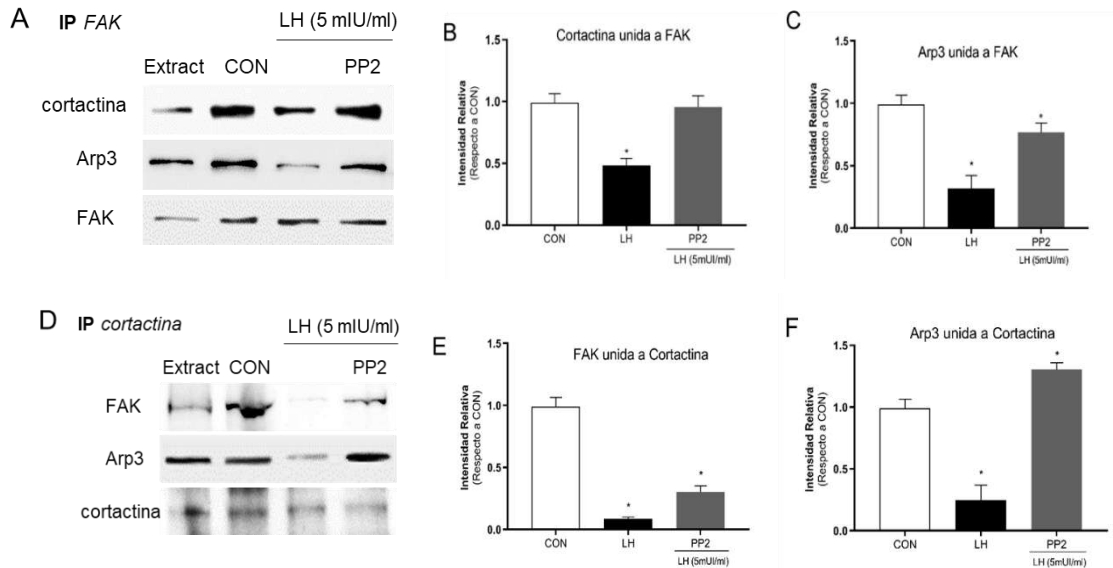


paxilina (siRNA paxilina), y con un constructo mutante vs. cortactina (constructo no fosforilable, Cortactina3YF) durante 24 hs previas al tratamiento con LH, con el propósito de determinar la fosforilación, activación y traslocación de cortactina hacia la periferia de la membrana plasmática. Las células fueron teñidas con p-cortactina<sup>Y466</sup> con isotiocianato de fluoresceína (FITC-verde), las fibras de actina con Faloidina conjugada con Texas Red (TRPh-Actina) y los núcleos celulares con DAPI (azules). Las flechas amarillas indican p-cortactina<sup>Y466</sup> localizado en la periferia de la membrana celular. **D)** Cuantificación de la intensidad p-cortactina<sup>Y466</sup> media en píxeles por área en las diferentes condiciones. Los resultados se expresan como porcentaje de la intensidad media de p-cortactina<sup>Y466</sup>  $\pm$  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  $\pm$  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. (10-20 células de 3 experimentos independientes fueron analizados por condición).

*Los resultados obtenidos sugieren que paxilina y cortactina son esenciales en la regulación del citoesqueleto, mediado por LH en células de CM.*

#### 4.1.4 LH disocia la interacción entre FAK, cortactina y la subunidad Arp3 al promover la fosforilación del complejo Arp2/3.

De acuerdo a trabajos previos, se ha demostrado que FAK y cortactina participan en la activación del complejo Arp2/3 mediante su interacción con la subunidad Arp3, a través del dominio FERM (FAK) y N-terminal (NtA, cortactina) [133, 141, 168, 169]. Dichas interacciones impulsan la polimerización de actina dependiente del complejo Arp2/3. Teniendo en cuenta esto, nuestro próximo objetivo fue evaluar la interacción directa entre FAK quinasa, cortactina y el complejo Arp2/3 (Arp3, subunidad predominante del complejo), a través de ensayos de inmunoprecipitación (IP). Para ello, células T-47D fueron tratadas con LH (5 mUI/ml, 20 minutos), en presencia y/o ausencia de un inhibidor específico de Src (PP2, 10  $\mu$ M). Usamos este inhibidor específico, ya que Src quinasa es una proteína precursora en la activación de FAK y cortactina. Mediante ensayos de IP y WBs, observamos que en condiciones basales (control) FAK presenta una marcada interacción con cortactina, y paralelamente, con la subunidad Arp3. Sin embargo, tras el tratamiento con LH, se redujo notablemente la interacción (disociación) de FAK con cortactina, y la subunidad Arp3 (*Figura 23 A*), mientras que estas interacciones se vieron afectadas por el uso del inhibidor PP2. Para corroborar nuestros resultados, realizamos nuevamente otro ensayo de IP, inmunoprecipitando cortactina y analizando su interacción con FAK y Arp3. En la *Figura 23 B*, observamos que LH redujo la interacción entre cortactina vs. FAK y la subunidad Arp3 en comparación con el control, pero el tratamiento con PP2 afectó parcialmente esta disociación, manteniendo la interacción entre cortactina, FAK y la subunidad Arp3 (*Figura 22 B*).



**Figura 23. LH regula la interacción entre FAK, cortactina y el complejo Arp2/3.** A-B) Células T-47D fueron tratadas con LH (5 mUI/ml) durante 20 min, en presencia y/o ausencia con el inhibidor específico de Src (PP2, 10  $\mu$ M) por 90min. Se utilizó en el primer carril un extracto total de T-47D como control positivo. Los extractos de proteína celular se inmunoprecipitaron con un anticuerpo frente a FAK (A) y cortactina (D). B-C) Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de FAK y Arp3 fueron normalizadas con las bandas de cortactina total. E-F) Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de FAK y Arp3 fueron normalizadas con las bandas de FAK total. Los homogenatos inmunoprecipitados con FAK y cortactina fueron analizados por western blot, y revelados contra FAK, cortactina y Arp3. A-B) El tratamiento con LH disocia la interacción directa entre FAK/cortactina y la subunidad Arp3. Estos efectos se vieron afectados parcialmente mediante el uso del inhibidor específico de Src quinasa, PP2.

*Estos resultados sugieren que FAK y cortactina interactúan, entre ambas, y con el complejo Arp2/3 (subunidad Arp3) en condiciones basales. Tras la estimulación con LH, el complejo FAK/Cortactina/Arp3 es disociado. Mediante el uso del inhibidor específico de Src quinasa, determinamos que SRC regula este mecanismo de asociación/disociación, posiblemente por su mecanismo de control hacia FAK y cortactina.*

Previamente se ha reportado que la fosforilación de ciertas proteínas, activadas por estímulos externos, pueden causar un impedimento estérico en la conformación de los complejos impidiendo las interacciones entre las proteínas [136, 145]. Una de esas proteínas incluye a FAK quinasa. La fosforilación, activación y cambio de conformación de FAK quinasa, tras la acción de LH, es inducida por cambios estructurales en su conformación, lo que conduce a desplegar sus sitios fosforilable y exponerlos para ser fosforilados, de manera específica en el residuo en Tyr397, a través de Src quinasa. Esta fosforilación en FAK, induce un cambio conformacional que permite a la proteína FAK su autofosforilación completa. Cuando FAK es totalmente fosforilada, impulsa su señalización hacia proteínas claves para finalmente impulsar la motilidad de la célula tumoral. Por lo tanto, para explicar esta disrupción parcial, nuestro próximo objetivo fue evaluar si el accionar de LH modula

los patrones de fosforilación de FAK (p-FAK<sup>Y397</sup>) y cortactina (p-cortactina<sup>Y466</sup>) a través de Src quinasa.

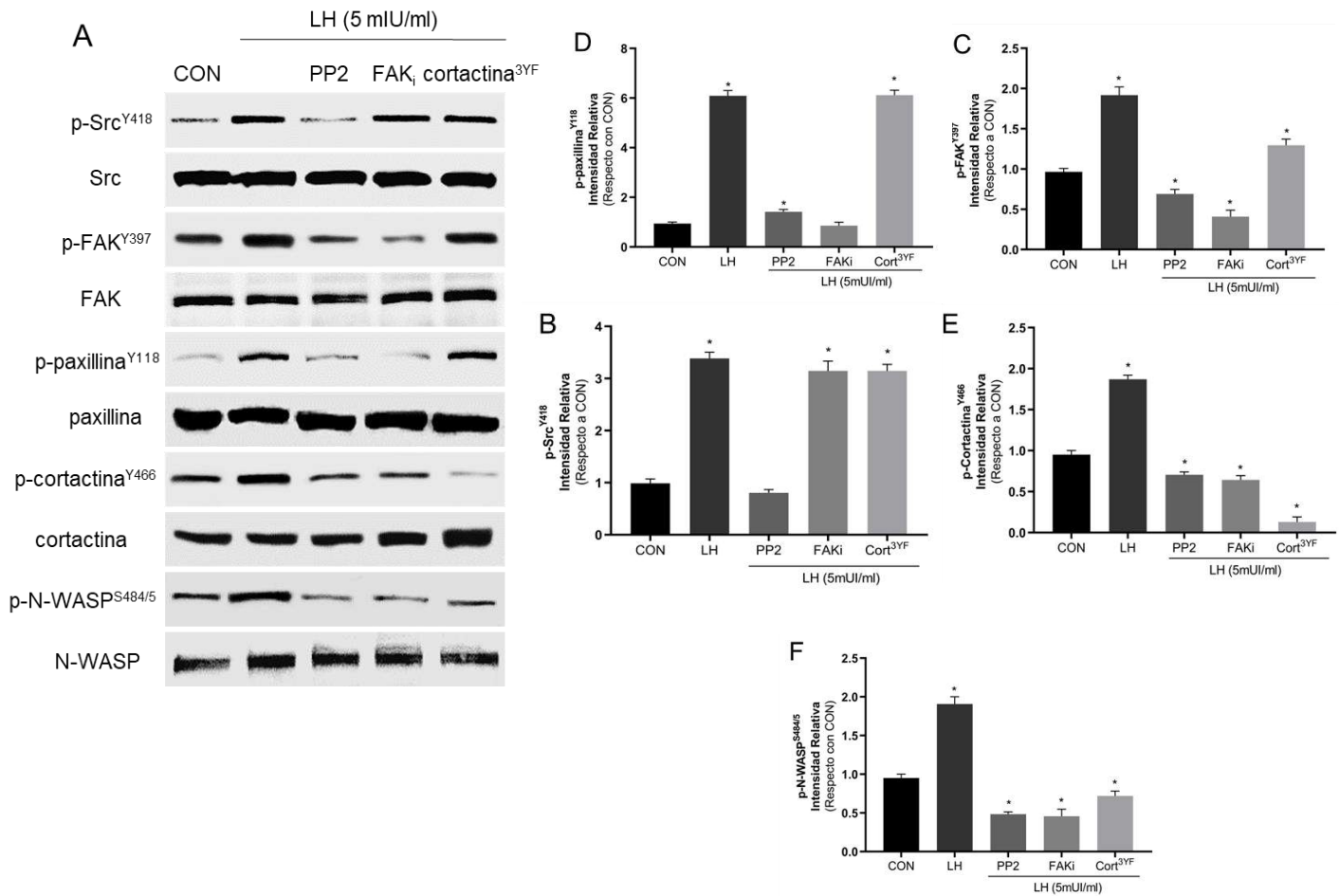
#### 4.1.5 LH controla el complejo Arp2/3 a través de la vía de señalización dependiente de Src/FAK/paxilina/cortactina y N-WASP.

El complejo Arp2/3 es fundamental para la rápida formación de la red actínica hacia la periferia de la membrana celular, que se requiere para construir estructuras celulares para la motilidad celular, como filopodios, ruffles y lamelipodios. Recientemente, se ha reportado que las subunidades principales del complejo Arp2/3, subunidad Arp2 y subunidad Arp3 son blanco de modificaciones postraduccionales, necesarias para regular la nucleación actínica [142, 152]. Estas modificaciones incluyen la fosforilación y ubiquitinación, y se ha demostrado que regulan la actividad del complejo Arp2/3. Además, se ha encontrado que ciertas proteínas, como WAVE1 (perteneciente a la familia de N-WASP), regulan la nucleación actínica a través de su interacción con el complejo Arp2/3 [145]. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la regulación de la nucleación actínica es un proceso altamente complejo y dinámico que implica la participación de múltiples proteínas y mecanismos de modificación postraduccionales.

Por lo tanto, nos propusimos evaluar el papel de varias quinasas y proteínas de andamios involucradas en la señalización del complejo Arp2/3. Mediante ensayos de western blot, se observó que los tratamientos rápidos con LH incrementaron los niveles de fosforilación de p-Src<sup>Y419</sup>, p-FAK<sup>Y397</sup>, p-paxilina<sup>Y118</sup>, p-cortactina<sup>Y466</sup> y p-N-WASP<sup>S484/5</sup>, y estos incrementos se redujeron significativamente mediante el uso de PP2, demostrando una regulación dependiente de Src quinasa. Además, mediante el uso de FAKi se observó una notable disminución en los niveles de fosforilación de p-FAK<sup>Y397</sup>, p-paxilina<sup>Y118</sup>, p-cortactina<sup>Y466</sup> y p-N-WASP<sup>S484/5</sup>, pero no afectó la fosforilación de p-Src<sup>Y416</sup>, demostrando que FAK se encuentra corriente debajo de Src. La transfección del constructo no fosforilable de cortactina (Cortactina3YF) impidió la fosforilación tanto de p-cortactina<sup>Y466</sup> como de p-N-WASP<sup>S484/5</sup>, pero no afectó la actividad de Src, FAK ni la de paxilina (*Figura 24 A*).

Teniendo en cuenta nuestros resultados, es importante destacar el rol de LH hacia el preciso mecanismo de control regulado por cortactina y N-WASP hacia al complejo Arp2/3. Por lo tanto, nos propusimos evaluar el paso final de la vía de señalización hacia la formación de la ramificación actínica, modulada por LH, a través el estudio de los niveles de fosforilación de N-WASP y de la subunidad Arp2. Mediante ensayos de WB, determinamos que LH aumentó significativamente los niveles de fosforilación de p-N-WASP<sup>S484/5</sup> y la subunidad p-Arp2<sup>T237</sup>, respecto a las células control. Este incremento fue notablemente reducido cuando las células fueron transfectadas con la mutante de cortactina<sup>3YF</sup>, y el inhibidor específico para N-WASP (Wiskostatin), indicando que las

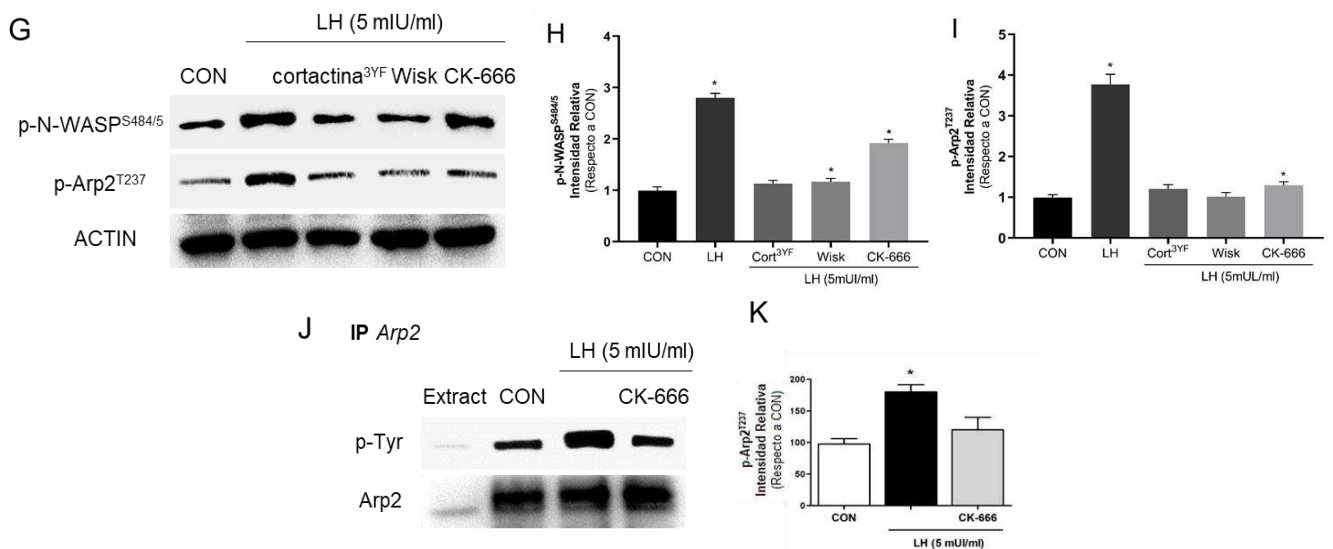
fosforilaciones específicas de cortactina y N-WASP, resultan ser esenciales para promover la fosforilación y activación del complejo Arp2/3 (Figura 24 G-H).



**Figura 24. LH promueve la fosforilación de Src/FAK/paxilina/cortactina/N-WASP y el complejo Arp2/3.** A-F Las células de cáncer de mama fueron tratadas con los inhibidores específicos PP2 (10 $\mu$ M), FAKi (1 $\mu$ M) y la transfección con el mutante Cortactina<sup>3YF</sup>, previas al tratamiento con LH (5 mIU/ml, 20min). Los niveles de fosforilación de Src<sup>Y418</sup>, FAK<sup>Y397</sup>, paxilina<sup>Y118</sup>, cortactina<sup>Y466</sup> y N-WASP<sup>S484/5</sup> fueron analizados por Western blot. Los blots representativos demuestran un incremento de las fosforilaciones de las 5 proteínas tras los tratamientos con LH. El inhibidor de Src disminuyó las fosforilaciones de dichas proteínas. FAKi afectó las fosforilaciones de FAK<sup>Y397</sup>, paxilina<sup>Y118</sup>, cortactina<sup>Y466</sup> y N-WASP<sup>S484/5</sup> pero no afectó la fosforilación de Src inducido por la hormona. La transfección con el mutante de cortactina (Cortactina<sup>3YF</sup>) disminuyó la fosforilación de cortactina<sup>Y466</sup> junto a la de N-WASP<sup>S484/5</sup>. La expresión de cortactina total se incrementó luego de expresar el mutante Cortactina<sup>3YF</sup>. B-F) Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas vs. el control, CON.

Además, en este estudio, nos propusimos investigar detalladamente el rol específico del complejo Arp2/3, responsable de la ramificación actínica, en células tumorales de mama T-47D. Para lograrlo, se empleó CK-666, un inhibidor específico diseñado para bloquear la actividad del complejo Arp2/3. Dado que el complejo Arp2/3 es esencial para la formación de estructuras que promueven la nucleación de nuevos filamentos de actina, la utilización de CK-666 nos brindó una herramienta sumamente útil para explorar su actividad y especificidad en la formación de estas estructuras.

Como se puede observar, los tratamientos con CK-666 afectaron la fosforilación específica de Arp2 (p-Arp<sup>T237</sup>), disminuyendo significativamente la formación actínica tras la administración con LH (Figura 24 G-I). Además, en concordancia con investigaciones previas que indican que ciertos residuos de tirosina pueden regular la actividad de Arp2 mediante fosforilaciones específicas, es por ello, que nos propusimos evaluar las mismas para confirmar nuestros resultados anteriores. Mediante un ensayo de inmunoprecipitación, se demostró que la subunidad Arp2 experimenta un incremento en los niveles de fosforilación en sus residuos de tirosina tras el tratamiento con LH. Sin embargo, este efecto fue abolido mediante el uso CK-666 (Figuras 24 J-K). Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la inhibición del complejo Arp2/3 mediante CK-666 repercute directamente en la formación actínica en respuesta al estímulo de LH.



**Figura 24. LH promueve la fosforilación de Src/FAK/paxilina/cortactina/N-WASP y el complejo Arp2/3.** **G)** Las células fueron transfectadas con el mutante de cortactina (cortactina<sup>3YF</sup>) e inhibida con los inhibidores específicos de N-WASP (Wikostantin, 10μM) y del complejo Arp2/3 (CK-666, 4μM) por 45-60 min, previas al tratamiento con LH. Los niveles de fosforilación de N-WASP<sup>S484/5</sup> y Arp2<sup>T237</sup> fueron analizados por Western blot. Los blots representativos demuestran un incremento de las fosforilaciones de las 2 proteínas tras el tratamiento con LH. La transfección con el mutante Cortactina<sup>3YF</sup> y la inhibición con Wikostantin disminuyeron las fosforilaciones de N-WASP<sup>S484/5</sup> y Arp2<sup>T237</sup>. CK-666 afecto la fosforilación de Arp2<sup>T237</sup>, pero no disminuyo la fosforilación de N-WASP inducido por LH. **H-I)** Los gráficos corresponde a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas vs. el control, CON. **J-K)** Células T-47D fueron tratadas con LH (5 mUI/ml) durante 20 min en presencia y/o ausencia con el inhibidor específico del complejo Arp2/3 (CK-666, 4μM) por 60 min. Los extractos de proteína celular se inmunoprecipitaron con un anticuerpo versus Arp2. Los homogenatos inmunoprecipitados con Arp2 fueron analizados por western blot, y revelados contra fosfo-tirosina (p-Tyr) y la subunidad Arp2. **J)** Tras el tratamiento con LH ocasiono un incrementó en la fosforilación en el residuo de tirosina de la subunidad Arp2. Este efecto se vio disminuido por el uso de CK-666. **K)** El grafico corresponde a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. La banda de p-Tyr fue normalizada con la banda de Arp2 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 ± SD. Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes.

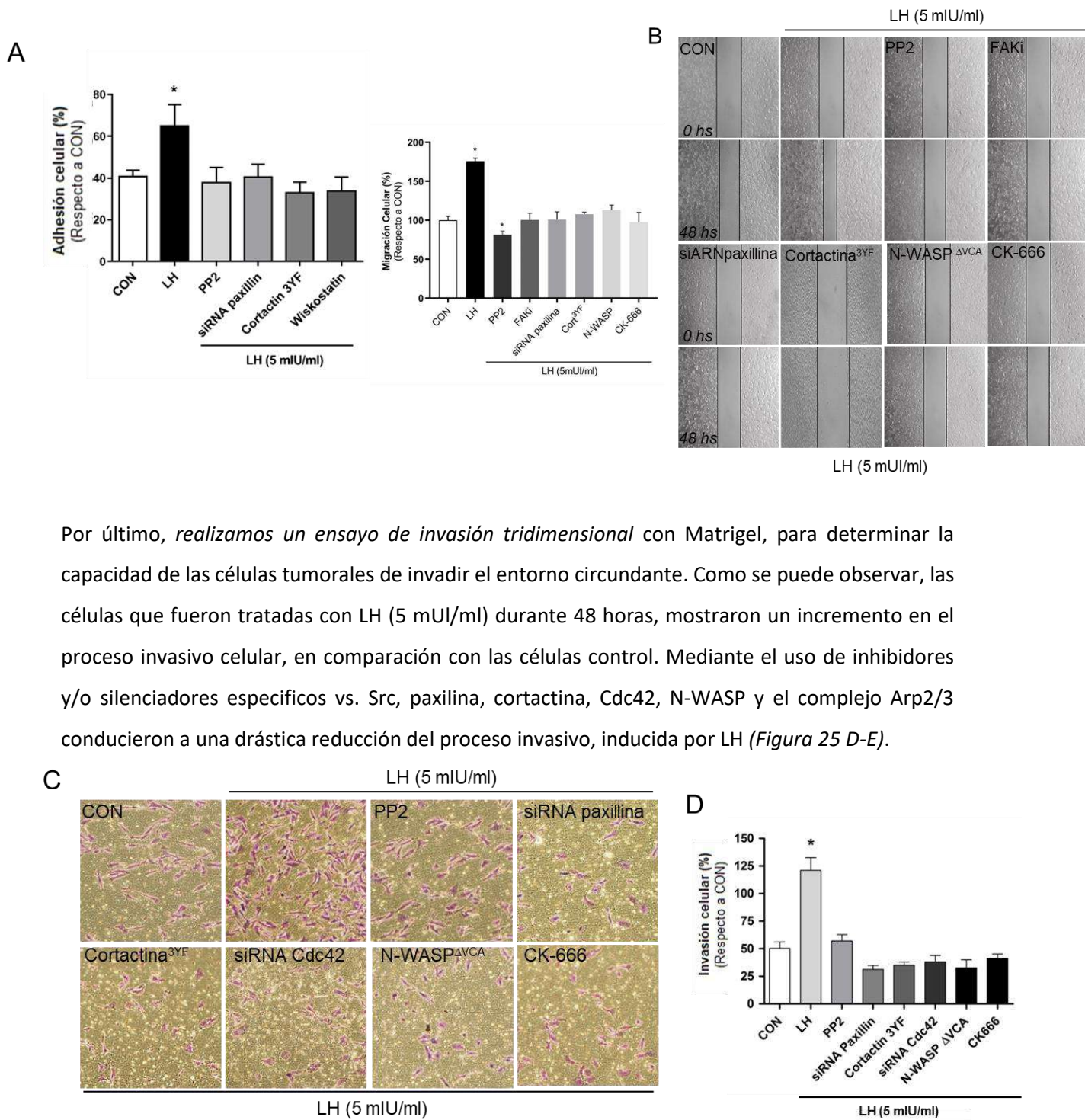
*Nuestros resultados nos permiten sugerir la existencia de una vía de señalización dependiente de Src, FAK, paxilina, cortactina, N-WASP y el complejo Arp2/3, desencadenada tras el pulso de LH en células de CM.*

#### 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.

Los peores pronósticos del cáncer de mama están íntimamente ligados a la capacidad de las células tumorales para invadir y hacer metástasis en sitios distantes. Este proceso ocurre a través de una serie de pasos específicos que alteran las propiedades de adhesión, migración e invasión de las células tumorales, lo que finalmente desencadena a la diseminación metastásica [170].

De acuerdo con nuestros resultados expuestos previamente, resulta fundamental evaluar el efecto de LH en los procesos que involucran la motilidad de las células tumorales de mama, mediante ensayos de adhesión, migración e invasión celular. En nuestro *ensayo de adhesión celular*, observamos que tras el tratamiento con LH (5 mUI/ml, 24 horas) aumentó notablemente la capacidad de las células T-47D para adherirse a una matriz de gelatina, en comparación con las células control. Sin embargo, esta capacidad de adhesión celular disminuyó significativamente cuando las células fueron expuestas a diversos inhibidores y/o silenciadores específicos como, PP2 (Src), siRNA vs. paxilina, plásmido mutante de cortactina<sup>3YF</sup> (cortactina), y Wiskostantin (N-WASP), en comparación con las células expuestas solo al tratamiento con LH (*Figura 25 A*).

*Para evaluar la migración celular*, realizamos un ensayo de cicatrización de heridas con células de cáncer de mama humanas. Nuestros resultados demuestran que tras 48 hs de tratamiento con LH, el proceso migratorio aumentó significativamente en células de CM, en comparación con las células de control (*Figura 24 B*). Mediante el uso de inhibidoras y/o silenciadores específicos de Src (PP2), FAK (FAKi), paxilina (siARN paxilina), cortactina (Cortactina<sup>3YF</sup>), N-WASP (N-WASP<sup>ΔVCA</sup>) y complejo Arp2/3 (CK-666) no se observó una reducción en el cierre de la herida, demostrando que la inhibición/silenciamiento de nuestra vía de señalización propuesta afecta el perfil migratorio celular, demostrando la participación de estas proteínas en la migración celular inducida por LH (*Figura 25 B-C*).



Por último, realizamos un ensayo de invasión tridimensional con Matrigel, para determinar la capacidad de las células tumorales de invadir el entorno circundante. Como se puede observar, las células que fueron tratadas con LH (5 mUI/ml) durante 48 horas, mostraron un incremento en el proceso invasivo celular, en comparación con las células control. Mediante el uso de inhibidores y/o silenciadores específicos vs. Src, paxilina, cortactina, Cdc42, N-WASP y el complejo Arp2/3 condujeron a una drástica reducción del proceso invasivo, inducida por LH (Figura 25 D-E).

**Figura 25. Efecto de LH sobre la adhesión, migración e invasión en células de carcinoma mamario.** A) Células T-47D fueron tratadas con los inhibidores específicos vs. PP2 (10µM), Wiskostantin (10µM), y la transfección con siRNA vs. paxilina y con el mutante de cortactina (Cortactina<sup>3YF</sup>), durante 48hs previas al tratamiento con LH (5 mUI/ml). Luego del tratamiento, se colocaron 1x10<sup>5</sup> células/pocillo (previamente cubierto con gelatina), y se incubaron por 60 min a 37°C. Las células adheridas fueron fijadas/teñidas con 10% etanol/cristal violeta durante 20min. Me midió el porcentaje de absorbancia a 570nm, luego de la tinción de las células adheridas con cristal violeta. Los datos graficados corresponden a 3 experimentos independientes, en los que cada condición se ensayó por sextuplicado, y se determinó el porcentaje de células adheridas. \*P <0.05 vs. CON, Control. B) Células de cáncer de mama fueron cultivadas en placas de 6 pocillos hasta que formaron una monocapa, donde fueron tratadas con hidrocloreuro de citosina b-D-arabinofuranósido (ARA-C, 10 µM), junto con LH (5mUI/ml) durante 48hs, en presencia y ausencia de los inhibidores específicos, PP2 (10µM), FAKi (1µM) y CK-666 (4µM), y la transfección con los mutante de cortactina (cortantina<sup>3YF</sup>), N-WASP (N-WASP<sup>ΔVCA</sup>), y con ARN de interferencia contra paxilina (siRNA vs. paxilina). Se realizó una herida a cada pocillo. En la

imagen se muestra la distancia de migración en el tiempo 0hs y 48hs. Los datos graficados corresponden a 3 experimentos independientes, en los que cada condición fue ensayada por sextuplicado. Células control fueron el 100% de migración celular. \* $P < 0.05$  vs. CON, Control. **C-D**) Las células fueron sembradas  $2,5 \times 10^4$  células/pocillo en una cámara de invasión Matrigel, y se trataron con ARA-C (10 mM) para detener la proliferación celular y poder diferenciar la misma del proceso migratorio. Luego, células T-47D fueron tratadas durante 24 hs con LH (5 mUI/ml), y tras la inhibición específica con PP2 (10 $\mu$ M), CK-666 (4 $\mu$ M), y la transfección con ARN de interferencia contra paxilina (siRNA paxilina), Cdc42 (siRNA Cdc42), mutantes de cortactina (cortactina<sup>3YF</sup>), y N-WASP (N-WASP <sup>$\Delta$ VCA</sup>) se midió el perfil invasivo celular. Las células invasoras se fotografiaron con un aumento de 100X, y se contaron en el campo central de las membranas por triplicados mediante el ensayo de cámara de Boyden, y los valores se expusieron como % del control. **C**) Se muestran imágenes representativas en las diferentes condiciones. **D**) Indica el número de células invasoras  $\pm$  SD de tres experimentos separados. \*  $P < 0.05$  vs CON, control.

Es importante destacar que estos resultados demuestran la participación de diversas proteínas fundamentales en los procesos que conllevan a la migración, invasión, y finalmente metástasis celular. Estos eventos inducidos por la gonadotropina LH resaltan la importancia de continuar explorando el rol de LH hacia la regulación de estas proteínas en la progresión del cáncer de mama.

*Como resultado obtuvimos que LH promueve la adhesión, migración e invasión celular en células T-47D. Tras el uso de diferentes inhibidores y/o silenciadores específicos, se observa una disminución en tales procesos, dependientes de las proteínas Src/FAK/paxilina/cortactina-N-WASP/complejo Arp 2/3.*

**4.1.7 Vía de señalización impulsada por LH y su impacto en la motilidad celular.** Representación esquemática de la vía de señalización desencadenada por LH y su accionar en la promoción de la adhesión, migración e invasión en células de cáncer de mama. En condiciones basales, las células control presentan una interacción directa entre FAK, cortactina, y la subunidad Arp3. Sin embargo, cuando LH se une a LHR, se interrumpe la interacción FAK/cortactina/Arp3 debido a la fosforilación, activación y cambio conformacional de FAK quinasa. La activación de FAK desencadena cambios estructurales, desplegando la conformación de la proteína y exponiendo sus sitios de fosforilación para promover su fosforilación específica en el residuo Tyr397, a través de Src quinasa. Este evento conduce a un cambio conformacional en la proteína FAK, lo que permite su autofosforilación en los residuos Tyr576/577 para su completa activación. Una vez que FAK ha sido totalmente fosforilada, impulsa su señalización hacia paxilina. Paxilina fosforilada interactúa con cortactina y N-WASP y mediante estas, modula el complejo Arp2/3. Estas interacciones potencian la nucleación actínica y promueve la motilidad de las células tumorales. Este esquema ilustrativo representa cómo la cascada impulsada por LH conlleva al incremento en la motilidad celular en células de CM.



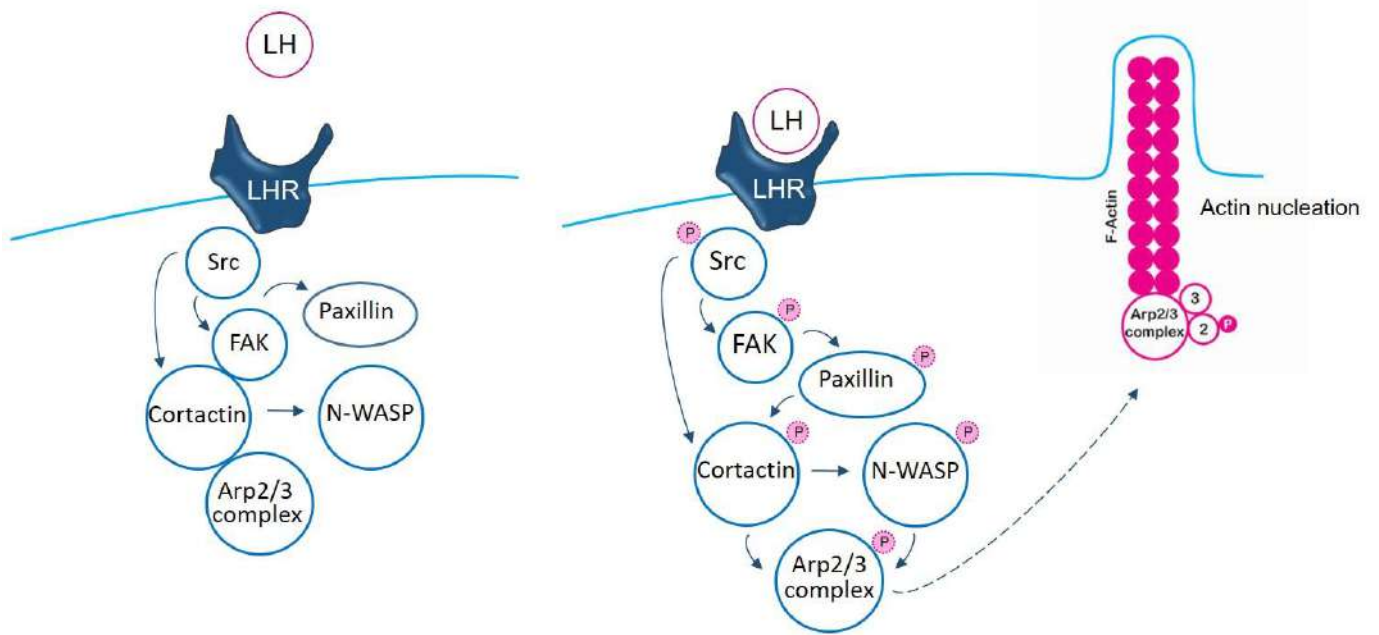


Figura 26. Esquema de la vía de señalización desencadenada por LH.

## **4.2 Segundo objetivo específico**

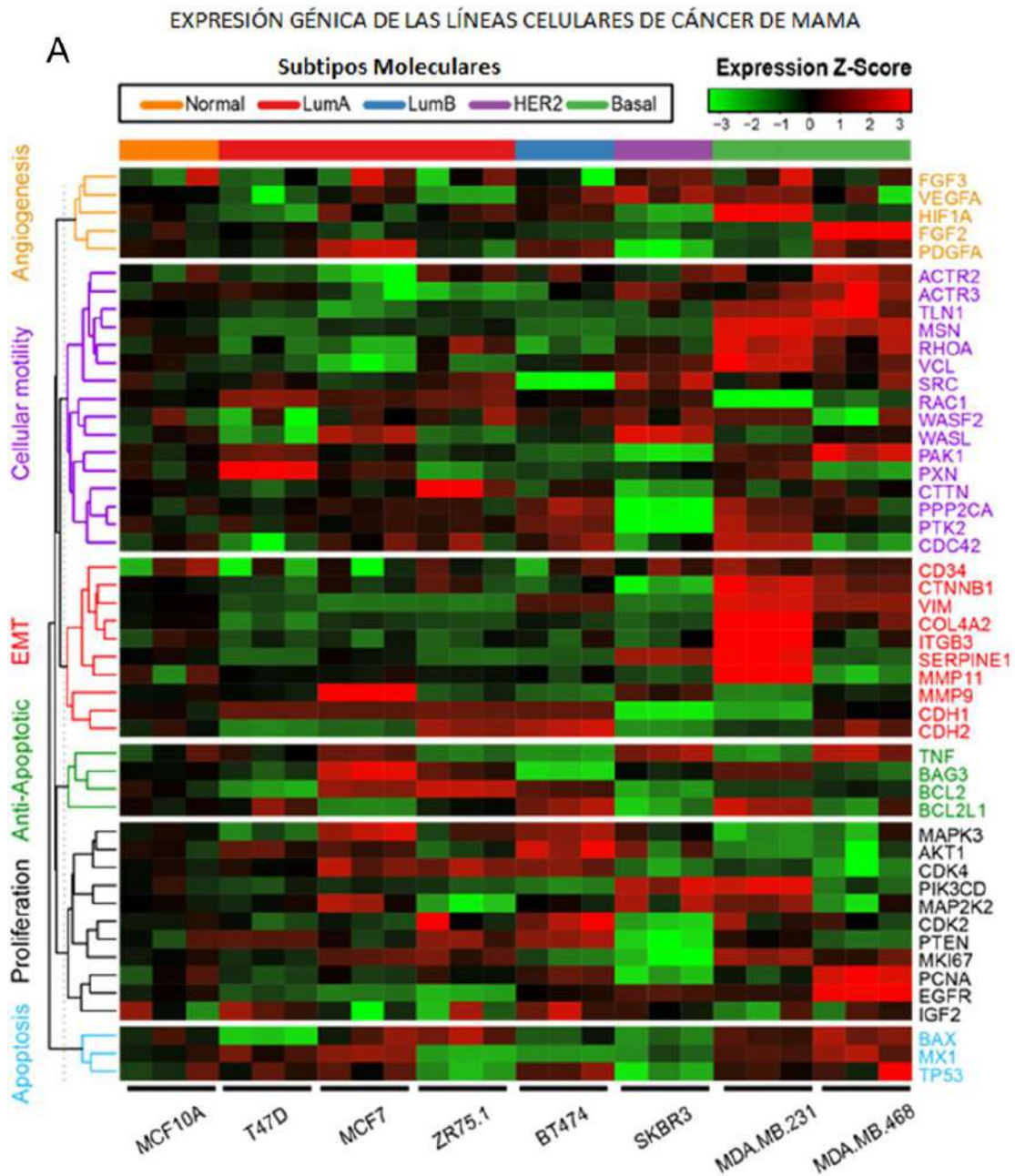
### **4.2.1 Análisis transcriptómico de diferentes subtipos de cáncer de mama**

Se han llevado a cabo varios estudios comparativos e integrativos de perfiles de expresión génica y alteraciones genómicas en tumores primarios de mama y líneas celulares de CM. Estos estudios han demostrado que la heterogeneidad presente en los cánceres de mama primarios se refleja hasta cierto punto en el panel de líneas celulares de CM. Dada la creciente comprensión de la diversidad y complejidad de los subtipos de carcinomas mamarios, resulta crucial contar con herramientas genómicas que nos permitan explorar las posibles variaciones en la expresión génica a nivel genómico en las líneas celulares con diversos subtipos de CM y en los tumores mamarios. En este sentido, una estrategia inicial ha sido identificar firmas de expresión génica que reflejen el estado de expresión y/o activación de diversas vías oncogénicas que promueven la tumorigenesis en los subtipos moleculares de CM.

En este estudio, nos interesó evaluar la expresión génica de diversas proteínas de interés que participan en la progresión tumoral en diversos subtipos moleculares de cáncer de mama. Es por ello que, realizamos un análisis transcriptómico utilizando dos conjuntos de datos disponibles públicamente en la base de datos Gene Expression Omnibus (GSE70884 y GSE68651), con el fin de determinar la expresión basal de 50 genes que se encuentran involucrados en procesos celulares relacionados con el desarrollo y la progresión tumoral en los diferentes subtipos moleculares de CM. Estos genes se seleccionaron por ser biomarcadores de procesos celulares implicados en la progresión tumoral como proliferación, matriz extracelular (MEC), transición epitelial-mesénquima (TEM), apoptosis, anti-apoptótico, motilidad celular y angiogénesis (*Tabla 5*). Al analizar los datos, observamos que cada línea celular presentaba un perfil de expresión característico que las diferenciaba de las demás. Las líneas celulares luminales A y B presentaron un patrón heterogéneo en los diferentes procesos celulares. En las células SK-BR3 se observaron los niveles de transcripción más bajos en la mayoría de los procesos celulares estudiados, excepto en los genes relacionados con la motilidad celular donde observamos una mayor variabilidad. Por otro lado, observamos que las células de tipo basal mostraban los niveles más altos de transcritos en la mayoría de los procesos que promueven la progresión tumoral, a excepción de algunos genes relacionados con la proliferación celular (*Figura 27 A*).

<b>GENES</b>	<b>NOMBRE DEL GEN</b>
<b>FGF3</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos 3
<b>VEGFA</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular A
<b>HIF1A</b>	Factor inducible por hipoxia 1-alfa
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos 1
<b>PDGF</b>	Subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>ACTR3</b>	Proteína relacionada con actina 3
<b>ACTR2</b>	Proteína relacionada con actina 2
<b>TLN1</b>	Talina-1
<b>MSN</b>	Moesin
<b>RHOA</b>	Ras miembro de la familia homólogo A (RhoA)
<b>VCL</b>	Vinculina
<b>SRC</b>	Proto-oncogén tirosina
<b>RAC1</b>	Sustrato de toxina botulínica C3 relacionada con Ras 1
<b>WASF2</b>	Miembro de la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich 2
<b>WASL</b>	Proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich neural
<b>PAK1</b>	Serina/treonina-proteína quinasa PAK 1
<b>PXN</b>	Paxillina
<b>CTTN</b>	Proteína de unión a actina cortical (Cortactina)
<b>PPP2CA</b>	Proteína Fosfatasa Subunidad Catalítica Alfa 2
<b>PTK2</b>	Kinasa de adhesión focal (FAK)
<b>CDC42</b>	Homólogo de la proteína 42 de control de la división celular
<b>CD34</b>	Antígeno de células progenitoras hematopoyéticas CD34
<b>CTNNA1</b>	Catenina beta-1
<b>VIM</b>	Vimentina
<b>COL4A2</b>	Cadena de colágeno alfa-2 (IV)
<b>ITGB3</b>	Subunidad de integrina beta 3
<b>SERPINE1</b>	Plasminógeno endotelial activador-1
<b>MMP11</b>	Matriz Metaloproteínasa-11
<b>MMP9</b>	Matriz Metaloproteínasa-9
<b>CDH2</b>	cadherina neural
<b>CDH1</b>	Cadherina-1
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumora
<b>BAG3</b>	Regulador de chaperonas moleculares de la familia BAG 3
<b>BCL-2</b>	Regulador de apoptosis Bcl-2
<b>BCL2L1</b>	Proteína Bcl-2 1
<b>MAPK3</b>	MAP quinasa 3
<b>AKT1</b>	RAC-alfa serina/treonina-proteína quinasa
<b>CDK4</b>	Quinasa dependiente de kinasa 4
<b>PIK3CD</b>	Fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)
<b>MAP2K2</b>	Proteína quinasa-quinasa activada por mitógenos
<b>CDK2</b>	Quinasa dependiente de ciclina 2
<b>PTEN</b>	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatas
<b>MIK67</b>	Antígeno ki-67
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de células en proliferación
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>IGF-2</b>	Factor de crecimiento insulínico 2
<b>BAX</b>	Regulador de apoptosis BAX
<b>MX1</b>	Proteína de unión a GTP inducida por interferón Mx1
<b>TP53 o p53</b>	Antígeno tumoral celular p53

**Tabla 5. Genes involucrados en procesos celulares relacionados con la progresión tumoral.** Estos genes se seleccionaron por ser biomarcadores de procesos celulares implicados en la progresión tumoral como proliferación celular (negro), matriz extracelular (MEC) (rojo), transición epitelial-mesénquima (TEM) (rojo), apoptosis (celestes), Anti-apoptótico (verde), motilidad celular (violeta) y angiogénesis (anaranjado).



**Figura 27. Expresión de genes implicados en el proceso de metástasis en un panel de células de cáncer de mama.** A) Mapa de calor que muestra el perfil de expresión génica de 50 genes implicados en 6 procesos relacionados con la progresión del cáncer. Dentro de cada proceso celular, los genes se ordenaron según un algoritmo de agrupación jerárquica, con ligamiento promedio y distancia de correlación de Pearson, como se puede ver en los dendogramas de silueta a la izquierda. Estos datos se obtuvieron de ocho líneas celulares de cáncer de mama, representativas de cada subtipo molecular, como se muestra en la parte superior del gráfico. Los patrones de expresión de estos genes se representaron en una escala verde-roja (niveles de expresión bajos en verde y niveles de expresión altos en rojo).

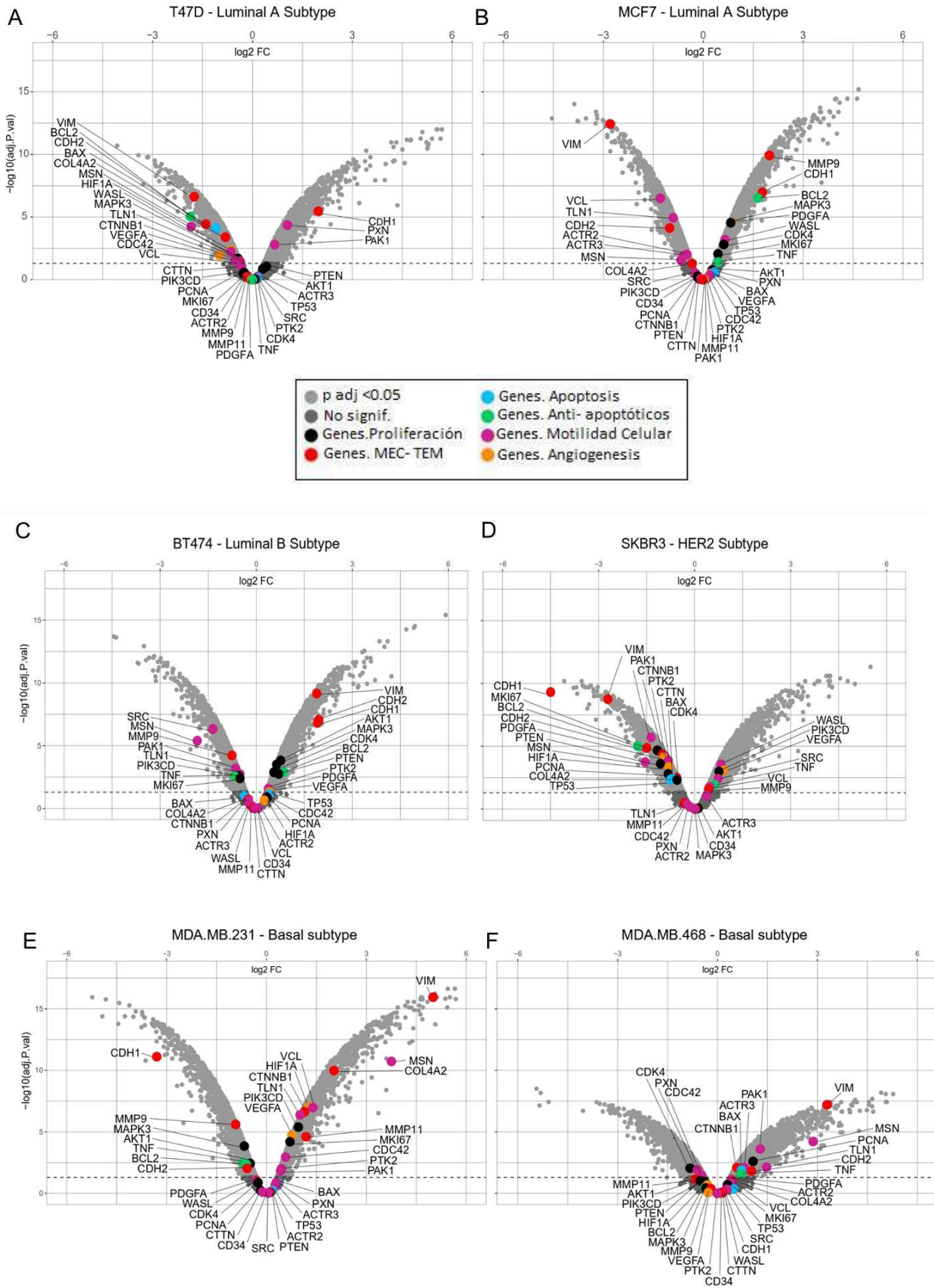
*Este estudio resalta la importancia de entender la heterogeneidad molecular en los cánceres de mama y cómo se refleja en las líneas celulares de cáncer de mama. La identificación de patrones de expresión génica específicos para cada subtipo molecular ofrece información valiosa para comprender las vías oncogénicas y procesos celulares involucrados en la progresión tumoral en diferentes contextos de cáncer de mama.*

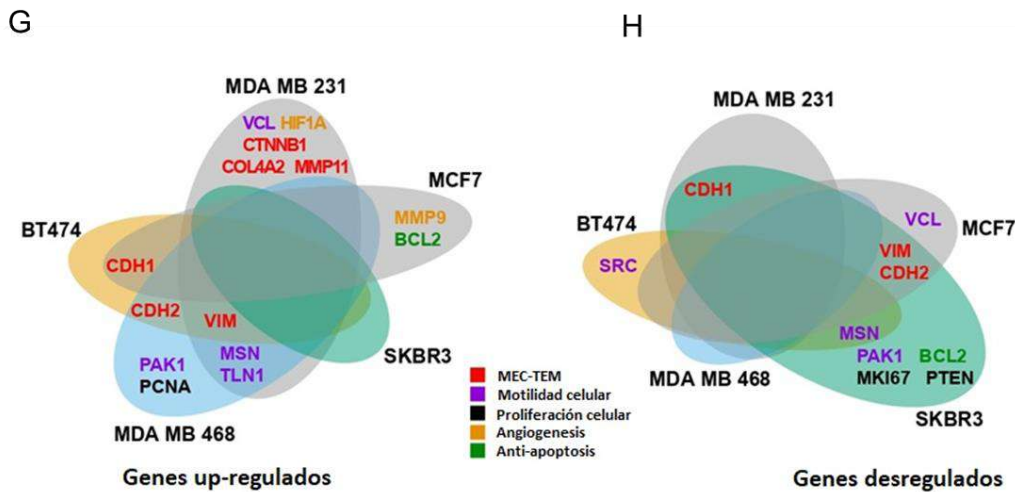
#### 4.2.1.1 Análisis de Expresión Génica Diferencial y Perfil de Genes de Interés en Diferentes Subtipos de Cáncer de Mama

Con el fin de hacer un análisis más selectivo respecto a los cambios de los niveles de expresión de los genes expresados diferencialmente en cada subtipo molecular, donde analizamos 35 genes que exhibieron cambios significativos con el propósito de evaluar su expresión génica en los distintos subtipos moleculares a través de gráficos de volcanos. Por lo tanto, evaluamos los genes expresados diferencialmente (GED) entre cada línea celular de cáncer de mama (CM) y las células normales (MCF-10A). Para este estudio, se utilizó el estadístico "limma R" [165]. Destacamos los 35 genes de interés relacionados con los procesos celulares analizados previamente, lo que permitió contextualizar los genes de interés con respecto al resto de los genes, y lograr una mejor apreciación de los cambios en la expresión génica modulada diferencialmente en cada subtipo celular.

Al analizar los resultados, observamos que las líneas celulares luminales A (T-47D y MCF-7) presentaron bajos niveles en la expresión de genes que participan en la matriz extracelular (MEC) y motilidad celular (VIM, MSN, VCL, CDH2 y TLN1). En particular, en las células T-47D, el 82% de los genes desregulados participaron en las vías vinculadas con la TEM, motilidad celular y angiogénesis. Por otra parte, las T-47D presentaron tres genes upregulados que participan en la motilidad celular (CDH1, PXN y PAK1). En las células MCF-7, encontramos una regulación negativa de genes relacionados con la motilidad celular, mientras que se observamos una regulación positiva de genes implicados en la proliferación celular, MEC y anti-apoptosis (*Figura 28 A-B*). Las células BT-474 presentaron una regulación al alza de genes relacionados con TEM y proliferación celular, y una desregulación en genes que promueven la motilidad celular (SRC, MSN, MMP9, PAK1 y TLN1) (*Figura 28 C*). En cambio, células SK-BR3 demostraron el mayor número de genes regulados a la baja (72%), los cuales están involucrados en todos los procesos. Por el contrario, las SK-BR3 muestran 4 genes up-regulados que participan en los procesos de motilidad celular (WASL, SRC, VCL y MMP9) (*Figura 28 D*). Finalmente, hemos determinamos que los subtipos basales (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) mostraron el mayor número de genes regulados al alza y una expresión disminuida de genes que inducen la proliferación celular (*Figura 28 E-F*).

Complementariamente, realizamos un diagrama de Venn's, donde pudimos resaltar los genes que exhibieron las mayores desregulaciones o que presentaron características más destacadas en sus mecanismos de expresión en cada subtipo molecular. En estos resultados, observamos que la mayoría de los genes up-regulados se encuentran relacionados principalmente con MEC-TEM, angiogénesis y motilidad celular en los subtipos moleculares tipo basal, mientras que los genes desregulados están relacionados con la motilidad celular y MEC, en los subtipos luminal A, B y enriquecidos por HER-2 (*Figura 28 G-H*).





**Figura 28. Expresión de genes implicados en el proceso de metástasis en un panel de células de cáncer de mama. A-F)** Gráficos volcánicos de análisis expresión génica diferencial realizados por el método lima. En el eje x se representó el log<sub>2</sub> (fold change) de cada línea celular respecto a las normales (MCF-10A). En el eje y, se muestra -log<sub>10</sub> (valor de p-ajuste) (los valores más altos muestran valores de p de ajuste más pequeños). Los genes con un valor de ajuste de P < 0,05, se indican encima de la línea discontinua horizontal. Los genes de interés fueron coloreados según el proceso celular en el que participan (Tabla 5). **G-H)** Este diagrama representa un resumen del análisis de expresión génica diferencial logrado por el método lima R. Podemos observar los genes upregulados y desregulados de los subtipos moleculares de cáncer de mama. Solamente, se tomaron en consideración los genes con log<sub>2</sub> > 1 (fold change), y un valor de p-ajustado < 0,05.

*Nuestros resultados nos proporcionan una mejor caracterización molecular de los subtipos de cáncer de mama en diferentes vías de señalización oncogénicas, pudiendo ser clave para identificar nuevas oportunidades terapéuticas para el tratamiento del cáncer de mama.*

#### 4.2.2 Análisis de genes vinculados a la progresión del carcinoma mamario, y regulados tras los tratamientos con diversas dosis de gonadotropina.

Considerando nuestros hallazgos en la cual pudimos determinar la amplia desregulación de genes que se expresan de forma diferencial en los distintos subtipos moleculares. Nuestro próximo objetivo fue determinar ya con microarreglos previamente establecido por nuestro grupo, si este amplio conjunto de genes de interés podría ser desregulados tanto up- down regulados en sus niveles de expresión tras el tratamiento con LH. Específicamente, nuestro enfoque se dirige a una exploración más profunda de cómo esta hormona podría influir en la expresión génica de un amplio conjunto de genes que desempeñan funciones esenciales en diversos procesos celulares que impulsan el desarrollo y la progresión tumoral [84].

A partir de la base de datos de expresión génica derivada de un análisis previo de microarrays realizado por nuestro grupo de investigación, obtuvimos información detallada de más de 200 genes en su estado sin procesar, procedentes de cuatro tratamientos distintos. Dentro de nuestro exhaustivo análisis, para profundizar el efecto de LH sobre eventos claves que impulsan la tumorigénesis celular, llevamos a cabo una minuciosa selección de 128 genes de interés

previamente identificados como componentes claves en la progresión tumoral. Estos genes fueron agrupados en distintos procesos celulares esenciales, tales como proliferación, la interacción célula y microambiente (TEC-MEC), la movilidad celular, la angiogénesis y la apoptosis.

Posteriormente, se analizó y evaluó de manera diversa, nuestro conjunto de genes de interés en el contexto de tres tratamientos distintos, los cuales consistieron en un grupo control y dos tratamientos que involucraban la administración de LH en diferentes concentraciones, uno a 5 mUI/ml (que simula los niveles hormonales pre-pubertad), y el segundo a 50 mUI/ml (que representa los niveles hormonales característicos de la etapa postmenopáusica en mujeres).

Mediante el uso de la base de datos, y un análisis diferencial de nuestros nuevos genes de interés, nuestros resultados exhibieron diferencias notables en nuestros nuevos análisis, identificando cambios en los patrones de expresión génica en un conjunto de genes relacionados

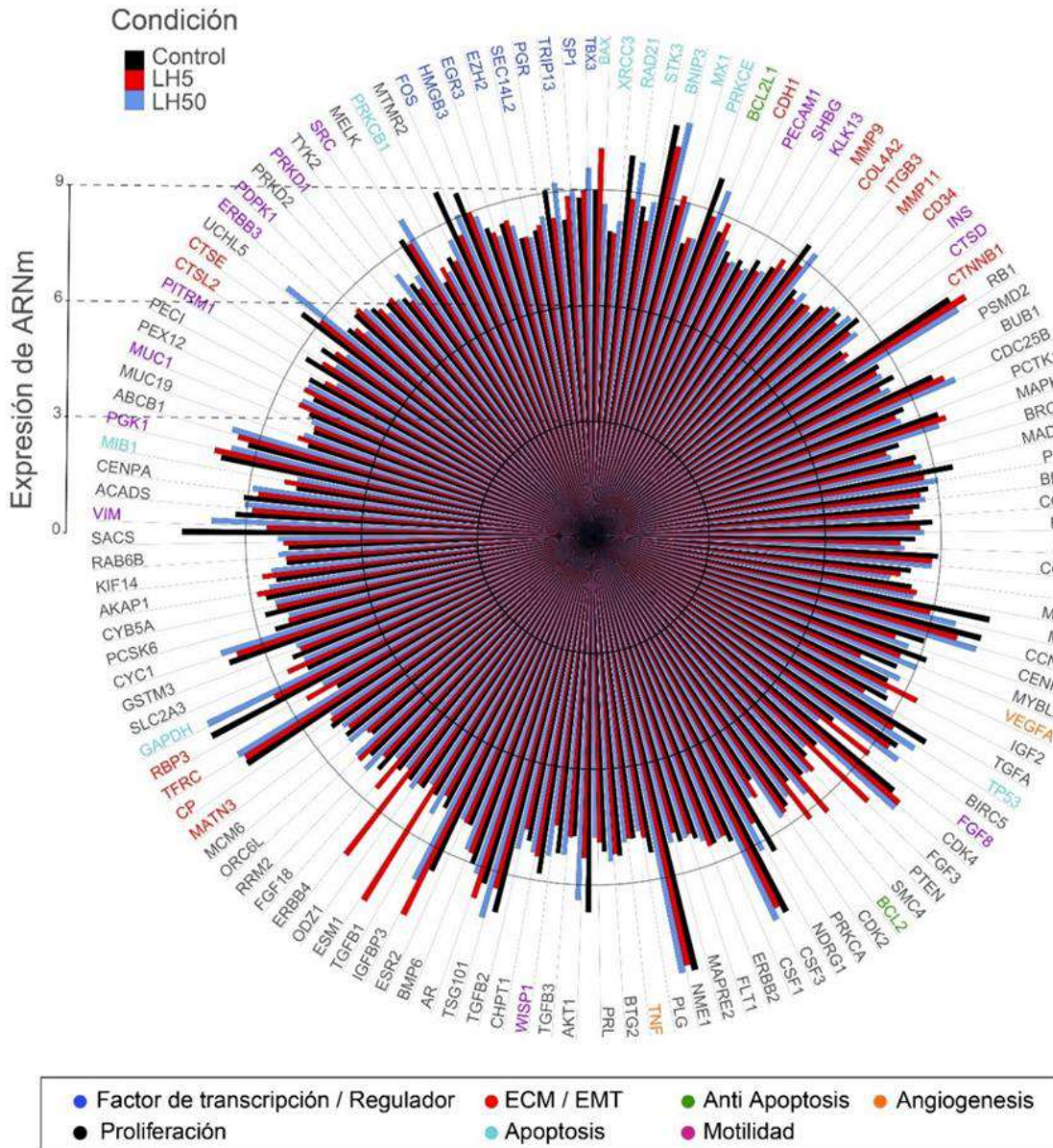
con los procesos que promueven la progresión tumoral. Estos resultados confirieron una mayor relevancia a nuestros hallazgos, ya que pudimos identificar una desregulación significativa en la expresión de genes relacionados con la motilidad, angiogénesis y apoptosis tras estimular las células con LH, en ambas concentraciones (5 y 50 mUI/ml), en comparación con el grupo control.

Esta modificación en los perfiles de expresión génica sugiere la existencia de mecanismos regulatorios que presentan un notable desbalance, observando importantes pérdidas o sobreexpresión de genes esenciales para la estructura, maquinaria motriz, y movimiento celular. Todos estos cambios conducen a desbalance en el perfil genético celular, otorgándole un fenotipo más proliferativo, migratorio e invasivo. Además, se observó un aumento en la expresión de genes relacionados con angiogénesis, apoptosis y motilidad celular, tras la exposición con LH (50 mUI/ml), en comparación con LH (5 mUI/ml), lo que nos permite sugerir que niveles incrementados de gonadotropinas podrían impulsar a la célula a un fenotipo más agresivo y tumorigénico.

Por otro lado, determinamos que tras el tratamiento con LH (5 mUI/ml), aumentó significativamente la expresión de genes implicados en la proliferación celular, pero a diferencia con nuestro trabajo previo, el tratamiento con diferentes dosis de LH (5, 5+50 y 50) no presentó modificaciones en los procesos proliferativos. Posiblemente estos cambios en los perfiles génicos, a periodos relativamente cortos (48 hs), no llegan a verse reflejados en los procesos que conducen a la proliferación de la célula, sugiriendo que dichos cambios podrían verse expresados a periodos más prolongados de tratamiento.

Es crucial señalar que estos hallazgos no solo nos brindan una nueva perspectiva sobre la progresión tumoral, sino que también apuntan hacia la posibilidad de mecanismos de regulación hormonal más complejos de lo que se había considerado previamente. Al profundizar en la relación entre los niveles de LH y la expresión génica, se abren nuevas vías de investigación que podrían utilizarse como estrategias terapéuticas innovadoras para abordar la progresión tumoral (*Figura 29*).





**Figura 29. Expresión de genes relacionados con la tumorigénesis, tras los tratamientos con LH a distintas concentraciones. A)** Se realizó un análisis mediante un gráfico de radar que ilustra las variaciones en la expresión de 128 genes de interés en una línea celular de cáncer de mama. Estas células fueron sometidas a tratamientos con LH en dos concentraciones distintas (5 y 50 mUI/ml), que simulan diferentes estadios hormonales pre-pubertad y postmenopáusicos presentes en mujeres. Estos tratamientos se compararon con células Control (Con), las cuales recibieron ningún tipo de tratamiento. En el gráfico de radar, los colores asignados a los genes representan los diferentes procesos celulares relacionados con la progresión tumoral.

*Estos resultados demuestran una notable desregulación de genes que participan en la progresión tumoral tras el tratamiento con LH a diferentes concentraciones, 5 y 50 mUI/ml, promoviendo de este modo a un fenotipo más agresivo, invasivo y metastásico en CM.*

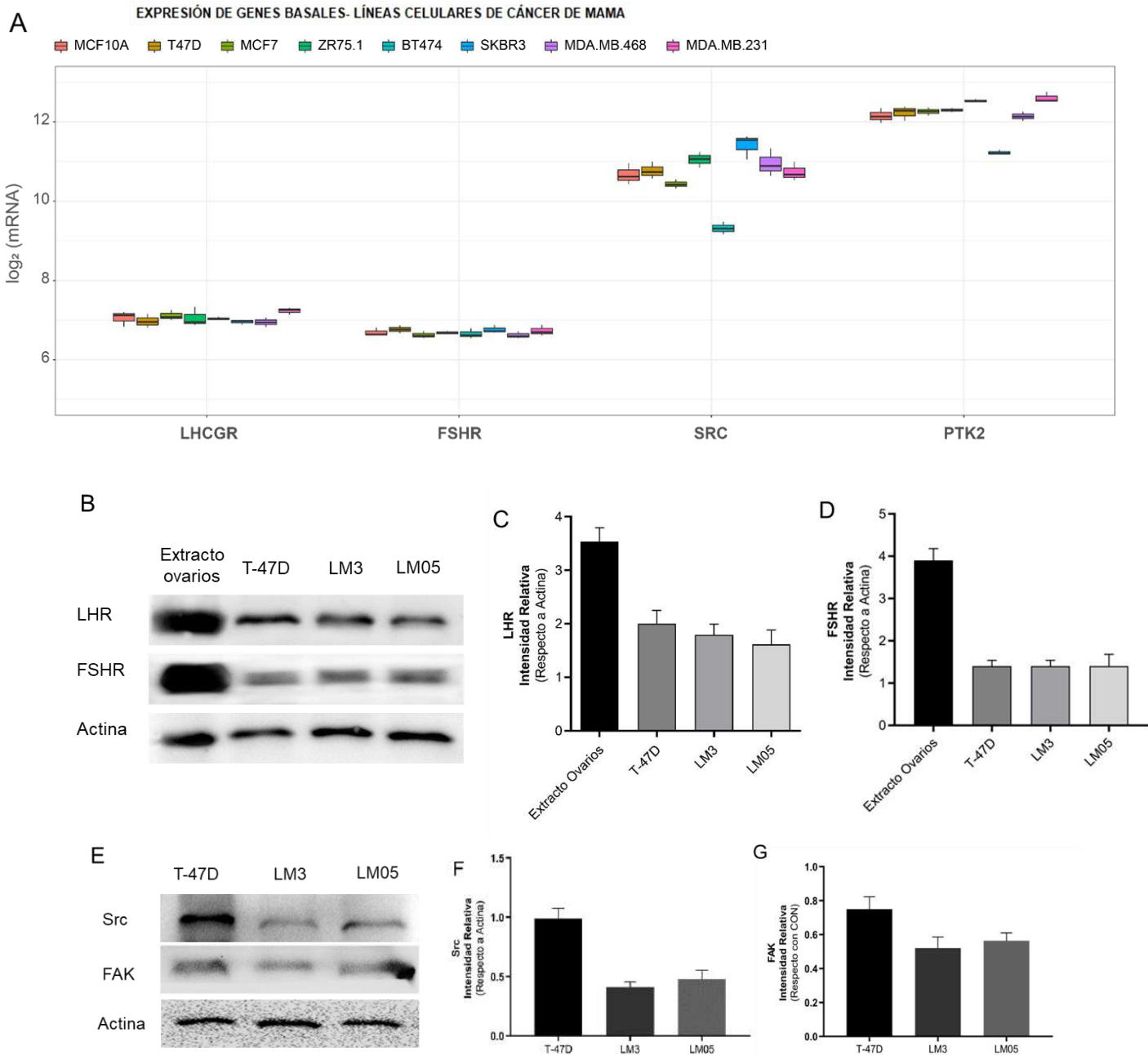
### **4.3 Tercer objetivo específico**

#### **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.**

Estudios previos han demostrado que LH tiene la capacidad de influir en la actividad y expresión de Src y FAK en células de cáncer de mama [82, 84]. Este estrecho vínculo entre la gonadotropina LH, Src y FAK es de particular importancia debido a su implicancia en la motilidad de la célula, un proceso clave en la progresión tumoral [82]. La activación de la vía de Src y FAK, por parte de LH, ha sido objeto de una extensa investigación por nuestro grupo, ya que se ha observado que estas proteínas desempeñan un papel crucial en la adhesión, migración, invasión y supervivencia celular [103, 135, 147, 167, 171].

Src y FAK son dos quinasas que se encuentran sobreexpresadas en distintos tipos de cáncer, incluyendo el CM, y su aumento y/o expresión se correlacionan con un fenotipo más invasivo y metastásico. Se ha informado que la activación de Src y FAK está mediada por diferentes factores de crecimiento, receptores de hormonas, integrinas y moléculas de adhesión celular [112, 172].

Por lo tanto, el próximo objetivo consistió en evaluar la expresión de los receptores de gonadotropinas, LH (LHR) y FSH (FSHR), junto a las quinasas Src y FAK en los distintos subtipos de CM, y en líneas celulares murinas, con el fin de determinar su posible participación en la progresión del CM. Inicialmente, se realizó un análisis de los perfiles de expresión génica de LHCGR (LHR), FSHR (FSHR), SRC (Src) y PTK2 (FAK) en varios tipos de células de CM humanas (T-47D, MCF7, ZR75.1, BT-474, SK-BR3, MDA-MB-468 y MDA-MB-231), y paralelamente en una línea celular de mama normal (MCF-10A). Para ello, se utilizó un análisis de transcriptoma a partir de dos conjuntos de datos de la base de datos pública Gene Expression Omnibus (GSE70884 y GSE68651). Los resultados obtenidos demostraron que LHCGR y FSHR presentan una expresión basal en todos los subtipos celulares de CM, mientras que SRC y PTK2 demostraron una expresión elevada en dichas células tumorales (*Figura 31 A*). Asimismo, se evaluó la expresión basal de LHR, FSHR, Src y FAK en extractos de ovario, líneas celulares T-47D y líneas murinas de CM, LM3 y LM05. Mediante ensayos de western blot se observó que todas las líneas celulares presentaron la expresión de LHR y FSHR, como también en el extracto de ovario. El extracto de ovario se utilizó como control positivo para poder confirmar la especificidad de los anticuerpos (*Figura 31 B-D*). Además, determinamos que ambas quinasas se encuentran expresadas en las líneas T-47D, como así también en las líneas murinas (*Figura 31 E-G*).



**Figura 31. Expresión de LHR, FSHR, Src y FAK en líneas celulares de cáncer de mama.** **A)** Diagrama de caja que muestra los patrones de expresión génica de cuatro genes de interés (LHCGR, FSHR, SRC y PTK2). Cada color representa una línea celular de cáncer de mama (MCF-10A, MCF-7, T-47D, ZR75.1, BT-474, SK-BR3, MDA-MB-468, MDA-MB-231). En el eje Y, se mostró  $\log_2$  (expresión de ARNm). **B)** Se realizaron lisados completos de extractos de ovarios, extracto de una línea celular de cáncer de mama humana (T-47D), y líneas celulares murinas de cáncer de mama (LM3 y LM05), con el fin de determinar el patrón de expresión de LHR, FSHR, Src y FAK en los diversos extractos. Los niveles de expresión fueron analizados mediante Western blot. Los blots representativos demuestran expresión en las líneas celulares de cáncer de mama, como también en el extracto de ovario. **C-D)** Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots, mediante la densidad óptica de las bandas. Las bandas de LHR y FSHR fueron normalizadas con las bandas de actina. **E)** Se realizaron lisados de las líneas celulares de cáncer de mama, T-47D, LM3 y LM05, con el propósito de evaluar la expresión de Src y FAK en dichas líneas. Los niveles de expresión de las quinasas fueron analizados mediante Western blot. **F-G)** Los gráficos corresponden a la cuantificación de los inmunoblots, mediante la densidad óptica de las bandas. Las bandas de Src y FAK fueron normalizadas con las bandas de actina. Los blots representativos demuestran la expresión en diversas líneas celulares. Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes.

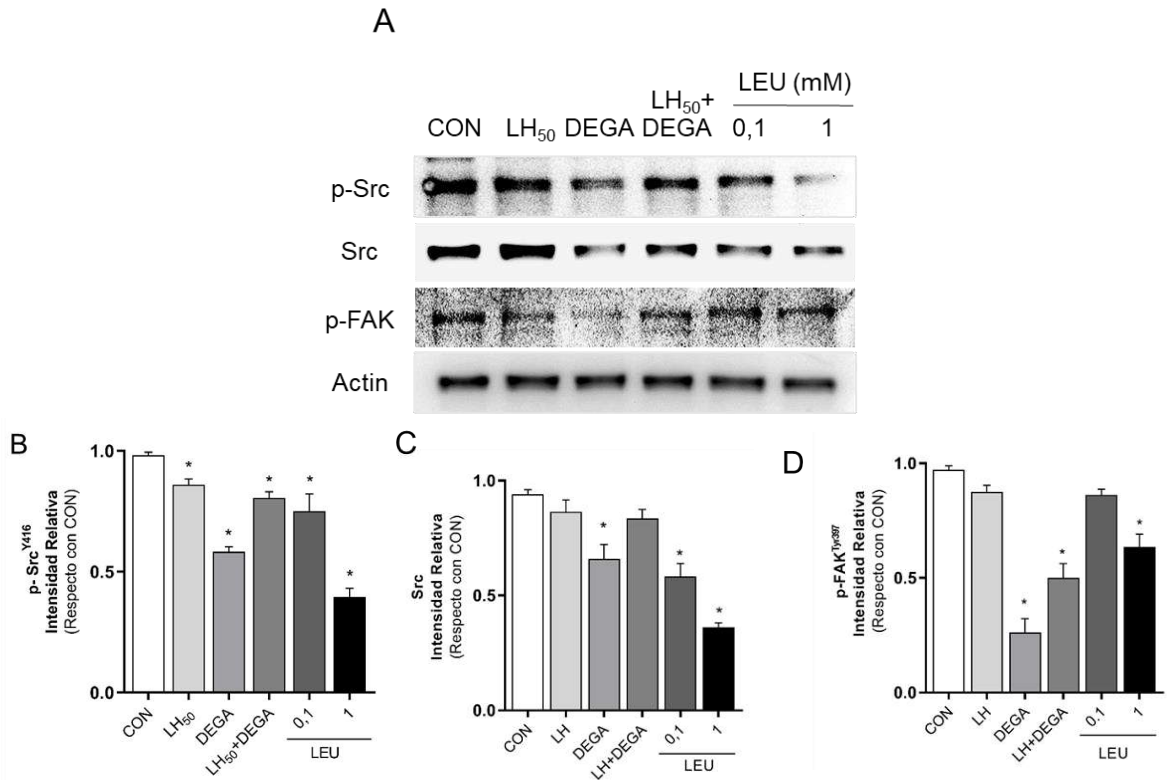
*Estos resultados demuestran la expresión de LHR, FSHR, Src y FAK en los distintos subtipos de cáncer de mama, así como también en líneas murinas.*

#### 4.3.2 Efectos de agonistas y antagonistas de GnRH sobre la regulación de Src y FAK.

A pesar de que las tasas de supervivencia del CM han mejorado en los últimos años, la diseminación metastásica del cáncer sigue siendo un grave problema que provoca la mayoría de las recaídas y muertes en los pacientes. Por esta razón, la búsqueda de nuevas terapias que prevengan o inhiban este proceso es crucial. Estudios previos han demostrado que los receptores de GnRH (GnRH-R) se expresan en tejidos cancerosos, ya sea relacionados o no con el sistema reproductivo [42, 45]. Debido a esto, se ha propuesto a los GnRH-R tumorales como una posible diana terapéutica para desarrollar nuevas estrategias moleculares contra el cáncer. Específicamente, se busca apuntar a la regulación de estos receptores en mujeres posmenopáusicas, en las cuales los niveles séricos de gonadotropinas son más elevados, con el objetivo de reducir la actividad de estas hormonas. Los agonistas y antagonistas de GnRH son compuestos que pueden regular la actividad de las gonadotropinas y, en consecuencia, influir en la expresión y fosforilación de ciertas proteínas targets que se encuentran desreguladas, entre ellas, Src y FAK quinasa.

Por lo tanto, nuestro próximo objetivo fue evaluar los efectos del agonista y antagonista de GnRH en nuestro modelo celular. Para ello, analizamos la expresión y fosforilación de Src y FAK en células murinas de CM. Seleccionamos las líneas murinas LM3 debido a su falta de receptores de estrógenos y progesterona, así como a su fenotipo más invasivo y metastásico en comparación con las líneas LM05. Es por ello, que las células LM3 fueron tratadas con leuprorelina (agonista selectivo; 0,1 mM y 1 mM), degarelix (antagonista selectivo; 10 mM), en presencia y/o ausencia con LH (50 mUI/ml, estadio postmenopáusico) durante 48 horas, con el fin de determinar los perfiles de expresión y fosforilación de las proteínas anteriormente descritas mediante ensayos de western blot. Se observó que, tras el tratamiento con LH<sub>50</sub> (durante 48 hs) no afectó la expresión de Src, pero disminuyó significativamente la fosforilación en p-Src<sup>Y416</sup>, y conjuntamente la fosforilación de p-FAK<sup>Y397</sup>, respecto a la línea control. En cambio, el tratamiento con degarelix (DEGA) disminuyó significativamente la expresión y fosforilación de p-Src<sup>Y416</sup> y p-FAK<sup>Y397</sup> (Figura 32 A-D), pero tras la administración de LH<sub>50</sub> al tratamiento con DEGA, se reconstituyeron parcialmente los niveles disminuidos de ambas proteínas en la expresión y fosforilación. Por otro lado, observamos que los niveles de fosforilación de p-Src<sup>Y416</sup> y p-FAK<sup>Y397</sup> disminuyeron significativamente tras el tratamiento con leuprorelina (LEU), en una mínima concentración de 0,1 - 1 mM (Figura 32 A-D). La evaluación de los efectos de estos análogos de GnRH versus proteínas quinasas, demuestran que afectan tanto la expresión como fosforilación en la línea tumoral de CM, pudiéndonos proporcionar una información valiosa para el diseño de nuevas terapias dirigidas a la regulación de estas proteínas y

mejorar la eficacia del tratamiento del cáncer de mama.



**Figura 32. Efecto de Leuprorelina y degarelix sobre la expresión y fosforilación de Src y FAK.** **A)** Las células murinas, LM3 fueron tratadas con leuprorelina (agonista, 0,1 mM y 1 mM); degarelix (antagonista; 10 mM) en presencia y/o ausencia con LH (50 mUI/ml) durante 48hs. Los niveles de fosforilación de Src<sup>Y419</sup> y FAK<sup>Y397</sup> fueron analizados por western blot. Los blots representativos demuestran una disminución en la actividad de Src y FAK, tras el tratamiento con LH. Además, el uso de Leuprorelina y degarelix notaron una significativa disminución en la fosforilación de Src<sup>Y419</sup> y FAK<sup>Y397</sup>. En paralelo, observamos cómo la expresión de Src fue disminuida tras el tratamiento con el agonista y antagonista de GnRH. **B-D)** El grafico corresponde a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de p-Src<sup>Y419</sup>, Src y p-FAK<sup>Y397</sup> fueron normalizadas con las bandas de actina. *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 resaltan un rol central de leuprorelina y degarelix sobre su modulación en la expresión y la fosforilación de Src y FAK en líneas celulares LM3. El uso de LEU y DEGA podría ser una gran herramienta contrarrestando los niveles incrementados de ambas quinasas en subtipos moleculares que presenten incrementados sus niveles de expresión.*

#### 4.3.3 Acción de Agonistas/antagonistas de GnRH e inhibidores quinasas en la progresión celular

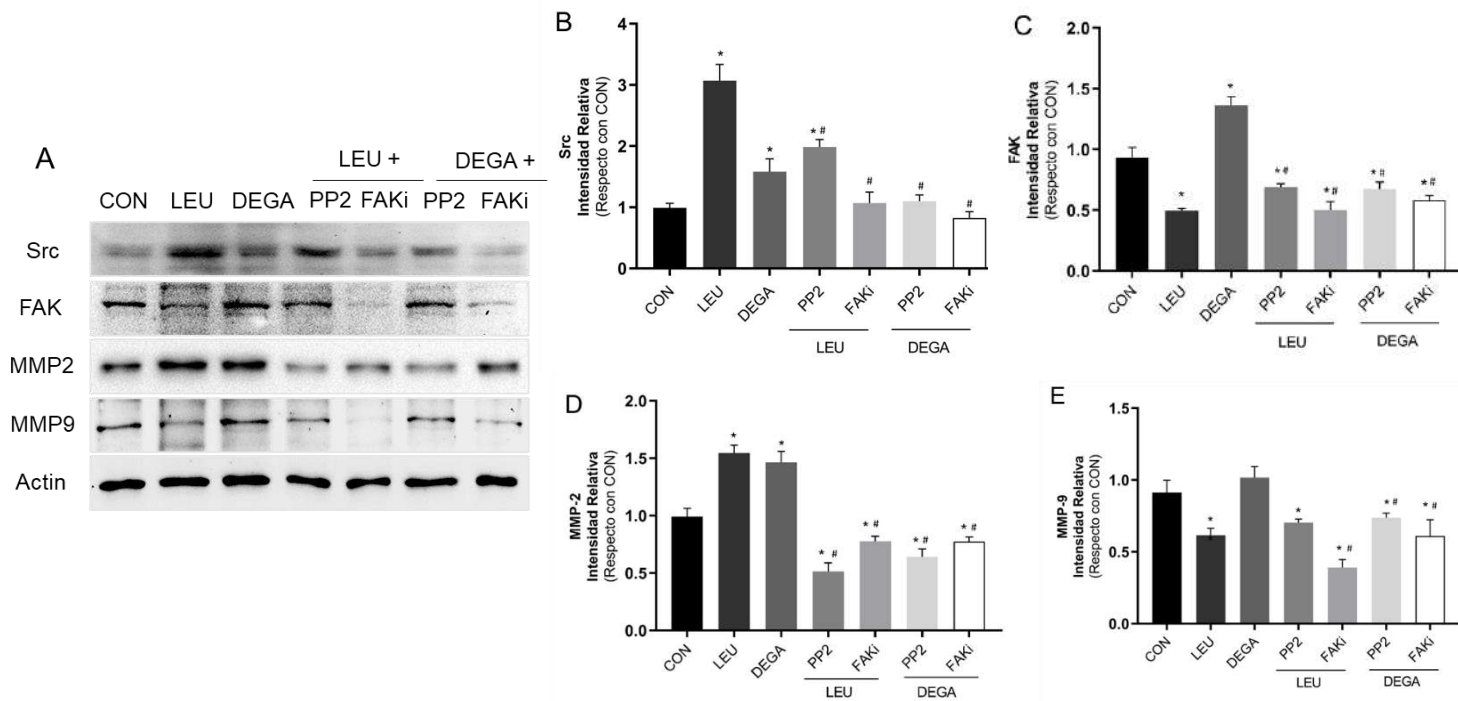
La identificación de blancos moleculares específicos se ha convertido en una estrategia clave para el desarrollo de terapias dirigidas contra la metástasis tumoral [173]. A pesar de la amplia variedad de agentes quimioterapéuticos que se utilizan actualmente, ciertos pacientes desarrollan resistencia a estas terapias. Ante esto, surge la necesidad de implementar nuevos tratamientos de quimioterapia combinados con la administración de moduladores químicos de proteínas específicas

[174].

En la progresión tumoral, se ha demostrado que las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MEC), como MMP-2 y MMP-9, juegan un papel crucial al degradar la matriz extracelular, promoviendo la invasión y metástasis de las células cancerosas [175, 176]. Varios estudios han demostrado que Src puede activar directamente a MMP-2 [177]. La activación de Src puede resultar en la fosforilación de la MMP-2, lo que incrementa su actividad enzimática y promueve la degradación de la matriz extracelular [177, 178]. Además, se ha demostrado la existencia de una correlación entre FAK y MMP-9 en diferentes tipos de cáncer, donde se ha identificado que la activación específica de FAK puede inducir la expresión y la actividad de MMP-9 en células tumorales. Se ha observado que la activación de FAK, mediante señales de adhesión celular o factores de crecimiento, puede aumentar la producción y la liberación de MMP-9 en células cancerosas [179].

Por lo tanto, es fundamental analizar la expresión de estas proteínas en las células tumorales de mama para comprender la actividad de las mismas y su relación con la progresión tumoral. Ante esto, nos surge la inquietud si, la combinación de inhibidores específicos de Src y FAK, junto con agonistas y antagonistas de GnRH, puede ser una estrategia prometedora para inhibir la actividad de MMP-2 y MMP-9 y prevenir el desarrollo y progresión tumoral.

Por lo tanto, nuestro objetivo se enfoca en investigar si estas combinaciones tienen efecto sinérgico en la inhibición de la progresión celular, por ello evaluamos la expresión de Src, FAK y los marcadores de la MEC, como MMP-2 y MMP-9, en líneas celulares murinas. Para evaluar este objetivo, células LM3 fueron tratadas con LEU (0,1 mM), DEGA (10  $\mu$ M), junto con la combinación de PP2 (10  $\mu$ M), FAKi (1  $\mu$ M) durante 48 hs, con el fin de determinar si la administración de estos compuestos afecta la expresión de Src, FAK, MMP-2 y MMP-9. Para ello, empleamos ensayos de Western blot. En los mismos observamos que tras el tratamiento con LEU, se incrementó significativamente la expresión de Src y MMP-2, pero no afectó la expresión de FAK y MMP-9 (*Figura 33 A*). En paralelo se observó cómo los niveles de expresión de FAK, MMP-2 y MMP-9 incrementaron notablemente tras el tratamiento con DEGA, mientras que disminuyó la expresión de Src. Por otro lado, la combinación de LEU+PP2 y DEGA+PP2 disminuyó la expresión de MMP-2 y Src, con respecto al Control. En cambio, el tratamiento combinado de LEU+FAKi y DEGA+ FAKi disminuyó la expresión de FAK y MMP-9 y MMP-2 (solo en LEU+FAKi) (*Figura 33 A-E*).



**Figura 33. Efecto de Leuprorelina/degarelix y PP2/FAKi en la progresión tumoral.** A) Células de cáncer de mama murinas LM3 fueron tratadas con leuprorelina (0,1 mM); degarelix (10 mM), en presencia y/o ausencia de inhibidores específicos de Src (PP2, 10µM) y FAK (FAKi, 1µM) durante 48 hs. Los niveles de expresión de Src, FAK, MMP-2 y MMP-9 fueron analizados por western blot. Los blots representativos demuestran un incremento de Src y MMP-2 tras el tratamiento con LEU, mientras que disminuye la expresión de FAK y MMP-9. Degarelix incrementa la expresión de FAK y MMP-2, mientras que disminuye la expresión de Src y MMP-9. Por otro lado, las combinaciones del agonista y/o antagonista, junto con el inhibidor de Src y/o FAK, disminuyeron notablemente los niveles de expresión de Src, FAK, MMP-2 y MMP-9. B-E) El gráfico corresponde a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de Src, FAK, MMP-2 y MMP-9 fueron normalizadas con las bandas de la proteína housekeeping actina. Análisis estadístico de western blot. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con respecto al grupo control (CON), LEU y DEG, utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn, considerando estadísticamente significativo \*P<0,05 (CON), #P<0,05 (LEU y DEGA). Las barras representan la media ± DE. Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que la combinación de inhibidores específicos de Src (PP2) y FAK (FAKi), junto al uso de agonista (LEU)/antagonista (DEGA) disminuyen significativamente la expresión de Src, FAK y los marcadores de la matriz extracelular, MMP-2 y MMP-9 en líneas celulares LM3.

#### 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

Después de los resultados obtenidos *in vitro*, se llevó a cabo un estudio *in vivo* en un modelo murino para evaluar los efectos de los tratamientos con LEU y DEGA, así como el uso de los inhibidores específicos PP2, FAKi, solos y en combinación, en un experimento de crecimiento tumoral. Este estudio es ampliamente utilizado para estudiar la progresión del cáncer de mama y permite evaluar la capacidad de los diversos tratamientos con el fin de inhibir el crecimiento tumoral. Para llevar a

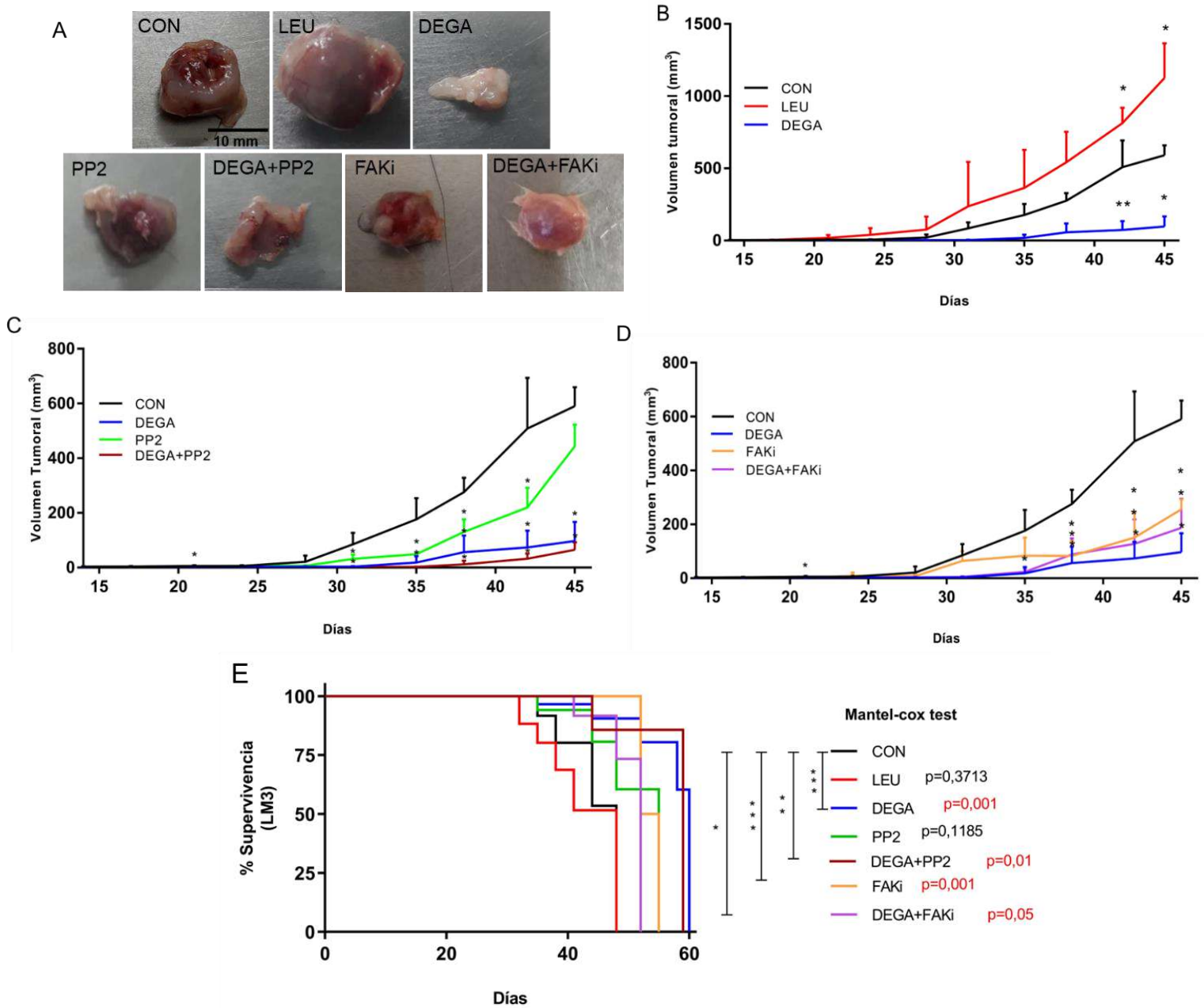
cabo este objetivo, se utilizó un ensayo de crecimiento tumoral ortotópico, que consistió en inocular células murinas de CM LM3, pretratadas o no con PP2 (10 mM) y FAKi (1  $\mu$ M) durante 5-7 días, en la cuarta glándula mamaria de ratones hembras BALB/c. Una vez que los tumores eran palpables, aproximadamente 7 días después de la inoculación, se administró a los ratones una dosis subcutánea de LEU (0.1 mg/kg) y/o DEGA (2 mg/kg) y se realizó el seguimiento del crecimiento tumoral durante 60 días. Nuestros resultados demostraron que los tratamientos con LEU indujeron un aumento significativo en el crecimiento tumoral, mientras que los animales que fueron tratados con DEGA experimentaron una disminución significativa en dicho crecimiento (*Figura 34 A-B*). Además, los animales que recibieron células inhibidas farmacológicamente con PP2 y FAKi también presentaron una notable disminución en el crecimiento tumoral, con respecto al grupo control (CON) (*Figura 34 C-D*). Sin embargo, los animales que recibieron el tratamiento combinado de DEGA+PP2 y DEGA+FAKi presentaron una mayor reducción en el volumen tumoral (*Figura 34 C-D*). Además de evaluar el efecto de los tratamientos en el crecimiento tumoral, se analizó la supervivencia de los ratones después de los distintos tratamientos. Se observó que los ratones tratados con DEGA, y la combinación de DEGA+PP2 y DEGA+FAKi aumentaron significativamente la supervivencia de los ratones, en comparación con los ratones Control (*Figura 34 E*). Además, determinamos que PP2 y FAKi también aumentaron significativamente la supervivencia de los ratones (*Figura 34 E*). En cambio, se determinó que el tratamiento con LEU disminuyó drásticamente la supervivencia de los ratones, respecto al grupo control (*Figura 34 E*).

A continuación, nos propusimos analizar la tasa de proliferación de los tumores. Por lo tanto, procedimos a analizar la expresión de Ki-67, mediante el análisis inmunohistoquímico en tumores de ratones. Ki-67 esta proteína marcadora ampliamente usada en patología clínica como un biomarcador de división celular. Mediante este análisis se encontró que el porcentaje de células positivas para Ki-67 fue significativamente alto en los tratamientos con LEU, en comparación con las muestras control; mientras que DEGA, PP2, FAKi y su combinación, disminuyeron significativamente el porcentaje de células positivas para Ki-67 (*Figura 34 F-G*).

Por otro lado, se evaluó si estas combinaciones presentadas podrían tener algún posible efecto en el proceso de angiogénesis. Debido a lo planteado, células tumorales murinas LM3 fueron tratadas con LEU (0,1 mM), DEGA (10  $\mu$ M), solos y en combinación con PP2 (10  $\mu$ M) y FAKi (1  $\mu$ M) durante 48 hs, con el fin de determinar la expresión de marcadores angiogénicos como VEGF y el factor de hipoxia HIF-1 $\alpha$ . Mediante ensayos de western blot hemos determinamos que los niveles de expresión de VEGF y HIF-1 $\alpha$  fueron incrementaron significativamente tras los tratamientos con el agonista (LEU) y antagonista (DEGA), respecto a las muestras control (CON); mientras que la combinación de LEU+PP2, LEU+FAKi, DEGA+PP2 y DEGA+FAKi disminuyeron significativamente los niveles de expresión de VEGF y HIF-1 $\alpha$  (*Figura 34 H-K*) sugiriendo que la combinación del agonista



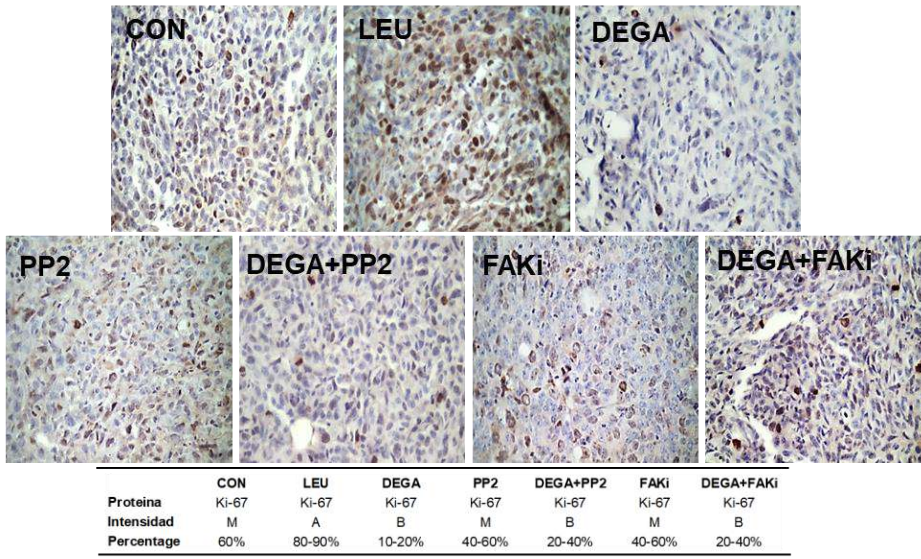
y/o antagonista plus inhibidores quinasas podría regular el proceso de angiogénesis, inhibiendo el mismo.



**Figura 34. Combinación de Leu y DEGA, junto con la combinación de PP2 y/o FAKi en el crecimiento del tumor.** A) Se realizó un ensayo de crecimiento de tumor ortotópico inoculando células de cáncer de mama murino LM3, pretratadas o no con PP2 (10 mM) y FAKi (1  $\mu$ M), en la cuarta glándula mamaria de ratones BALB/c. Cuando los tumores son palpables aproximadamente 7 días después de la inoculación, los ratones recibieron una dosis subcutánea del agonista Leuprorelina (LEU; 0.1 mg/kg) y antagonista Degarelix (DEGA; 2 mg/kg). Se muestran imágenes representativas del desarrollo del tamaño del tumor del experimento en B-D. B-D) Se midieron los diámetros de los tumores dos veces por semana y se utilizaron para calcular el volumen del tumor. Cada punto de datos representa la media  $\pm$  SD,  $\ast$ = $p < 0,05$  vs. control, CON. Para comparar los valores medios entre los diferentes grupos por día, 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%. La figura es representativa de dos experimentos independientes realizados con resultados similares. E) Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia del punto final del animal definido como un tumor LEU, DEGA y/o PP2 (10 mM) y FAKi (1  $\mu$ M). El punto final del animal se definió como un diámetro del tumor mayor de 10 mm o cuando los animales mostraron signos de sufrimiento. Cada color representa un grupo experimental diferente. El grupo de control (negro); el grupo LEU (rojo); el grupo DEGA

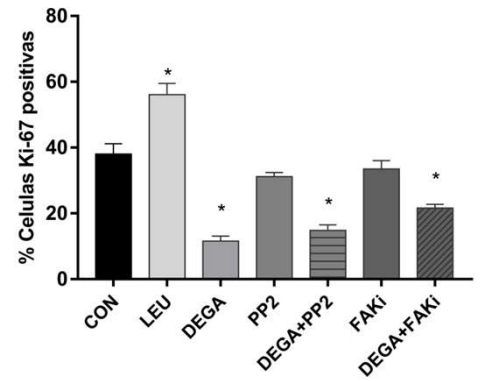
(azul); el grupo PP2 (verde claro); el grupo DEGA+PP2 (bordo); el grupo FAKi (naranja); y el grupo DEGA+FAKi (morado). Cada punto de datos representa la media  $\pm$  SD, \*\*\*= $p < 0,0001$ , \*\*= $p < 0,001$  y \*= $p < 0,05$  vs. control.

F

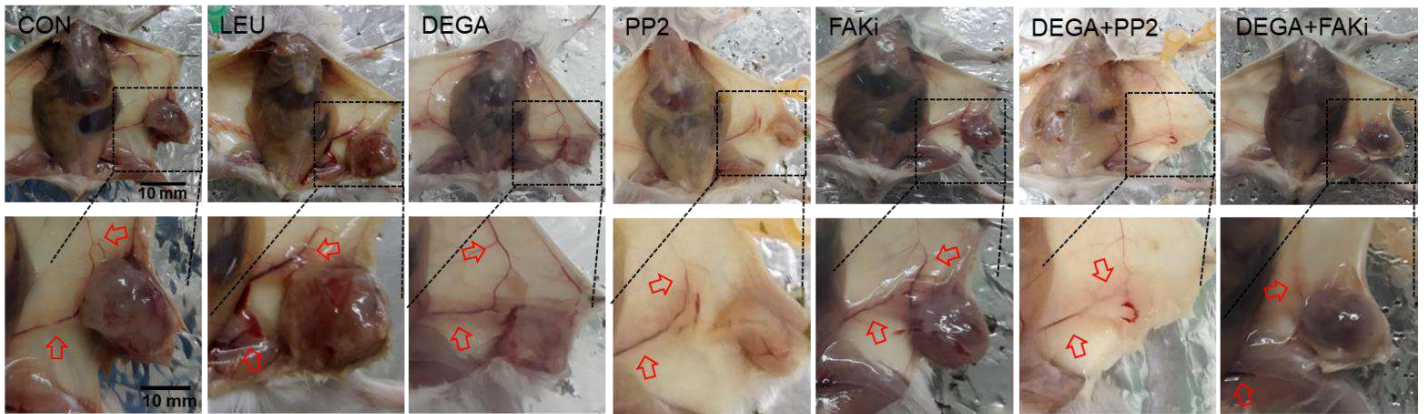


Intensidad de la expresión de Ki-67.  
 - Bajo (B)                      - Medio (M)                      - Alto (A)

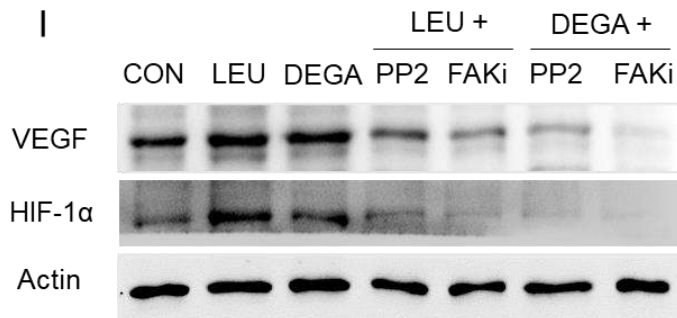
G



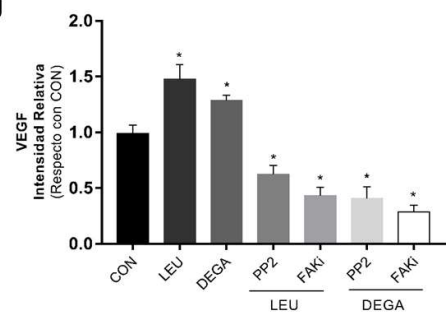
H



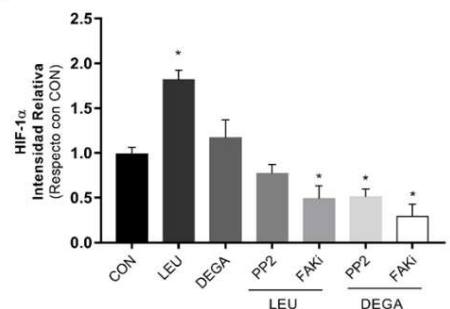
I



J



K



**Figura 34 bis. Combinación de Leu y DEGA, junto con la combinación de PP2 y/o FAKi en el crecimiento del tumor. F-G)** Se muestran imágenes y el porcentaje de tumor mamario positivo para Ki-67 de las células LM3, en relación con el control, CON, para cada condición experimental.  $*=p<0,05$  vs control, CON. **H-I)** Células murinas LM3 fueron tratadas con leuprorelina (0,1 mM); degarelix (10 mM), en presencia y/o ausencia con PP2 (10  $\mu$ M) y FAKi (1 $\mu$ M), durante 48hs. Los niveles expresión de VEGF y HIF-1 $\alpha$  fueron analizados por western blot. Los blots representativos demuestran un incremento tras el tratamiento con LEU y DEGA. Sin embargo, tras la combinación de LEU+PP2, LEU+FAKi, DEGA+PP2 y DEGA+FAKi disminuyeron significativamente los niveles de VEGF y HIF-1 $\alpha$ . **J-K)** El gráfico corresponde a la cuantificación de los inmunoblots mediante densidad óptica de las bandas. Las bandas de VEGF y HIF-1 $\alpha$  fueron normalizadas con las bandas de actina. *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  $\pm$  DE. Cada blot se realizó por duplicado a partir de 3 experimentos independientes.

*Estos resultados sugieren que los tratamientos con leuprorelina pueden promover e incrementar el crecimiento tumoral, proliferación celular y disminuir la supervivencia de los ratones, mientras que degarelix, y su combinación con PP2 y FAKi, disminuyeron el crecimiento tumoral, la proliferación celular e incrementaron la supervivencia del ratón.*

#### 4.3.5 Efecto de leuprorelina y degarelix sobre el crecimiento tumoral en células murinas LM05 (ER+/PR+).

La mayoría de los tumores de mama expresan receptores de estrógenos, indicando una dependencia del tumor a dichas hormonas [180]. Los mismos son tratados con terapias donde reducen los niveles de estrógenos o inhiben sus receptores. Dado que las gonadotropinas y sus receptores están estrechamente involucrados en la síntesis de los estrógenos, las alteraciones en los niveles circundantes de gonadotropinas o desregulaciones en sus vías de señalización podrían influenciar el ambiente estrogénico e influir en la progresión del CM.

Por lo tanto, nos interesó comparar las líneas murinas LM3 vs. LM05, ya que cada una expresa diferentes tipos de receptores. *Las células LM05 son líneas que expresan receptores de estrógenos (ER+) y receptores de progesterona (PR+).* Para llevar a cabo esta comparación, evaluamos el efecto con LEU, DEGA, y los inhibidores de Src (PP2) y FAK (FAKi), en forma individual como en combinación, sobre el crecimiento tumoral en las líneas murinas LM05. Para ello, inoculamos células LM05, *pretratadas con PP2 y FAKi* (inhibición persistente durante 5-7 días), y *células no tratadas* en la glándula mamaria de los ratones BALB/c. Una vez que los tumores fueron palpables, los ratones recibieron una dosis subcutánea de LEU (0.1 mg/kg) y DEGA (2 mg/kg). Observamos un patrón de crecimiento tumoral similar al de las células LM3. Sin embargo, notamos que el tratamiento con LEU tendió a aumentar el crecimiento tumoral, mientras que DEGA lo inhibió significativamente (*Figura 35 A-B*). Paralelamente determinamos que PP2 y FAKi indujeron una disminución en el crecimiento tumoral, en comparación con el grupo control (*Figura 35 C-D*). En cambio, pudimos observar que la combinación de LEU+PP2 y LEU+FAKi no tuvo un efecto

significativo en el crecimiento tumoral, con respecto al grupo LEU. Sin embargo, los animales que recibieron el tratamiento combinado de DEGA+FAKi presentaron una disminución en el volumen tumoral (Figura 35 E).

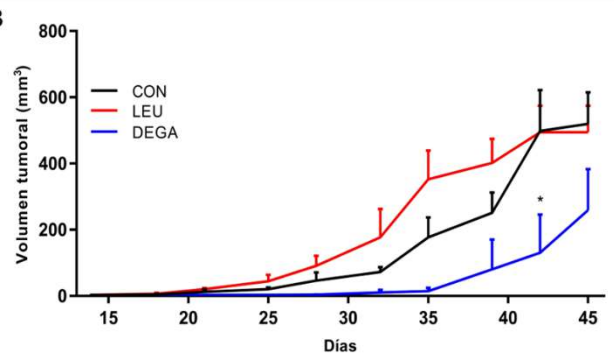
También se analizó la supervivencia de los ratones después de los tratamientos y observamos que los ratones tratados con DEGA presentaron un incremento en su supervivencia, pero solo la combinación de DEGA+FAKi resultó estadísticamente significativa. Por otro lado, el tratamiento con LEU y la combinación con PP2 y FAKi disminuyeron la supervivencia de los ratones (Figura 35 F).

Finalmente, evaluamos la tasa de proliferación de los tumores de las líneas LM05 midiendo la expresión del biomarcador pronóstico Ki-67 mediante inmunohistoquímica. Mediante esta técnica observamos que el porcentaje de células positivas para Ki-67 fue significativamente alto en los tratamientos con LEU en comparación con el grupo control, mientras que DEGA, PP2, FAKi y la combinación de DEGA+FAKi disminuyeron significativamente el porcentaje de células positivas para Ki-67 (Figura 35 G-H).

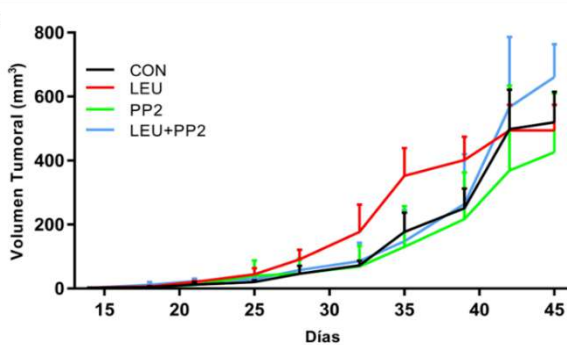
A



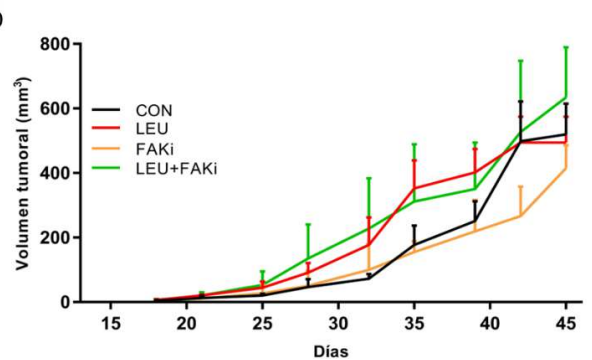
B



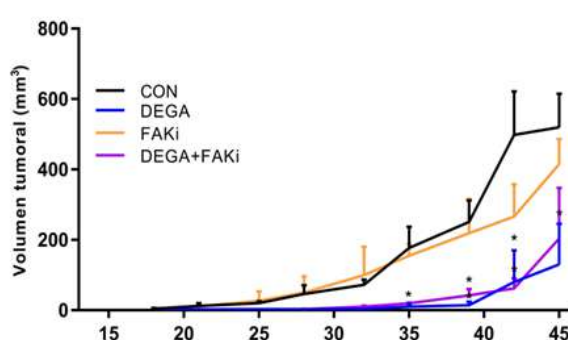
C

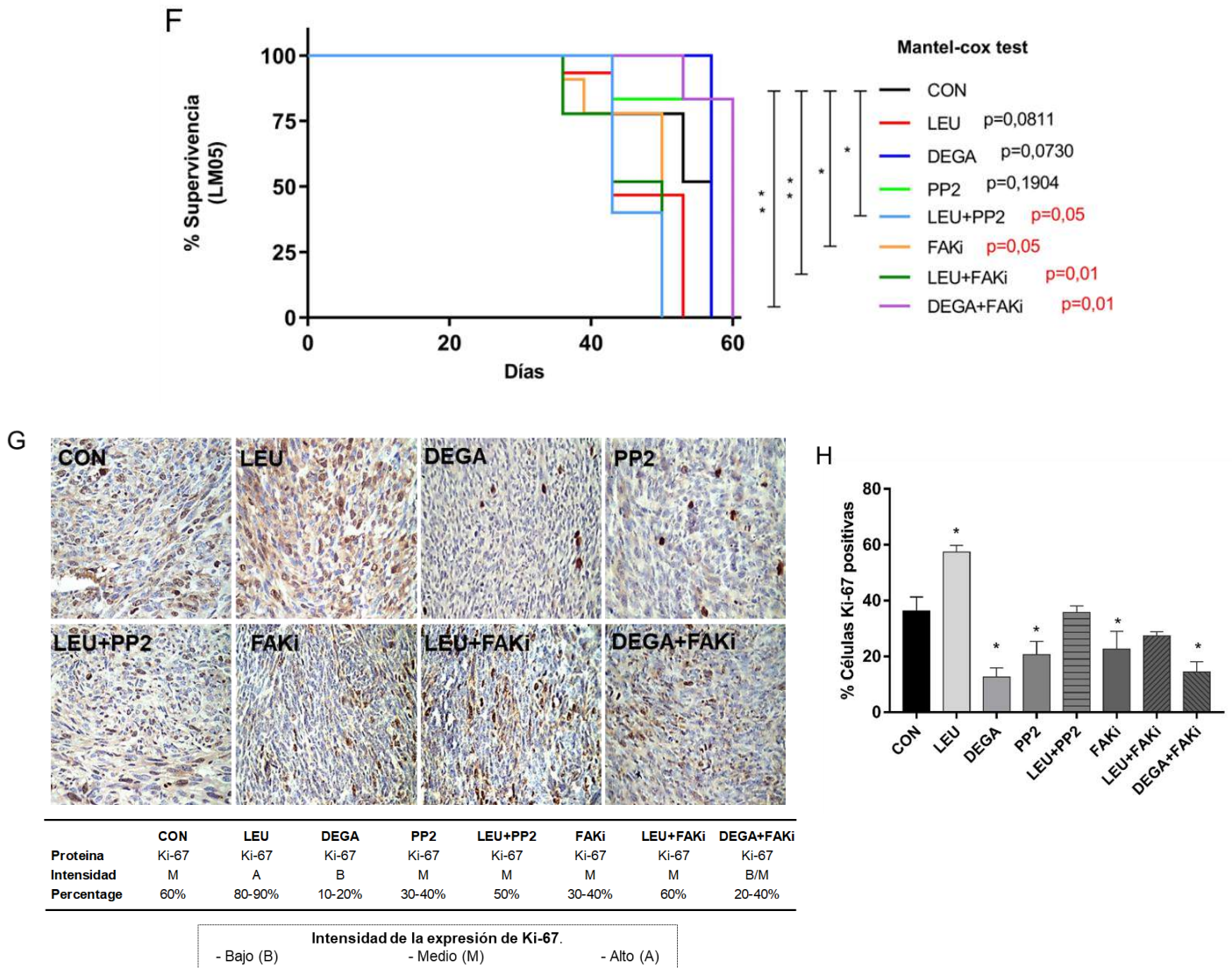


D



E





**Figura 33. Efecto del agonista y antagonista de GnRH sobre el crecimiento tumoral de las LM05.** **A)** Se realizó un ensayo de crecimiento de tumor ortotópico inoculando células de cáncer de mama murino LM05 pretratadas o no con PP2 (10 mM) y FAKi (1  $\mu$ M) durante 72 horas en la cuarta glándula mamaria de ratones BALB/c. Cuando los tumores son palpables aproximadamente 7 días después de la inoculación, los ratones recibieron una dosis subcutánea del agonista Leuprorelina (LEU; 0.1 mg/kg) y antagonista Degarelix (DEGA; 2 mg/kg). Se muestran imágenes representativas de los tumores del experimento en B-E. **B-E)** Se midieron los diámetros de los tumores dos veces por semana y se utilizaron para calcular el volumen del tumor. Cada punto de datos representa la media  $\pm$  SD, \* =  $p < 0,05$  vs. control, CON. La figura es representativa de dos experimentos independientes realizados con resultados similares. Para comparar los valores medios entre los diferentes grupos por día, 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%. **F)** Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia del punto final del animal definido como un tumor LEU, DEGA y/o PP2 (10 mM) y FAKi (1  $\mu$ M). El punto final del animal se definió como un diámetro del tumor mayor de 10 mm o cuando los animales mostraron signos de sufrimiento. Cada color representa un grupo experimental diferente. En negro, el grupo de control; en rojo, el grupo LEU; en azul, el grupo DEGA; en verde claro, el grupo PP2; en bordo, el grupo DEGA+PP2; en naranja, el grupo FAKi; y en morado, el grupo DEGA+FAKi. Cada punto de datos representa la media  $\pm$  SD, \*\*= $p < 0,01$  y \* =  $p < 0,05$  vs. control, CON. **G-H)** Se muestran imágenes y el porcentaje de tumor mamario positivo para Ki-67 de las células LM3 en relación con el control, CON, para cada condición experimental. \* =  $p < 0,05$  vs control, CON.

Los resultados obtenidos de la comparación entre las líneas celulares murinas de cáncer de mama LM3 y LM05 revelan diferencias significativas en la respuesta al tratamiento y la progresión tumoral.

La línea LM3, caracterizada por la ausencia de receptores de estrógenos y progesterona, exhibió un patrón más pronunciado de crecimiento tumoral y menor supervivencia en comparación con la línea LM05. Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar los subtipos moleculares y los perfiles de receptores hormonales al seleccionar terapias para el cáncer de mama. La presencia o ausencia de estos receptores puede influir en la sensibilidad a diferentes tratamientos y orientar la elección de enfoques terapéuticos más eficaces.

Además, los resultados destacan el potencial de los inhibidores específicos de quinasas, como PP2 y FAKi, para suprimir el crecimiento tumoral en ambas líneas celulares, independientemente de la expresión de receptores hormonales. La combinación de estos inhibidores con DEGA demostró una mayor eficacia en la reducción del crecimiento tumoral y la mejora de la supervivencia en ambas líneas celulares. Estos hallazgos sugieren que la inhibición de quinasas junto con DEGA puede ser una estrategia terapéutica prometedora en el tratamiento del cáncer de mama, incluso en tumores que no expresan receptores hormonales.

*Estos resultados resaltan que los tratamientos con LEU incrementan el crecimiento tumoral y proliferación celular, y sola y en combinación con PP2 y FAKi disminuyeron la supervivencia de los ratones, mientras que degarelix disminuyó el crecimiento tumoral, proliferación celular e incrementó la supervivencia de las líneas murinas LM05.*

## **CAPÍTULO 5**

### **DISCUSIÓN**

El cáncer de mama (CM) continúa siendo una problemática de salud relevante a nivel mundial, y es la principal causa de muerte en mujeres que lo padecen. Su tratamiento se vuelve difícil particularmente cuando ocurre metástasis, que es la diseminación del cáncer a otras partes del cuerpo. Cada año se diagnostican más de 300.000 nuevos casos de cáncer de mama [181]. A pesar de todos los tratamientos existentes y de los avances en las tasas de supervivencia, muchos pacientes experimentan recaídas y la mayoría de las muertes están relacionadas con la diseminación metastásica de la enfermedad. Por esta razón, la prevención de la metástasis es uno de los objetivos principales en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para el CM.

El CM se desarrolla en un entorno hormonal que determina el comportamiento del tumor y la respuesta clínica al tratamiento [182]. La mayoría de los CM expresan receptores de estrógenos, lo que indica que el tumor depende de estrógenos [180], y es modulado por terapias que reducen los niveles de estrógenos o inhiben sus receptores. Sin embargo, además de la influencia hormonal, factores genéticos también pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo y progresión del CM. Estudios recientes han identificado mutaciones en los genes LH y LHR que alteran los niveles de estrógeno y aumentan el riesgo de CM [183, 184]. Estas mutaciones podrían afectar la síntesis de estradiol, una hormona que promueve el crecimiento de las células mamarias y, por ende, la progresión del CM. En los últimos años, se ha propuesto que las gonadotropinas, además de su papel en la síntesis de estradiol, pueden tener un efecto directo en el desarrollo del CM. Aunque la evidencia disponible es limitada e inconsistente, algunos estudios sugieren que las gonadotropinas actúan como moduladores en la progresión de esta enfermedad [26, 73, 185, 186]. Investigaciones adicionales son necesarias para comprender mejor la relación entre las gonadotropinas y el CM, así como para determinar si la modulación de estas hormonas podría ser una estrategia terapéutica efectiva en el tratamiento de esta enfermedad.

Los hallazgos clave de este estudio demuestran que LH regula los procesos de adhesión, migración e invasión celular a través de la fosforilación de proteínas fundamentales del citoesqueleto de actina en la línea celular de CM T-47D. Nuestros resultados recientes indican la presencia de receptores funcionales de LH en estas células [82, 84]. Mediante una vía no genómica, LH, a través de su receptor LHR, desencadena el reclutamiento de diversas quinasas y proteínas de andamiaje que promueven la fosforilación y translocación de N-WASP, una proteína que desempeña un papel crucial en la regulación del citoesqueleto de actina y en la formación de protrusiones celulares, como lamellipodios y filopodios. Estas estructuras son importantes para la migración e invasión celular, procesos clave en el desarrollo y progresión del cáncer. En el cáncer de mama, se ha

observado que N-WASP está desregulado, lo que puede contribuir a la capacidad invasiva y metastásica de las células tumorales [140, 187]. Recientemente, se ha descubierto que varias hormonas y ligandos, como la triyodotironina [135], estradiol [100, 111], y Heregulina [167] activan N-WASP, promoviendo la migración e invasión celular en células de cáncer de mama. Esto induce la capacidad de ramificación de la actina a través de N-WASP y, por lo tanto, sugiere que podría ser un potencial blanco terapéutico para inhibir la invasión y metástasis en diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama. Considerando esto, Hebbrecht et al. (2017), han desarrollado nanopartículas dirigidas al dominio N-WASPVCA, responsable de la activación de Arp2/3, reduciendo así la formación de invadopodios en células de cáncer de mama, lo que resulta en un enfoque prometedor para abordar el CM [188]. Esta estrategia representa un nuevo enfoque farmacológico para limitar el potencial metastásico de las células cancerosas y mejorar los resultados del tratamiento en pacientes con cáncer de mama.

Asimismo, evaluamos la influencia de LH en la regulación de la formación de complejos de adhesiones focales (FAs). En células T-47D, observamos que LH aumenta rápidamente la fosforilación de FAK y paxilina, lo que induce sus translocaciones a los FAs, y potencia la formación de estructuras de membrana celular involucradas en la motilidad celular. En estudios previos, hemos reportado que varias hormonas ejercen un efecto regulador en la activación de los FAs. La formación de FAs es el primer paso para impulsar la reorganización del citoesqueleto de actina y lograr la motilidad celular [99, 100, 111, 145]. Además, se ha demostrado que FAK está sobreexpresada y activada en tumores de mama, y se la ha relacionado con la adquisición de características malignas, como la invasión, migración y la resistencia a la apoptosis. La activación anormal de FAK promueve la desregulación del citoesqueleto de actina, lo que permite a las células tumorales adquirir un fenotipo más invasivo y migratorio [92, 105, 169, 174].

Paxilina es otro componente crucial de las adhesiones focales. Una vez fosforilada, sirve como molécula de andamiaje que media en el ensamblaje y renovación de los FAs. Desempeña un papel importante en la transformación neoplásica debido a su capacidad para unirse directamente a varias proteínas oncogénicas, como las quinasas Src y FAK, interrumpiendo la adhesión normal y las cascadas de señalización de los factores de crecimiento necesarios para impulsar la migración e invasión celular [111, 122]. Varios estudios han informado que la sobreexpresión de paxilina se asocia con alteraciones y progresión maligna en tumores de mama [189]. Por lo tanto, paxilina podría utilizarse como un biomarcador pronóstico y también podría tener implicaciones en enfoques terapéuticos dirigidos a prevenir la invasión.

A continuación, exploramos el rol de cortactina, una proteína de unión a la actina y adaptadora con sitios de unión para diversas proteínas, como Src, FAK y la subunidad Arp3. Desempeña un papel central en la regulación de la motilidad celular al facilitar la formación de adhesiones focales y la



nucleación de actina, etapas cruciales en el proceso de migración celular [190, 191]. Además, funciona como un factor promotor de la nucleación actínica (*NPF*), que, junto con N-WASP, regula de forma individual o sinérgica a la activación del complejo Arp2/3 [138, 142, 190]. Nuestros hallazgos demuestran que LH aumenta la fosforilación y translocación de cortactina a las adhesiones focales, de manera dependiente de Src/FAK/paxilina. La inhibición de esta señalización, mediante el uso de inhibidores específicos, siRNA o construcciones mutantes, reduce significativamente la adhesión, migración e invasión celular, revelando así el papel fundamental de las proteínas de nucleación de actina en la tumorigénesis. En los últimos años se ha avanzado en la comprensión del papel de cortactina y su mecanismo molecular en la motilidad celular. Cortactina ha sido implicada en la formación de invadopodios, que son estructuras especializadas de la membrana celular involucradas en la migración y e invasión de las células tumorales. La capacidad de las células tumorales para formar invadopodios se correlaciona con su capacidad invasiva y metastásica [192]. Estudios previos, han determinado que la inhibición de la formación de invadopodios mediante el uso de micro-ARN vs. cortactina suprime la migración celular en el cáncer de pulmón [193]. Por lo contrario, la sobreexpresión de cortactina aumenta la migración celular en el cáncer oral [194]. Se han demostrado que la expresión de cortactina está aumentada en células tumorales de mama resistentes a tratamientos como la terapia hormonal o la quimioterapia [195]. Esto sugiere que cortactina podría influir en la resistencia a terapias y representa un posible blanco terapéutico para superar la resistencia en el CM. Por lo tanto, el tratamiento con inhibidores específicos de *NPF* podría ser, una alternativa interesante para contrarrestar la progresión tumoral. Actualmente, Dasatinib, un fármaco que interrumpe la señalización de Src/cortactina, está siendo probado como fármaco que bloquea la activación de la nucleación actínica [192].

Por otro lado, nuestros hallazgos también destacan que LH ejerce una influencia directa sobre la interacción basal de las subunidades FAK/cortactina/Arp3. Además, hemos identificado que este efecto puede ser contrarrestado mediante la administración del inhibidor específico de Src, conocido como PP2. Esta constancia se alinea con investigaciones recientes que señalan que los esteroides sexuales disminuyen la asociación entre la cortactina y la subunidad Arp3 en las células neuronales corticales [145]. Proponemos que la fosforilación específica de estas proteínas afecta su interacción como consecuencia de impedimentos físicos que involucran un ciclo de unión, fosforilación y posterior disociación, acompañado por el recambio de FAs y el movimiento celular. Este resultado concuerda con el trabajo de Wang y col., que reporta que la fosforilación en residuos de tirosina de cortactina puede ocasionar la ruptura entre ella y FAK, para promover la migración celular [136]. Nuestros resultados demuestran que una regulación precisa de Arp2/3 es crucial para la migración, invasión y metástasis celular. Actualmente existen varios inhibidores del complejo Arp2/3, como CK-666, que están disponibles y que detienen la motilidad celular al alterar la

ramificación de la actina. Sin embargo, se requiere una mayor investigación sobre los inhibidores de Arp2/3 para comprender mejor los mecanismos de la actividad de Arp2/3, dado que su activación descontrolada se ha relacionado con la aparición y progresión de muchas enfermedades, incluido el CM [196].

Las gonadotropinas desempeñan un papel importante en la transición a la menopausia. Durante este período, los niveles séricos de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) aumentan significativamente durante un período de 3 a 9 años [197]. Estas variaciones pueden dar lugar a cambios fisiológicos que impactan en la salud de la mujer. Se ha observado que niveles elevados de gonadotropinas están asociados con diversas patologías. Se ha descrito que LH promueve la migración e invasión celular en el cáncer de ovario [198], endometrio [199] y mama [82]. Casadesús et al. (2007) describieron que los niveles elevados de LH están asociados con disminuciones en el rendimiento cognitivo. En cuanto al receptor de LH (LHR), la sobreexpresión de este receptor en células de cáncer de endometrio ha demostrado aumentar la invasividad, el desarrollo tumoral y la metástasis a distancia [200]. Toda esta evidencia destaca las diversas acciones extragonadales de las gonadotropinas y sus consecuencias fisiológicas.

En conjunto, nuestros experimentos revelan una señalización rápida de LH a través de su receptor extragonadal (LHR), promoviendo la fosforilación de Src/FAK/paxillin/cortactin/N-WASP y el complejo Arp2/3 aumentando la adhesión, migración e invasión de células de CM. Estos hallazgos destacan la capacidad de LH para promover la progresión del cáncer de mama, especialmente en mujeres posmenopáusicas con niveles elevados de gonadotropinas circulantes debido a la falta de ciclo menstrual. Por lo tanto, regular los niveles de gonadotropina podría ser una estrategia terapéutica prometedora para pacientes con CM.

Además, llevamos a cabo análisis in silico y verificación por western blot, para confirmar la expresión de LHCGR, FSHR, SRC y PTK2 en diferentes líneas celulares de CM. Observamos que LHCGR y FSHR, los cuales codifican para LHR y FSHR respectivamente, se expresan de forma basal y uniforme en todas las líneas celulares de CM. Varios estudios han demostrado que LHR y FSHR se expresan ampliamente en tumores de mama humanos [79, 84] y en líneas celulares de CM [78, 82, 83, 201]. Además, confirmamos que la expresión de SRC y PTK2, que codifican Src y FAK respectivamente, es alta en todas las líneas celulares de CM. Se ha observado la sobreexpresión y el aumento de la actividad de Src/FAK en múltiples tumores malignos humanos, asociados con un fenotipo más invasivo y metastásico [112-115, 202]. Src y FAK han sido reconocidos recientemente como los principales reguladores de la motilidad celular, especialmente durante la diseminación tumoral. Debido a las evidencias que respalda su papel en los procesos malignos, Src y FAK se consideran biomarcadores prometedores contra el cáncer. Actualmente, los inhibidores de Src y

FAK se utilizan en combinación con otros agentes terapéuticos para desarrollar estrategias más efectivas en el tratamiento del cáncer [171, 174].

Al combinar estos hallazgos, se resalta la importancia de la señalización de LH a través de LHR en la progresión del cáncer de mama, lo cual abre nuevas posibilidades terapéuticas mediante la regulación de los niveles de gonadotropina. Estos datos exploratorios respaldan firmemente la hipótesis de que la inhibición de LH y sus receptores, así como la modulación de las vías de señalización relacionadas, podrían ofrecer nuevas estrategias terapéuticas para reducir el crecimiento tumoral en los cánceres sensibles a las gonadotropinas. Existen fármacos disponibles que reducen la síntesis y liberación de LH/FSH mediante agonistas y antagonistas de GnRH. Los agonistas de GnRH suprimen los niveles de esteroides sexuales y se utilizan como tratamiento adyuvante de tumores sensibles a hormonas, como el cáncer de próstata o de mama [26, 203]. Los pacientes con cáncer de próstata son tratados con agonistas de LHR como terapia de primera línea para regular la expresión de LHR en la glándula pituitaria promoviendo una disminución de LH, lo que conduce a una reducción en la síntesis de andrógenos [204]. El mismo enfoque se ha propuesto para tratar a pacientes con cáncer de vejiga metastásico y expresión positiva de LHR [205]. Investigaciones en terapias dirigidas contra LH y FSH han mostrado resultados prometedores en la inhibición de la progresión tumoral y la metástasis en modelos preclínicos de cáncer de mama. Además, algunos estudios sugieren que los pacientes tratados con gonadotropinas para inducir la ovulación [52] o con medicamentos que aumentan sus niveles circulantes [206, 207] pueden tener un mayor riesgo de contraer cáncer de mama.

Es por ello, que en el presente estudio exploramos el uso de agonistas de GnRH (Leuprorelin, LEU) y/o antagonistas (Degarelix, DEGA), así como el uso de inhibidores específicos de Src (PP2) y FAK (FAKi) en un modelo murino de cáncer de mama. Nuestros resultados demuestran que el antagonista DEGA inhibe del crecimiento tumoral en comparación con el control, mientras que el agonista LEU tendió a aumentar el crecimiento tumoral en tumores murinos de mama. Estos resultados son consistentes con estudios previos que demuestran que Degarelix suprime de manera significativa el crecimiento tumoral inmediatamente después de su administración, con una eficacia similar a la castración quirúrgica [208]. Por otro lado, en un modelo murino de cáncer de próstata, no se observó variación del crecimiento tumoral con leuprorelina en comparación con el grupo de control [209, 210]. Además, determinamos que el uso de inhibidores de Src y FAK, PP2 y FAKi respectivamente, disminuyen el crecimiento tumoral con respecto a control. Varios estudios han demostrado que diferentes inhibidores de Src y FAK pueden inducir una disminución en el crecimiento tumoral, metástasis, angiogénesis, motilidad y proliferación celular [110, 171, 174, 202].

Hasta la fecha, no existen estudios que evalúen la combinación del agonista y/o antagonista de GnRH, junto con inhibidores de Src y/o FAK en el tratamiento del CM. Por lo tanto, nuestros hallazgos son prometedores en cuanto demuestran que la administración de DEGA más PP2 y/o FAKi reduce el volumen tumoral a partir de los quince días posteriores a la inoculación ortotópica y mejora la supervivencia de los ratones. Además, mostramos que la combinación de DEGA más PP2 y/o FAKi disminuye la expresión de Ki-67 en los tumores, lo que indica un estado más diferenciado y una reducción en la proliferación celular tumoral.

Si consideramos que las gonadotropinas pueden estimular el desarrollo del CM, sería primordial explorar enfoques terapéuticos en mujeres posmenopáusicas. Estas mujeres presentan niveles elevados de LH y FSH en circulación, lo que se asocia con una mayor incidencia de cáncer de mama [211]. Estos hallazgos respaldan firmemente la hipótesis de que la combinación de antagonistas de GnRH, junto con inhibidores específicos de quinasas (PP2 y/o FAKi) podría ofrecer nuevos enfoques terapéuticos destinados a reducir el crecimiento tumoral en aquellos tipos de cáncer sensibles a las gonadotropinas. Particularmente en este trabajo de investigación, hemos revelado aspectos novedosos relacionados con la modulación de factores promotores nucleares, como cortactina y N-WASP, en el control del complejo regulador de actina Arp2/3, el cual desempeña un papel crucial en la nucleación de actina. Mediante nuestros experimentos, hemos dilucidado la vía de señalización a través de la cual LH, mediado por su receptor LHR, desencadena la fosforilación de Src/FAK, paxilina/cortactina-N-WASP y el complejo Arp2/3, regulando así la adhesión, migración e invasión en las células de CM.

Desde esta perspectiva, nuestros hallazgos aportan nuevos conocimientos sobre la expresión de un conjunto de genes y proteínas que están directamente relacionadas en la progresión tumoral en CM. Estos descubrimientos tienen el potencial de permitirnos modular su expresión con el fin de potenciar las respuestas a las terapias y mejorar la progresión de esta enfermedad. Además, hemos observado un papel crucial desempeñado por las gonadotropinas en la regulación de los genes involucrados en la motilidad celular y los procesos que fomentan la progresión del cáncer en las células mamarias. En vista a la complejidad de la señalización de LH en el cáncer de mama, hemos identificado una prometedora estrategia terapéutica que involucra el uso de antagonistas de GnRH-R, como degarelix en combinación con inhibidores de Src (PP2) y/o FAK (FAKi). Estos agentes en conjunto podrían ser capaces de modular el crecimiento tumoral en pacientes con cáncer de mama. Estos hallazgos podrían sentar las bases para el desarrollo de nuevos fármacos que interrumpan la capacidad de los tumores de mama de mantener un fenotipo maligno, especialmente en mujeres posmenopáusicas, y así inhibir la propagación de las células cancerosas en estas pacientes.

En conclusión, este estudio ha proporcionado una mayor comprensión de los mecanismos involucrados en la señalización de LH y su influencia en la progresión del cáncer de mama. Nuestros

hallazgos sugieren nuevas estrategias terapéuticas potenciales que podrían tener un impacto significativo en el tratamiento del cáncer de mama y mejorar la calidad de vida de las pacientes afectadas

## **CAPÍTULO 6**

### **CONCLUSIONES**

En conclusión, este trabajo resalta los mecanismos moleculares de la acción de la hormona Luteinizante en la motilidad celular, a través de la regulación de vías de señalización mediadas por importantes reguladores actínicos.

- LH promueve la reorganización del citoesqueleto actínico en células de cáncer de mama, a través de mecanismos rápidos (no genómicos). Este efecto se logra al controlar proteínas reguladoras del citoesqueleto actínico, como N-WASP, que facilita el proceso de migración celular.
- LHR actúa como un potente regulador de proteínas claves que reclutan señales provenientes del remodelamiento actínico, formación de complejos de adhesión focal, y consecuente nucleación actínica.
- LH, a través de su receptor, estimula la fosforilación y activación de proteínas clave, como Src, FAK, paxilina, cortactina, N-WASP y el complejo Arp2/3. Estas proteínas desempeñan un papel fundamental en la adhesión, migración e invasión celular en el cáncer de mama.
- El receptor de las gonadotropinas (LHR) se expresa de forma extragonadal, en células de CM con diversos subtipos molecular, sensibles a hormonas (ER+/PR+) e independientes a hormonas (HER2+ y Triple negativo).
- Estos fenómenos biológicos nos proporcionan información invaluable sobre efecto extragonadal de LH, lo que abre nuevas perspectivas en términos de estrategias terapéuticas para la prevención y control del cáncer de mama. Esto es especialmente relevante en pacientes que presentan elevados niveles de gonadotropinas, como en mujeres postmenopáusicas.
- El uso de agonistas (Leuprorelina) y antagonistas (Degarelix) de GnRH podrían ser una herramienta útil con el fin de reducir los niveles de gonadotropinas, interfiriendo o disminuyendo con la aparición y/o progresión de metástasis a nivel mamario.
- Comprender en mayor profundidad los pasos claves que promueven la invasión y metástasis celular es de suma importancia para el estudio y desarrollo de posibles nuevos blancos terapéuticos en el cáncer de mama. Específicamente, se busca identificar proteínas quinasas como posibles objetivos terapéuticos, con el objetivo de intervenir en esta patología, sin importar el subtipo molecular del CM.

**CAPÍTULO 7****REFERENCIAS**

1. Siegel, R.L., et al., *Cancer statistics, 2022*. CA Cancer J Clin, 2022. **72**(1): p. 7-33.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Lukasiewicz, S., et al., *Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review*. Cancers (Basel), 2021. **13**(17).
4. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8418-23.
5. Russo, J. and I.H. Russo, *Development of the human breast*. Maturitas, 2004. **49**(1): p. 2-15.
6. Waks, A.G. and E.P. Winer, *Breast Cancer Treatment: A Review*. JAMA, 2019. **321**(3): p. 288-300.
7. Perou, C.M. and A.L. Borresen-Dale, *Systems biology and genomics of breast cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(2).
8. Sergina, N.V. and M.M. Moasser, *The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets*. Trends Mol Med, 2007. **13**(12): p. 527-34.
9. Cheang, M.C., et al., *Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression*. Oncologist, 2015. **20**(5): p. 474-82.
10. Onitilo, A.A., et al., *Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival*. Clin Med Res, 2009. **7**(1-2): p. 4-13.
11. Parise, C.A. and V. Caggiano, *Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers*. J Cancer Epidemiol, 2014. **2014**: p. 469251.
12. Holliday, D.L. and V. Speirs, *Choosing the right cell line for breast cancer research*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(4): p. 215.
13. Blows, F.M., et al., *Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies*. PLoS Med, 2010. **7**(5): p. e1000279.
14. Anderson, K.N., R.B. Schwab, and M.E. Martinez, *Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **144**(1): p. 1-10.
15. Kaminska, M., et al., *Breast cancer risk factors*. Prz Menopauzalny, 2015. **14**(3): p. 196-202.
16. Hall, J.E., *Neuroendocrine physiology of the early and late menopause*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2004. **33**(4): p. 637-59.
17. Burger, H., *The menopausal transition--endocrinology*. J Sex Med, 2008. **5**(10): p. 2266-73.
18. Burger, H.G., et al., *A review of hormonal changes during the menopausal transition: focus on findings from the Melbourne Women's Midlife Health Project*. Hum Reprod Update, 2007. **13**(6): p. 559-65.
19. Su, H.I. and E.W. Freeman, *Hormone changes associated with the menopausal transition*. Minerva Ginecol, 2009. **61**(6): p. 483-9.
20. Hale, G.E. and H.G. Burger, *Hormonal changes and biomarkers in late reproductive age, menopausal transition and menopause*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2009. **23**(1): p. 7-23.
21. Fait, T., *Menopause hormone therapy: latest developments and clinical practice*. Drugs Context, 2019. **8**: p. 212551.
22. Chlebowski, R.T., et al., *Estrogen plus progestin and breast cancer detection by means of mammography and breast biopsy*. Arch Intern Med, 2008. **168**(4): p. 370-7; quiz 345.
23. Anderson, G.L., et al., *Conjugated equine oestrogen and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women with hysterectomy: extended follow-up of the*

- Women's Health Initiative randomised placebo-controlled trial.* Lancet Oncol, 2012. **13**(5): p. 476-86.
24. Practice Committee of American Society for Reproductive, M., *The menopausal transition.* Fertil Steril, 2008. **90**(5 Suppl): p. S61-5.
  25. Manavathi, B., et al., *Derailed estrogen signaling and breast cancer: an authentic couple.* Endocr Rev, 2013. **34**(1): p. 1-32.
  26. Huhtaniemi, I., *Are gonadotrophins tumorigenic--a critical review of clinical and experimental data.* Mol Cell Endocrinol, 2010. **329**(1-2): p. 56-61.
  27. Knobil, E., *Patterns of hormonal signals and hormone action.* N Engl J Med, 1981. **305**(26): p. 1582-3.
  28. Ulloa-Aguirre, A., et al., *Novel pathways in gonadotropin receptor signaling and biased agonism.* Rev Endocr Metab Disord, 2011. **12**(4): p. 259-74.
  29. Ulloa-Aguirre, A., et al., *Constitutive activity in gonadotropin receptors.* Adv Pharmacol, 2014. **70**: p. 37-80.
  30. Schalch, D.S., et al., *Measurement of human luteinizing hormone in plasma by radioimmunoassay.* J Clin Invest, 1968. **47**(3): p. 665-78.
  31. Brekelmans, C.T., *Risk factors and risk reduction of breast and ovarian cancer.* Curr Opin Obstet Gynecol, 2003. **15**(1): p. 63-8.
  32. Choi, J.H., et al., *Gonadotropins activate proteolysis and increase invasion through protein kinase A and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human epithelial ovarian cancer cells.* Cancer Res, 2006. **66**(7): p. 3912-20.
  33. Hajian-Tilaki, K.O. and T. Kaveh-Ahangar, *Reproductive factors associated with breast cancer risk in northern Iran.* Med Oncol, 2011. **28**(2): p. 441-6.
  34. Huo, D., et al., *Parity and breastfeeding are protective against breast cancer in Nigerian women.* Br J Cancer, 2008. **98**(5): p. 992-6.
  35. Jiang, X., J.A. Dias, and X. He, *Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: insights to signaling.* Mol Cell Endocrinol, 2014. **382**(1): p. 424-451.
  36. Segaloff, D.L. and M. Ascoli, *The lutropin/choriogonadotropin receptor ... 4 years later.* Endocr Rev, 1993. **14**(3): p. 324-47.
  37. Gharib, S.D., et al., *Molecular biology of the pituitary gonadotropins.* Endocr Rev, 1990. **11**(1): p. 177-99.
  38. Bousfield, G.R. and J.A. Dias, *Synthesis and secretion of gonadotropins including structure-function correlates.* Rev Endocr Metab Disord, 2011. **12**(4): p. 289-302.
  39. Tsutsumi, R. and N.J. Webster, *GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction.* Endocr J, 2009. **56**(6): p. 729-37.
  40. Kaiser, U.B., P.M. Conn, and W.W. Chin, *Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines.* Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 46-70.
  41. Burger, H.G., et al., *Hormonal changes in the menopause transition.* Recent Prog Horm Res, 2002. **57**: p. 257-75.
  42. Limonta, P., et al., *GnRH receptors in cancer: from cell biology to novel targeted therapeutic strategies.* Endocr Rev, 2012. **33**(5): p. 784-811.
  43. Stamatiades, G.A. and U.B. Kaiser, *Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression.* Mol Cell Endocrinol, 2018. **463**: p. 131-141.
  44. Grundker, C., et al., *Invasion and increased expression of S100A4 and CYR61 in mesenchymal transformed breast cancer cells is downregulated by GnRH.* Int J Oncol, 2016. **48**(6): p. 2713-21.
  45. Huerta-Reyes, M., et al., *Treatment of Breast Cancer With Gonadotropin-Releasing Hormone Analogs.* Front Oncol, 2019. **9**: p. 943.
  46. Ramakrishnappa, N., et al., *GnRH in non-hypothalamic reproductive tissues.* Anim Reprod Sci, 2005. **88**(1-2): p. 95-113.
  47. Rossi, L. and O. Pagani, *The Role of Gonadotropin-Releasing-Hormone Analogues in the Treatment of Breast Cancer.* J Womens Health (Larchmt), 2018. **27**(4): p. 466-475.



48. Huhtaniemi, I., et al., *Will GnRH antagonists improve prostate cancer treatment?* Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(1): p. 43-50.
49. Tarlatzis, B.C. and E.M. Kolibianakis, *GnRH agonists vs antagonists*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2007. **21**(1): p. 57-65.
50. Hayden, C., *GnRH analogues: applications in assisted reproductive techniques*. Eur J Endocrinol, 2008. **159 Suppl 1**: p. S17-25.
51. Loumaye, E., *The control of endogenous secretion of LH by gonadotrophin-releasing hormone agonists during ovarian hyperstimulation for in-vitro fertilization and embryo transfer*. Hum Reprod, 1990. **5**(4): p. 357-76.
52. Pappo, I., et al., *The possible association between IVF and breast cancer incidence*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(4): p. 1048-55.
53. Struthers, R.S., et al., *Suppression of gonadotropins and estradiol in premenopausal women by oral administration of the nonpeptide gonadotropin-releasing hormone antagonist elagolix*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(2): p. 545-51.
54. Tahara, M., et al., *Treatment of endometriosis with a decreasing dosage of a gonadotropin-releasing hormone agonist (nafarelin): a pilot study with low-dose agonist therapy ("draw-back" therapy)*. Fertil Steril, 2000. **73**(4): p. 799-804.
55. Robertson, J.F. and R.W. Blamey, *The use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonists in early and advanced breast cancer in pre- and perimenopausal women*. Eur J Cancer, 2003. **39**(7): p. 861-9.
56. Maggi, R., et al., *GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system*. Hum Reprod Update, 2016. **22**(3): p. 358-81.
57. Van Poppel, H. and L. Klotz, *Gonadotropin-releasing hormone: an update review of the antagonists versus agonists*. Int J Urol, 2012. **19**(7): p. 594-601.
58. Plosker, G.L. and R.N. Brogden, *Leuprorelin. A review of its pharmacology and therapeutic use in prostatic cancer, endometriosis and other sex hormone-related disorders*. Drugs, 1994. **48**(6): p. 930-67.
59. Emons, G. and A.V. Schally, *The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers*. Hum Reprod, 1994. **9**(7): p. 1364-79.
60. Kendzierski, D.C., B.P. Schneider, and P.J. Kiel, *Efficacy of Different Leuprolide Administration Schedules in Premenopausal Breast Cancer: A Retrospective Review*. Clin Breast Cancer, 2018. **18**(5): p. e939-e942.
61. Corona, S.P., et al., *Could gonadotropin-releasing hormone analogs be helpful in the treatment of triple-negative breast cancer?* Future Oncol, 2017. **13**(27): p. 2473-2477.
62. Kurebayashi, J., et al., *Efficacy and safety of leuprorelin acetate 6-month depot, TAP-144-SR (6M), in combination with tamoxifen in postoperative, premenopausal patients with hormone receptor-positive breast cancer: a phase III, randomized, open-label, parallel-group comparative study*. Breast Cancer, 2017. **24**(1): p. 161-170.
63. Gourd, E., *Degarelix improves suppression of ovarian function*. Lancet Oncol, 2019. **20**(2): p. e73.
64. Sakai, M., et al., *In search of the molecular mechanisms mediating the inhibitory effect of the GnRH antagonist degarelix on human prostate cell growth*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0120670.
65. Shore, N.D., *Experience with degarelix in the treatment of prostate cancer*. Ther Adv Urol, 2013. **5**(1): p. 11-24.
66. Dellapasqua, S., et al., *Neoadjuvant Degarelix Versus Triptorelin in Premenopausal Patients Who Receive Letrozole for Locally Advanced Endocrine-Responsive Breast Cancer: A Randomized Phase II Trial*. J Clin Oncol, 2019. **37**(5): p. 386-395.
67. Dufau, M.L., *The luteinizing hormone receptor*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 461-96.
68. Angelova, K., P. Narayan, and D. Puett, *The luteinizing hormone receptor: influence of buffer composition on ligand binding and signaling of wild type and mutant receptors*. Mol Cell Endocrinol, 2003. **204**(1-2): p. 1-9.

69. Chen, H., R.S. Ge, and B.R. Zirkin, *Leydig cells: From stem cells to aging*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **306**(1-2): p. 9-16.
70. Jeppesen, J.V., et al., *LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(8): p. E1524-31.
71. Sharpe, R.M., *Intratesticular control of steroidogenesis*. Clin Endocrinol (Oxf), 1990. **33**(6): p. 787-807.
72. Dias, J.A., et al., *Molecular, structural, and cellular biology of follitropin and follitropin receptor*. Vitam Horm, 2002. **64**: p. 249-322.
73. Huhtaniemi, I., *A short evolutionary history of FSH-stimulated spermatogenesis*. Hormones (Athens), 2015. **14**(4): p. 468-78.
74. Richards, J.S. and S.A. Pangas, *The ovary: basic biology and clinical implications*. J Clin Invest, 2010. **120**(4): p. 963-72.
75. Ulloa-Aguirre, A., E. Reiter, and P. Crepieux, *FSH Receptor Signaling: Complexity of Interactions and Signal Diversity*. Endocrinology, 2018. **159**(8): p. 3020-3035.
76. Simoni, M., J. Gromoll, and E. Nieschlag, *The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology*. Endocr Rev, 1997. **18**(6): p. 739-73.
77. Wayne, C.M., et al., *Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(8): p. 1940-57.
78. Jiang, X., I.H. Russo, and J. Russo, *Alternately spliced luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor mRNA in human breast epithelial cells*. Int J Oncol, 2002. **20**(4): p. 735-8.
79. Meduri, G., et al., *Luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in breast cancer*. Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 857-64.
80. Meduri, G., et al., *Luteinizing hormone receptor status and clinical, pathologic, and prognostic features in patients with breast carcinomas*. Cancer, 2003. **97**(7): p. 1810-6.
81. Planeix, F., et al., *Endothelial follicle-stimulating hormone receptor expression in invasive breast cancer and vascular remodeling at tumor periphery*. J Exp Clin Cancer Res, 2015. **34**: p. 12.
82. Sanchez, A.M., et al., *LH and FSH promote migration and invasion properties of a breast cancer cell line through regulatory actions on the actin cytoskeleton*. Mol Cell Endocrinol, 2016. **437**: p. 22-34.
83. Bodek, G., et al., *A novel approach of targeted ablation of mammary carcinoma cells through luteinizing hormone receptors using Hecate-CGbeta conjugate*. Breast Cancer Res Treat, 2003. **79**(1): p. 1-10.
84. Sanchez, A.M., et al., *Regulatory Actions of LH and Follicle-Stimulating Hormone on Breast Cancer Cells and Mammary Tumors in Rats*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 239.
85. Hudelist, G., et al., *Beta-hCG/LH receptor (b-HCG/LH-R) expression is increased in invasive versus preinvasive breast cancer: implications for breast carcinogenesis?* J Cancer Res Clin Oncol, 2009. **135**(2): p. 191-5.
86. Mikola, M., et al., *High levels of luteinizing hormone analog stimulate gonadal and adrenal tumorigenesis in mice transgenic for the mouse inhibin-alpha-subunit promoter/Simian virus 40 T-antigen fusion gene*. Oncogene, 2003. **22**(21): p. 3269-78.
87. Aseervatham, J., *Cytoskeletal Remodeling in Cancer*. Biology (Basel), 2020. **9**(11).
88. Janssens, J.P., et al., *Human chorionic gonadotropin (hCG) and prevention of breast cancer*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **269**(1-2): p. 93-8.
89. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
90. Jiang, P., A. Enomoto, and M. Takahashi, *Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signalling and the actin cytoskeleton*. Cancer Lett, 2009. **284**(2): p. 122-30.

91. Yamazaki, D., S. Kurisu, and T. Takenawa, *Regulation of cancer cell motility through actin reorganization*. *Cancer Sci*, 2005. **96**(7): p. 379-86.
92. Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(1): p. 56-68.
93. Pollard, T.D. and G.G. Borisy, *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. *Cell*, 2003. **112**(4): p. 453-65.
94. Lambrechts, A., M. Van Troys, and C. Ampe, *The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(10): p. 1890-909.
95. Flamini, M.I., et al., *Effects of raloxifene on breast cancer cell migration and invasion through the actin cytoskeleton*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(8B): p. 2396-2407.
96. Flamini, M.I., et al., *Differential actions of estrogen and SERMs in regulation of the actin cytoskeleton of endometrial cells*. *Mol Hum Reprod*, 2009. **15**(10): p. 675-85.
97. Fu, X.D., et al., *Extra-nuclear signaling of progesterone receptor to breast cancer cell movement and invasion through the actin cytoskeleton*. *PLoS One*, 2008. **3**(7): p. e2790.
98. Mattila, P.K. and P. Lappalainen, *Filopodia: molecular architecture and cellular functions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(6): p. 446-54.
99. Sanchez, A.M., et al., *Estrogen receptor-alpha promotes breast cancer cell motility and invasion via focal adhesion kinase and N-WASP*. *Mol Endocrinol*, 2010. **24**(11): p. 2114-25.
100. Sanchez, A.M., et al., *Rapid signaling of estrogen to WAVE1 and moesin controls neuronal spine formation via the actin cytoskeleton*. *Mol Endocrinol*, 2009. **23**(8): p. 1193-202.
101. Sanchez, A.M., et al., *Estrogen receptor- $\alpha$  promotes endothelial cell motility through focal adhesion kinase*. *Mol Hum Reprod*, 2011. **17**(4): p. 219-26.
102. Sanchez, A.M. and T. Simoncini, *Extra-nuclear signaling of ER $\alpha$  to the actin cytoskeleton in the central nervous system*. *Steroids*, 2010. **75**(8-9): p. 528-32.
103. Sanchez, A.M., et al., *Effects of progesterone and medroxyprogesterone on actin remodeling and neuronal spine formation*. *Mol Endocrinol*, 2013. **27**(4): p. 693-702.
104. Zhao, X. and J.L. Guan, *Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011. **63**(8): p. 610-5.
105. Luo, M. and J.L. Guan, *Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis*. *Cancer Lett*, 2010. **289**(2): p. 127-39.
106. Wu, X., et al., *Focal adhesion kinase regulation of N-WASP subcellular localization and function*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(10): p. 9565-76.
107. McLean, G.W., et al., *The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(7): p. 505-15.
108. Romer, L.H., K.G. Birukov, and J.G. Garcia, *Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus*. *Circ Res*, 2006. **98**(5): p. 606-16.
109. Roskoski, R., Jr., *A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors*. *Pharmacol Res*, 2015. **100**: p. 1-23.
110. Tapial Martinez, P., P. Lopez Navajas, and D. Lietha, *FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions*. *Biomolecules*, 2020. **10**(2).
111. Shortrede, J.E., et al., *Paxillin, a novel controller in the signaling of estrogen to FAK/N-WASP/Arp2/3 complex in breast cancer cells*. *Mol Cell Endocrinol*, 2016. **430**: p. 56-67.
112. Bolos, V., et al., *The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer*. *Onco Targets Ther*, 2010. **3**: p. 83-97.
113. Deramaudt, T.B., et al., *Altering FAK-paxillin interactions reduces adhesion, migration and invasion processes*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e92059.
114. Irby, R.B. and T.J. Yeatman, *Role of Src expression and activation in human cancer*. *Oncogene*, 2000. **19**(49): p. 5636-42.
115. Mayer, E.L. and I.E. Krop, *Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(14): p. 3526-32.
116. Finn, R.S., *Targeting Src in breast cancer*. *Ann Oncol*, 2008. **19**(8): p. 1379-1386.
117. Lu, Y. and H. Sun, *Progress in the Development of Small Molecular Inhibitors of Focal Adhesion Kinase (FAK)*. *J Med Chem*, 2020. **63**(23): p. 14382-14403.

118. Pang, X.J., et al., *Drug Discovery Targeting Focal Adhesion Kinase (FAK) as a Promising Cancer Therapy*. *Molecules*, 2021. **26**(14).
119. Parkin, A., et al., *Targeting the complexity of Src signalling in the tumour microenvironment of pancreatic cancer: from mechanism to therapy*. *FEBS J*, 2019. **286**(18): p. 3510-3539.
120. Lo, S.H., *Focal adhesions: what's new inside*. *Dev Biol*, 2006. **294**(2): p. 280-91.
121. Zaidel-Bar, R., et al., *A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 1): p. 137-48.
122. Lopez-Colome, A.M., et al., *Paxillin: a crossroad in pathological cell migration*. *J Hematol Oncol*, 2017. **10**(1): p. 50.
123. Deakin, N.O. and C.E. Turner, *Paxillin comes of age*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 15): p. 2435-44.
124. Xu, W., et al., *Paxillin promotes breast tumor collective cell invasion through maintenance of adherens junction integrity*. *Mol Biol Cell*, 2022. **33**(2): p. ar14.
125. Buday, L. and J. Downward, *Roles of cortactin in tumor pathogenesis*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1775**(2): p. 263-73.
126. Meiler, E., E. Nieto-Pelegrin, and N. Martinez-Quiles, *Cortactin tyrosine phosphorylation promotes its deacetylation and inhibits cell spreading*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e33662.
127. Jing, X., et al., *Cortactin promotes cell migration and invasion through upregulation of the dedicator of cytokinesis 1 expression in human colorectal cancer*. *Oncol Rep*, 2016. **36**(4): p. 1946-1952.
128. Kirkbride, K.C., et al., *Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness*. *Cell Adh Migr*, 2011. **5**(2): p. 187-98.
129. Hammer, A., S. Laghate, and M. Diakonova, *Src tyrosyl phosphorylates cortactin in response to prolactin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **463**(4): p. 644-9.
130. Kowalski, J.R., et al., *Cortactin regulates cell migration through activation of N-WASP*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 1): p. 79-87.
131. Weaver, A.M., *Cortactin in tumor invasiveness*. *Cancer Lett*, 2008. **265**(2): p. 157-66.
132. Rothschild, B.L., et al., *Cortactin overexpression regulates actin-related protein 2/3 complex activity, motility, and invasion in carcinomas with chromosome 11q13 amplification*. *Cancer Res*, 2006. **66**(16): p. 8017-25.
133. Uruno, T., et al., *Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(3): p. 259-66.
134. Weed, S.A., et al., *Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex*. *J Cell Biol*, 2000. **151**(1): p. 29-40.
135. Uzair, I.D., et al., *Molecular Actions of Thyroid Hormone on Breast Cancer Cell Migration and Invasion via Cortactin/N-WASP*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019. **10**: p. 139.
136. Wang, W., Y. Liu, and K. Liao, *Tyrosine phosphorylation of cortactin by the FAK-Src complex at focal adhesions regulates cell motility*. *BMC Cell Biol*, 2011. **12**: p. 49.
137. Helgeson, L.A. and B.J. Nolen, *Mechanism of synergistic activation of Arp2/3 complex by cortactin and N-WASP*. *Elife*, 2013. **2**: p. e00884.
138. Yin, M., W. Ma, and L. An, *Cortactin in cancer cell migration and invasion*. *Oncotarget*, 2017. **8**(50): p. 88232-88243.
139. Helgeson, L.A., et al., *Interactions with actin monomers, actin filaments, and Arp2/3 complex define the roles of WASP family proteins and cortactin in coordinately regulating branched actin networks*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(42): p. 28856-69.
140. Frugtniet, B., W.G. Jiang, and T.A. Martin, *Role of the WASP and WAVE family proteins in breast cancer invasion and metastasis*. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2015. **7**: p. 99-109.
141. Uruno, T., et al., *Sequential interaction of actin-related proteins 2 and 3 (Arp2/3) complex with neural Wiscott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and cortactin during branched actin filament network formation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(28): p. 26086-93.
142. Takenawa, T. and S. Suetsugu, *The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(1): p. 37-48.
143. Peterson, J.R., et al., *Chemical inhibition of N-WASP by stabilization of a native autoinhibited conformation*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(8): p. 747-55.

144. Raftopoulou, M. and A. Hall, *Cell migration: Rho GTPases lead the way*. Dev Biol, 2004. **265**(1): p. 23-32.
145. Uzair, I.D., M.I. Flamini, and A.M. Sanchez, *Rapid Estrogen and Progesterone Signaling to Dendritic Spine Formation via Cortactin/Wave1-Arp2/3 Complex*. Neuroendocrinology, 2020. **110**(6): p. 535-551.
146. Torres, E. and M.K. Rosen, *Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in WASP*. Mol Cell, 2003. **11**(5): p. 1215-27.
147. Mondaca, J.M., et al., *Molecular Basis of LH Action on Breast Cancer Cell Migration and Invasion via Kinase and Scaffold Proteins*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 630147.
148. Yamaguchi, H., J. Wyckoff, and J. Condeelis, *Cell migration in tumors*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 559-64.
149. Martin, T.A., et al., *N-WASP is a putative tumour suppressor in breast cancer cells, in vitro and in vivo, and is associated with clinical outcome in patients with breast cancer*. Clin Exp Metastasis, 2008. **25**(2): p. 97-108.
150. Oser, M., et al., *Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation*. J Cell Biol, 2009. **186**(4): p. 571-87.
151. Higgs, H.N. and T.D. Pollard, *Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 649-76.
152. LeClaire, L.L., 3rd, et al., *Phosphorylation of the Arp2/3 complex is necessary to nucleate actin filaments*. J Cell Biol, 2008. **182**(4): p. 647-54.
153. Padrick, S.B., et al., *Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(33): p. E472-9.
154. Swaney, K.F. and R. Li, *Function and regulation of the Arp2/3 complex during cell migration in diverse environments*. Curr Opin Cell Biol, 2016. **42**: p. 63-72.
155. Zheng, S., et al., *Role and mechanism of actin-related protein 2/3 complex signaling in cancer invasion and metastasis: A review*. Medicine (Baltimore), 2023. **102**(14): p. e33158.
156. Radu, A., et al., *Expression of follicle-stimulating hormone receptor in tumor blood vessels*. N Engl J Med, 2010. **363**(17): p. 1621-30.
157. Tehrani, S., et al., *Src phosphorylation of cortactin enhances actin assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(29): p. 11933-8.
158. Kovacs, E.M., et al., *N-WASP regulates the epithelial junctional actin cytoskeleton through a non-canonical post-nucleation pathway*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(8): p. 934-43.
159. Kelley, J.B. and B.M. Paschal, *Fluorescence-based quantification of nucleocytoplasmic transport*. Methods, 2019. **157**: p. 106-114.
160. Barrett, T., et al., *NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--10 years on*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D1005-10.
161. Barrett, T., et al., *NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D991-5.
162. Johnson, W.E., C. Li, and A. Rabinovic, *Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods*. Biostatistics, 2007. **8**(1): p. 118-27.
163. Leek, J.T., et al., *The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments*. Bioinformatics, 2012. **28**(6): p. 882-3.
164. Gentleman, R.C., et al., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome Biol, 2004. **5**(10): p. R80.
165. Ritchie, M.E., et al., *limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(7): p. e47.
166. Benjamini, Y., et al., *Controlling the false discovery rate in behavior genetics research*. Behav Brain Res, 2001. **125**(1-2): p. 279-84.
167. Mondaca, J.M., et al., *Heregulin-induced cell migration is prevented by trastuzumab and trastuzumab-emtansine in HER2+ breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2021. **186**(2): p. 363-377.

168. Molinie, N. and A. Gautreau, *The Arp2/3 Regulatory System and Its Deregulation in Cancer*. *Physiol Rev*, 2018. **98**(1): p. 215-238.
169. Serrels, B., et al., *Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(9): p. 1046-56.
170. Jiang, W.G., et al., *Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives*. *Semin Cancer Biol*, 2015. **35 Suppl**: p. S244-S275.
171. Castro-Guijarro, A.C., et al., *Combination Treatment of Retinoic Acid Plus Focal Adhesion Kinase Inhibitor Prevents Tumor Growth and Breast Cancer Cell Metastasis*. *Cells*, 2022. **11**(19).
172. Rigracciolo, D.C., et al., *Focal adhesion kinase (FAK) activation by estrogens involves GPER in triple-negative breast cancer cells*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019. **38**(1): p. 58.
173. Scully, O.J., et al., *Breast cancer metastasis*. *Cancer Genomics Proteomics*, 2012. **9**(5): p. 311-20.
174. Chuang, H.H., et al., *FAK in Cancer: From Mechanisms to Therapeutic Strategies*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(3).
175. Niland, S., A.X. Riscanevo, and J.A. Eble, *Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression*. *Int J Mol Sci*, 2021. **23**(1).
176. Winer, A., S. Adams, and P. Mignatti, *Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures Into Future Successes*. *Mol Cancer Ther*, 2018. **17**(6): p. 1147-1155.
177. Sanchez-Pozo, J., et al., *Extracellular Phosphorylation of TIMP-2 by Secreted c-Src Tyrosine Kinase Controls MMP-2 Activity*. *iScience*, 2018. **1**: p. 87-96.
178. Li, H., et al., *The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis*. *Oncol Lett*, 2017. **14**(5): p. 5865-5870.
179. Ok Atilgan, A., et al., *Association between focal adhesion kinase and matrix metalloproteinase-9 expression in prostate adenocarcinoma and their influence on the progression of prostatic adenocarcinoma*. *Ann Diagn Pathol*, 2020. **45**: p. 151480.
180. Tokunaga, E., et al., *Molecular mechanisms regulating the hormone sensitivity of breast cancer*. *Cancer Sci*, 2014. **105**(11): p. 1377-83.
181. Siegel, R.L., et al., *Cancer statistics, 2023*. *CA Cancer J Clin*, 2023. **73**(1): p. 17-48.
182. Redig, A.J. and S.S. McAllister, *Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis*. *J Intern Med*, 2013. **274**(2): p. 113-26.
183. Haavisto, A.M., et al., *Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. **80**(4): p. 1257-63.
184. Powell, B.L., et al., *Luteinizing hormone signaling and breast cancer: polymorphisms and age of onset*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(4): p. 1653-7.
185. Mann, R.J., R.A. Keri, and J.H. Nilson, *Consequences of elevated luteinizing hormone on diverse physiological systems: use of the LHbetaCTP transgenic mouse as a model of ovarian hyperstimulation-induced pathophysiology*. *Recent Prog Horm Res*, 2003. **58**: p. 343-75.
186. Ziecik, A.J., et al., *Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor*. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **269**(1-2): p. 51-60.
187. Gligorijevic, B., et al., *N-WASP-mediated invadopodium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 3): p. 724-34.
188. Hebbrecht, T., et al., *VCA nanobodies target N-WASp to reduce invadopodium formation and functioning*. *PLoS One*, 2017. **12**(9): p. e0185076.
189. Short, S.M., et al., *The expression of the cytoskeletal focal adhesion protein paxillin in breast cancer correlates with HER2 overexpression and may help predict response to chemotherapy: a retrospective immunohistochemical study*. *Breast J*, 2007. **13**(2): p. 130-9.
190. MacGrath, S.M. and A.J. Koleske, *Cortactin in cell migration and cancer at a glance*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 7): p. 1621-6.
191. Tomar, A., et al., *Cortactin as a target for FAK in the regulation of focal adhesion dynamics*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e44041.

192. Meirson, T. and H. Gil-Henn, *Targeting invadopodia for blocking breast cancer metastasis*. Drug Resist Updat, 2018. **39**: p. 1-17.
193. Li, Y., et al., *miR-182 suppresses invadopodia formation and metastasis in non-small cell lung cancer by targeting cortactin gene*. J Exp Clin Cancer Res, 2018. **37**(1): p. 141.
194. Ramos-Garcia, P., et al., *An update of knowledge on cortactin as a metastatic driver and potential therapeutic target in oral squamous cell carcinoma*. Oral Dis, 2019. **25**(4): p. 949-971.
195. Yamada, S., et al., *Overexpression of cortactin increases invasion potential in oral squamous cell carcinoma*. Pathol Oncol Res, 2010. **16**(4): p. 523-31.
196. Chanez-Paredes, S., A. Montoya-Garcia, and M. Schnoor, *Cellular and pathophysiological consequences of Arp2/3 complex inhibition: role of inhibitory proteins and pharmacological compounds*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(17): p. 3349-3361.
197. Landgren, B.M., et al., *Menopause transition: Annual changes in serum hormonal patterns over the menstrual cycle in women during a nine-year period prior to menopause*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2763-9.
198. Mertens-Walker, I., et al., *Gonadotropin-induced ovarian cancer cell migration and proliferation require extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation regulated by calcium and protein kinase Cdelta*. Endocr Relat Cancer, 2010. **17**(2): p. 335-49.
199. Noci, I., et al., *hLH/hCG-receptor expression correlates with in vitro invasiveness in human primary endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 2008. **111**(3): p. 496-501.
200. Pillozzi, S., et al., *Over-Expression of the LH Receptor Increases Distant Metastases in an Endometrial Cancer Mouse Model*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 285.
201. Rao, C.V. and Z.M. Lei, *The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **269**(1-2): p. 2-8.
202. Sulzmaier, F.J., C. Jean, and D.D. Schlaepfer, *FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(9): p. 598-610.
203. Chengalvala, M.V., J.C. Pelletier, and G.S. Kopf, *GnRH agonists and antagonists in cancer therapy*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2003. **3**(6): p. 399-410.
204. Liu, S.V., S. Liu, and J. Pinski, *Luteinizing hormone-releasing hormone receptor targeted agents for prostate cancer*. Expert Opin Investig Drugs, 2011. **20**(6): p. 769-78.
205. Szepeshazi, K., et al., *Receptor-targeted therapy of human experimental urinary bladder cancers with cytotoxic LH-RH analog AN-152 [AEZS- 108]*. Oncotarget, 2012. **3**(7): p. 686-99.
206. Lerner-Geva, L., et al., *Infertility, ovulation induction treatments and the incidence of breast cancer--a historical prospective cohort of Israeli women*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **100**(2): p. 201-12.
207. Orgeas, C.C., et al., *Breast cancer incidence after hormonal infertility treatment in Sweden: a cohort study*. Am J Obstet Gynecol, 2009. **200**(1): p. 72 e1-7.
208. Sawazaki, H., et al., *Metabolic changes with degarelix vs leuprolide plus bicalutamide in patients with prostate cancer: a randomized clinical study*. World J Urol, 2020. **38**(6): p. 1465-1471.
209. Cucchiara, V., et al., *GnRH Antagonists Have Direct Inhibitory Effects On Castration-Resistant Prostate Cancer Via Intracrine Androgen and AR-V7 Expression*. Mol Cancer Ther, 2019. **18**(10): p. 1811-1821.
210. Princivalle, M., et al., *Rapid suppression of plasma testosterone levels and tumor growth in the dunning rat model treated with degarelix, a new gonadotropin-releasing hormone antagonist*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **320**(3): p. 1113-8.
211. Bray, F., P. McCarron, and D.M. Parkin, *The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(6): p. 229-39.

## **CAPÍTULO 8**

### **ANEXO**

Los resultados del objetivo específico 1 de esta tesis fueron publicados recientemente en la revista *Frontiers in Cell and Developmental Biology*



ORIGINAL RESEARCH  
published: 05 February 2021  
doi: 10.3389/fcell.2020.630147



# **Molecular Basis of LH Action on Breast Cancer Cell Migration and Invasion via Kinase and Scaffold Proteins**

*Joselina Magali Mondaca<sup>1</sup>, Ivonne Denise Uzair<sup>1</sup>, Ana Carla Castro Guijarro<sup>2</sup>, Marina Inés Flamini<sup>2</sup> and Angel Matias Sanchez<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>Laboratorio de Transducción de Señales y Movimiento Celular, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina, <sup>2</sup>Laboratorio de Biología Tumoral, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina