3)- Degarelix (DEGA): ratones que fueron inoculados con células LM3 o LM05, inyectados subcutáneamente con Degarelix.
- 4)- PP2: ratones que fueron inoculados con células LM3 o LM05, pretratadas con PP2.

- 5)- LEU+PP2: ratones que fueron inoculados con células LM05, pretratadas con PP2 e inyectados por vía subcutánea con Leuprorelina.
- 6)- DEGA+PP2: ratones que fueron inoculados con células LM3 o LM05, pretratadas con PP2 e inyectados por vía subcutánea con Degarelix.
- 7)- FAKi: ratones que fueron inoculados con células LM3 o LM05, pretratadas con FAKi.
- 8)- LEU+FAKi: ratones que fueron inoculados con células LM05, pretratadas con FAKi e inyectados por vía subcutánea con Leuprorelina.
- 9)- DEGA+FAKi: ratones que fueron inoculados con células LM3 o LM05, pretratadas con FAKi e inyectados por vía subcutánea con Degarelix.



**Figura 19. Esquema del tratamiento de animales para la inducción de crecimiento tumoral ortotópico (t= tiempo).**

### 3.3.6 Inmunohistoquímica

Luego del sacrificio de los ratones, se extirparon las glándulas mamarias normales y tumorales, los cuales fueron fijados en formol al 10% durante 24 h, y posteriormente deshidratados en soluciones de etanol, aclarados con xilol e incluidos en parafina. Los cortes histológicos, de 3-5  $\mu$ m de espesor, se realizaron con un microtomo Carl Zeiss HYRAX M 25 Rotary 56 en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de la Universidad Nacional de Cuyo (Mendoza). Los cortes fueron teñidos con H&E, y se procedió a realizar un análisis histopatológico de los tumores, definiendo su tipo, grado tumoral y el grado de necrosis que presentaban los tejidos.

Una vez que realizamos el análisis de los tumores, se cortaron secciones seriadas de 3-5  $\mu$ m, las cuales fueron montadas en portaobjetos, previamente recubiertos con 3-aminopropiltriethoxisilano (Sigma-Aldrich). Con el objetivo de desenmascarar los antígenos, se utilizó un protocolo de recuperación de antígenos con buffer citrato (0,01 M, pH 6) a 100°C durante 30 min. Posteriormente, se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena con azida sódica al 0,1% durante

30 min, seguido de un lavado con auto buffer durante 15 min, y bloqueo con leche de cabra al 10% por 1 h. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario *anti-Ki67* (ab15580, Abcam, USA, *marcador biológico de la proliferación celular*,) en una dilución de 1:500 en buffer de anticuerpo (0,02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15 M NaCl, 0,04 % azida sódico y 1% BSA, pH 7,6) durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se utilizó el sistema de biotina-estreptavidina-peroxidasa como método de detección, en una dilución de 1:400, y se empleó diaminobencidina como sustrato cromógeno. Finalmente, los cortes fueron ligeramente coloreados con hematoxilina para revelar los núcleos. Se capturaron imágenes con un microscopio Eclipse E400 (Nikon®) equipado con una cámara digital micrométrica SE Alta Calidad (Accu-Scope, Commak, NY 11725) bajo aumentos 100x y 60x.

### 3.3.6.1 Análisis de la histología tumoral

Para el análisis de inmunohistoquímica, se seleccionaron aleatoriamente cinco muestras de cada grupo de interés. En cada muestra, se evaluaron cinco campos de forma aleatoria, contando un mínimo de 500 células por tejido. La puntuación se realizó utilizando una escala de intensidad que considera la presencia de tinción en las células tumorales, siendo 0 para ausencia de tinción, 1 para tinción en menos del 10% de las células tumorales, 2 para tinción entre el 11% y el 33% de las células tumorales, 3 para tinción entre el 34% y el 65% de las células tumorales, y 4 para tinción en más del 66% de las células tumorales. Se graficó como porcentaje de células Ki-67+.

Es importante mencionar que el análisis fue realizado por dos observadores independientes, quienes desconocían el grupo experimental al que pertenecía cada muestra, con el fin de minimizar el sesgo en la interpretación de los resultados. En caso de haber puntuaciones contradictorias, se llegó a un consenso entre ambos observadores.

### 3.3.7 Análisis estadístico

Los valores se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar y se utilizó el programa GraphPad PRISM versión 5.03 (San Diego, CA, USA) para el análisis estadístico y la creación de gráficos. Para comparar los valores medios entre los diferentes grupos, se empleó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. La significancia estadística se definió como  $P < 0,05$ , y se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

Para el análisis estadístico de los datos de supervivencia, se utilizaron las pruebas de Kaplan-Meier y log-rank para estimar el tiempo de supervivencia tras los tratamientos, y para realizar comparaciones entre grupos experimentales. La prueba de Kaplan-Meier se utilizó para estimar la función de supervivencia, mientras que la prueba de log-rank se utilizó para comparar las curvas de supervivencia entre los diferentes grupos. La significancia estadística se definió como  $P < 0,05$  y se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

## **CAPÍTULO 4**

### **RESULTADOS**

#### **4.1 Primer objetivo específico**

##### **4.1.1 LH induce la remodelación actínica, a través de la rápida activación de la proteína reguladora de actina, N-WASP**

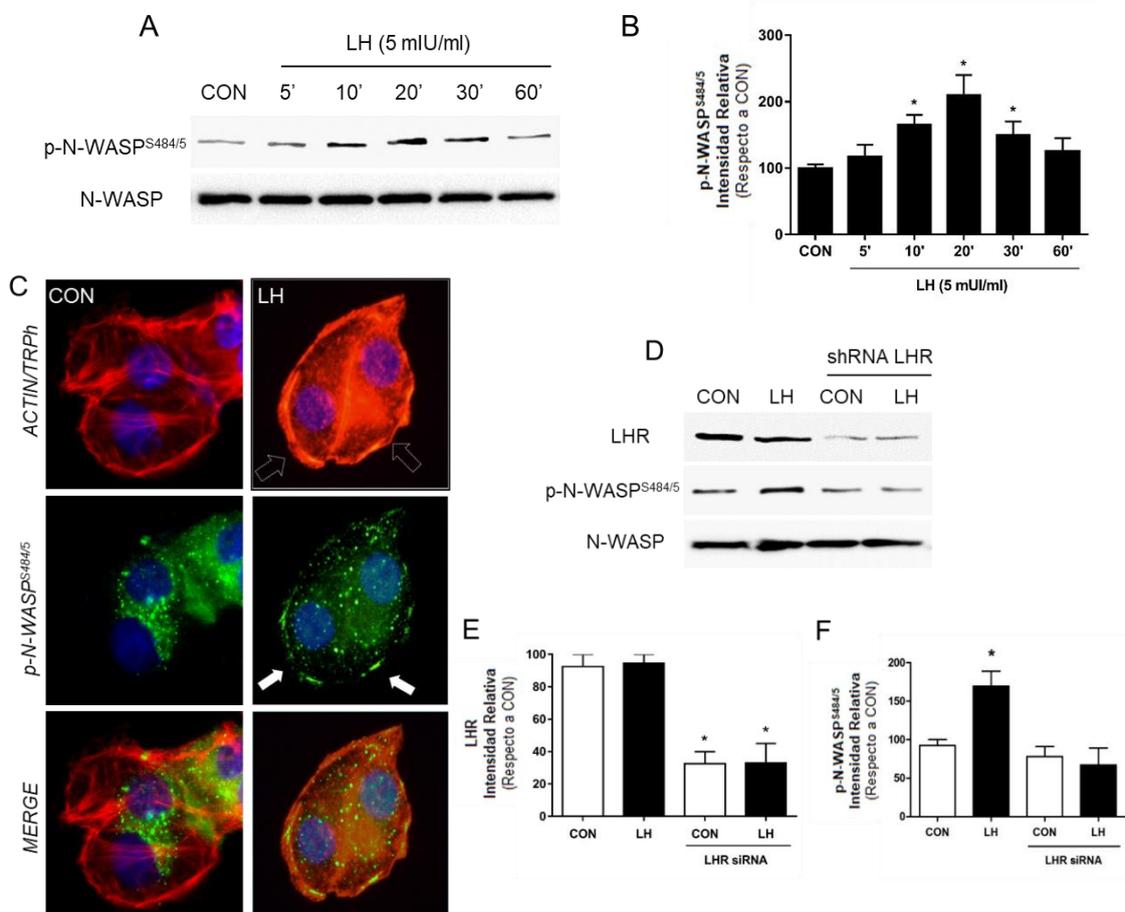
Desde hace varios años, nuestro grupo se encuentra abocado al estudio de los efectos extragonadales de las gonadotropinas, tanto la hormona luteinizante (LH) como la hormona folículo estimulante (FSH). En estudios previos hemos demostrado la expresión, especificidad y funcionalidad de los receptores de ambas hormonas, LHR y FSHR, en diversos subtipos de líneas celulares de cáncer de mama (CM), y cómo tales receptores desempeñan un papel crucial en la regulación de la motilidad e invasión celular a través del control del citoesqueleto de actina y los complejos de adhesión focal [82, 84].

Fundamentalmente, nos hemos concentrado en la acción de diversas proteínas claves que regulan de forma orquestada, precisa y secuencial, la reorganización del citoesqueleto. La misma consta de varias etapas que incluyen el *remodelamiento del citoesqueleto actínico*, *formación de complejos de adhesión focal*, y finalmente desencadenar el proceso llamado *ramificación o nucleación actínica*. Estos procesos son fundamentales para coordinar e impulsar la adhesión, migración e invasión celular, para finalmente promover la formación de metástasis en células de CM. Inicialmente, nos hemos focalizado en estudiar los *mecanismos de señalización, rápidos o no genómicos*, inducidos por LH/LHR a través de los cuales podría regular proteínas claves que impulsan la maquinaria motriz hacia los procesos adhesivos, migratorios e invasivos en células de CM.

Nuestro primer objetivo consta en profundizar el mecanismo de acción de LH sobre la fosforilación y consecuente activación de una de las principales proteínas que participan en la reorganización del citoesqueleto actínico, como N-WASP. N-WASP es una proteína esencial en la regulación de la nucleación actínica. La activación de la misma conduce a cambios en la morfología celular y, en consecuencia, estimula la migración e invasión celular [140]. En nuestros estudios previos hemos identificado la regulación específica de N-WASP, a través de su estado fosforilado en residuos específicos en Serina en la posición 484 y 485, tras el tratamiento con 17- $\beta$ -estradiol [99, 111], triyodotironina [135], y heregulina [167], incrementando significativamente la formación de protuberancias de membranas implicadas en la migración e invasión celular. Por este motivo, nuestro primer enfoque fue estudiar las acciones extragonadales de LH sobre la maquinaria motriz celular en células de CM. Para ello, células T-47D fueron tratadas con LH (5 mUL/ml) a diferentes periodos de tiempo (0-60 min), con el propósito de determinar los patrones de fosforilación/activación de N-WASP, respecto al tiempo. Mediante ensayos de Western blots,

observamos que LH promovió un rápido aumento en la fosforilación de N-WASP en Serina<sup>484/485</sup>, de manera transitoria y dependiente del tiempo. Este efecto se observó máximo tras 20 min de exposición con la hormona, y retorna a los niveles basales tras 60 min (*Figura 20 A-B*). Para evaluar el efecto de la hormona sobre la activación, y su redistribución celular de N-WASP, realizamos un ensayo de inmunofluorescencia (IF), donde las células T-47D fueron tratadas con LH durante 20 min. En dicha figura se puede observar como el tratamiento rápido con LH conlleva un cambio en la reorganización actínica, con un remodelamiento del citoesqueleto actínico hacia la periferia de la membrana, resultando un engrosamiento de la misma (*Figura 20 C*). Conjuntamente, visualizamos que LH induce la fosforilación/activación, y consecuente translocación de p-N-WASP<sup>S484/5</sup> hacia la periferia de la membrana plasmática.

Para determinar si el receptor de la hormona luteinizante (LHR) se encuentra involucrado en el control de N-WASP, silenciamos LHR con el uso de un específico Short hairpin ARN (shARN) versus LHR. Mediante ensayos de WB, pudimos determinar la expresión de LHR en las células T-47D. Por otra parte, observamos cómo el específico silenciamiento de LHR (shARN), reduce significativamente la expresión del LHR, junto a una notable reducción en los niveles de fosforilación de N-WASP (p-N-WASP<sup>S484/5</sup>), tras el tratamiento con LH (*Figura 20 D-F*), permitiendo determinar que LH/LHR se encuentran involucrados en la señalización hacia la activación de N-WASP.



**Figura 20. LH promueve a través de LHR la fosforilación de N-WASP.** **A)** Células T-47D fueron tratadas con LH (5 mUI/ml) a diferentes periodos de tiempo (0-60 min) con el fin de determinar el patrón de activación de p-N-WASP. Los niveles de expresión y fosforilación de N-WASP fueron analizados mediante Western blot. Los blots representativos demuestran un incremento en la fosforilación de N-WASP (Serina 484/85) a los 20 min tras el tratamiento con LH. **B)** El grafico corresponde a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de p-N-WASP<sup>S484/5</sup> fueron normalizadas con las bandas de N-WASP total. **C)** Las células de cáncer de mama T-47D fueron tratadas con LH (5 mUI/ml) durante 20 min con el propósito de determinar la fosforilación, activación y translocación de N-WASP hacia la periferia de la membrana plasmática. Las células fueron teñidas con p-N-WASP junto a isotiocianato de fluoresceína (FITC-verde), las fibras de actina con Faloidina conjugada con Texas Red (TRPh-rojo) y los núcleos celulares teñidos con DAPI (azul). Las flechas blancas indican p-N-WASP<sup>S484/5</sup> localizado en la periferia de la membrana celular. **D)** Células T-47D fueron transfectadas con Lipofectamina junto al específico Short hairpin ARN vs. LHR durante 90 min previo al tratamiento con LH (5 mUI/ml, 20 min), con el fin de determinar si LHR se encuentra involucrado en la señalización hacia N-WASP. El silenciamiento de LHR disminuyo la expresión del LHR junto con una reducción en los patrones de fosforilación de N-WASP (p-N-WASP<sup>S484/5</sup>) después del tratamiento con LH. Los niveles de fosforilación de N-WASP, y la expresión de LHR y N-WASP fueron determinados mediante Western blot. **E-F)** Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de LHR (E) fue normalizada con las bandas de actina, mientras que p-N-WASP (F) fue normalizada con las bandas de su respectivo total. *Análisis estadístico de western blot.* Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. Las barras representan la media ± DE. Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes.

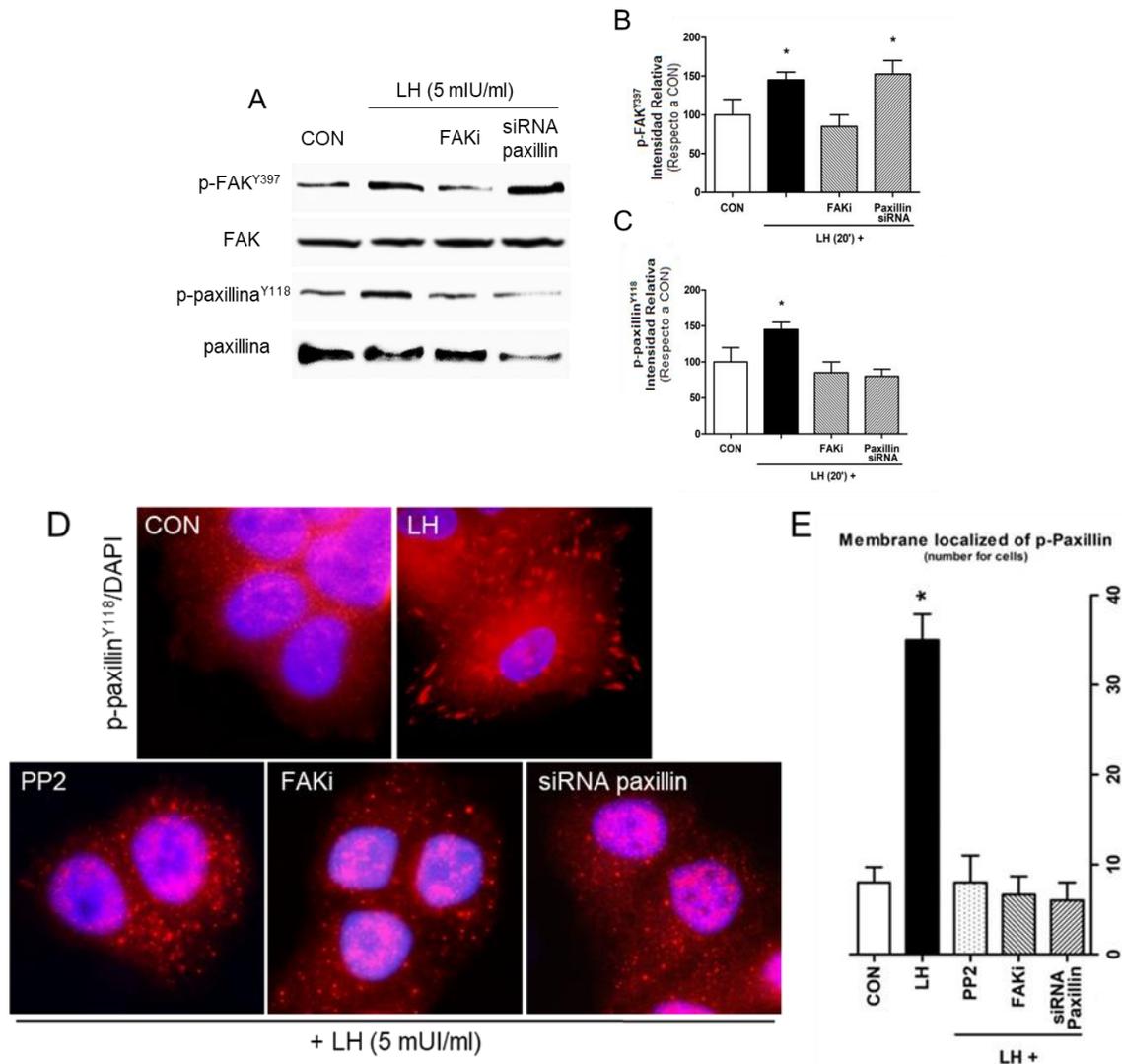
*Estos resultados sugieren que N-WASP podría estar actuando como un importante modulador en la reorganización del citoesqueleto actínico, a través de la hormona luteinizante y su receptor.*

#### 4.1.2 LH induce una reorganización dinámica del citoesqueleto de actina a través de Src/FAK/paxilina en células de cáncer de mama.

Con el propósito de ampliar la vía de señalización, desencadenada tras el efecto de LH hacia N-WASP, nos propusimos explorar el rápido mecanismo de fosforilación/activación de las presuntas proteínas involucradas en la regulación de los complejos de adhesión focal (AF) hacia el la nucleación actínica [102, 111]. Considerando nuestros antecedentes previos, en donde determinamos la formación de AF inducidas por las proteínas Src/FAK tras la estimulación con LH [82]; nos interesó evaluar el rol de paxilina. Paxilina es una proteína clave que sirve como plataforma para el reclutamiento de varias proteínas reguladoras y estructurales que modulan los cambios dinámicos en la adhesión celular, mediante el control en el ensamblaje y desensamblaje de las AF, así como la reorganización del citoesqueleto promoviendo de este modo la motilidad celular [113]. Por ello, hipotetizamos que paxilina podría ser reclutada por el complejo quinasa Src/FAK y, tras su fosforilación/activación, podría estar regulando la activación de N-WASP. Por lo tanto, nuestro próximo experimento fue determinar si Src/FAK regula la fosforilación/activación de paxilina tras el tratamiento con LH.

Por lo tanto, analizamos la expresión y fosforilación de FAK y paxilina en células de CM. Por ello, células T-47D fueron tratadas previamente con inhibidores específicos para la proteína FAK (FAKi; 1  $\mu$ M, 90 min); y transfecciones específicas con ARN de interferencia contra paxilina (siRNA vs.

paxilina) durante 24 hs; y determinamos los perfiles de fosforilación y expresión de las proteínas anteriormente descritas. Mediante ensayos de western blots observamos que tras el pulso rápido con la gonadotropina LH, durante 20 min, aumenta significativamente la fosforilación de p-FAK<sup>Y397</sup> y p-paxilina<sup>Y118</sup>, lo que determina una fosforilación/activación de FAK y paxilina dependiente de LH, y sugiere una posible participación de ambas hacia la activación de N-WASP (*Figura 21 A-C*). Además, determinamos que los niveles de fosforilación de p-FAK<sup>Y397</sup> y p-paxilina<sup>Y118</sup> disminuyeron significativamente tras la inhibición con FAKi, en respuesta a LH (*Figura 21 A-B*); mientras que el silenciamiento de paxilina indujo una disminución sólo en los niveles de fosforilación de paxilina, no afectando a FAK, demostrando que se encuentra corriente abajo de FAK quinasa (*Figura 21 A-C*). Mediante inmunofluorescencia evaluamos la localización subcelular de p-paxilina<sup>Y118</sup> en células T-47D. Observamos que tras el pulso de LH, paxilina aumenta los niveles de fosforilación/activación, y consecuente translocación de p-paxilina<sup>Y118</sup> hacia la periferia de la membrana, generando de este modo su rol hacia las adhesiones focales (*Figura 21 D-E*). Mediante IF visualizamos cómo el tratamiento con inhibidores específicos para Src (PP2; 10 µM), FAK (FAKi; 1 µM) y paxilina (siRNA paxilina) contrarrestaron estos eventos inducidos por LH.



**Figura 21. LH promueve la fosforilación de FAK y paxilina a través de LHR.** **A)** Células T-47D fueron tratadas con el inhibidor específico de FAKi (45 min) y el silenciamiento de paxilina con su específico siRNA (siRNA vs. paxilina), durante 24 hs previas al tratamiento con LH (5 mUI/ml, 20min). Los niveles de fosforilación de FAK<sup>Y397</sup> y paxilina<sup>Y118</sup> fueron analizados mediante ensayos de Western blot. Los blots representativos demuestran un incremento de la fosforilación de ambas proteínas, tras los tratamientos con LH. El inhibidor FAKi afectó la fosforilación de FAK<sup>Y397</sup> y paxilina<sup>Y118</sup> inducido por la hormona. En cambio, el silenciamiento de paxilina disminuyó sólo la fosforilación de paxilina<sup>Y118</sup>, pero no afectó a FAK<sup>Y397</sup>. La expresión de paxilina total se redujo significativamente en los tratamientos con su siRNA. **B-C)** El grafico corresponde a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas vs. el control, CON. **D)** Las células fueron tratadas con los inhibidores específicos PP2 (inhibidor de Src quinasa) y FAKi, durante 90 min previas al tratamiento con LH (5 mUI/ml, 20 min). Las células fueron teñidas con p-paxilina<sup>Y118</sup> con DyLight594 (rojo) y los núcleos celulares con DAPI (azul). Magnificación 60 X. **E)** Cuantificación de la intensidad p-paxilina<sup>Y118</sup> media en píxeles por área en las diferentes condiciones. Los resultados se expresan como porcentaje de la intensidad media de p-paxilina<sup>Y118</sup> ± SD en comparación con las células de control, CON. *Análisis estadístico de western blot.* Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn, considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. Las barras representan la media ± DE. Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes. *Análisis estadístico de IF:* Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON) utilizando el test ANOVA seguido del test de Bonferroni, considerando estadísticamente significativo \*P<0,05. (30-40 células, de 3 experimentos independientes fueron analizadas por condición).

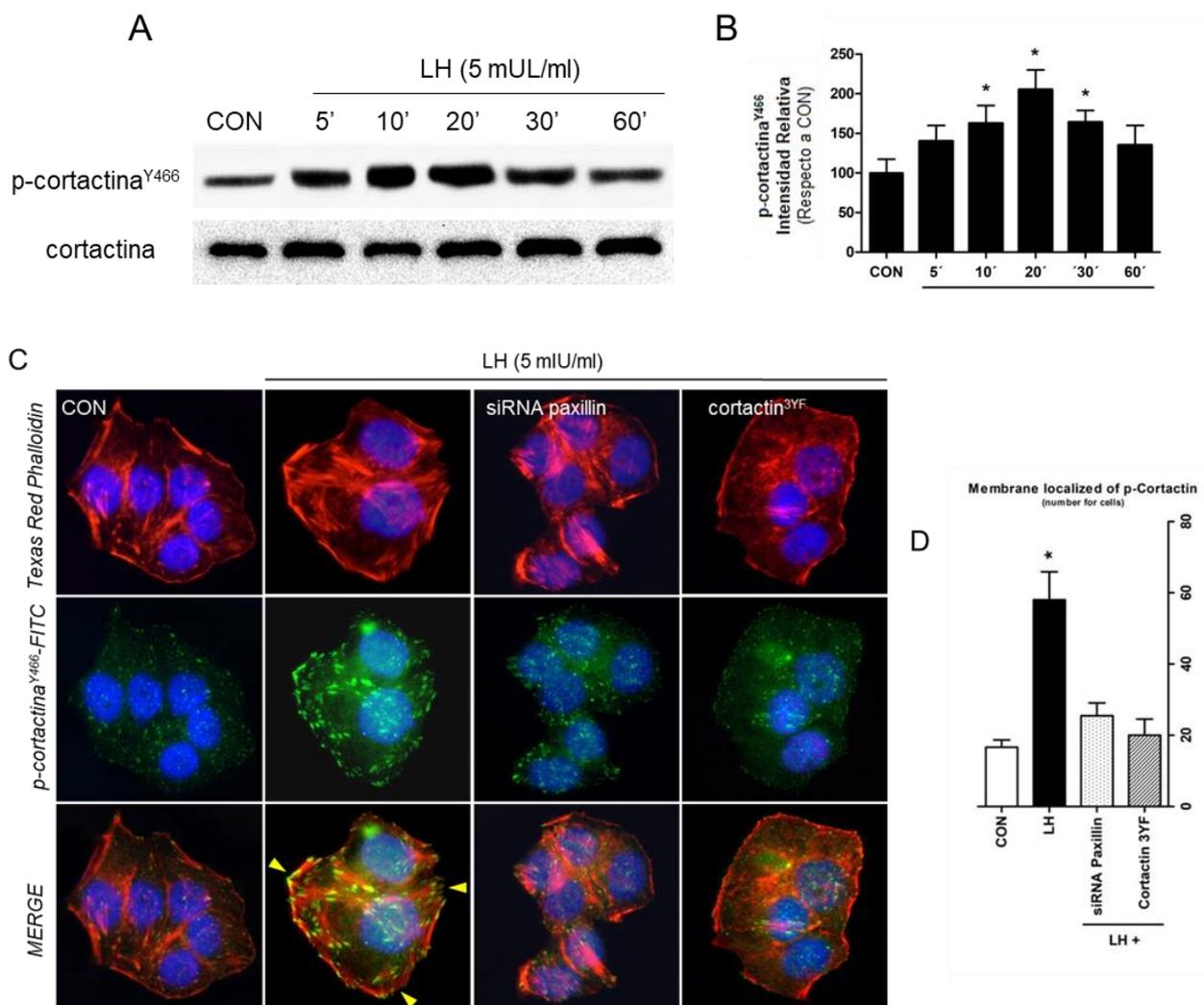
*Estos resultados sugieren la existencia de una vía de señalización que involucra a Src, FAK y paxilina en un mecanismo de acción regulado por LH en células de cáncer de mama.*

#### 4.1.3 Cortactina participa en la reorganización del citoesqueleto actínico, inducido por LH, a través de una vía dependiente de paxilina.

Varios investigadores han demostrado que cortactina es una proteína con múltiples dominios que le permite actuar como una proteína de andamio (scaffold), reclutando diferentes proteínas hacia el sitio de polimerización de la actina [125, 126], actuando como nexo entre la formación de complejos de adhesión focal y la nucleación actínica. Una característica distintiva de cortactina es su capacidad de unión a la actina y regular su dinámica a través de la activación del complejo Arp2/3, habilidad compartida y complementaria con la proteína N-WASP [137]. Estudios previos han reportado que la fosforilación de cortactina se encuentra regulada por una vía de señalización mediada por paxilina [135, 136, 167]. Por lo tanto, nuestro objetivo fue investigar la posible modulación de LH hacia cortactina, a través de una vía dependiente de paxilina, y si la misma participa en la reorganización del citoesqueleto, regulando los procesos migratorios e invasivos en el carcinoma mamario. Para ello, células T-47D fueron tratadas con LH (5 mUI/ml) a diferentes periodos de tiempos (0-60 min), con el fin de determinar los niveles de fosforilación/activación de cortactina, respecto al tiempo. Mediante ensayos tiempo dependencia, observamos que LH indujo un rápido aumento de la fosforilación de cortactina en los residuos específicos y claves para esta proteína en tirosina 466 tras 20 min de exposición con la gonadotropina, y luego dicho efecto retorna a los niveles basales tras los 60 min (*Figura 22 A-B*). Tanto N-WASP como cortactina

comparten un patrón similar de fosforilación/activación en el tiempo tras la exposición con LH (Figuras 20 A-B), por lo que sugerimos que ambas proteínas podrían estar involucradas en los procesos migratorios e invasivos modulados por la hormona luteinizante.

Para evaluar el posible rol de cortactina en la reorganización del citoesqueleto actínico mediada por LH, realizamos un ensayo de inmunofluorescencia para determinar su localización tras su activación. Para ello, tratamos células T-47D durante 20 min con LH, y observamos la fosforilación y redistribución de p-cortactina<sup>Y466</sup> hacia la periferia de la membrana plasmática (Figuras 22 C-D, flechas amarillas). Además, la transfección con un específico siRNA versus paxilina, y un constructo no fosforilable para cortactina (cortactina<sup>3YF</sup>) afectó la fosforilación y la consiguiente translocación de p-cortactin<sup>Y466</sup> inducida por LH (Figuras 22 C-D).



**Figura 22. LH regula a cortactina a través de una vía de señalización dependiente de paxilina. A)** Las células T-47D fueron tratadas con LH (5 mUI/ml) a diferentes periodos de tiempo (0-60 min) con el fin de determinar el patrón de activación de p-cortactina<sup>Y466</sup>. Los niveles de expresión y fosforilación de cortactina fueron analizados mediante Western blot. Los blots representativos demuestran un incremento en la fosforilación de cortactina (Tyr<sup>466</sup>) a los 20 min tras el tratamiento con LH. **B)** El grafico corresponde a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de p-cortactina<sup>Y466</sup> fueron normalizadas con las bandas de cortactina total. **C)** Las células T-47D fueron transfectadas con ARN de interferencia contra