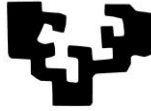


eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

TESIS DOCTORAL

# **Efecto de los bifenilos policlorados en el potencial invasivo tumoral y el desarrollo cardíaco *in vitro***

***Autor:***

Amaia IZQUIERDO MAIZBIDE

***Directores:***

Dr. Ricardo ANDRADE POCINO  
Dr. Jon ARLUZZEA JAUREGIZAR

Leioa, 2022

Hogar es contemplar la luna elevarse sobre la durmiente tierra baldía y tener a alguien a quien llamar para que se acerque a la ventana y te acompañe. Hogar es donde bailas con otros y el baile es vida.

-Fragmento del libro *22/11/63*, de Stephen King-

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	6
ABREVIATURAS .....	9
RESUMEN.....	14
1. INTRODUCCIÓN .....	16
1.1 PCBs.....	17
1.1.1 Toxicidad .....	25
1.1.2 Niveles en suero .....	29
1.1.3 Aroclor 1254 .....	32
1.2 CÁNCER .....	33
1.2.1 Melanoma.....	35
1.2.2 Cáncer de mama.....	40
1.2.3 Invasión tumoral.....	41
1.2.3.1 Matriz extracelular .....	46
1.2.3.2 Metaloproteasas de la matriz (MMPs) .....	52
1.2.3.3 Transición epitelio-mesénquima (EMT).....	56
1.2.3.4 Rho GTPasas.....	62
1.3 CARDIOTOXICIDAD .....	66
1.3.1 Células madre embrionarias.....	67
1.3.2 Diferenciación de células ES a cardiomiocitos.....	68
1.3.3 Biomarcadores cardíacos.....	71
1.3.4 Frecuencia cardíaca y riesgo cardiovascular.....	72
2. OBJETIVOS .....	75
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	77
3.1 CULTIVOS CELULARES.....	77
3.1.1 Líneas celulares empleadas .....	77
3.1.2 Metodología general de cultivo.....	79
3.1.2.1 Cultivo de las líneas de melanoma (A375 y HT-144) y adenocarcinoma de mama (MCF-7/6 y MCF-7/AZ).....	81
3.1.2.2 Cultivo de la línea STO.....	82
3.1.2.3 Cultivo de la línea R1.....	82
3.1.3 Tratamiento con Aroclor 1254 .....	84
3.2 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTT).....	84
3.3 CITOMETRÍA DE FLUJO .....	85

3.3.1	Análisis del ciclo celular .....	85
3.3.2	Análisis de apoptosis mediante Anexina V –IP .....	86
3.4	ENSAYOS DE INVASIÓN.....	88
3.4.1	Ensayo de invasión en Matrigel .....	88
3.4.1.1	Preparación de los geles de Matrigel.....	89
3.4.1.2	Ensayo de invasión y análisis de los resultados .....	89
3.4.2	Ensayo de invasión en colágeno tipo I.....	90
3.4.2.1	Preparación de los geles de colágeno tipo I .....	90
3.5	ENSAYOS DE MIGRACIÓN .....	92
3.5.1	Ensayo de cicatrización ( <i>wound healing</i> ).....	92
3.6	TÉCNICAS BIOQUÍMICAS .....	94
3.6.1	<i>Western blot</i> .....	94
3.6.1.1	Lisado celular .....	94
3.6.1.2	Determinación de la cantidad de proteína por colorimetría .....	95
3.6.1.3	Electroforesis de proteínas .....	96
3.6.1.4	<i>Western blot</i> .....	96
3.6.2	Inmunoprecipitación .....	97
3.6.2.1	<i>Pull down</i> de GTPasas Rho: RhoA, Cdc42 y Rac1 activas .....	97
3.6.3	Zimografía de gelatina .....	99
3.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	100
3.8	ANÁLISIS DE IMAGEN.....	100
3.9	ENSAYO DE DIFERENCIACIÓN A CARDIOMIOCITO .....	101
3.9.1	Análisis de las grabaciones de los cardiomiocitos .....	102
3.10	Q-RT-PCR.....	104
3.11	INMUNOFLUORESCENCIA .....	105
3.11.1	Inmunofluorescencia con $\alpha$ -actinina .....	106
3.11.2	Inmunofluorescencia con troponina-T y conexina 43 .....	107
3.12	OTRAS SOLUCIONES EMPLEADAS .....	108
4.	RESULTADOS .....	111
4.1	EFFECTO DEL AROCLOR 1254 SOBRE LAS PROPIEDADES METASTÁTICAS DE LÍNEAS TUMORALES HUMANAS .....	111
4.1.1	Efecto del Aroclor 1254 sobre la viabilidad celular .....	112
4.1.2	Efecto sobre el ciclo celular e inducción de apoptosis .....	116
4.1.3	Efecto sobre la invasividad .....	118
4.1.3.1	Invasión en Matrigel .....	118
4.1.3.2	Invasión en colágeno tipo I .....	122

4.1.4	Efecto sobre la migración .....	124
4.1.5	Efecto en la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9.....	128
4.1.6	Transición epitelio-mesénquima .....	130
4.1.7	Implicación de las GTPasas Rho (RhoA, Rac1 y Cdc42) .....	133
4.1.8	Inhibición de ROCK mediante el inhibidor selectivo Y27632 .....	136
4.2	EFECTO DEL AROCLOR 1254 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS A CARDIOMIOCITOS .....	137
4.2.1	Efecto del Aroclor 1254 en el tamaño de los cuerpos embrioides.....	138
4.2.2	Análisis de la cinética y las propiedades contráctiles de los cardiomiocitos .....	138
4.2.2.1	Exposición al contaminante durante 15 días .....	138
4.2.3	Organización sarcomérica de los cardiomiocitos .....	140
4.2.3.1	$\alpha$ -Actinina.....	141
4.2.3.2	Troponina T .....	142
4.2.3.3	Análisis de la frecuencia de cardiomiocitos con organización sarcomérica correcta .....	143
4.2.3.4	Conexina 43.....	144
4.2.4	Efecto del Aroclor 1254 en la expresión de genes marcadores de diferenciación cardíaca .....	145
5.	DISCUSIÓN .....	148
6.	CONCLUSIONES.....	172
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	174
8.	PUBLICACIONES .....	203

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todos aquellos que habéis formado parte del increíble y largo viaje que me ha llevado a este momento. A mi familia, amigos y compañeros, y a aquellos que por desgracia tuvieron que partir demasiado pronto.

He de comenzar agradeciendo todo lo que soy a la persona más importante de mi vida, la que nunca se ha separado de mi lado y la que nunca dudó de mi potencial ni siquiera por un momento. Todo lo que soy y todo lo que tengo es gracias a ti mamá. Eres sin duda lo mejor que me ha dado la vida. No hay suficientes palabras para agradecer un amor tan grande y desinteresado.

Gracias a mi pareja Lander por descubrirme que el amor no es solo posibles en las novelas épicas. Agradecerte especialmente la paciencia durante los momentos de escritura de la tesis, se que no fue fácil de llevar mi mal humor y mi desánimo.

A mis compañeros de laboratorio y amigos María, Eli, Miguel y Pablo. Gracias por haber compartido conmigo tantos grandes momentos y risas. Nunca el trabajo de laboratorio fue tan divertido. Recuerdo con especial cariño mi estancia en el laboratorio y siempre os agradeceré vuestro apoyo y ayuda en los momentos más difíciles. Realmente hicisteis que me sintiera parte de una familia.

A Raquel y Vanessa, mis otras compañeras y amigas, me llevo de vosotras muchos buenos recuerdos como los descansos con café y risas y las escapadas por Bilbao. Espero que esta vez no tardemos tanto en volver a quedar.

Gracias al consejo de sabios, Ricardo, Jon y Alex, por el apoyo científico y moral y por los *brainstorming* de los viernes tarde. Gracias una vez más a Jon y Ricardo por estar ahí y vertebrar esta tesis con vuestras correcciones y aportaciones, y sobre todo por una espera tan larga.

Por último, toda mi gratitud para la persona que me dio la oportunidad de formar parte del laboratorio. Gracias Juan, sin usted no habría podido embarcarme en este bonito viaje.

Ha sido un proceso largo en el que muchas veces decaía el ánimo pero todos vosotros habéis sido la fuerza propulsora que me ha permitido levantarme y seguir adelante incluso en los momentos de mayor flaqueza y pesadumbre. Habéis estado a mi lado compartiendo los buenos momentos, que no han sido pocos, y los no tan buenos, y es por ello por lo que nunca podré agradeceréoslo lo suficiente.

Gracias a todos por haber formado parte de lo que ha sido uno de los principales momentos de desarrollo y crecimiento personal, no sería la mujer que soy a día de hoy sin vuestro cariño y apoyo.

Siempre he creído que todas las personas que pasan por tu vida y te aportan vivencias positivas, dejan su poso, te modelan y te mejoran como persona. Por ello, en cierto modo, siempre formareis parte de mí.

## **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

**2,3,7,8-TCDD** *2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina*

**ADN** *Ácido desoxirribonucleico*

**AhR** *Aryl hydrocarbon receptor*

**ARN** *Ácido ribonucleico*

**ARNT** *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*

**ASTDR** *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

**ATCC** *American Type Culture Collection*

**BCA** *Bicinchoninic Acid*

**CAF** *Cancer-associated fibroblasts*

**CAPV** *Comunidad Autónoma del País Vasco*

**CDI** *Carcinoma ductal infiltrante*

**CDIS** *Carcinoma ductal in situ*

**CDKN2A** *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

**CLIS** *Carcinoma lobular in situ*

**CMM** *Cutaneous malignant melanoma*

**CTC** *Células tumorales circulantes*

**CVD** *Cardiovascular disease*

**CYP1A1** *Citocromo P4501A1*

**DDR** *Discoidin domain receptor*

**DMEM** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**DMSO** *Dimetilsulfóxido*

**EAC** *Enfermedad de las arterias coronarias*

**EBs** *Embryoid bodies*

**EC** *Environment Canada o Embryonic carcinoma*

**ECM** *Extracellular matrix*

**EFSA** *European Food Safety Authority*

**EG** *Embryonic germ*

**EGF** *Epidermal growth factor*

**EMT** *Epithelial to mesenchymal transition*

**EPA** *Environmental Protection Agency*

**ER** *Estrogen receptor*

**ERK** *Extracellular Signal-Regulated Kinase*

**ES** *Embryonic stem*

**FAK** *Focal Adhesion Kinase*

**FET** *Factor de equivalencia tóxica*

**FGF** *Fibroblast growth factor*

**FIV** *Fecundación in vitro*

**GF** *Growth factor*

**GF-R** *Growth factor receptor*

**GTP** *Guanosine 5'-Triphosphate*

**GDP** *Guanosine diphosphate*

**HA** *Hialuronato*

**HAPs** *Hidrocarburos aromáticos policíclicos*

**HPF** *High power field*

**Hsp90** *Heat shock protein 90*

**HSPGs** *Heparan sulphate proteoglycans*

**IARC** *International Agency for Research on Cancer*

**ICSI** *IntraCytoplasmic Sperm Injection*

**IG** *Inmunoglobulina*

**IL-1 $\beta$**  *Interleukin 1 beta*

**IP** *Ioduro de propidio*

**IUPAC** *International Union of Pure and Applied Chemists*

**LIF** *Leukemia inhibitory factor*

**LIMK** *LIM Kinase*

**LOX** *Lysyl oxidases*

- MAPK** *Mitogen-activated protein kinase*
- MEM-NEAA** *MEM Non Essential Amino Acids*
- MES** *Melanoma de extensión superficial*
- MET** *Mesenchymal-to-epithelial transition*
- MITF** *Microphthalmia-associated transcription factor*
- MLA** *Melanoma lentiginoso acral*
- MLC** *Myosin light chain*
- MLCK** *Myosin light chain kinase*
- MLCP** *Myosin light chain phosphatase*
- MLM** *Melanoma lentigo maligno*
- MN** *Melanoma nodular*
- MMP** *Matrix metalloproteinase*
- MT** *Mesenchymal transition*
- MT-MMP** *Membrane-type matrix metalloprotease*
- NF- $\kappa$ B** *Nuclear factor kappa B*
- NMIIA** *Non-muscle myosin IIA*
- OMS** *Organización mundial de la salud*
- PAK** *p21-activated kinase*
- PBS** *Phosphate Buffered Saline*
- PCBs** *Polychlorinated biphenyls*
- PGs** *Proteoglicanos*
- PI3K** *Phosphatidylinositol-3 kinase*
- PR** *Progesterone receptor*
- PTEN** *Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa*
- RBD** *Rho binding domain*
- RECK** *Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal Motifs*
- RGP** *Radial growth phase*
- ROS** *Reactive oxygen species*

**RTK** *Receptor tyrosine kinase*

**SBF** *Suero bovino fetal*

**SRF** *Serum response factor*

**T3** *Triyodotironina*

**T4** *Tiroxina*

**TBS** *Tris-buffered saline*

**TGF- $\alpha$**  *Transforming growth factor alpha*

**TGF- $\beta$**  *Transforming growth factor beta*

**TIMP** *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*

**UK** *United Kingdom*

**UNEP** *United Nations Environment Programme*

**UV** *Ultraviolet radiation*

**VEGF** *Vascular endothelial growth factor*

**VGP** *Vertical growth phase*

**VST** *Video Spot Tracker*

**XRE** *Xenobiotic responsive element*

## RESUMEN

**RESUMEN**

El cáncer y las enfermedades cardiovasculares son en la actualidad las principales causas de mortalidad a nivel mundial. El rápido desarrollo socioeconómico experimentado durante el último siglo ha traído consigo la producción e introducción en el ambiente de millones de sustancias químicas sin suficiente control toxicológico. El incremento experimentado en los últimos años en la incidencia y mortalidad causadas por el cáncer y las enfermedades cardiovasculares no puede ser explicado únicamente por el aumento en el tamaño poblacional, el envejecimiento y factores como la dieta y el estilo de vida. Cada vez existe mayor evidencia de que la exposición a determinados factores ambientales incrementa el riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Entre estos contaminantes ambientales se encuentran los bifenilos policlorados (PCBs). Los PCBs son compuestos químicos fabricados para su comercialización desde el año 1920. Su estabilidad y propiedades propiciaron su uso comercial (en plásticos, pinturas, pesticidas...) y que se distribuyeran a nivel mundial en el medio ambiente. Su amplia distribución, su resistencia a la degradación y su lipofiliidad son las responsables de que hayan entrado en la cadena alimentaria y sigan detectándose en la actualidad en el aire, alimentos e incluso leche materna humana, en niveles que exceden los valores de referencia establecidos por la EFSA. Los PCBs son conocidos actualmente por ser contaminantes orgánicos persistentes y carcinógenos. Sin embargo, aún existe a día de hoy controversia sobre la relación entre la exposición a PCBs y su correlación con el cáncer de mama y el melanoma, y su potencial cardiotóxico durante el desarrollo embrionario apenas ha sido estudiado. Por ello, se decidió estudiar el efecto de una mezcla representativa de la contaminación ambiental por PCBs (Aroclor 1254) sobre el potencial invasivo de líneas tumorales humanas y sobre las propiedades cinemáticas y dinámicas de cardiomiocitos derivados de células ES mediante diferenciación *in vitro*.

Los resultados obtenidos revelan que la exposición al Aroclor 1254 incrementa sobremanera la capacidad invasiva y migratoria de las líneas tumorales de cáncer de mama (MCF-7/AZ y MCF-7/6) y melanoma estudiadas (A375 y HT-144). Para ello, la mezcla de PCBs induce la secreción de MMPs (MMP-2 y MMP-9), favorece la transición epitelio-mesénquima y altera además las dinámicas celulares a través de la activación de la señalización de RhoA. La inhibición de ROCK es capaz de revertir completamente el efecto proinvasivo inducido por los PCBs. La exposición a PCBs durante la cardiomiogénesis temprana altera la frecuencia cardíaca, las propiedades contráctiles y la organización estructural del sincitio latiente.

Nuestros resultados muestran que los PCBs son importantes agentes etiológicos en el cáncer de mama y el melanoma, así como en el futuro desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Esta tesis aporta un mayor conocimiento del riesgo actual que supone la exposición a PCBs y pone de manifiesto la necesidad de un mayor estudio del riesgo que supone la exposición a contaminantes ambientales en la salud humana.

## **INTRODUCCIÓN**

## **1. INTRODUCCIÓN**

El cáncer y las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de mortalidad a nivel mundial (Sung *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021). De acuerdo con la OMS, el cáncer supone la primera o segunda causa de muerte por debajo de los 70 años para 112 de 183 países. Tanto la incidencia como la mortalidad asociadas al cáncer están creciendo rápidamente a nivel mundial. En 2020, se estimaron más de 19 millones de nuevos casos y casi 10 millones de muertes por cáncer. Para el año 2040 se estiman 28.4 millones de casos de cáncer, lo que supone un incremento de un 47% con respecto a 2020. Este incremento no sólo refleja el envejecimiento y el aumento del tamaño poblacional sino que también es reflejo de cambios en la prevalencia y distribución de diversos factores de riesgo asociados con el desarrollo socioeconómico (Sung *et al.*, 2021). Por otro lado, las enfermedades cardiovasculares ocasionaron 17 millones de muertes en 2017, una cifra un 50% superior si la comparamos con la del año 1990. Al igual que ocurre con el cáncer, la incidencia de las enfermedades cardiovasculares se incrementa año tras año. Esto es debido en parte al rápido desarrollo de la economía mundial y a los profundos cambios en el estilo de vida que ha originado. Los factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares incluyen el riesgo metabólico, el riesgo conductual y el riesgo ambiental/ocupacional (Li *et al.*, 2021; Münzel *et al.*, 2021). Los fetos y los niños son especialmente vulnerables a la exposición ambiental debido al rápido desarrollo del sistema cardiovascular (Kim *et al.*, 2020).

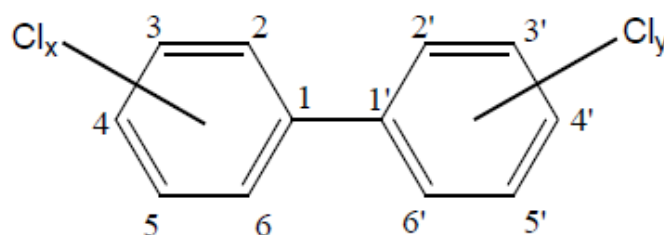
Dentro de los factores de riesgo ambientales relacionados con el desarrollo socioeconómico se incluyen diversos compuestos químicos fabricados y comercializados por el ser humano. La revolución industrial que tuvo lugar durante la segunda mitad del siglo pasado condujo a la síntesis, producción e introducción en el ambiente de millones de sustancias químicas. Según la Comisión Europea, se han comercializado desde la segunda guerra mundial hasta el momento unos 100.000 compuestos químicos sin el suficiente control toxicológico. Muchos de estos productos pueden actuar como contaminantes tóxicos persistentes y contaminar el aire, la tierra, el agua y los alimentos. Además, algunos de ellos son moléculas carcinógenas, mutagénicas y reprotóxicas. Esto supone que dichos compuestos podrían actuar como mutágenos, promotores, o ambos, o bien ser cocarcinógenos, lo cual significa que pueden contribuir a la génesis del cáncer y ser responsables en cierta medida del incremento actual en la incidencia de cáncer. Dentro de estos compuestos se encuentran el asbesto (amianto), ftalatos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, biocidas, pesticidas, dioxinas y otros compuestos organoclorados como los PCBs (Belpomme, Irigaray, Hardell *et al.*, 2007). La exposición a factores ambientales como los PCBs podría jugar un papel más importante en la incidencia de cáncer y de enfermedades cardiovasculares de lo que se establece habitualmente.



Por este motivo, la presente Tesis doctoral pretende profundizar en el conocimiento de los efectos de los PCBs en los procesos de migración, proliferación, metástasis y diferenciación a nivel celular y molecular, empleando para ello diferentes modelos experimentales *in vitro*.

### 1.1 PCBs

Los bifenilos policlorados (PCBs) constituyen una familia de compuestos orgánicos fabricados y comercializados por el ser humano desde el año 1920 (Robertson and Ludewig, 2011). Han sido asociados con un amplio rango de efectos perjudiciales para la salud, entre los que se encuentran: neuro e inmunotoxicidad, carcinogénesis y actividad estrogénica (Liu *et al.*, 2010). No se conocen fuentes naturales de PCBs en el ambiente. Todos ellos presentan una estructura común, un par de anillos de benceno, que varía principalmente en el grado de cloración. Cada una de las formas que pueden adoptar los PCBs se conoce con el nombre de congénere y se identifica seguido de un número (por ejemplo: PCB 153). Los PCBs en su forma pura son líquidos viscosos o sólidos, incoloros o de un color amarillo claro. No tienen sabor ni olor conocido.



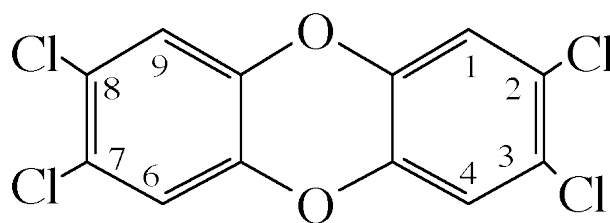
**Figura 1:** Estructura general de los PCBs y sistema de numeración

### Estructura

Constituyen una familia de hidrocarburos aromáticos clorados estructuralmente relacionados. Los PCBs son compuestos químicos en los cuales hay de 1 a 10 átomos de cloro unidos a una molécula de bifenilo (figura 1). La fórmula molecular general es  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ , donde "n" puede ser cualquier número de 1 a 10. Dependiendo del grado de cloración y de la posición de los átomos de cloro en la molécula se pueden distinguir 209 congéneres diferentes posibles. Sin embargo, solo se han identificado hasta 150 de todos los congéneres posibles en las mezclas comerciales de PCBs, en el medio

ambiente y la biota y en los alimentos (DeCaprio *et al.*, 2005). Se emplea el término "homólogo" para referirse a todos los PCBs con el mismo número de sustituciones de cloro, habiendo por tanto 10 homólogos diferentes. Los homólogos con diferente patrón de sustituciones de cloro son conocidos como isómeros.

Las posiciones 2, 2',6 y 6' se denominan posiciones *ortho*, las posiciones 3, 3', 5 y 5' se denominan *meta* y las posiciones 4 y 4' se denominan *para* (figura 1). Los anillos de benceno pueden rotar alrededor del enlace que los une adoptando dos configuraciones extremas, una configuración planar en la cual los dos anillos de benceno están en el mismo plano, y una configuración no planar en la cual los anillos de benceno están formando un ángulo de 90° el uno con respecto al otro. El grado de planaridad depende en gran medida del número de sustituciones en las posiciones *ortho*. El reemplazo de los átomos de hidrógeno por átomos de cloro en las posiciones *ortho* fuerza a los anillos de benceno a rotar fuera de la configuración planar. Los anillos de benceno no-*ortho* sustituidos y los mono-*ortho* sustituidos asumen una configuración planar y se les denomina **congéneres planares** o coplanares. Los anillos de benceno del resto de congéneres no pueden asumir una configuración planar y se hace referencia a ellos como **congéneres no planares** o no coplanares. Los congéneres sin sustituciones en la posición *ortho* tienen una estructura coplanar similar a la de la dioxina (figura 2) y son capaces de unirse al receptor aril-hidrocarburo (AhR), permitiendo a las moléculas planares causar una toxicidad similar a la de la dioxina, una clase de compuestos químicos altamente tóxicos que muestran propiedades genotóxicas y mutagénicas (Mandal, 2005). Sin embargo, los congéneres con sustituciones de cloro en las posiciones *ortho*, especialmente con 2 o más sustituciones, favorecen una conformación no planar y no se unen al receptor AhR.



**Figura 2:** Estructura general de la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

El receptor **AhR** (*aryl hydrocarbon receptor*) es un factor de transcripción activado por ligando involucrado en el metabolismo de compuestos xenobióticos. Como receptor huérfano, no tiene ningún ligando endógeno de alta afinidad asociado, sino que se une a una amplia variedad de ligandos entre los que se encuentran la dioxina y ciertos PCBs. Sin un ligando presente, AhR existe en el citoplasma de las células como un complejo inactivo con una proteína de choque térmico (Hsp90) así como con otras

proteínas co-chaperonas, como la proteína p23. Una vez unido al ligando, AhR se transloca al interior del núcleo, se disocia de las chaperonas, y forma un heterodímero con el translocador nuclear del receptor aril-hidrocarburo (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* o ARNT). El complejo AhR-ARNT se une después a elementos sensibles a xenobióticos (*xenobiotic responsive element* o XRE) en la región promotora de genes diana. Además del efecto directo mediado a través de los XREs, AhR es capaz de interactuar con otros factores de transcripción y coactivadores entre los que se incluyen el receptor de estrógeno (ER) y NF-κB (Barroso *et al.*, 2021). Como resultado de la activación de AhR se inducen una gran cantidad de enzimas que metabolizan xenobióticos, incluyendo rutas metabólicas de la fase I (oxidación), fase II (conjugación) y transportadores de la fase III (excreción). El hecho de que el receptor AhR sea una proteína relativamente extendida y expresada en la mayoría de los tejidos corporales, ha propiciado que AhR se reconozca como la primera defensa molecular del cuerpo cuando es expuesto a una toxina ambiental. Los PCBs coplanares son capaces de actuar como agonistas de AhR. La toxicidad causada por estos PCBs se atribuye a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha sugerido que el estrés oxidativo inducido por ROS en conjugación con la exposición a PCBs planares es resultado de un incremento en la expresión, y de la eventual disociación de la subfamilia del citocromo P450 1A (CYP1A1). El metabolismo de PCBs por enzimas del citocromo P450 involucra un ciclo catalítico de reacciones que produce metabolitos del compuesto original (Perkins *et al.*, 2016).

A diferencia de los PCBs planares, los PCBs no planares no son capaces de actuar como ligandos del receptor AhR pero sí de otros receptores nucleares. Algunos PCBs no planares como los PCBs 138, 153 y 180 se encuentran entre los PCBs predominantes en la biota (Safe, 1994) y contribuyen en gran medida a la carga corporal de PCBs en los seres humanos (Agudo *et al.*, 2009; Walkowiak *et al.*, 2001; Grandjean *et al.*, 2001).

En cuanto a los PCBs con estructura similar a la dioxina, la aproximación más aceptada para evaluar su toxicidad ambiental usa los factores de equivalencia tóxica (FET). Esta aproximación está basada en que la dioxina y otros compuestos estructuralmente similares llevan a cabo su toxicidad a través de un mecanismo común de acción, el receptor AhR. Este factor indica el grado de toxicidad comparado con el del 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), al que se le otorga un valor de referencia de 1. La potencia de las mezclas y muestras ambientales puede estimarse calculando sus FET a partir de la suma de la concentración de cada congénere y su FET correspondiente, suponiendo un efecto aditivo.

El sistema de numeración de los PCBs propuesto inicialmente por Ballschmiter y Zell (1980) ha sido adaptado por la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemists*) y es usado frecuentemente para referirse a los distintos congéneres. En este

sistema a los congéneres individuales se les asigna un número, empezando por el PCB-1 (2-CB) y acabando con el PCB-209 (2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-CB).

### **Propiedades físicas y químicas**

Los bifenilos policlorados son químicamente inertes, resisten tanto ácidos como álcalis y tienen estabilidad térmica. En general son relativamente insolubles en agua y la solubilidad disminuye con el aumento del grado de cloración. Son solubles en solventes orgánicos no polares y en lípidos biológicos. Su lipofilidad aumenta con el incremento del grado de cloración (ASTDR, 2000).

Los congéneres con un grado de cloración más bajo son más volátiles que aquellos con un mayor número de sustituciones.

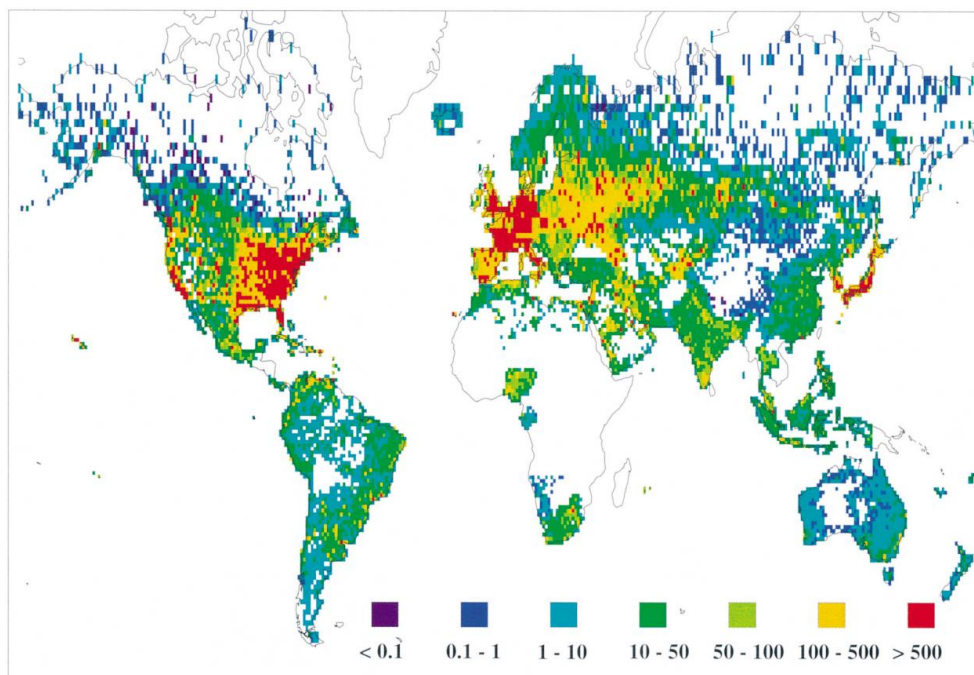
Tienen baja conductividad eléctrica, una alta conductividad térmica y una alta resistencia a la degradación térmica. Son prácticamente resistentes al fuego ya que tienen elevados puntos de inflamación (170-380°C). Forman vapores que son más pesados que el aire, pero no son explosivos.

Debido a que los PCBs no arden fácilmente, a que son buenos materiales aislantes y a que su coste de producción es bajo, su uso se extendió globalmente hasta el cese de su producción en el año 1993 (Breivik *et al.*, 2007).

### **Producción y uso**

Los PCBs se fabricaron en su origen como fluidos de transferencia de calor, refrigerantes, aceites lubricantes, plastificantes y retardantes de llamas debido a su elevada conductividad térmica y a que son químicamente inertes (Perkins *et al.*, 2016). Los bifenilos policlorados se comercializaron en su origen como mezclas de congéneres y son conocidos por su nombre comercial industrial (Aroclor, Clophen, Kanechlor...). El Aroclor es el nombre comercial bajo el cual la corporación Monsanto (el mayor productor de los Estados Unidos) comercializó las mezclas de PCBs, el Kanechlor es de origen japonés y el Clophen es alemán. Algunas de estas combinaciones de congéneres se identifican mediante un número. Por ejemplo el Aroclor 1254 es una mezcla de congéneres mono- a hepta- clorados en la cual los dos primeros dígitos indican el tipo de mezcla y los dos últimos dígitos indican el contenido de cloro expresado en porcentaje de peso. De este modo, el Aroclor 1254 constituye una mezcla de bifenilos policlorados con un contenido medio en cloro del 54%. Del volumen total de PCBs vendidos por la corporación Monsanto en el año 1974, el Aroclor 1254 supuso un 20% del total (U.S Department of health and human services, 2000).

La producción de PCBs estuvo limitada básicamente a 10 países (Estados Unidos, Japón, China, Rusia, Checoslovaquia, UK, Francia, Italia, Alemania y España). Durante los años 1930 a 1977 se produjeron en Estados Unidos unas 642.000 toneladas métricas. En España se produjeron entre 1955 y 1984, unas 29.000 toneladas de PCBs en su única sede en Tarragona. Se ha estimado que la producción global entre los años 1930 y 1993 fue de 1.5 millones de toneladas, aunque la producción real se supone mucho mayor ya que de muchas fábricas se desconoce la cantidad de PCBs que produjeron y de otras muchas los datos que se tienen se limitan a unos pocos años de la producción total (De Voogt and Brinkman, 1989).



**Figura 3:** Uso acumulado estimado de PCBs. Los valores de la leyenda se expresan en toneladas (Breivik *et al.*, 2007).

La utilización de PCBs se extendió mundialmente, siendo en Norteamérica, Europa y Japón donde se obtienen los mayores niveles de uso acumulado (figura 3). Dentro de España se alcanzaron niveles superiores a las 500 toneladas dentro de comunidades autónomas como el País Vasco, Cataluña y Andalucía.

Los PCBs han estado presentes en gran variedad de equipos industriales así como en productos de consumo. Se han empleado como refrigerantes y lubricantes en transformadores, en equipos hidráulicos y eléctricos y en condensadores. Como productos de consumo los PCBs se emplearon para la fabricación de plástico, barnices, adhesivos, tinta de impresora, papel autocopiativo, pintura, productos de sellado,

medios de montaje para microscopía, productos de goma y en pesticidas (Zhu *et al.*, 2022; Collins and Capen, 1980; Silberhorn *et al.*, 1990).

Aunque su bajo coste y sus propiedades propiciaron una amplia distribución, la producción de PCBs cesó en Estados Unidos en el año 1977 debido a que había indicios de que los PCBs se acumulaban en el ambiente y podían causar efectos dañinos. En España la producción de PCBs duró desde 1955 hasta 1984. Los niveles de PCBs están disminuyendo desde su cese total en 1993 pero aún continúan persistiendo en el ambiente y bioacumulándose en los peces y otros animales. Los PCBs también se emplearon como materiales para la construcción de edificios durante ese periodo, en forma de dispositivos de iluminación fluorescentes, aparatos eléctricos (televisores, frigoríficos...), material de calafateo y como aditivos en el cemento y el yeso, de modo que aún hoy siguen encontrándose en muchos edificios (Herrick *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2022). En un estudio llevado a cabo en 2004 en edificios públicos (incluyendo museos, escuelas, hospitales, universidades y hoteles) de la ciudad de Boston (Estados Unidos) se detectó que un tercio de los mismos contenían niveles de PCBs que excedían significativamente los niveles establecidos como aceptables (50 ppm por la *U.S. Environmental Protection Agency*) (Herrick *et al.*, 2004).

La producción de PCBs en Estados Unidos se prohibió en 1979 por el Congreso de los Estados Unidos, y posteriormente a nivel global la Convención de Estocolmo prohibió la producción y uso de PCBs en Mayo de 2001 (UNEP 2004) (Huetos *et al.*, 2014; Perkins *et al.*, 2016). En España, el plan de implementación de la Convención de Estocolmo fue aprobado en 2007. Sin embargo, se ha hecho una excepción para permitir el uso de equipamiento que contenga PCBs hasta el año 2025 (Huetos *et al.*, 2014).

## Exposición

La dieta es la principal ruta de exposición para la población general, supone un 90% de la exposición total, junto con la inhalación de aire contaminado (Domingo and Bocio, 2007). Los PCBs se han detectado en alimentos como el pescado, marisco, carne, leche, vegetales y en otros productos de consumo diario. El mayor aporte se corresponde con el consumo de productos de origen animal (Kiviranta *et al.*, 2004). Las propiedades lipofílicas de estos compuestos y su alta estabilidad química les permiten bioacumularse en el tejido graso de animales vivos, incluyendo el cerebro, para posteriormente acumularse en niveles tróficos superiores a través de la cadena alimenticia hasta llegar a los humanos (Stølevik *et al.*, 2013). Además, se ha descrito que estos contaminantes son capaces de atravesar la placenta y alcanzar al feto (Covaci *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2005). Los fetos son especialmente vulnerables frente a la exposición a contaminantes, ya que se encuentran en pleno desarrollo del sistema de órganos, con lo cual la exposición a los PCBs puede ser especialmente adversa.

En la mayoría de los animales hay una captación inicial por parte del hígado y del músculo, probablemente debido a la elevada perfusión sanguínea en el hígado y al gran volumen de músculo. Posteriormente, en particular los congéneres con un mayor grado de cloración, son redistribuidos en el tejido adiposo y la piel, reflejando la alta afinidad de estos compuestos por tejidos con un alto contenido lipídico (Wyss *et al.*, 1986). La vida media de los PCBs en sangre varía entre valores inferiores a un año y superiores a 10 años dependiendo del congénere (Meeker *et al.*, 2011).

Antes de que su producción cesara, los PCBs entraron en el aire, el agua y la tierra. Además, durante ese tiempo se generaron residuos que contenían PCBs y estos residuos eran frecuentemente colocados en vertederos. Los PCBs también entraron en el ambiente a partir de vertidos accidentales y fugas durante su transporte, y a partir de escapes o incendios en condensadores y transformadores, u otros productos que contenían bifenilos policlorados.

Hoy en día los PCBs aún pueden ser liberados al medio ambiente: 1) a partir de sitios de almacenamiento de residuos que contienen PCBs pobremente mantenidos; 2) de la descarga ilegal o inadecuada de residuos de PCBs, como fluidos de viejos transformadores; 3) de escapes o de la liberación desde transformadores eléctricos que contienen PCBs; 4) y de la eliminación de productos de consumo que contienen PCBs en vertederos municipales o en otros vertederos no diseñados para encargarse de residuos peligrosos. Los PCBs también pueden ser liberados al medio ambiente a través de la incineración de algunos residuos en incineradores municipales e industriales.

En la CAPV (Comunidad Autónoma del País Vasco) durante el 2016 se generaron un total de 321.628 t de residuos peligrosos, de los cuales 11.791 t se engloban en los denominados *residuos históricos* (flujos residuales derivados de la gestión de la comunidad). Estos *residuos históricos* suponen un 3.67% del total e incluyen tierras contaminadas, residuos de amianto y aceites y aparatos con PCBs (transformadores eléctricos, resistencias, condensadores...) ([https://www.euskadi.eus/web01-a2inghon/es/contenidos/documentacion/inventario\\_rp/es\\_rp/index.shtml](https://www.euskadi.eus/web01-a2inghon/es/contenidos/documentacion/inventario_rp/es_rp/index.shtml)).

Una vez en el ambiente los PCBs no se descomponen fácilmente y permanecen por tanto durante largos periodos de tiempo. Pueden alternar con facilidad entre el aire, el agua y la tierra. Por ejemplo, los PCBs pueden entrar en el aire por evaporación desde la tierra y el agua. Una vez en el aire, los PCBs pueden ser transportados a largas distancias, de hecho se han detectado en la nieve y el agua de mar de áreas muy distantes de donde fueron liberados, como el ártico. Como consecuencia, los PCBs se han detectado por todo el mundo. En general, cuanto más ligero es el congénere, más lejos puede ser transportado desde la fuente de contaminación. Están presentes como partículas sólidas o como vapor en la atmósfera. Regresan al agua y la tierra depositándose como polvo o en la lluvia. En el agua son transportados por la corriente, se pegan al sedimento del fondo o a partículas en el agua y se evaporan en el aire. Los

congéneres más pesados se depositan con más frecuencia en el sedimento, mientras que los PCBs más ligeros es más probable que se evaporen. Los sedimentos que contienen PCBs también pueden liberarlos en el agua circundante. Los bifenilos policlorados se adhieren fuertemente a la tierra y no suelen ser transportados muy profundamente en el interior de la misma con el agua de lluvia. No se descomponen fácilmente en la tierra, donde alcanzan una vida media que varía de meses a incluso años. Cuantos más átomos de cloro posee el congénere, más lentamente se descompone. La evaporación parece ser una vía importante por la cual los congéneres más ligeros abandonan la tierra. Como gas, los PCBs se pueden acumular en las hojas y las partes de las plantas por encima del suelo y por tanto contaminar las cosechas. Los PCBs se acumulan especialmente en los peces y en los mamíferos marinos. Cuanto más alto se encuentra un animal en la cadena alimenticia, mayor es la cantidad de PCBs que contiene.

La habilidad para ser degradados en el ambiente depende del grado de cloración así como del patrón de sustitución. En la fase de vapor, la reacción de los PCBs con radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) es el proceso de transformación dominante en la atmósfera. En el agua, la fotólisis parece ser el único proceso abiótico de degradación viable. En la tierra y el sedimento, la biodegradación (aeróbica y anaeróbica) es el proceso de degradación mayoritario (ASTDR, 2000).

### **Poblaciones con alta exposición potencial**

En general, se consideran como poblaciones con una alta exposición potencial a aquellos individuos ocupacionalmente expuestos a los PCBs. Sin embargo, hay otros grupos dentro de la población general con una mayor exposición (mayor que los niveles basales) a los PCBs. Estos grupos incluyen a los pescadores que típicamente consumen cantidades mucho mayores de pescado capturado localmente que la población general; poblaciones de nativos americanos como los Inuits u otros pescadores y/o cazadores de subsistencia; niños alimentados con leche materna de madres que consumieron grandes cantidades de pescado o carne de caza contaminada con PCBs; granjeros y sus familiares expuestos a comida contaminada debido al almacenaje de la misma en silos contaminados con PCBs; personas que viven próximas a incineradores o instalaciones de almacenamiento de residuos de PCBs.

La exposición a PCBs relacionada con la exposición ocupacional ha disminuido desde finales de los años 70 debido a su prohibición. Aunque la producción de PCBs cesó mundialmente en el año 1993 (Breivik *et al.*, 2007), la exposición ocupacional actual se ha reducido a tres grupos de trabajadores: personal encargado del reemplazo o la reparación de transformadores y condensadores que aún contienen fluidos dieléctricos con PCBs (Altenkirch *et al.*, 1996); trabajadores de la construcción encargados de



eliminar pintura vieja, acabados de yeso o suelos con PCBs (Herrick *et al.*, 2007; Kontsas *et al.*, 2004); y trabajadores en puntos de almacenamiento de desechos peligrosos (González *et al.*, 2000).

De acuerdo con la *Environmental Protection Agency* (EPA) y la *Environment Canada* (EC) (2004), al menos un 44% (87.000) de los transformadores con PCBs y un 10% de los condensadores (143.000) fueron desechados entre 1994 y el año 2000. Sin embargo, se ha calculado que 113.000 transformadores y 1.330.000 condensadores pueden seguir en uso. Aquellas personas encargadas de la reparación y el mantenimiento de los condensadores y transformadores con PCBs y los encargados del desmantelamiento de los mismos tienen la mayor exposición potencial (Ruder *et al.*, 2006).

### 1.1.1 Toxicidad

Los PCBs presentan un complejo espectro de propiedades toxicológicas. Están relacionados con una función tiroidea anormal, con alteraciones del tejido óseo, carcinogénesis, toxicidad reproductiva, disminución del coeficiente intelectual, diabetes, efectos proinflamatorios, efectos inmuno, neuro (Cocco *et al.*, 2015) y cardiotoxicos y con un bajo peso en el neonato al estar presentes durante el desarrollo prenatal. Estos compuestos constituyen por ello un serio problema de salud en la actualidad.

En el año 1987, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) clasificó inicialmente los PCBs como probables carcinógenos humanos (Grupo 2A), con suficientes evidencias de carcinogenicidad en animales pero reducidas en humanos. Años más tarde, los estudios aportados por la comunidad científica han hecho que la IARC modifique la clasificación de los PCBs del Grupo 2A al Grupo 1, lo que implica que son considerados actualmente como agentes carcinógenos para los humanos (IARC, 2016).

Espectro de propiedades toxicológicas:

#### ➤ **Función tiroidea anormal**

La exposición al Aroclor 1254 se ha relacionado con una disminución en los niveles de las hormonas tiroideas, tiroxina (T4) (Hallgren and Darnerud, 2002) y triyodotironina (T3) (Collins and Capen, 1980). Además, Collins and Capen (1980) observaron que el examen histológico de las glándulas tiroideas de animales expuestos a PCBs mostraba signos morfológicos de una actividad glandular tiroidea incrementada.

### ➤ **Inmunotoxicidad**

Los efectos adversos en el sistema inmune derivan de enfermedades relacionadas, como el desarrollo de alergias, asma y un incremento en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas. En estudios llevados a cabo en una cohorte Noruega, la exposición prenatal a PCBs se asoció con un incremento en el riesgo de infecciones y con dificultades en la respiración durante el primer año de vida de los neonatos (Stølevik *et al.*, 2011). El seguimiento de la misma cohorte durante los tres años siguientes de vida demostró el mismo patrón en cuanto a la dificultad en la respiración, y un incremento en la frecuencia de infecciones en el tracto respiratorio superior y de gastroenteritis, ambos relacionados con la exposición materna a PCBs a través de la dieta (Stølevik *et al.*, 2013). La exposición a PCBs también redujo la producción de anticuerpos anti-sarampión que se induce como respuesta a la vacunación (Stølevik *et al.*, 2013; Weisglas-Kuperus *et al.*, 2000). La misma disminución en la producción de anticuerpos como respuesta a la vacunación se observó tras la vacunación contra el tétanos y la difteria (Heilmann *et al.*, 2010). Se ha documentado que la exposición prenatal a PCBs también altera los niveles de la población de linfocitos T (Weisglas-Kuperus *et al.*, 2000).

### ➤ **Neurotoxicidad**

La exposición prenatal produce una disminución en las habilidades cognitivas y altera la memoria tanto a corto como a largo plazo (Patandin *et al.*, 1999). El coeficiente intelectual también parece disminuir y la comprensión verbal se empobrece tras la exposición prenatal a PCBs (Jacobson and Jacobson, 1996). Los PCBs son capaces de alterar el neurodesarrollo normal a través de diversos mecanismos que incluyen la disrupción de la hormona tiroidea, la alteración de la señalización del receptor GABA y la interferencia de las dinámicas del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Klocke *et al.*, 2020).

### ➤ **Cardiotoxicidad**

Se ha documentado un incremento significativo en la mortalidad por enfermedades cardiovasculares entre individuos empleados durante al menos 5 años en trabajos con una alta exposición potencial a PCBs (Gustavsson and Hogstedt, 1997). Se ha demostrado que habitar en la cercanía de sitios contaminados con contaminantes orgánicos persistentes como los PCBs constituye un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades coronarias y de infarto agudo de miocardio (Sergeev and Carpenter, 2005). También se ha encontrado una asociación positiva entre la exposición a PCBs y el riesgo a padecer hipertensión (Everett *et al.*, 2008). El estudio de una cohorte en Alabama (Estados Unidos) entre individuos cuya residencia se situaba cerca de la

fábrica de PCBs de la corporación Monsanto mostró que la concentración total de PCBs era el factor más determinante, después de la edad, en el incremento de la presión sanguínea (Goncharov *et al.*, 2011). Esta relación no sólo se ha confirmado en individuos altamente expuestos a PCBs por su cercanía a plantas de fabricación de PCBs, sino que el estudio de una población control de Navarra (España) demostró que aquellos individuos con una ingesta diaria de PCBs dentro del quintil de consumo de PCBs más alto tenían mayor riesgo de desarrollar hipertensión con el paso de los años (Donat-Vargas *et al.*, 2015). La exposición a PCBs también se ha documentado que causa disfunción endotelial (Hennig *et al.*, 2002), la cual se considera como un evento importante en el desarrollo de la arteriosclerosis y está asociada con la hipertensión y otras enfermedades. Esta disfunción parece darse en el caso de los PCBs coplanares a través de la inducción de AhR y de CYP1A1 y del incremento del estrés oxidativo. La exposición a los PCBs planares provoca la activación de NF- $\kappa$ B, factor de transcripción sensible al estrés oxidativo, el cual puede conducir a la expresión de genes proinflamatorios involucrados en la activación de las células endoteliales.

El estudio de una población nativa americana (población Mohawk) tradicionalmente consumidora de pescado local que se contaminó con PCBs como resultado de descargas de fundiciones de aluminio, reflejó una asociación entre la concentración en suero y el incremento en la síntesis de colesterol y triglicéridos. Un aumento en ambas sustancias está asociado con enfermedades del corazón y una elevada presión sanguínea, principales factores de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Goncharov *et al.*, 2008).

#### ➤ **Alteraciones del tejido óseo**

En humanos, la exposición a los PCBs puede provocar la presencia de dientes en los neonatos, fontanelas ampliamente abiertas y anormalidades en el cráneo debido a una calcificación irregular (Miller, 1985). Además, se ha encontrado una relación negativa entre la concentración de PCBs y la densidad mineral de los huesos (Hodgson *et al.*, 2008). *In vitro*, la exposición al Aroclor 1254 inhibe la proliferación e induce apoptosis en la línea de preosteoblastos MC3T3-E1. Además, reduce la actividad fosfatasa alcalina, la expresión del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  TRPV6 y disminuye los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, los cuales están envueltos en el proceso de diferenciación de los osteoblastos (An *et al.*, 2012; Herlin *et al.*, 2015).

#### ➤ **Carcinogénesis**

El análisis de distintas poblaciones de trabajadores de Estados Unidos (1957-1986) expuestos a los PCBs de forma ocupacional por su trabajo en la producción de

condensadores que contenían PCBs, como fluidos dieléctricos, mostró un incremento significativo en el número de casos de cáncer de cerebro y de melanoma (Sinks *et al.*, 1992; Ruder *et al.*, 2006; Loomis *et al.*, 1997). Se ha documentado también un exceso de muertes por cáncer del tracto digestivo, cáncer de pulmón y neoplasias hematológicas en relación con la exposición ocupacional o en individuos residentes en áreas con una alta exposición potencial (Maifredi *et al.*, 2011; Yassi *et al.*, 2003; Bertazzi *et al.*, 1987; Greenland *et al.*, 1994).

A parte del estudio de la carcinogénesis en relación con la exposición ocupacional a los PCBs, se han conducido numerosos estudios con el fin de estudiar la posible relación entre el desarrollo de determinados tipos de cáncer y la concentración en plasma y en tejido adiposo de PCBs.

Los PCBs han sido estudiados con respecto a su implicación en el cáncer de mama debido a su potencial para actuar como carcinógenos directos o indirectos imitando la acción del estrógeno, para interferir en la comunicación intercelular y para activar enzimas del citocromo P450. Aronson *et al.*, 2000 muestran una clara asociación entre la concentración de PCBs (PCBs 105, 118, 170 y 180) en el tejido adiposo mamario y el riesgo a padecer cáncer de mama. Otros autores también han documentado niveles elevados de PCBs en plasma o en el tejido adiposo de mujeres con cáncer de mama, en comparación con aquellas que muestran únicamente enfermedades benignas del seno o con tejido normal, sugiriendo un papel para estos carcinógenos ambientales en el origen del carcinoma de mama (Demers *et al.*, 2002; Falck *et al.*, 1992). Otros autores documentan que solo aquellas personas con variantes específicas de CYP1A1 son susceptibles a los efectos adversos de la exposición a PCBs. De modo que el incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama se da únicamente en aquellas mujeres con una mayor concentración de PCBs y al menos un alelo del polimorfismo genético CYP1A1 m2 (transición de A a G en el nucleótido 4889 que codifica para valina en vez de isoleucina), mientras que ambos factores por separado no se asocian con el riesgo de padecer cáncer de mama (Zhang *et al.*, 2004; Laden *et al.*, 2002; Moysich *et al.*, 1999).

Otros estudios en cambio no muestran relación entre la exposición a PCBs y un incremento en el riesgo de cáncer de mama (Ward *et al.*, 2000; Helzlsouer *et al.*, 1999; Høyer *et al.*, 1998; Hunter *et al.*, 1997; Wolff *et al.*, 1993).

Se ha sugerido que la exposición a PCBs puede incrementar el riesgo a padecer un melanoma maligno cutáneo (CMM). Un estudio llevado a cabo entre pacientes caucásicos con CMM y pacientes caucásicos control en relación a la concentración en plasma de PCBs encontró una fuerte asociación entre el riesgo a padecer melanoma y la concentración en plasma de PCBs (Gallagher *et al.*, 2011), sugiriendo que hay otros factores ambientales potenciales además de la radiación UV involucrados en el origen del melanoma.

### ➤ Alteraciones reproductivas

La exposición a PCBs se ha relacionado con un incremento en el riesgo de un resultado adverso en mujeres sometidas a fertilización *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), en particular debido a un fallo en la implantación del embrión (Meeker *et al.*, 2011).

Se ha encontrado una relación negativa entre la concentración de PCBs en cordón umbilical y el peso al nacer. Además, el incremento en la concentración de PCBs en cordón umbilical y suero materno induce una disminución en la tasa de crecimiento, en la longitud y en el valor de la circunferencia de la cabeza en neonatos (Patandin *et al.*, 1998; Fein *et al.*, 1984).

#### 1.1.2 Niveles en suero

Los PCBs se han detectado en suero humano, en el cordón umbilical, en el tejido adiposo fetal, la placenta, leche humana... A continuación se detalla la concentración de PCBs detectada en múltiples estudios realizados en distintos países.

### Europa

#### ➤ Dinamarca

Se han detectado niveles de PCBs de 1.3 µg/g de lípido en muestras obtenidas de mujeres embarazadas que habitan en las islas Feroe (Dinamarca), población cuya economía depende en gran medida de la pesca. Los niveles en la leche materna de estas mujeres alcanzaron un valor medio de 1.4 µg/g. El análisis del suero de los neonatos a los 18 meses de vida mostró niveles medios de 1.2 µg/g (Heilmann *et al.*, 2010). Otro estudio basado en el análisis de la sangre del cordón umbilical de niños de la misma cohorte Feroesa muestra un valor medio de 1.02 µg/g de lípido, con valores comprendidos entre los 0.53 µg/g de valor mínimo y los 1.71 µg/g de valor máximo (Grandjean *et al.*, 2001).

El análisis del suero de mujeres de Copenhague en busca de una relación entre la concentración en suero de PCBs y el desarrollo de cáncer de mama reveló valores en torno a 1.1 µg/g (Høyer *et al.*, 1998).

➤ **Noruega**

El análisis de la asociación potencial entre la exposición a PCBs y el cáncer de mama usando suero almacenado obtenido de individuos de una población noruega entre 1973 y 1991 mostró valores medios de 0.8 µg/g en los controles y de 0.78 µg/g en los casos y ningún tipo de tendencia entre un incremento en el riesgo de cáncer con los cuartiles de exposición más altos (Ward *et al.*, 2000).

➤ **Alemania**

Un estudio llevado a cabo por Weisglas-Kuperus *et al.*, 2000, detectó niveles de 0.4 µg/l en el cordón umbilical y en el suero de niños de 42 meses, y de 2 µg/l en las madres, aunque estos valores se refieren a la suma total de tan solo 4 congéneres (PCB 118, 138, 153 y 180).

➤ **República Checa**

En la República Checa los congéneres que más contribuyen a la contaminación en el suero humano son los PCBs 153, 138 y 180, siendo la media del congener más abundante, el PCB 153, de 0.44 µg/g de lípido. La suma de todos los PCBs (28, 52, 118, 138, 153 y 180) estudiados alcanzó un valor medio de 1.3 µg/g y 1.7 µg/g en individuos de las poblaciones checas de Ostrava y Uherské Hradište respectivamente. Sin embargo, el rango de los valores detectados en los individuos de ambas poblaciones varía ampliamente. En Ostrava el valor más bajo detectado entre los individuos fue de 0.18 µg/g y el valor más alto de 2.9 µg/g. En Uherské Hradište el rango fluctúa entre los 0.79 y los 5.3 µg/g (Cěrná *et al.*, 2008).

➤ **Eslovaquia**

En Eslovaquia se ha documentado una concentración media de PCBs de 3.1 µg/g de lípido en individuos que habitan en Michalovce, ciudad caracterizada por poseer la única fábrica de producción de PCBs en Eslovaquia. Estos valores contrastan con los detectados en poblaciones no afectadas en las cuales la concentración media ronda los 0.9 µg/g (Petrik *et al.*, 2006). Como contaminantes que se bioacumulan, los valores de PCBs detectados se incrementaron con la edad. De manera que dentro del grupo perteneciente al área contaminada, los individuos entre 50 y 59 años alcanzan concentraciones en suero de 4 µg/g, y en mayores de 60 años los niveles llegan hasta los 8 µg/g. Del mismo modo señalaron a los PCBs 153, 138 y 180 como contribuyentes mayoritarios a la contaminación por PCBs.

➤ **Italia**

El análisis en grupos con alto riesgo potencial a la exposición de PCBs por su cercanía a las emisiones de dos plantas incineradoras y en grupos pertenecientes a áreas no expuestas en la Toscana (Italia) no mostró diferencias significativas entre ambos. Para ambos casos se detectaron niveles medios de 0.3-0.38  $\mu\text{g/g}$  en el grupo de 27 a 54 años, y de 0.59-0.64 en el grupo con una edad superior a 54 años (De Felip *et al.*, 2008). Turrio-Baldassarri *et al.*, 2008 analizaron la concentración en suero de PCBs en la ciudad industrial de Brescia (noroeste de Italia), caracterizada por su planta química encargada de la producción de PCBs durante un periodo de 30-50 años. Periodo en el cual la contaminación se extendió por las zonas adyacentes dedicadas a la agricultura y ganadería, contaminando subsecuentemente los alimentos. Los individuos de la población se dividieron en 6 grupos, 4 de los mismos representaban a la población local general y a los residentes de 3 zonas (zona sur, sureste y sur suroeste) del área contaminada respectivamente. Los dos últimos grupos representan a los trabajadores actuales y pasados de la planta química. El valor medio en la población general fue de 1.1  $\mu\text{g/g}$ . De los 3 grupos pertenecientes a zonas contaminadas, 2 de ellos tuvieron niveles significativamente superiores a los de la población general (1.4 y 1.8  $\mu\text{g/g}$  en la zona sureste y sur respectivamente). Los trabajadores actuales de la planta muestran un valor de 0.77  $\mu\text{g/g}$ , valores muy inferiores a los detectados en los primeros trabajadores de la planta, presentes durante el periodo de producción de PCBs, en los cuales se dan valores de 12  $\mu\text{g/g}$ . El análisis en individuos que consumieron alimentos contaminados con PCBs detectó un valor medio de 14  $\mu\text{g/g}$ .

➤ **España**

En España se han llevado a cabo varios estudios con el fin de determinar la concentración de PCBs. Huetos *et al.*, 2014 realizaron un análisis a escala nacional en individuos de la población adulta entre 2009-2010 para los congéneres número 28, 52, 101, 138, 153 y 180. El valor medio de la suma de los PCBs más abundantemente detectados (PCB 138, 153 y 180) fue de 0.14  $\mu\text{g/g}$  de lípido. Al ser contaminantes que se bioacumulan, se detectó un incremento en la concentración de PCBs con la edad, este incremento fue de un 56% cada 10 años de edad. Con respecto a las diferencias geográficas, el nivel de los congéneres en las muestras de individuos de la zona norte y noreste fue superior al de los individuos de la zona sur. La concentración media para Asturias-Cantabria y País Vasco fue un 45 y un 88% superior que la media española respectivamente. El valor más bajo fue detectado en las islas Canarias, con un valor medio de 0.078  $\mu\text{g/g}$ . Estas diferencias geográficas parecen estar asociadas con el uso de equipamiento con PCBs. El valor más alto detectado fue en País Vasco, en el que se han cuantificado 18.000 toneladas de aparatos inventariados que contienen PCBs, en contraste con las 1.200 toneladas detectadas en las islas Canarias. Se encontró una

correlación entre la tasa de consumo de pescado a la semana y los niveles de PCBs, siendo superior en los individuos que consumen habitualmente pescado que en aquellos que no. Agudo *et al.*, 2009 analizaron la concentración de los PCBs 118, 138, 153 y 180. La concentración media en este estudio ronda los 0.46 µg/g y los niveles más altos se detectan en la zona norte (el valor más alto se da en Guipúzcoa con un 0.6 µg/g). La concentración de PCBs se relaciona inversamente con el índice de masa corporal y es mayor en hombres (un 30%) que en mujeres. El consumo de pescado es el factor dentro de la dieta que muestra la mayor asociación con la concentración en suero de PCBs. Wingfors *et al.*, 2000 analizaron un total de 33 PCBs en muestras de sangre y tejido adiposo, obteniendo un valor medio de 1.45 µg/g.

## Asia

### ➤ Korea

Los niveles en suero detectados en poblaciones de Seúl (Korea) seleccionadas por contener un incinerador municipal de residuos sólidos mostraron un valor medio de 0.24 µg/g de lípido. Los trabajadores de los incineradores, así como la población con residencia cercana a la misma, duplicaron la tasa de aquellos individuos que habitaban a más de 10km de distancia (0.21, 0.28 y 0.11 µg/g respectivamente) (Park *et al.*, 2007).

## América

### ➤ Estados Unidos

Falck *et al.*, 1992 documentan un valor medio de 1.7 µg/g en los casos detectados con cáncer y de 1.1 µg/g en los controles (enfermedades benignas de mama). Otro estudio llevado a cabo entre mujeres caucásicas en Connecticut para analizar la posible asociación entre el cáncer de mama y la concentración en suero de PCBs reporta niveles entre 0.31 y 2.6 µg/g (Zhang *et al.*, 2004).

El análisis en suero en mujeres que se han sometido a FIV e ICSI en la región de Boston reporta un nivel medio de 0.26 µg/g (Meeker *et al.*, 2011).

### **1.1.3 Aroclor 1254**

El Aroclor 1254 es una mezcla comercial de PCBs ampliamente usada que contiene congéneres similares y no similares a la dioxina, así como impurezas (dioxinas y



furano), representativa de la contaminación ambiental por PCBs (An *et al.*, 2012). Tiene la apariencia de un líquido viscoso amarillo. En esta mezcla de PCBs son especialmente abundantes los PCBs 52, 70, 87, 101, 110, 118, 138 y 153 (figura 4). Su uso se extendió en transformadores, condensadores, como aceite en sistemas hidráulicos y motores, en lámparas fluorescentes, como material de aislamiento para cables, adhesivos y cintas adhesivas, pintura, fabricación de plástico, papel autocopiativo sin carbono, líquido para el acabado de suelos y en la fabricación de material de sellado para edificios (Herrick *et al.*, 2004; Coghlan *et al.*, 2002).

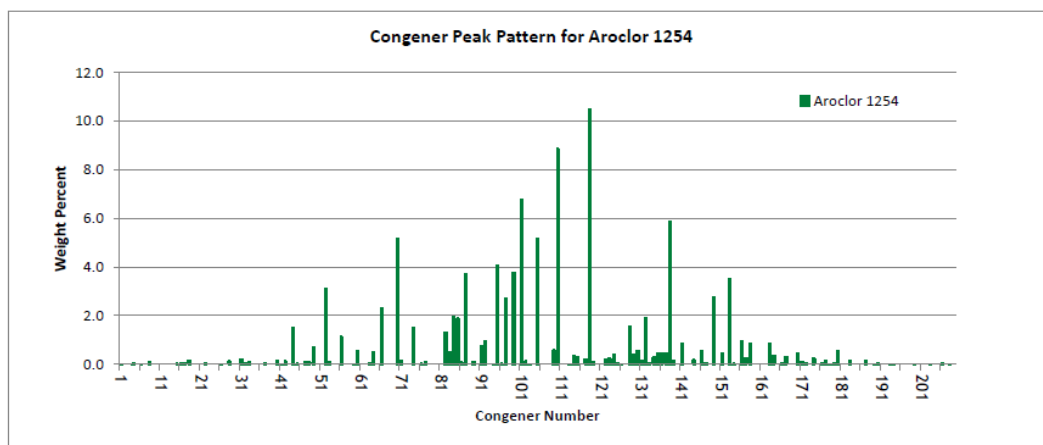


Figura 4: patrón de congéneres en la mezcla de Aroclor 1254.

## 1.2 CÁNCER

El cuerpo humano adulto se compone de aproximadamente  $10^{15}$  células, algunas de las cuales se dividen y diferencian para repoblar órganos y tejidos que requieran de recambio celular. Este proceso depende de un estrecho control, que se consigue mediante mecanismos moleculares que gobiernan por un lado la proliferación y por otro la muerte celular. Cualquier factor que altere este balance tiene el potencial, si no es corregido, de alterar el número total de células en un órgano o tejido dado y desembocar en un cáncer (Bertram, 2000).

El cáncer supone en la actualidad la principal causa de muerte a nivel mundial independientemente del nivel de desarrollo del país. Además, se espera que el número de casos de cáncer, así como el de muertes causadas por el mismo, aumente rápidamente junto con el incremento en el tamaño de la población, la edad, así como con el cambio en el estilo de vida que supone una transición económica y el desarrollo industrial (Torre *et al.*, 2016).

Los datos proporcionados por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) y recogidos en el proyecto GLOBOCAN 2020 indican que a nivel mundial se alcanzaron los 19.3 millones de nuevos casos detectados y más de 10 millones de muertes por cáncer para este pasado 2020. La IARC estima además que 1 de cada 5 personas han padecido cáncer a lo largo de su vida, y que 1 de cada 8 hombres y 1 de cada 11 mujeres morirán a causa de esta enfermedad.

La incidencia y mortalidad con respecto al tipo de cáncer varía en función del género, siendo el de mayor incidencia en mujeres el cáncer de mama, seguido del colorrectal, pulmón, cérvix y tiroides. El cáncer de mama supuso un 25% del total de los diagnósticos nuevos de cáncer para las mujeres en 2020. El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer diagnosticado con mayor frecuencia en hombres, seguido del de próstata, colorrectal y estómago. De forma global en ambos sexos la mayor tasa de mortalidad está causada por el cáncer de pulmón, mama, colorrectal, hígado y estómago (<https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>).

En España, el cáncer de mama es la principal causa de mortalidad por cáncer para las mujeres, así como el de mayor incidencia. Mientras que para los hombres la mayor incidencia es debida al cáncer de próstata y la principal causa de mortalidad por cáncer es atribuible al cáncer de pulmón. De manera conjunta en hombres y mujeres, los tipos de cáncer con mayor prevalencia en nuestro país son de mayor a menor importancia: cáncer de mama, próstata, colorrectal, cáncer de piel no melanoma, vejiga, pulmón, linfoma no Hodgkin, útero, riñón y melanoma.

La evidencia científica apoya la asociación entre el cáncer y la exposición ambiental. Sin embargo, pese a que numerosos estudios han intentado hacer una estimación de la proporción de cánceres que pueden ser relacionados con diferentes factores ambientales (Parkin *et al.*, 2011; Inoue *et al.*, 2012), no se ha conseguido a día de hoy una estimación fiable de la proporción real de los casos de cáncer que pueden ser atribuidos a factores ambientales (McGuinn *et al.*, 2012). El concepto de ambiente se usa a menudo en la literatura médica para un amplio espectro de factores que incluyen aquellos factores no genéticos como la dieta, el estilo de vida así como agentes infecciosos. Si tenemos en cuenta esta definición tan amplia, el ambiente estaría implicado en el origen de la mayor parte de los cánceres humanos. Teniendo en cuenta un sentido más específico del término, los factores ambientales incluyen solo aquellos agentes, naturales o creados por el hombre, con los que se encuentran los seres humanos en su vida diaria y sobre los cuales tienen un nulo o limitado control. En este estricto sentido, la exposición ambiental incluye contaminantes que se encuentran en el agua, aire, barro y alimentos (Boffetta, 2006).

En la actualidad existen dos interpretaciones opuestas que buscan explicar el incremento en la incidencia de cáncer observado en el último siglo. La primera de ellas considera que los contaminantes ambientales solo realizan una contribución menor en

los cambios en la incidencia de cáncer detectados. Según esta interpretación, los factores responsables del incremento en la incidencia de cáncer serían el aumento del tamaño y edad poblacional y la influencia de hábitos de vida como el tabaco, el alcohol y la dieta (Taylor *et al.*, 2007; Gallagher and LeRoith, 2015). Por el contrario, la segunda interpretación considera que estos argumentos no serían suficientes y estima que además de estos factores habría una importante contribución ambiental, en la que estaría involucrada la exposición involuntaria a distintos contaminantes (Belpomme, Irigaray, Hardell, *et al.*, 2007; Irigaray *et al.*, 2007; Kiriluk *et al.*, 2012).

Esta última interpretación estaría apoyada por diversos autores, según los cuales los factores ambientales juegan un papel más importante en el origen del cáncer de lo que se establece habitualmente (Belpomme, Irigaray, Hardell, *et al.*, 2007; Belpomme, Irigaray, Sasco, *et al.*, 2007; Irigaray *et al.*, 2007; Kiriluk *et al.*, 2012). Para estos autores, si bien factores como la obesidad se han incrementado en algunos países durante el transcurso de las últimas décadas, el creciente aumento en la incidencia de cáncer no está solo relacionado con aquellos cánceres relacionados con factores como la obesidad u otros que obedezcan al ámbito del estilo de vida. Además, estos autores citan la evidencia de que el ambiente haya cambiado durante la misma escala de tiempo durante la cual ha tenido lugar el incremento en la incidencia de cáncer en la población, y que ese cambio incluye la acumulación de nuevos factores carcinógenos en el ambiente. Por otro lado, el hecho de que la susceptibilidad genética al cáncer debido a polimorfismos genéticos no pueda haber cambiado en el transcurso de una generación favorecería la hipótesis del papel de factores exógenos actuando mediante interacciones genes-ambiente (Mucci *et al.*, 2001). Por último, la edad no es el único factor que debiera considerarse, dado que el incremento en la incidencia de cáncer se ha detectado en todos los rangos de edad incluyendo los niños. Estos autores consideran además como ambiente aquellos agentes biológicos (virus, bacterias...), químicos (compuestos xenobióticos) y físicos (radiactividad, UV...) que pueden estar presentes en el entorno de los individuos, excluyendo hábitos conductuales como el tabaco, consumo de alcohol y la dieta.

### **1.2.1 Melanoma**

El melanoma es un tipo de cáncer que surge a partir de la transformación maligna de los melanocitos. Los melanocitos son células pigmentadas especializadas que se encuentran predominantemente en la piel y los ojos, donde producen melanina, el pigmento responsable del color de la piel y el pelo (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Los melanocitos cutáneos se originan a partir de progenitores de la cresta neural que migran a la piel durante el desarrollo embrionario. En la piel, los melanocitos residen en la capa basal de la epidermis y los folículos pilosos, y su homeostasis está controlada por queratinocitos epidérmicos.

## Epidemiología

El cáncer de piel es el tercer tipo de cáncer más abundante y su incidencia global está aumentando de forma alarmante en los últimos años. Dentro del cáncer de piel, el carcinoma de células basales, el carcinoma de células escamosas y el melanoma son las formas más comunes. El melanoma maligno cutáneo es una de las formas más mortales, ya que es responsable del 75% de las muertes relacionadas con el cáncer de piel (Su *et al.*, 2009).

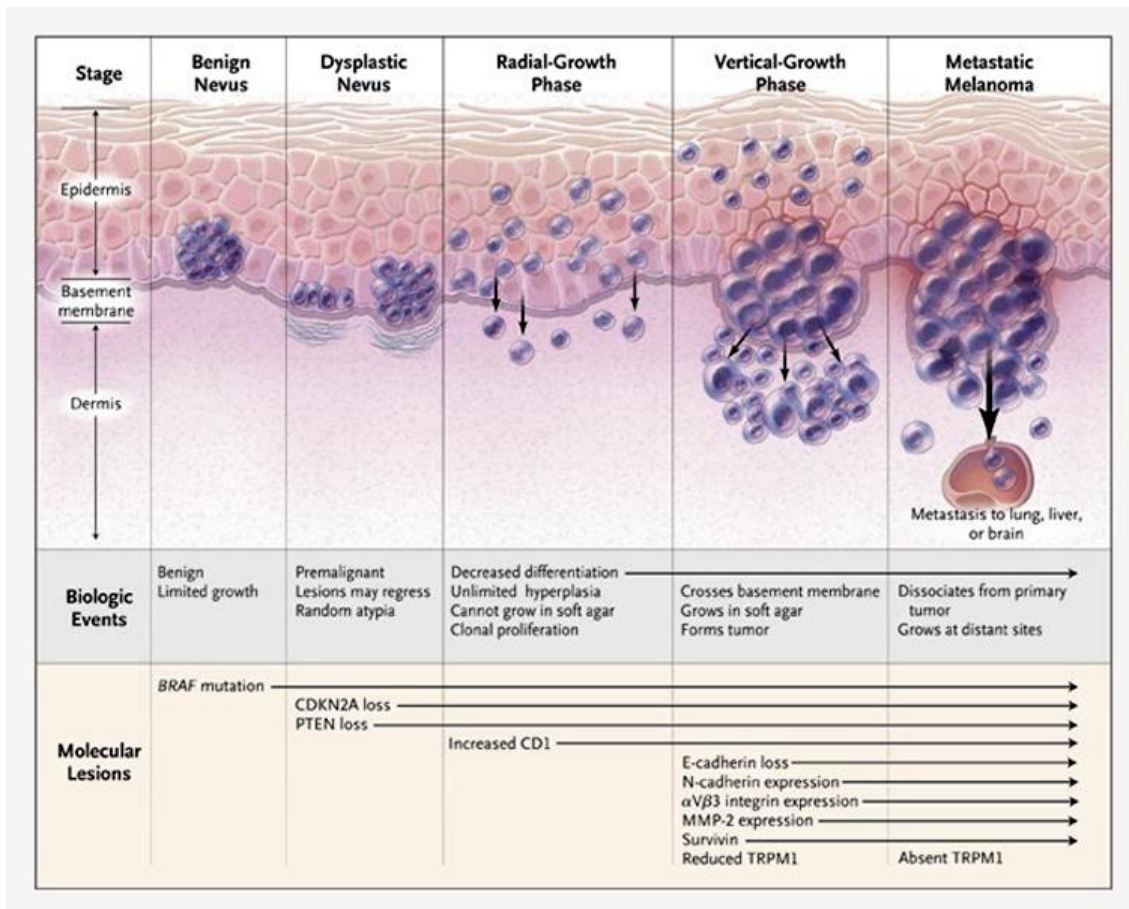
Si el melanoma es diagnosticado en fases tempranas, puede curarse mediante escisión quirúrgica. Sin embargo, el melanoma maligno metastático es ampliamente resistente a las terapias actuales y tiene un mal pronóstico, con una tasa media de supervivencia de 6 meses, y de 5 años en un porcentaje inferior al 5% de los pacientes (Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

El principal factor de riesgo ambiental para el melanoma maligno cutáneo es la radiación ultravioleta (UV), procedente del sol o de fuentes artificiales (Gallagher *et al.*, 2011). Algunos estudios conducidos para analizar otros factores de riesgo ambiental u ocupacional para el melanoma maligno cutáneo han mostrado un elevado riesgo en ocupaciones relacionadas con la exposición a compuestos organoclorados como los PCBs (Loomis *et al.*, 1997; Ruder *et al.*, 2006).

## Tipos de melanoma cutáneo y progresión

Las mutaciones en genes críticos en la regulación del crecimiento, la producción de factores de crecimiento autocrinos y la pérdida de receptores de adhesión contribuyen a la alteración en la señalización intracelular de los melanocitos, permitiéndoles escapar de la férrea regulación que ejercen sobre ellos los queratinocitos (Haass *et al.*, 2004). De este modo, los melanocitos pueden proliferar y extenderse, conduciendo a la formación de un nevus o lunar común. La proliferación de los melanocitos puede restringirse a la epidermis (nevus de unión), a la dermis (nevus dérmico), o solapar componentes de ambos (nevus compuesto).

Los nevus son generalmente benignos pero pueden progresar al melanoma de fase de crecimiento radial (*radial-growth-phase* (RGP)), una lesión intradérmica que puede involucrar microinvasiones locales de la dermis. Las células en fase de crecimiento radial pueden progresar a la fase de crecimiento vertical (*vertical-growth-phase* (VGP)), una fase más peligrosa en la cual las células tienen potencial metastático, con nódulos o nidos de células invadiendo la dermis (figura 5). No todos los melanomas pasan por cada una de estas fases individuales. La RGP y la VGP se pueden desarrollar directamente a partir de melanocitos aislados o nevus, y ambos pueden progresar directamente a melanoma maligno metastático.



**Figura 5:** Eventos biológicos y cambios moleculares en la progresión del melanoma (Miller and Mihm, 2006). Durante la fase de nevus benigno puede tener lugar una mutación en el gen BRAF y la activación de la ruta de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). La atipia citológica observada en los nevus displásicos refleja lesiones en las rutas del inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* o CDKN2A) y en la ruta del homólogo de la fosfatasa y tensina (PTEN). El siguiente paso en la progresión del melanoma está asociado con una pérdida de la diferenciación y una disminución en la expresión de los marcadores de melanoma regulados por el factor de transcripción asociado a microftalmia (*microphthalmia-associated transcription factor*, MITF). En la fase de crecimiento vertical y de melanoma metastático son característicos los notables cambios que se producen en el control de la adhesión celular. Entre estos cambios se incluyen la pérdida de E-cadherina y un aumento en la expresión de la N-cadherina y de la metaloproteasa de matriz 2 (MMP-2).

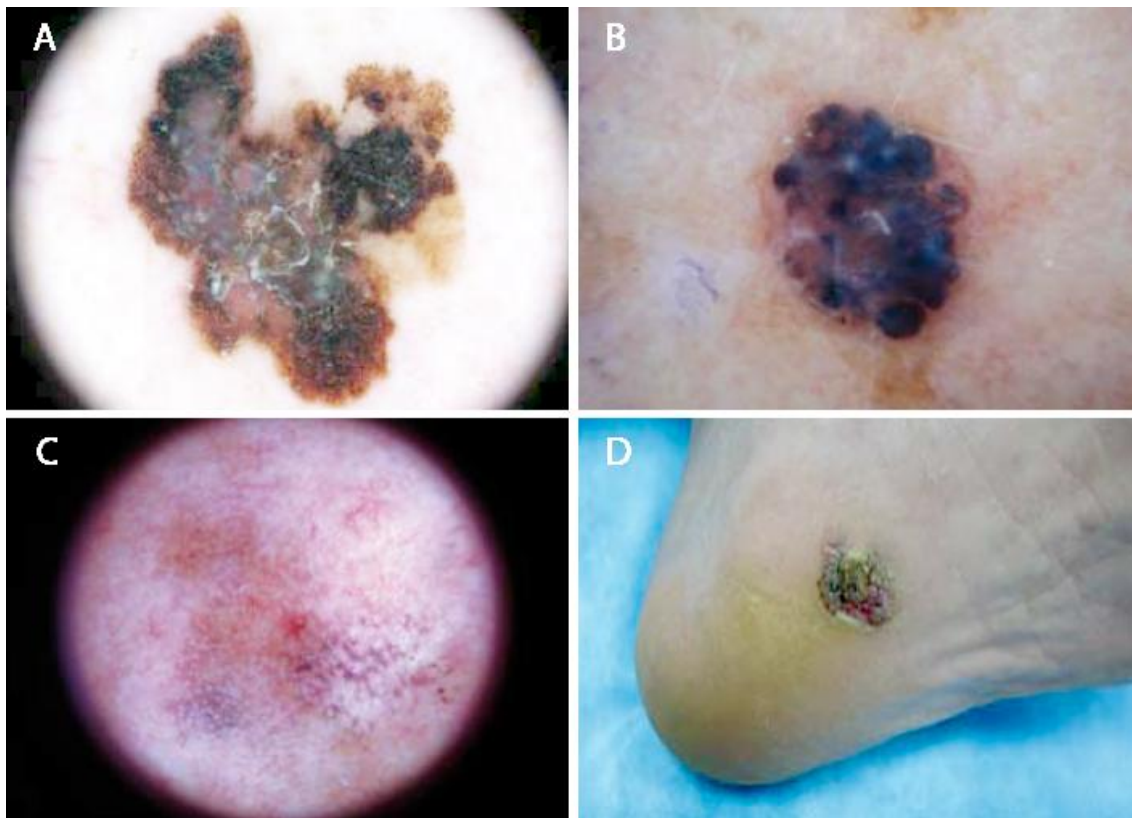
No hay una presentación clínica típica del melanoma. El principal hallazgo clínico es una lesión cutánea pigmentada que muestre importantes cambios clínicos a lo largo de un periodo de tiempo que puede ser de meses o incluso años. Cualquier cambio en el color, forma o tamaño de las lesiones cutáneas, asociado además a bordes irregulares o a sensación de quemazón, picor o dolor debe de ser evaluado con atención. Estos cambios son parte de la conocida como "regla ABCDEFG" de gran importancia en el examen clínico de toda lesión pigmentada (A-asimetría, B-borde, C-color, D-diámetro,

E-elevación o evolución, F-*feeling* o sensación, G-*growth* o crecimiento) (Šitum *et al.*, 2014). Además, en la práctica diaria el conocido como el signo "*ugly duckling*" o el signo del "patito feo", es una herramienta de diagnóstico muy útil a la hora de detectar lesiones sospechosas. Este método se basa en que las personas con múltiples nevos tienen un patrón o perfil específico, de modo que se presenta un tipo morfológico predominante de nevus en el individuo. Por ello, cualquier lesión que parezca diferente del resto de lesiones cercanas debiera ser considerada como el "patito feo" y examinarla con detenimiento o extirparla (Šitum *et al.*, 2014).

La presentación clínica del melanoma varía dependiendo de la localización anatómica y del tipo de crecimiento tumoral, conocido como tipo histopatológico. Hay cuatro clases histopatológicas principales de melanoma (figura 6). La forma más común de melanoma en la población caucásica es el **melanoma de extensión superficial** (MES). Este tipo de melanoma es generalmente plano, con un componente intraepidérmico particularmente en los bordes, y está asociado a episodios de quemaduras solares graves, especialmente en edades tempranas. Durante la fase de crecimiento horizontal se presenta como una mácula de color marrón claro a negro con bordes irregulares. En la fase de crecimiento vertical, la superficie es rugosa o papilomatosa y puede estar ulcerada. Es más frecuente en mujeres y puede aparecer en cualquier localización anatómica, con mayor frecuencia en el tronco en los hombres y en las extremidades inferiores en mujeres.

El **melanoma nodular** (MN), el cual consiste en nódulos abultados que no poseen una porción plana significativa, es el segundo tipo de melanoma más común. Aparece con una frecuencia similar en hombres y mujeres, localizándose principalmente en el tronco, cuello y cabeza. La evolución de esta lesión es corta ya que suele desarrollarse desde tan solo un par de meses a dos años antes del diagnóstico. Se considera más agresivo que el MES y suele desarrollarse más rápido. Suele ser más oscuro que el MES, está bien delimitado y se presenta como un nódulo uniformemente coloreado con o sin ulceración. El MN a menudo presenta una pigmentación marcada y una superficie brillante que permite su reconocimiento clínico.

El **melanoma lentigo maligno** (MLM) es generalmente plano en apariencia y se desarrolla principalmente en áreas de exposición solar crónica (nariz y mejillas) en pacientes de edad media-avanzada, con misma frecuencia en ambos sexos. Entre el 5 y el 15% de los melanomas se diagnostican como MLM. La lesión cutánea precursora del MLM es el MLM *in situ*, el cual se presenta como una mácula de varias formas con pigmentación marrón irregular, un tamaño de 3-6 cm, y a menudo pobremente definido. El MLM *in situ* experimenta una fase de crecimiento horizontal durante 15 años o más antes de transformarse en la forma invasiva MLM. La aparición de áreas o nódulos oscuros y la infiltración en el MLM *in situ* indican la progresión hacia el MLM.



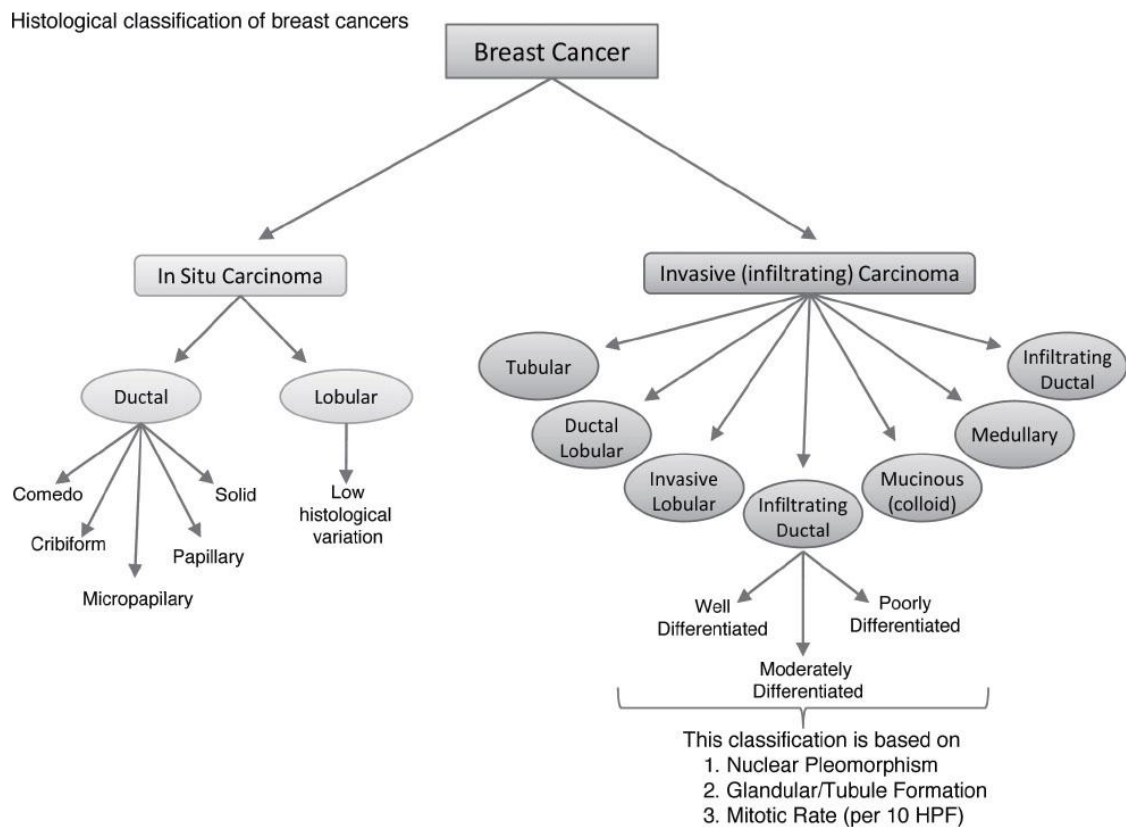
**Figura 6:** Presentación de las cuatro clases principales de melanoma (adaptado de Šitum *et al.*, 2014). 1) Melanoma de extensión superficial (MES) que muestra una absoluta asimetría en el color y forma; 2) melanoma nodular (MN) con glóbulos oscuros distribuidos de forma asimétrica y velo blanco azulado; 3) melanoma lentigo maligno (MLM) con aberturas foliculares pigmentadas de forma asimétrica; 4) melanoma lentiginoso acral (MLA).

El **melanoma lentiginoso acral** (MLA) suele encontrarse en las palmas de las manos y pies y en el lecho ungueal, de modo que no está asociado con la exposición UV. El MLA es el tipo de melanoma menos común en la población caucásica. Sin embargo, es el tipo más frecuente diagnosticado entre la población asiática y en individuos de piel oscura. Se desarrolla en varios meses hasta varios años. Inicialmente se presenta como una mácula marrón desigualmente pigmentada con bordes irregulares. La lesión puede alcanzar un tamaño de 3 cm con posible formación de un componente nodular. La localización subungueal es muy común en el MLA, especialmente en el dedo gordo. Se presenta como una banda de uña longitudinal marrón o negra, a veces acompañada de distrofia. En ocasiones el MLA presenta una superficie verrugosa que es el motivo por el cual este tumor a veces no se identifica durante un largo período (Šitum *et al.*, 2014).



### 1.2.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, tanto genéticamente como en la práctica clínica. Puede clasificarse en carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo (infiltrante) (figura 7).



**Figura 7:** Clasificación histológica de los diferentes subtipos del cáncer de mama. Este esquema se basa en las características arquitectónicas y en los patrones de crecimiento para clasificar la heterogeneidad encontrada en el cáncer de mama. HPF= *high power field*. (Malhotra *et al.*, 2010).

El **carcinoma de mama *in situ*** puede subdividirse además en ductal o lobular. El carcinoma ductal *in situ* (CDIS) es más común que su homólogo, el carcinoma lobular *in situ* (CLIS), e incluye un grupo heterogéneo de tumores. El CDIS se subclasifica a su vez basándose en las características arquitectónicas del tumor, lo que ha dado lugar a cinco subtipos bien reconocidos; comedo, cribiforme, papilar, micropapilar y sólido. Si bien esta clasificación ha sido una importante herramienta durante años, depende únicamente de la histología y no emplea marcadores moleculares. A la luz de los avances moleculares que han tenido lugar en los últimos años y a las mejoras quirúrgicas que permiten conservar la mama, ha sido necesario categorizar a los



pacientes en base al riesgo de recurrencia o progresión. Estas nuevas demandas han llevado a la creación de algunos nuevos sistemas de clasificación que incorporan marcadores moleculares como el ER, PR, ErbB2 (Her2/neu) y p53.

De manera muy similar a lo que ocurre con los carcinomas *in situ*, los **carcinomas invasivos** son un grupo heterogéneo de tumores que se diferencia en distintos subtipos histológicos. La gran mayoría de los tipos de tumores invasivos incluye el ductal infiltrante, lobular invasivo, ductal/lobular, mucinoso (coloide), tubular, medular y carcinoma papilar. De todos ellos, el carcinoma ductal infiltrante (CDI) es con creces el subtipo más común, ya que supone entre el 70-80% de todas las lesiones invasivas. El CDI se divide a su vez en grado 1 (bien diferenciado), grado 2 (moderadamente diferenciado) y grado 3 (pobrementemente diferenciado), en base a los niveles de pleomorfismo nuclear, formación glandular/tubular e índice mitótico. En comparación con el carcinoma ductal *in situ*, donde el uso de los marcadores moleculares todavía es un ámbito a debate, la utilidad de los marcadores ER, PR y HER2/neu está bien establecida para el carcinoma ductal infiltrante y se recomienda que se determine dicho estatus en todos los carcinomas invasivos (Malhotra *et al.*, 2010).

Si bien la citada clasificación histológica actual tiene un valor de pronóstico, la ausencia de componentes moleculares en este esquema limita sobremanera la capacidad para predecir la respuesta a las nuevas terapias dirigidas. La reciente identificación de subtipos moleculares dentro del cáncer de mama ha proporcionado respuestas para resolver dicha cuestión. Diferentes estudios identifican algunos subtipos moleculares intrínsecos del cáncer de mama que han sido posteriormente confirmados y además clasificados como: tipo basal, ErbB2<sup>+</sup>, *normal breast like* (similar a la mama normal), luminal subtipo A, luminal subtipo B y *claudin-low*. Estos subtipos muestran diferencias significativas a la hora de predecir la tasa de supervivencia, siendo de todos ellos el subtipo tipo basal o triple negativo (ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/ErbB2<sup>-</sup>) el de una tasa de supervivencia más baja (Malhotra *et al.*, 2010).

### 1.2.3 Invasión tumoral

La migración e invasión celular no son sólo acontecimientos cruciales en diversos eventos fisiológicos (embriogénesis, morfogénesis, angiogénesis...), sino que también están implicados en diferentes enfermedades entre las que se encuentra el cáncer (Bozzuto *et al.*, 2010).

Las neoplasias o tumores tienen dos sellos distintivos, por un lado la acumulación excesiva de células y por otro lado la organización tisular alterada. Desde una perspectiva clínica, las neoplasias se clasifican como benignas o malignas. Las primeras están circunscritas, con bordes delimitados y no son invasivas. En este contexto, los tumores benignos están formados por células que no metastatizan a distancia a través

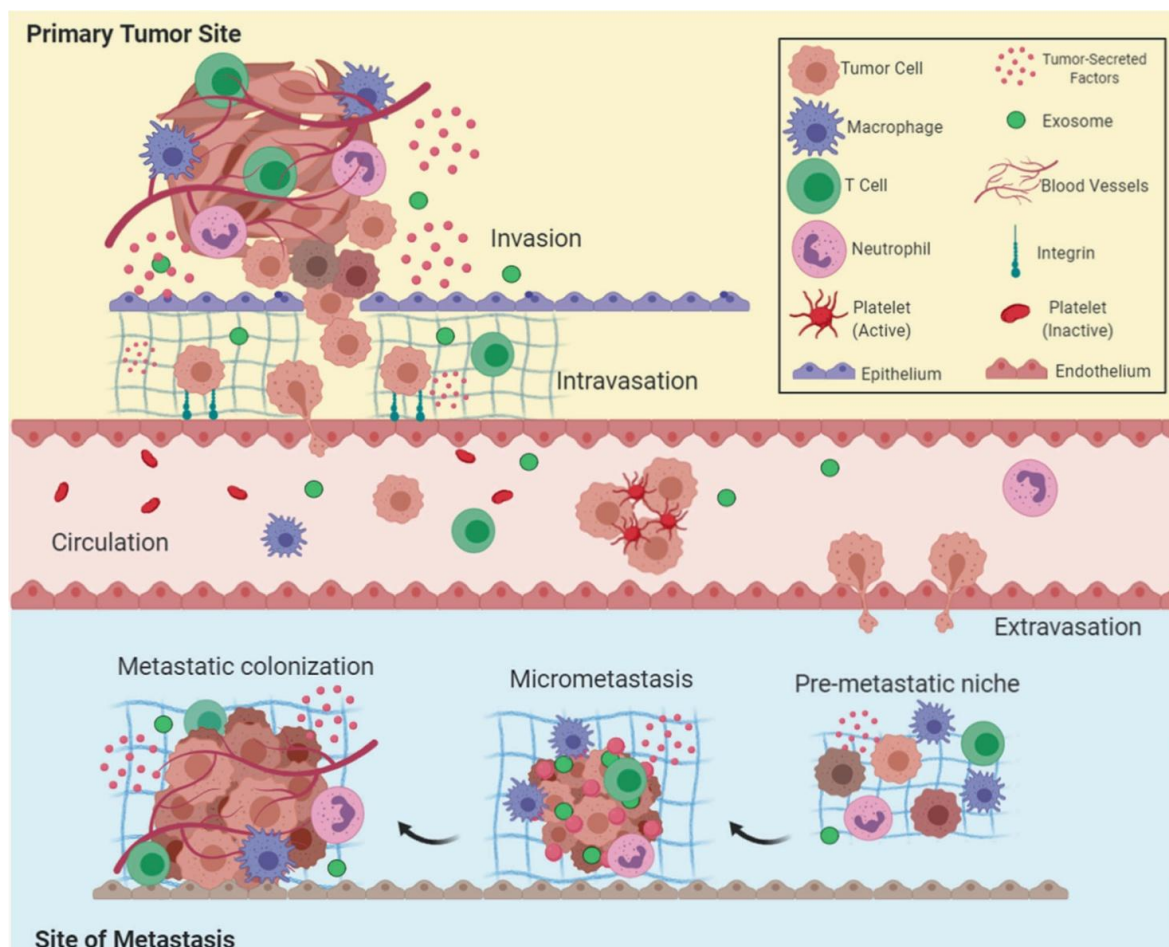
de la sangre o de los vasos linfáticos. Hay que tener en cuenta que los tumores benignos pueden llegar a ser letales si su crecimiento compromete la función de un tejido u órgano vecino. Por el contrario, las neoplasias malignas son tumores que invaden el estroma colindante, adquieren motilidad y se anclan en órganos cercanos o distantes donde frecuentemente recapitulan las características fenotípicas del tumor primario. Desde un punto de vista histogenético, el cáncer se puede clasificar en aquellos que tienen su origen en el tejido epitelial o carcinomas, y en aquellos cuyo origen es el tejido conectivo incluyendo el sarcoma y leucemias. Se calcula que aproximadamente el 90% de los tumores clínicos son carcinomas (Sonnenschein and Soto, 2016).

La diseminación de células malignas desde el tumor primario a lugares distantes, también conocida como metástasis, es la principal característica de los tumores malignos. De hecho, es precisamente esta capacidad la principal causa de mortalidad (>90%) entre los pacientes con cáncer. En estos pacientes, se liberan diariamente a la circulación un gran número de células cancerígenas. Sin embargo, estudios realizados en modelos animales con melanoma sugieren que sólo consigue metastatizar un porcentaje inferior al 0.1% de las células tumorales (Cretu and Brooks, 2007; Bozzuto *et al.*, 2010; Fares *et al.*, 2020). Tanto el desarrollo como la progresión maligna del cáncer son procesos que involucran múltiples etapas. En particular, las metástasis originadas por carcinomas se forman tras completar una compleja sucesión de eventos celulares y biológicos, que se denominan de forma colectiva como **cascada metastática** (Saxena and Christofori, 2013).

Los principales acontecimientos que tienen lugar durante el proceso de metástasis son (figura 8): (1) escape de células tumorales del tumor primario mediante desconexión de las adhesiones intercelulares, (2) escape de la anoikis (apoptosis inducida por ausencia de adhesión celular), (3) invasión del tejido circundante mediante proteólisis de la matriz extracelular y locomoción de las células tumorales en la matriz, (4) intravasación a la sangre o a los vasos linfáticos, (5) evasión del sistema inmunitario y diseminación por el torrente sanguíneo o por el sistema linfático, (6) adhesión a células endoteliales, (7) extravasación de los vasos linfáticos/sanguíneos, y finalmente (8) colonización y proliferación en un lugar secundario e inducción de angiogénesis (Hapach *et al.*, 2019; Böhle and Kalthoff, 1999).

Para definir las **características de las células metastáticas** es necesario conocer de donde provienen. La cascada metastática es consecuencia de la inestabilidad cromosómica originada por errores continuos en la segregación de los cromosomas durante la mitosis (Fares *et al.*, 2020). Dentro del tumor, las células son morfológica, bioquímica y genéticamente heterogéneas. Estas diferencias de comportamiento pueden ser debidas a variaciones genéticas, epigenéticas, posicionales o temporales. La heterogeneidad genética se refiere a las propiedades inherentes a las células

tumorales. La heterogeneidad epigenética hace referencia a modificaciones químicas transitorias del ADN y/o cromatina, las cuales conducen a una selectiva regulación espacio-temporal de la transcripción genética para una célula dada en respuesta a condiciones ambientales (pH, factores de crecimiento, O<sub>2</sub>, citocinas, quimioquinas...). Algunos de los dogmas más importantes en el cáncer son: a) los tumores y metástasis son de origen clonal, b) la heterogeneidad es una característica constante en los tumores, c) la heterogeneidad existe para prácticamente todos los fenotipos encontrados en el cáncer, d) las variantes existentes dentro del tumor surgen independientemente, y e) éstas parecen conservar la capacidad de autorreplicación y la inestabilidad genómica (Welch and Hurst, 2019).



**Figura 8:** Esquema general de la cascada metastásica. Se observan los pasos clave de la metástasis: invasión, intravasación, circulación, extravasación y colonización (Obtenido de Fares *et al.*, 2020).

Antes de volverse tumorigénicas, las células pierden su habilidad para diferenciarse completamente, pierden la inhibición por contacto, dejan de ser dependientes de anclaje y son genéticamente inestables. Esta masa de células típicamente pasa por una

fase expansible en ausencia de invasión. En esta etapa, las células son aún pleomórficas y la masa está frecuentemente encapsulada por una densa red fibrosa. Con el paso de sucesivas generaciones surgen variantes y la presión selectiva cambia la composición de la población. Algunos subconjuntos de células neoplásicas adquieren la habilidad de escapar a través de la membrana basal, la conocida marca distintiva de la malignidad. Estos pequeños grupos de células invasivas adquieren entonces la capacidad de separarse del tumor primario y de moverse a otros lugares para formar metástasis. La adquisición de estas características puede ocurrir en cualquier orden, pero es necesario adquirir todas las características neoplásicas para que la transición a la malignidad sea satisfactoria.

Sin embargo, esta teoría de la mutación-selección tiene sus detractores, que argumentarían que la adquisición del comportamiento metastático e invasivo es más bien una recapitulación del proceso que ocurre durante la embriogénesis: la transición epitelio-mesénquima (*epithelial to mesenchymal transition* o EMT). Aunque no son equivalentes, la EMT que tiene lugar en el cáncer y la que ocurre durante el desarrollo normal presentan algunas características en común. La EMT en el cáncer se caracteriza por la pérdida del marcador epitelial E-cadherina de las uniones adherentes y por un cambio de la expresión de queratinas como principal filamento intermedio al filamento intermedio mesenquimal vimentina. En última instancia, los mecanismos epigenéticos y la plasticidad celular pueden jugar un papel significativo conduciendo la progresión tumoral a la malignidad, que solo podría explicarse por mutación y selección (Welch and Hurst, 2019).

La **invasión** es la capacidad de las células tumorales para alterar la membrana basal y penetrar en el estroma subyacente. La invasión a través de la membrana basal es considerada como el paso diferenciador entre una neoplasia precancerosa y un cáncer maligno. Aunque la invasión es necesaria para que tenga lugar la metástasis, no es suficiente por sí sola. La invasión requiere cambios en la morfología y en el fenotipo, así como alterar el ambiente del entorno. Durante la invasión hay 3 procesos importantes dinámicamente regulados que incluyen la adhesión, la reorganización de la matriz extracelular (ECM) y la motilidad. Las células epiteliales normalmente forman láminas polarizadas que se mantienen unidas por desmosomas y uniones estrechas. Se anclan a la membrana basal por hemidesmosomas y filamentos intermedios, integrinas y actina organizada en el citoesqueleto. Para invadir, las células alteran las adhesiones célula-célula y célula-matriz, mientras que al mismo tiempo reorganizan la matriz extracelular y la motilidad. Esta motilidad es necesaria pero no suficiente para pasar a la sangre o los vasos linfáticos. Las células deben adherirse y crear pasajes a través de la ECM. Por lo tanto, es necesaria la adhesión para tener la suficiente tracción y avanzar por la matriz pero las células no deben estar tan fuertemente adheridas como para impedir el movimiento. La matriz extracelular se remodela por enzimas producidas directamente por las células tumorales o bien por células asociadas a estas. Estas

enzimas degradarían la ECM y facilitarían la invasión de las células tumorales. De forma conjunta, el movimiento celular requiere que la adhesión célula-célula, célula-matriz, la degradación de la ECM y la actividad del citoesqueleto se den de forma coordinada (Hapach *et al.*, 2019; Welch and Hurst, 2019).

Tras la invasión local, para la dispersión celular es necesaria la entrada a un compartimento de tránsito. Este proceso es conocido como **intravasación**. La intravasación requiere como mínimo de la degradación parcial de la ECM y de la membrana basal subyacente a las células endoteliales. Tras este proceso, las células tumorales sufren deformaciones para conseguir pasar entre las células endoteliales y extender filopodios en el lumen. En este punto, la liberación de VEGF está asociada con un incremento en la permeabilidad vascular.

Una vez en el compartimento de transporte, las células pueden diseminarse a donde quiera que el compartimento vaya. El movimiento dentro de los vasos o cavidades puede ser activo o pasivo. Durante la diseminación, las características de las células tumorales circulantes (CTC) varían ampliamente. Un ejemplo de ello es la gran variedad de marcadores tanto epiteliales como mesenquimales encontrados en las CTCs. Durante la **diseminación**, el comportamiento de las células tumorales está determinado por la existencia de células individuales o de émbolos. La embolización puede ser homotípica (célula tumoral-célula tumoral) o heterotípica (célula tumoral-leucocito, -plaqueta, -fibrina). Aunque representan la minoría de las CTCs encontradas en la circulación, los émbolos están asociados con un peor pronóstico en numerosos tipos de cáncer. El tamaño del émbolo protege las células del efecto del daño mecánico durante el transporte, así como del ataque del sistema inmunitario (Castro-Giner and Aceto, 2020). De los millones de células que pasan a la circulación diariamente, la gran mayoría falla en colonizar con éxito lugares secundarios, por lo que es un proceso altamente ineficiente. Esto es debido a que la mayor parte de las CTCs mueren durante la circulación debido a una combinación de estrés físico, estrés oxidativo, anoikis y a la ausencia de factores de crecimiento y citocinas (Micalizzi *et al.*, 2017).

Las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos constituyen la primera barrera que deben superar las células tumorales para escapar de los vasos. Las células endoteliales de cada tejido expresan una combinación única de marcadores que las células tumorales pueden reconocer y de este modo adherirse de una manera selectiva. La adhesión inicial de las células tumorales tiene lugar preferentemente en las uniones celulares de las células endoteliales. Tras la migración transendotelial, las células tumorales encuentran la membrana basal subyacente, secretan proteinasas, se deforman al pasar entre las células y los agujeros en la matriz y comienzan el proceso de colonización. Los mecanismos moleculares involucrados en la **extravasación** son similares a aquellos involucrados en la intravasación. La eficiencia de la extravasación

depende del comportamiento intrínseco de las células tumorales y de las características del tejido huésped (Labelle and Hynes, 2012; Welch and Hurst, 2019).

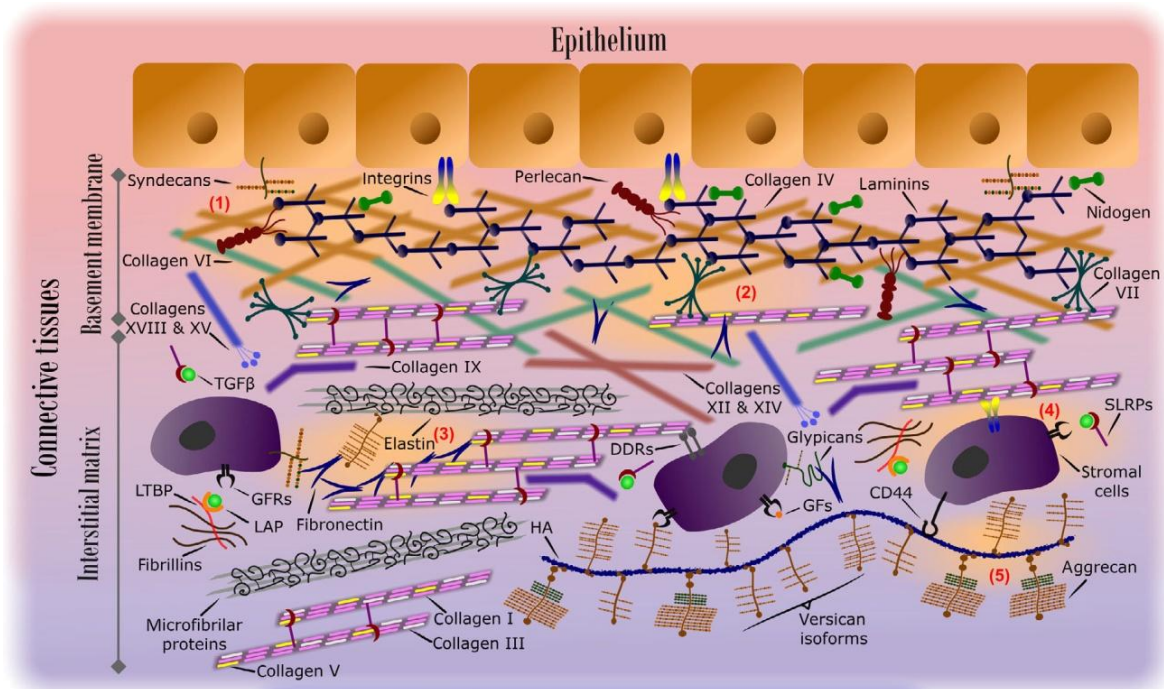
La **colonización** de tejidos secundarios requiere de los mismos elementos que el crecimiento del tumor primario. Aunque el crecimiento inicial de las metástasis puede ocurrir en ausencia de angiogénesis, el crecimiento a partir de un determinado tamaño (~1mm) requiere de cooptación de vasos existentes y desarrollo de nuevos vasos o formación de canales vasculares por las células tumorales. El establecimiento de un ambiente metastático de apoyo tiene lugar antes de la llegada de cualquier célula tumoral, y es lo que se conoce como el nicho pre-metastático. El patrón que siguen las metástasis no es aleatorio, como establece la conocida teoría de "la semilla y la tierra" de Stephen Paget, 1889. Los dogmas clave de esta hipótesis son: 1) las células tumorales están dotadas de ciertas características que las permiten sobrevivir a los múltiples pasos de la cascada metastática; 2) las células tumorales responden de manera selectiva a señales provenientes de los tejidos huésped, de manera que la distribución de las metástasis no es debida al azar sino a la combinación de propiedades entre la célula "semilla" y el órgano "tierra" en el que se desarrollarán. Recientemente se ha añadido un tercer elemento a los dos dogmas preexistentes, el cual es una analogía del "clima". Este "clima" representa la salud general del individuo y ciertos componentes genéticos inherentes que pueden conducir a alteraciones de la función inmune, del metabolismo etc. (Eslami-S *et al.*, 2020; Welch and Hurst, 2019).

Es importante señalar que la cascada metastática y la formación de un tumor secundario solo pueden entenderse a partir de cuatro capacidades o sellos esenciales que son: 1) motilidad e invasión, 2) habilidad para modular el lugar secundario o el microambiente local (p. ej. alterando la matriz extracelular), 3) plasticidad y 4) habilidad para colonizar tejidos secundarios (Amos and Choi, 2021; Welch and Hurst, 2019).

### **1.2.3.1 Matriz extracelular**

La matriz extracelular (ECM) es una estructura tridimensional, no celular, presente en todos los tejidos. Cada órgano tiene una matriz con una composición única, la cual se genera ya en fases embrionarias tempranas. Su función va más allá de proporcionar soporte físico y mantener la integridad y elasticidad del tejido, ya que es un componente fisiológicamente activo del tejido vivo y es responsable de la comunicación celular, la adhesión celular y la proliferación. La estructura de la matriz es dinámica y se remodela continuamente de forma estrechamente controlada para mantener la homeostasis. Este proceso de remodelación supone cambios cualitativos y cuantitativos en la ECM, y en él están involucradas enzimas específicas como las metaloproteasas de la matriz (MMPs). La desregulación de su composición, estructura,

rigidez, y abundancia contribuye a la aparición de patologías como la fibrosis y el cáncer invasivo (Bonnans *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2018).



**Figura 9:** Esquema de la organización de las matrices extracelulares y sus componentes principales. Puede observarse la membrana basal, un tipo especializado de ECM definido como una amalgama de dos redes: un andamio de lamininas y una red similar a un polímero de colágeno tipo IV. El perlecan y el nidogen actúan como puentes entre estas redes. Las células epiteliales se conectan a la membrana basal a través de hemidesmosomas, donde las lamininas se unen a integrinas. La membrana basal se ancla a la matriz intersticial a través de distintas fibrillas de colágeno, incluyendo el colágeno tipo VI y el VII. Los principales tipos de colágeno en la matriz intersticial son las fibrillas heterotípicas de colágeno I, III y V. Receptores celulares de las células del estroma como las integrinas, DDRs, sindecanos, glicoproteínas y GF-Rs interactúan con componentes de la ECM y GFs (Adaptado de Theocharis *et al.*, 2019).

En los mamíferos, la ECM está compuesta por aproximadamente 300 proteínas que se conocen como matrisoma, y entre las que se incluyen el colágeno, los proteoglicanos (PGs) y las glicoproteínas.

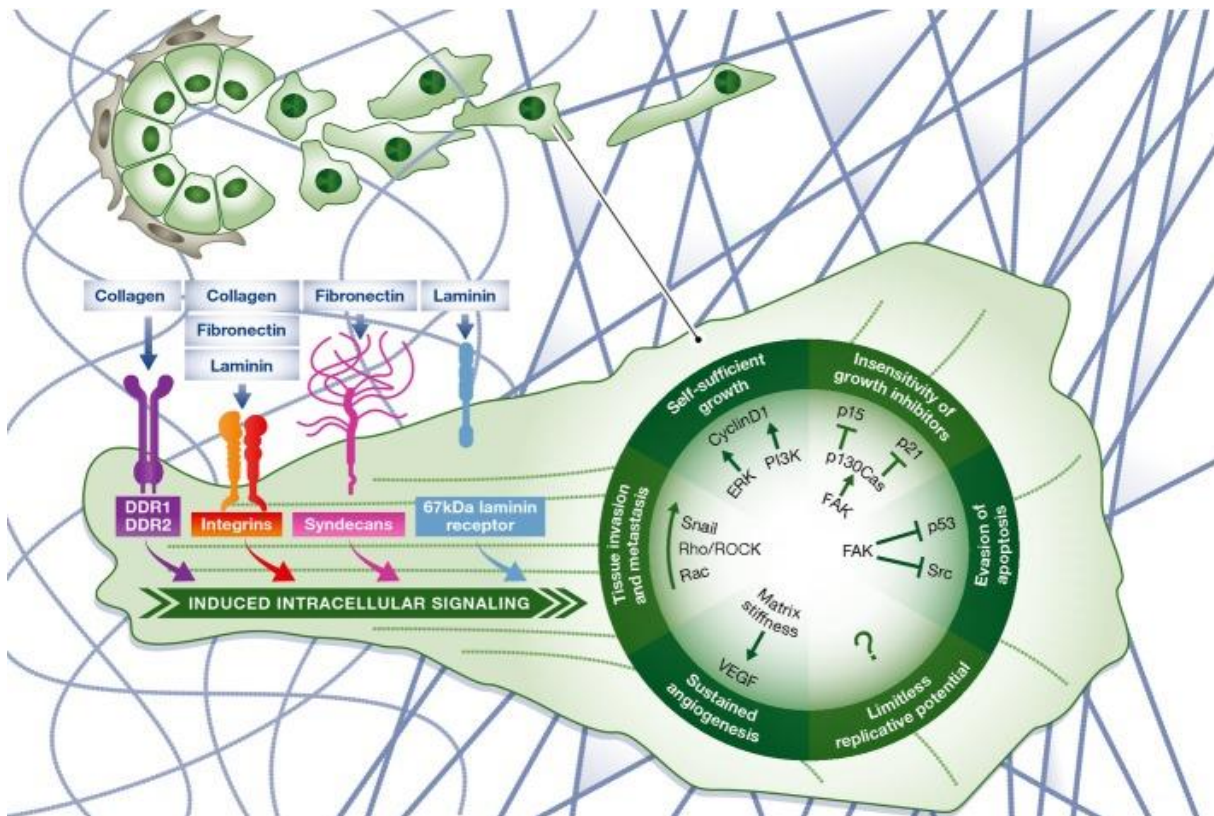
Existen dos tipos principales de matriz extracelular que difieren en cuanto a localización y composición (figura 9): la membrana basal y la matriz intersticial del tejido conectivo (rodea a las células y proporciona un andamio estructural a los tejidos).

La **membrana basal** es un tipo de matriz pericelular que separa el epitelio del estroma que lo rodea, y que además controla la organización celular y la diferenciación a través de interacciones con receptores de la superficie celular y con proteínas de la ECM.

La **matriz intersticial** subyacente está estrechamente conectada a la membrana basal proporcionando integridad al tejido. La matriz intersticial rodea a las células en los tejidos conectivos y está compuesta principalmente de colágeno tipo I, fibronectina, elastina, PGs secretados e hialuronato (HA). Estos interactúan unos con otros creando un complejo y dinámico entramado tridimensional que sirve de andamiaje a los tejidos. Por el contrario, la membrana basal es más compacta y menos porosa que la matriz intersticial y se compone principalmente de colágeno tipo IV, lamininas, proteoglicanos de heparán sulfato (*heparan sulphate proteoglycans* o HSPGs) y proteínas como la entactina y el nidógeno. Las membranas basales consisten en polímeros de laminina, que proporcionan principalmente lugares de adhesión a las células epiteliales, y en un entramado de colágeno tipo IV que estabiliza la estructura general. Ambos entramados interactúan con otros componentes de la membrana basal que actúan como enlaces moleculares interconectando ambas redes. Un ejemplo de ello son los agregados que contienen el proteoglicano perlecán. Estos agregados están implicados en la conexión estrecha entre las redes de colágeno tipo IV y la de laminina, además de tener influencia en la hidratación y por lo tanto en las propiedades biomecánicas. Las células epiteliales están ancladas a la membrana basal a través de estructuras específicas conocidas como hemidesmosomas. Estos se forman cuando las integrinas de la superficie celular interactúan en el nivel extracelular con lamininas e intracelularmente con filamentos intermedios. Las células embebidas en la matriz extracelular interactúan con esta red macromolecular a través de receptores de superficie como las integrinas, receptores de dominio discoidina (DDR), proteoglicanos de superficie, sindecanos y el receptor de hialuronato CD44 (figura 10). Aunque los fibroblastos son la principal fuente de componentes de la matriz extracelular durante la remodelación de la ECM, todas las células parecen contribuir a la formación de la matriz (Bonnans *et al.*, 2014; Theocharis *et al.*, 2016; Theocharis *et al.*, 2019).

Los componentes de la ECM interactúan de manera continua con las células epiteliales, sirviendo de ligando a receptores celulares como las integrinas. Es por todo ello por lo que las proteínas y estructuras de la matriz juegan un papel fundamental en la adhesión, migración, polaridad, proliferación, apoptosis, supervivencia y diferenciación. La ECM puede además secuestrar y liberar localmente factores de crecimiento (*growth factors* o GFs) como el factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF), el factor de crecimiento fibroblástico (*fibroblast growth factor*, FGF) y otras moléculas de señalización como WNTs, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* , TGF- $\beta$ ) y la anfiregulina (Bonnans *et al.*, 2014; Hynes, 2009). Estos se liberan tras la degradación de la ECM y se unen de forma específica a sus receptores (*growth factor receptors* o GF-Rs) y correceptores (sindecanos y glicanos) activando diversas rutas de señalización (Theocharis *et al.*, 2016).





**Figura 10:** Influencia de la ECM en los sellos distintivos del cáncer. Desde la iniciación del tumor a la metástasis, la ECM ejerce su influencia en cada uno de los sellos característicos del cáncer. Moléculas de la ECM se unen a receptores de la superficie celular, los cuales activan rutas de señalización intracelular. Las señales inducidas por adhesión a la ECM promueven a través de ERK y PI3K el crecimiento autosuficiente. La señalización de FAK inhibe los supresores de tumores p15 y p21 y limita la inducción de apoptosis a través de p53. Los componentes de la ECM y las propiedades biofísicas promueven la EMT además de rutas pro migratorias (particularmente la señalización de TGF- $\beta$  y RhoA/Rac). La rigidez de la ECM también promueve la angiogénesis e incrementa la señalización de VEGF en las células endoteliales (Pickup *et al.*, 2014).

El término **matrisoma** engloba el conjunto de todas las proteínas de una determinada matriz junto con el de las proteínas que pueden contribuir a las matrices en diferentes situaciones. Basándose en características funcionales y estructurales y mediante el análisis del genoma humano y murino se ha conseguido establecer un robusto listado de las proteínas que definen el matrisoma de los mamíferos, y es a este "núcleo" de proteínas de la ECM a lo que se conoce como el núcleo del matrisoma. Este núcleo comprende casi 300 proteínas entre las que se incluyen 43 subunidades de colágeno, unos 36 proteoglicanos y sobre 200 glicoproteínas. Dentro de las proteínas englobadas en el núcleo del matrisoma no se incluirían mucinas, plexinas, galectinas y otros grupos de proteínas que si bien se asocian con la ECM no son vistas comúnmente como proteínas de la matriz. Pese a su importancia en la remodelación de la matriz extracelular, tampoco se incluirían enzimas que modifican la ECM como las proteasas, o factores de crecimiento y citocinas (Hynes and Naba, 2012; Naba *et al.*, 2016).

El colágeno es la principal proteína estructural de la matriz y se clasifica como: forma fibrilar (colágeno tipo I-III, V y XI) y forma no fibrilar. Las fibrillas de colágeno proporcionan fuerza tensora a la ECM, limitando de este modo la distensibilidad de los tejidos. Los proteoglicanos se intercalan entre las fibrillas de colágeno, llenan el espacio intersticial extracelular y proporcionan hidratación a través del secuestro de agua dentro del tejido. Los proteoglicanos están presentes no sólo en las ECMs sino que también aparecen en la superficie celular e intracelularmente. En la superficie celular pueden actuar como receptores de citocinas. Las glicoproteínas (lamininas, elastina, fibronectina, trombospondinas, nidógeno...) no están sólo implicadas en el ensamblaje de la ECM sino que están además involucradas en la interacción célula-ECM, ya que actúan como ligandos para receptores de la superficie celular como las integrinas. Las glicoproteínas también sirven como reservorio de factores de crecimiento, los cuales estarían ligados a la ECM y pueden ser liberados por proteólisis (Bonnans *et al.*, 2014; Theocharis *et al.*, 2019).

La degradación de los componentes de la matriz es el principal proceso que tiene lugar durante la remodelación de la ECM y es de vital importancia para regular la composición, abundancia y estructura de la ECM, así como para la liberación de moléculas biológicamente activas (factores de crecimiento...). La matriz se degrada por diferentes familias de proteasas entre las cuales se encuentran las metaloproteasas de la matriz (MMPs), las adamalisin, meprinas e inhibidores de metaloproteasas (Bonnans *et al.*, 2014). El nivel de MMPs suele ser elevado en la mayor parte de los cánceres, en los que se asocia con un peor pronóstico (Fares *et al.*, 2020).

Muchos tumores sólidos se caracterizan por la producción de una densa matriz rica en colágeno, cuya deposición se asocia con un mal pronóstico. La alteración en las proteínas de la ECM como resultado del desarrollo de un cáncer, ocasiona cambios recíprocos en las células tumorales y activa rutas responsables de la migración celular, inhibición de la apoptosis y proliferación (Yuzhalin, Urbonas, *et al.*, 2018).

La matriz extracelular de los tumores sólidos está implicada en la progresión de la metástasis, sin embargo no se conoce completamente cómo la composición molecular de la ECM promueve la progresión del cáncer. La desregulación en la homeostasis de la ECM acompaña frecuentemente al crecimiento del cáncer y desencadena una remodelación patológica de la matriz que promueve el desarrollo del tumor a través de dos mecanismos putativos. El primer mecanismo potencial se cree que involucra la inducción de una respuesta pro fibrótica que conduce a una excesiva deposición de ECM. Esta se produciría a través del reclutamiento y la activación de fibroblastos asociados al cáncer (*cancer-associated fibroblasts* o CAF) que resultaría en la activación de las quinasas de adhesión focal (*focal adhesion kinases* o FAK) de las células cancerígenas, necesaria para la invasión celular y el comienzo de la hipoxia tisular. Una deposición excesiva de fibrillas de colágeno (tipo I, II, III, V y XI) también tiene

implicaciones directas en la diseminación metastática. Un ejemplo de ello es que el incremento en la densidad de colágeno eleva la tensión de la membrana basal vascular aumentando su permeabilidad a las células tumorales. Otra de las consecuencias de un exceso de síntesis de colágeno es la alteración en la adhesión célula-célula y célula-matriz que se asocia con la progresión del cáncer. Además, una elevada rigidez de la matriz incrementa la adhesión de las células metastáticas al endotelio tumoral. Aunque los CAFs contribuyen a la mayor parte de la ECM en los tumores sólidos, también hay evidencia de la producción de ECM por parte de las células tumorales. Un posible mecanismo alternativo mediante el que la remodelación de la matriz facilita la tumorigénesis y la metástasis está orquestado por la ruptura gradual de la ECM. Esta descomposición gradual contribuiría a la progresión del cáncer mediante el incremento en la movilidad de las células cancerígenas y la invasión vía modulación de integrinas, la disminución en la adhesión célula-ECM y la promoción de la intravasación de células tumorales a través de la formación de invadopodios. Dentro de este contexto la degradación de la ECM, tanto dirigida por proteasas como no proteolítica, es un requisito para la invasión tumoral. Un incremento en la ruptura del colágeno reduce la densidad de la matriz facilitando la migración de las células tumorales. Las MMPs están especialmente implicadas en este aspecto y su expresión se asocia con una mala prognosis en gran variedad de cánceres. La degradación de la ECM también es importante para la liberación de quimioquinas pro-metastáticas y factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico y el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (*transforming growth factor  $\beta 1$*  o TGF- $\beta$ ), los cuales aumentan la angiogénesis aberrante y la invasión e intravasación.

La alteración de la homeostasis de la ECM dirigida por las células tumorales y las células huésped permite que estos dos procesos aparentemente opuestos se reconcilien para tener lugar de forma simultánea y promover la progresión del cáncer y la metástasis. Estas alteraciones de la matriz extracelular incluyen deposición excesiva, degradación, re-deposición y entrecruzamiento de componentes de la ECM para cambiar sus propiedades estructurales y biomecánicas. Mientras las células tumorales adquieren un fenotipo metastático, la ECM cambia gradualmente de blanda y adaptable a rígida y dura debido al entrecruzamiento originado por lisil oxidasas (*lysyl oxidases* o LOX). Este cambio afecta al micro ambiente tumoral modulando la geometría celular, la contractilidad, la proliferación y la diferenciación.

Por lo tanto, la deposición aberrante y la degradación de los componentes de la ECM allanan el camino para la invasión de las células malignas, y en última instancia les permiten alcanzar el sistema vascular y metastatizar.

Los mecanismos subyacentes a la remodelación de la matriz extracelular en el cáncer son complejos y multifactoriales, sin embargo es conocido que cualquier cambio en el sutil balance entre las proteasas de la matriz y sus inhibidores remodela la ECM de

diferentes maneras con el fin de promover la progresión metastática y desencadenar la metástasis. Las células tumorales pueden alterar este balance para conseguir una ventaja a medida en las diferentes etapas de la progresión metastática. Un ejemplo de ello es que hipotéticamente los tumores primarios se beneficiarían de la rotura de la ECM para invadir eficazmente los tejidos adyacentes, mientras que las colonias metastáticas establecidas pueden necesitar una deposición excesiva de ECM para mejorar la adherencia celular y promover la hipoxia. Otro aspecto importante es la activación de fibroblastos en condiciones patológicas, la cual conduce a una deposición aberrante de ECM y a la fibrosis. La diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos activados productores de ECM puede desencadenarse por la liberación de TGF- $\beta$  y otras citocinas producidas en el microambiente tumoral, tanto por células tumorales como por otros tipos celulares (Yuzhalin, Lim, *et al.*, 2018).

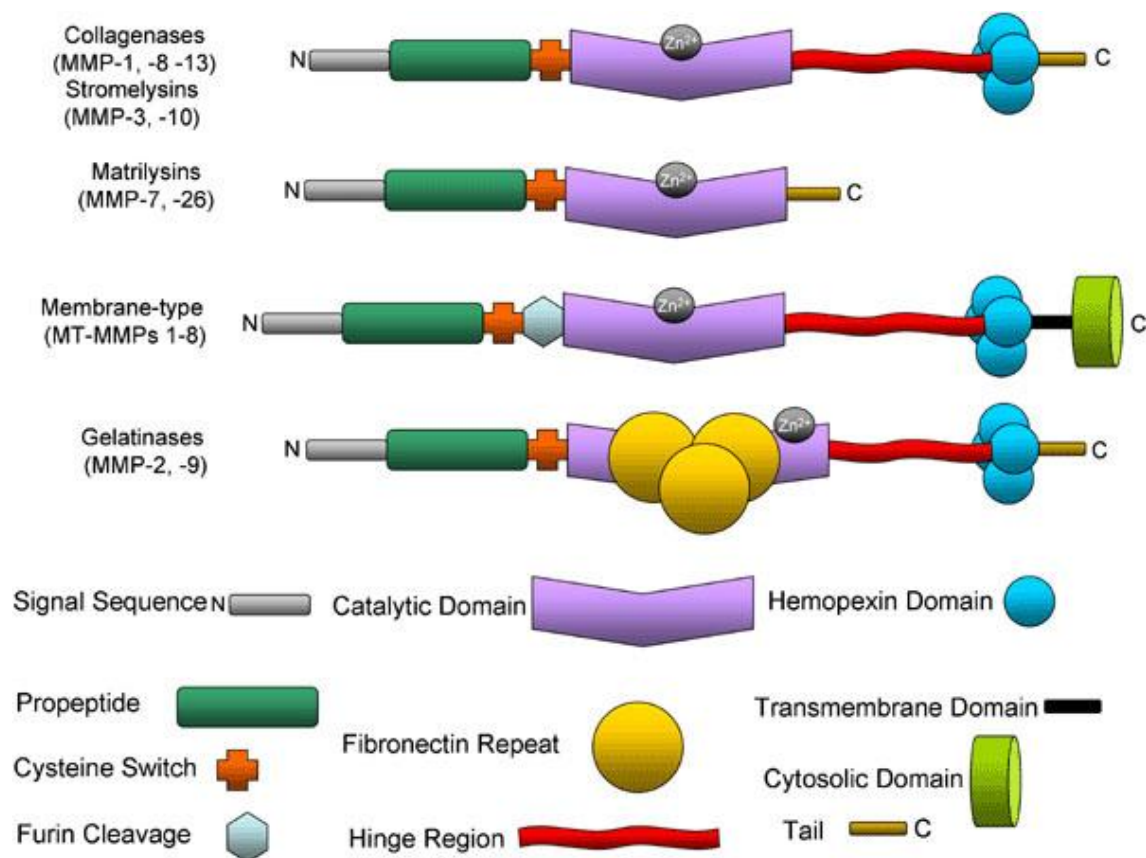
### 1.2.3.2 Metaloproteasas de la matriz (MMPs)

La degradación y remodelación de la matriz extracelular son etapas esenciales en la migración, invasión y metástasis de las células cancerígenas. Estos procesos son llevados a cabo principalmente por dos tipos de enzimas proteolíticas: las metaloproteasas de la matriz (MMPs) y componentes del sistema activador de plasminógeno (Bozzuto *et al.*, 2010).

Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) son endopeptidasas dependientes de zinc capaces de degradar los componentes de la membrana basal y de la matriz extracelular (colágeno, laminina, elastina, gelatina, fibronectina...) (Bozzuto *et al.*, 2010). En vertebrados, la familia de las MMPs consta de unos 28 miembros, de los cuales al menos 23 se expresan en el tejido humano (Laronha and Caldeira, 2020). Se pueden dividir en diferentes clases en base a la homología de su secuencia, a la especificidad del sustrato, a la localización celular y a su estructura (Yoon *et al.*, 2003; Bozzuto *et al.*, 2010). Además de componentes de la matriz extracelular, son capaces de degradar también moléculas de la superficie y proteínas pericelulares no pertenecientes a la matriz (Yoon *et al.*, 2003).

Las MMPs humanas generalmente contienen un péptido señal (que lo convierte en diana para la secreción del péptido en el retículo endoplasmático y su transporte fuera de la célula), un dominio propéptido (donde un residuo de cisteína actúa como quelante del ion de Zn<sup>2+</sup>) en la porción amino-terminal (N-terminal), un dominio central catalítico que incluye sitios de unión a zinc altamente conservados y una región bisagra seguida de un dominio similar a la hemopexina C-terminal (figura 11). Es el dominio propéptido el encargado de que la actividad enzimática sea latente. Este prodominio se elimina cuando la enzima es activada mediante proteólisis. El dominio hemopexina reconoce los sustratos en los que la endopeptidasa puede ser activa

(Bozzuto *et al.*, 2010; Chow *et al.*, 2007; Laronha and Caldeira, 2020; Pons, 2004). Las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 presentan un dominio de fibronectina adicional insertado entre el dominio catalítico y el dominio del sitio activo. Las MT-MMPs pueden tener bien un dominio transmembrana adicional, un lugar de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI) o un dominio similar a Ig que determina su localización en la superficie celular (Bozzuto *et al.*, 2010).



**Figura 11:** Estructura general de las MMPs. Las MMPs habitualmente se clasifican en base al sustrato que degradan y poseen algunas características estructurales comunes. Típicamente contienen un péptido señal que permite exportar la enzima al medio extracelular. Todas las MMPs se producen en forma de zimógeno, con un dominio propéptico que contiene un "interruptor de cisteína" (*cysteine switch*). El dominio catalítico de todas las MMPs contiene un ion  $Zn^{2+}$  y, salvo las matrilisinas, una región bisagra flexible seguida de un dominio hemopexina (Adaptado de Chow *et al.*, 2007).

Las MMPs intervienen en procesos fisiológicos normales como son el desarrollo embrionario, la ovulación, reabsorción de hueso y la reparación de heridas. Por otro lado, estas enzimas cumplen una importante función en condiciones patológicas como

la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple. Además son el principal grupo de enzimas proteolíticas involucradas en varias etapas del cáncer como son la invasión, metástasis, crecimiento tumoral y angiogénesis. Etapas en las cuales son consideradas como enzimas clave (Yoon *et al.*, 2003).

Su actividad es baja en condiciones normales, pero se incrementa durante la remodelación y reparación así como en el tejido inflamado o enfermo (Bonnans *et al.*, 2014). De hecho, la capacidad de invasión tumoral *in vivo* está relacionada con unos altos niveles de expresión de determinadas MMPs (Yoon *et al.*, 2003).

Las metaloproteasas de la matriz son secretadas por el tejido conectivo y células proinflamatorias entre las que se incluyen fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales, macrófagos, neutrófilos y linfocitos (Verma and Hansch, 2007). Aunque las MMPs están ligadas a la supervivencia y expansión del cáncer, las células cancerígenas sintetizan MMPs en menor cantidad. De forma paracrina secretan interleucina, interferón e inductores de MMPs que estimulan a las células huésped circulantes para que produzcan MMPs (Jabłońska-Trypuć *et al.*, 2016).

Las MMPs se producen bien como proteasas solubles o ancladas a membrana. Las metaloproteasas de la matriz se sintetizan como pre-proMMPs. Durante la traducción se elimina el péptido señal y se generan las proMMPs o zimógenos. Las MMPs se secretan en forma de precursores latentes o zimógenos y se activan posteriormente mediante proteólisis en el espacio extracelular. El principal mecanismo de activación es la eliminación proteolítica del prodominio, ya que desestabiliza el "interruptor de cisteína". Este interruptor está formado por la interacción de una cisteína del propéptido con el zinc del dominio catalítico que bloquea el acceso de éste al sustrato. La activación consigue disociar la unión covalente entre la cisteína y el zinc catalítico y permite por tanto que el sitio activo sea accesible (Bozzuto *et al.*, 2010; Laronha and Caldeira, 2020; Pons, 2004).

De forma colectiva las MMPs pueden degradar todas las proteínas de la matriz extracelular (Bonnans *et al.*, 2014). En base a su especificidad al sustrato, las MMPs se clasifican en: colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), estromelisininas (MMP-3, MMP-10, MMP-11), metaloelastasas (MMP-12, MMP-18, MMP-19), matrilisininas (MMP-7) y metaloproteasas de membrana (MT-MMPs) (Bozzuto *et al.*, 2010; Pérez-García, 2004) (figura 12).

Grupo	MMP	Nombre	Sustrato
Colagenasas	MMP-1	Colagenasa fibroblástica	Colágenos fibrilares tipos III, I, II, VII y X, agreganos y serpinas Colágenos fibrilares I, III y II, agreganos y serpinas Colágeno II
	MMP-8	Colagenasa intersticial	
	MMP-13	Colagenasa de los neutrófilos	
Gelatinasas	MMP-2	Gelatinasa A 72 kDa gelatinasa	Colágenos IV, V, VII y X, elastina
	MMP-9	Colagenasa-4 Colagenasa-5 92 kDa gelatinasa	
Estromelisinias	MMP-3	Estromelisinina-1	Fibronectina, colágenos IV, V, IX y X, elastina, laminina y proteoglicano Fibronectina, colágenos III, IV, V, elastina, laminina y proteoglicanos Muy débilmente: laminina y fibronectina
	MMP-10	Estromelisinina-2	
	MMP-11	Estromelisinina-3	
Matrilisinias	MMP-7	Matrilisinina PUMT-1 Matrina	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, elastina, gelatina
Metaloelastasa	MMP-12	Metaloelastasa macrofágica	Elastina, fibronectina, colágeno tipo IV
Metaloproteinasas de membrana	MMP-14	MT1-MMP	Colágenos I, II y III, laminina, gelatina, fibronectina y proteoglicanos. ProMMP-2 ProMMP-2 ProMMP-2 Forma parte de la actividad proteolítica leucocitaria
	MMP-15	MT2-MMP	
	MMP-16	MT3-MMP	
	MMP-17	MT4-MMP	
	MMP-24	MT5-MMP	
	MMP-25	MT6-MMP	

**Figura 12:** Clasificación de las metaloproteasas de la matriz y sustratos sobre los que actúan (Adaptado de Pérez-García, 2004).

Las **colagenasas** degradan algunas proteínas de la ECM y otras proteínas solubles, pero el papel más importante de este tipo de MMPs es la degradación del colágeno fibrilar tipo I, II, III, IV y XI. Las **gelatinasas** juegan un papel importante en varios procesos fisiológicos como la degradación y remodelación de la ECM, el crecimiento embrionario, la osteogénesis y la cicatrización de heridas. Las gelatinasas degradan gelatina, colágeno tipo I, IV, V, VIII, X, XI y XIV, elastina, fibronectina, laminina, TNF- $\alpha$  y el precursor de IL-1 $\beta$ . La MMP-2 es fundamentalmente una gelatinasa, aunque es capaz de actuar como colagenasa pero de un modo más débil. La MMP-9 puede actuar como las colagenasas además de su actividad gelatinasa. Además de en procesos fisiológicos, la gelatinasas están implicadas en estados patológicos como enfermedades vasculares, inflamatorias, infecciones, enfermedades degenerativas del cerebro y la progresión tumoral. La actividad gelatinasa es crucial para la salida de las células metastáticas y la entrada al lugar de metástasis. Se ha descrito un incremento en la expresión y actividad de las gelatinasas en enfermedades como el cáncer de mama, piel, urogenital, pulmón y cerebro. La principal característica de las **matrilisinias** es la ausencia del dominio de hemopexina presente en otras MMPs. Las **metaloproteasas de membrana** se activan intracelularmente y la enzima activa se expresa en la superficie celular (Laronha and Caldeira, 2020).



En condiciones fisiológicas normales la actividad de las MMPs está regulada tanto a nivel transcripcional como post transcripcional. Citocinas, factores de crecimiento, hormonas y oncogenes entre otros son capaces de influir en la transcripción de los genes que codifican estas endopeptidasas (Bozzuto *et al.*, 2010). Dentro de la regulación a nivel post transcripcional se incluyen: la activación del zimógeno (pro-MMP) por proteólisis (por otras MMPs o mediante serina proteasas y furinas entre otros), la inhibición de la forma activa mediante inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs) y la regulación mediante la glicoproteína RECK (*Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal Motifs*). En condiciones patológicas, este equilibrio se desplaza hacia un incremento en la actividad de las MMPs que conduce a la degradación tisular (Verma and Hansch, 2007; Yoon *et al.*, 2003).

La actividad de las MMPs contribuye de forma importante al crecimiento y progresión tumoral. Esto es debido a que son capaces de liberar moléculas de señalización y reguladores del crecimiento (FGF, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , EGF...) de su unión a proteínas de la ECM y de la superficie celular y de hacerlos por tanto biodisponibles a células que no están en contacto físico directo (Yoon *et al.*, 2003; Yuzhalin, Lim, *et al.*, 2018). Del mismo modo, las MMPs son consideradas reguladores esenciales en distintas fases del proceso de vascularización tumoral. Durante la angiogénesis, estas endopeptidasas son responsables de la degradación de la membrana basal de las estructuras vasculares así como de la proliferación y migración de las células endoteliales. Una parte de su influencia es debida a que las MMPs son capaces de liberar moléculas proangiogénicas (como miembros de VEGF o de la familia de las angiopoyetinas) del reservorio extracelular. Esta función se ha observado con las gelatinasas MMP-2 y MMP-9. Según Riedel *et al.*, (2000), los carcinomas de cuello y cabeza negativos para MMP-9 tenían una densidad de microvasculatura inferior a aquellos tumores positivos para MMP-9. Bergers *et al.*, (2000) demostraron que la MMP-9 estaba involucrada en el paso de la quiescencia vascular a la angiogénesis a través de la liberación de VEGF-A al reservorio extracelular. En el artículo de Itoh *et al.*, (1998) ratones deficientes para MMP-2 mostraron una progresión tumoral y angiogénesis reducidas. Además se han reportado alteraciones en la angiogénesis en aquellos ratones que carecen de MMP-2, MMP-9 y MT1-MMP (Yoon *et al.*, 2003).

### **1.2.3.3 Transición epitelio-mesénquima (EMT)**

Como se ha comentado anteriormente, la cascada metastática comienza con la pérdida de adhesión de las células tumorales, su migración fuera del tumor primario y la invasión del tejido circundante. Después se intravasan a la circulación, se diseminan y extravasan y migran al parénquima del órgano diana. Una vez alcanzado el nicho metastático pueden entrar en estado de latencia o proliferar para formar metástasis macroscópicas (Diepenbruck and Christofori, 2016).



El epitelio normal posee contactos célula-célula que son los responsables tanto del correcto desarrollo de estos tejidos durante la etapa embrionaria como del mantenimiento de la homeostasis y arquitectura de las estructuras epiteliales durante la vida adulta. Las células tumorales epiteliales pierden esta restricción durante los últimos pasos de la tumorigénesis, al mismo tiempo que pierden sus características epiteliales y adquieren motilidad. Estas conversiones en el fenotipo son reminiscencias de la conocida como transición epitelio-mesénquima (*epithelial to mesenchymal transition (EMT)*) que surge durante el desarrollo embrionario en momentos y lugares precisos. La EMT es un componente de varios procesos organogénicos y morfogénicos. Está implicada en eventos como la gastrulación, la migración de las células de la cresta neural desde el tubo neural y la formación de las válvulas cardíacas. Los fibroblastos que se originan a partir de células epiteliales a través de eventos de EMT desactivan los genes que codifican moléculas de adhesión celular y modifican el tipo de filamentos intermedios que expresan. De hecho, en algunos casos empiezan a sintetizar moléculas de la matriz extracelular como fibronectina y colágeno. Además también pueden sintetizar enzimas proteolíticas para degradar la ECM y contribuir a la movilidad e invasividad. El proceso de EMT se asocia con numerosos cambios a nivel celular, si bien no todas las transiciones epitelio-mesénquima presentan el mismo rango de cambios (Boyer *et al.*, 2000). Cabe destacar que la EMT siempre se asocia con dispersión celular y se define por la pérdida de uniones intercelulares, pérdida de la organización polarizada (sin polaridad apicobasal), y la conversión a un estado de baja proliferación con morfología en forma de huso y elevada capacidad de migración, invasión y supervivencia (Boyer *et al.*, 2000; Diepenbruck and Christofori, 2016). Tanto la disociación de las uniones célula-célula, resultado de la rotura de los complejos intercelulares, como el movimiento celular, dirigido por el reordenamiento del citoesqueleto y la formación de nuevos contactos célula-sustrato, son eventos independientes pero que tienen lugar de forma simultánea (Boyer *et al.*, 2000). La reorganización del citoesqueleto de actina que activa la maquinaria de motilidad está mediada por Rho GTPasas (Guarino, 2007).

De este modo, durante el proceso de transición epitelio-mesénquima las células epiteliales pierden sus características epiteliales y adquieren propiedades de células mesenquimales. La EMT se asocia con una disminución en la expresión de marcadores epiteliales como la E-cadherina y con un incremento en la expresión de marcadores mesenquimales como la N-cadherina, la vimentina y la fibronectina. La pérdida de marcadores epiteliales como la E-cadherina se ha asociado a un potencial metastático y a una pobre prognosis en varios tipos de carcinoma (Mikesh *et al.*, 2010).

Tanto las células epiteliales como mesenquimales poseen un rango de características distintivas. Como se ha comentado, una de las propiedades fundamentales de las células epiteliales es su polarización a lo largo del eje apico-basal junto con una superficie apical libre, al contrario que las células mesenquimales. Otras diferencias

incluyen la morfología celular, la presencia o ausencia de filopodios y la capacidad de migración y adhesión. La mayor parte de los investigadores definen la EMT teniendo en cuenta su base molecular. En términos del programa transcripcional, la EMT consiste en una disminución en la expresión de E-cadherina, cateninas y citoqueratinas y el incremento de los marcadores mesenquimales N-cadherina, vimentina y fibronectina. Sin embargo, hay que tener en cuenta que no hay una sola característica que sea exclusiva bien del tipo celular epitelial o bien del tipo celular mesenquimal y que identifique todas las EMTs bajo todas las circunstancias posibles. De hecho, las células poseen frecuentemente una combinación de estas características, e incluso dentro de estas dos categorías (epitelial y mesenquimal) puede observarse un continuo de comportamientos celulares. Por lo tanto, algunas células epiteliales altamente especializadas son capaces de mostrar uniones elaboradas a la vez que características apicales especializadas como los cilios. Se ha observado que numerosos cánceres derivados de células epiteliales presentan una mezcla de marcadores epiteliales y mesenquimales, lo que sugiere que estas células no se encuentran en un estado "puro" epitelial o "puro" mesenquimal (Campbell and Casanova, 2016). Las transiciones fenotípicas entre el estado epitelial y mesenquimal no son binarias (Jolly *et al.*, 2017). La EMT y su opuesto, la transición mesénquima-epitelio (*mesenchymal-to-epithelial transition* (MET)), son procesos graduales con un rango de diferentes resultados que llevan a las células a presentar varias combinaciones de características epiteliales y mesenquimales. Los estados "enteramente" epitelial o "enteramente" mesenquimal deberían considerarse como aquellos estados que flanquean el final de un continuo de características celulares (Campbell and Casanova, 2016). Muchas células cancerígenas experimentan una EMT parcial y exhiben un fenotipo híbrido epitelial/mesenquimal que puede ser más tumorigénico y quimiorresistente que las células tumorales con fenotipo predominante bien epitelial o bien mesenquimal (Loh *et al.*, 2019; Lu and Kang, 2019). Por ejemplo, la co-expresión de E-cadherina y vimentina en muestras de pacientes con cáncer de mama invasivo se ha correlacionado con una peor prognosis y una menor tasa de supervivencia, en comparación con aquellos pacientes que muestran otros patrones de expresión de E-cadherina/Vimentina (E-cad+/vim-, E-cad-/vim- y E-cad-/vim+) (Yamashita *et al.*, 2018).

La activación aberrante de la EMT promueve la invasión y diseminación de las células tumorales, mientras que el proceso inverso, la **transición mesénquima-epitelio** (MET), se cree que favorece el crecimiento de las células metastáticas una vez alcanzan los órganos diana (Diepenbruck and Christofori, 2016). Tras la invasión peritumoral tiene lugar la proliferación de las células metastáticas, lo que permite el crecimiento del tumor en el nuevo ambiente estromal y se asocia a la restauración de la arquitectura cohesiva multicelular original (Guarino *et al.*, 2007). Esta hipótesis se basa en la observación de que muchas metástasis recuperan la expresión de marcadores epiteliales en el foco secundario (Guarino *et al.*, 2007; Jolly *et al.*, 2017). Chao *et al.*, (2010) mostraron que en el 62% de los casos de cáncer de mama analizados, la

expresión de E-cadherina era superior en el lugar de las metástasis en comparación con la del tumor primario (Jolly *et al.*, 2017). Las células tumorales que entran en MET adquieren ventajas de supervivencia. Una de estas ventajas es que la formación de adhesiones celulares heterotípicas de E-cadherina en el lugar de metástasis puede conducir a la dormancia y permitir a las células tumorales sobrevivir con una menor carga metabólica durante la etapa de micro metástasis. La E-cadherina también puede actuar como un regulador que desencadena la activación de quinasas, ayudando a las células tumorales diseminadas a sobrevivir en el lugar de metástasis y posteriormente formar la metástasis. Además, la adhesión celular por E-cadherina suprime la anoikis e incrementa la resistencia a agentes citotóxicos (Yao *et al.*, 2011).

El mecanismo básico de adhesión del epitelio en desarrollo es a través de uniones adherentes mediadas por **E-cadherina**, las cuales aparecen como un anillo o cinturón en el límite apico-lateral de las células epiteliales. Las uniones adherentes median la adhesión entre las células a través de la trans dimerización de la E-cadherina en superficies celulares adyacentes, las cuales se ensamblan en complejos vía asociación del dominio intracelular de E-cadherina con la  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina. La E-cadherina es el componente mayoritario de las uniones adherentes (Campbell and Casanova, 2016). Es crucial para el mantenimiento de la polaridad y de la integridad estructural del epitelio, además de ser uno de los componentes de la red de señalización celular. La E-cadherina es una glicoproteína transmembrana de 120 kDa con un dominio extracelular que interactúa con la molécula de E-cadherina de las células adyacentes, y con un dominio intracelular asociado a un complejo multiproteínico que consta de las cateninas,  $\alpha$ -,  $\beta$ - , y p120. La  $\beta$ -catenina se une estrechamente al dominio citoplasmático de la E-cadherina y a través de la  $\alpha$ -catenina a la red de microfilamentos de actina del citoesqueleto. Conecta de este modo la adhesión célula-célula con la maquinaria intracelular involucrada en la forma de la célula y en la regulación de la migración. Por ello, cualquier alteración en la adherencia mediada por E-cadherina conduce a una reorganización del citoesqueleto y vice versa. Los complejos de unión basados en E-cadherina mantienen a las células epiteliales en un estado estacionario, sin motilidad y por tanto la disrupción de dicha adhesión celular es de gran relevancia en la invasión tumoral. La E-cadherina actúa como supresor tumoral impidiendo la invasión y metástasis y es por ello que su función se deroga a través de diversos mecanismos durante la progresión maligna de la mayor parte de los carcinomas. Se considera un regulador "maestro" del fenotipo epitelial/mesenquimal ya que su represión puede ser suficiente tanto para inducir y completar la EMT como por otro lado su reactivación puede activar el proceso opuesto de MET (Guarino *et al.*, 2007).

La E-cadherina y la **N-cadherina** comparten una estructura similar. Ambas forman complejos cadherina-catenina en los que el dominio citoplasmático consiste en repeticiones de cadherina extracelular que se unen con cateninas para regular el filamento del citoesqueleto que contiene actina. La diferencia estructural entre la E- y

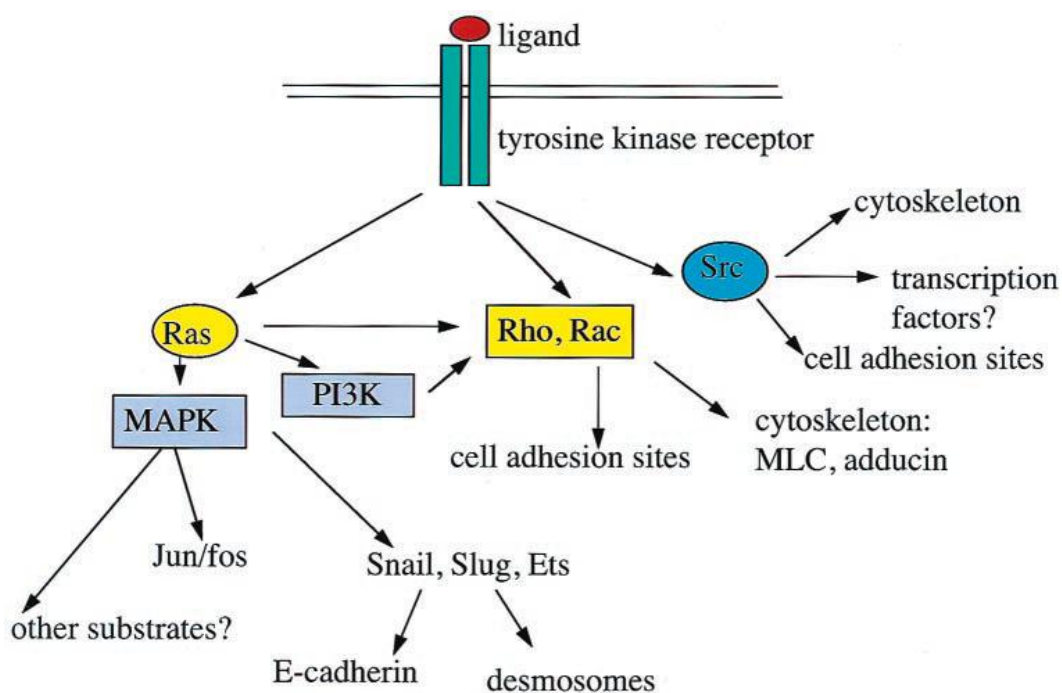
N-cadherina es que la E-cadherina se une la isoforma más corta de la p120 catenina, mientras que la N-cadherina se une con la isoforma más larga. La N-cadherina es una proteína de 130 KDa predominante en tejidos no epiteliales y se expresa en diferentes tipos celulares como las células endoteliales y del estroma. En resumen, las uniones adherentes mediadas por E-cadherina suprimen la activación de rutas como la RTK/PI3K en las células epiteliales. Mientras que las uniones adherentes mediadas por N-cadherina facilitan la activación de las rutas MAPK/ERK y PI3K para incrementar la supervivencia celular y la migración. El conocido como "*cadherin switching*" o intercambio de cadherinas, es la regulación a la baja de las E-cadherinas y la sobre expresión de N-cadherinas en la EMT. Este intercambio de cadherinas se asocia con un incremento en los rasgos invasivos y con una disminución de la tasa de supervivencia. Las uniones adherentes mediadas por E-cadherina se disocian debido a la regulación a la baja de la E-cadherina, mientras que las uniones de N-cadherina establecen un tipo de unión relativamente débil. Rutas como PI3K/AKT y RhoA se activan por la  $\beta$ -catenina tras la pérdida de E-cadherina (Loh *et al.*, 2019).

La **vimentina** es el principal filamento intermedio del citoesqueleto de la células mesenquimales (Guarino *et al.*, 2007). El cambio en el tipo de filamentos intermedios expresados se asocia con la malignidad. Un ejemplo de ello es el reemplazo en la expresión de citoqueratina por la de vimentina en células de cáncer de mama maligno. La expresión de vimentina también se asocia con la invasión tumoral y una peor prognosis en numerosos tipos de cáncer como el cáncer de pulmón, próstata y melanoma, y sirve como diana potencial para terapias de cáncer (Liu *et al.*, 2015).

Cuando la EMT no se desencadena por activación oncogénica, el principal mecanismo de inducción lo aportan diversos factores de crecimiento (EGF, FGF, TGF- $\alpha$ ...) o componentes de la ECM tras su unión a receptores celulares afines (Boyer *et al.*, 2000). Estos factores no se secretan únicamente por las células tumorales sino que también pueden ser secretados por las células del estroma tumoral (Diepenbruck and Christofori, 2016). La mayor parte de los factores de crecimiento ejercen su efecto en la EMT a través de receptores con actividad tirosina quinasa (RTK) inducibles por ligando. La activación de RTK por sus ligandos afines se inicia con la autofosforilación de tirosinas específicas en los receptores activados. Esta activación genera una cascada de eventos de transducción citoplasmáticos como son la activación de las rutas Ras/MAPK, PI3K/Akt, Rho/Rac y Src (figura 13) (Boyer *et al.*, 2000; Guarino *et al.*, 2007). La activación de Ras, Src y la alteración en el balance de las Rho GTPasas, Cdc42, Rac y Rho aportaría más señales para completar la disociación celular e inducir la remodelación del esqueleto necesaria para que se origine el movimiento (Guarino, 2007).

Src pertenece a la familia de tirosina quinasas citoplasmáticas. Estas enzimas juegan un papel clave en la regulación de gran variedad de funciones biológicas asociadas a

cambios en la morfología celular como la transformación a la malignidad, la plasticidad epitelial y la modulación de las adhesiones intercelulares (Boyer *et al.*, 2000). La activación de Src puede fosforilar la quinasa de adhesión focal FAK que conlleva a la activación de MAPK y en última instancia a la fosforilación de la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) (Guarino, 2007). La superfamilia Ras engloba a pequeñas GTPasas que tienen múltiples moléculas efectoras. Uno de estos efectores es la proteína Raf, capaz de iniciar una cascada de fosforilaciones que resulta en la activación de MAPK (Boyer *et al.*, 2000).



**Figura 13:** Esquema de las rutas de señalización inducidas durante la EMT. La dimerización de RTK inducida por la unión al ligando promueve la activación de diversas rutas de señalización que conducen a cambios en la adhesión celular, remodelación del citoesqueleto y la inducción de genes específicos. MLC o cadena ligera de la miosina (*myosin light chain*) (Obtenido de Boyer *et al.*, 2000).

Aunque se encuentren embebidos dentro de la lámina basal de las células epiteliales escamosas, los melanocitos no se consideran epiteliales porque no forman un revestimiento. Sin embargo, la migración de los melanocitos desde la cresta neural del ectodermo está facilitada por un fenotipo mesenquimal transitorio. Al igual que las células epiteliales, los melanocitos adultos expresan E-cadherina, la cual mantiene el contacto con los queratinocitos y su regulación. La pérdida de E-cadherina contribuye a un fenotipo invasivo. Los melanocitos adultos son negativos para la N-cadherina pero las células de melanoma pueden expresarla. La N-cadherina permite la unión a los

fibroblastos dérmicos y a las células endoteliales vasculares en el estroma tumoral, lo cual se cree que facilita la metástasis. Se ha descrito la existencia de un cambio en la expresión de E-cadherina a N-cadherina en las células de melanoma. Además, estas células son capaces de expresar generalmente la proteína mesenquimal vimentina, lo cual sugiere que cierto grado de transición mesenquimal (*mesenchymal transition* (MT)) puede ser constitutivo en algunos melanomas. La expresión de E-cadherina está negativamente regulada por el factor de transcripción Snail. La expresión de la N-cadherina es mayor en las células del melanoma metastático en comparación con las del no metastático, sugiriendo una posible asociación entre la transición mesenquimal y el potencial metastático (Mikesh *et al.*, 2010).

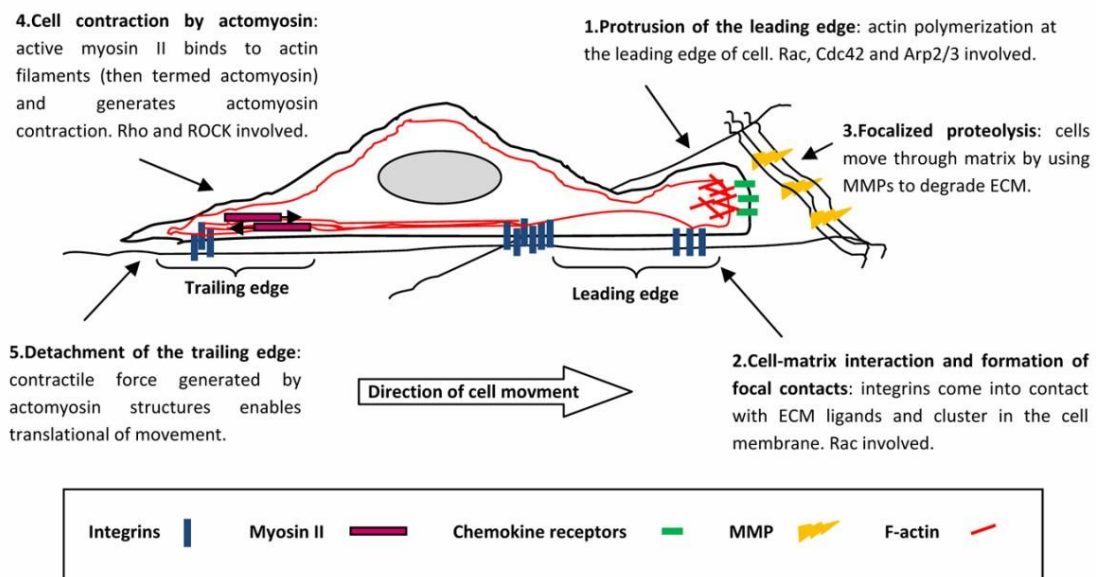
#### 1.2.3.4 Rho GTPasas

La migración celular es un proceso esencial en todos los organismos multicelulares y está presente durante el desarrollo y la reparación de heridas. La principal fuerza que conduce la migración celular es la extensión de una protrusión en el borde frontal, o lamelipodio, el establecimiento de nuevos lugares de adhesión en la parte delantera, la contracción del cuerpo celular y la separación de adhesiones en el borde trasero de la célula. Todos estos pasos involucran la reorganización activa del citoesqueleto de actina, y cada uno de ellos debe de estar coordinado tanto en el espacio y en el tiempo para generar el movimiento. Se han implicado una gran variedad de moléculas de señalización intracelular en la migración celular. Entre ellas se encuentran las cascadas MAPK, fosfolipasas, Ser/Thr, tirosina quinasas y proteínas de andamiaje. Sin embargo, una familia de proteínas en particular parece jugar un papel clave en la regulación de las rutas bioquímicas más relevantes para la migración celular. Se trata de las Rho GTPasas (Raftopoulou and Hall, 2004) (figura 14).

Las células muestran diferentes tipos de migración cuando invaden ambientes tridimensionales. El tipo de movimiento mesenquimal se caracteriza por una forma celular elongada, alargada, y que requiere de proteólisis extracelular. Este tipo de movimiento depende de la polarización celular mediada por Rac1 y de la formación de lamelipodios. Por el contrario, en el movimiento ameboide las células tienen una morfología redondeada. El movimiento ameboide es independiente de proteasas y requiere de una elevada actividad Rho GTPasa para impulsar los elevados niveles de contractilidad de actomiosina necesarios. Estos dos tipos de movimiento celular son interconvertibles y determinadas células móviles, entre las que se incluyen las células tumorales, muestran un nivel elevado de plasticidad, cambiando según la necesidad entre el movimiento mesenquimal o el ameboide (Parri and Chiarugi, 2010).

Las Rho GTPasas pertenecen a la superfamilia Ras. Son pequeñas proteínas (21-25 KDa) que comparten homología estructural. Generalmente tienen una longitud de entre 190

a 250 residuos (Parri and Chiarugi, 2010). La familia Rho consiste en 8 subfamilias, entre las cuales se encuentran Rac (Rac1, Rac2 y Rac3), Rho (RhoA, RhoB y RhoC) y Cdc42 (Cdc42, RhoQ y RhoJ) (Zeng *et al.*, 2020). Se expresan de manera ubicua y hay identificados 20 miembros en mamíferos. Actúan como interruptores moleculares que controlan rutas de transducción de señales alternando entre una forma inactiva, de unión a GDP, y una forma activa, de unión a GTP. En su estado de unión de GTP interactúan con efectores moleculares para desencadenar diversas respuestas intracelulares (Raftopoulou and Hall, 2004). Su función mejor caracterizada es en la reorganización del citoesqueleto y la movilidad celular, además también están involucradas en la proliferación, transformación y diferenciación (Parri and Chiarugi, 2010).



**Figura 14:** Migración en matrices extracelulares (Parri and Chiarugi, 2010).

Las moléculas mejor caracterizadas son Rho, Rac y Cdc42. Rho regula el ensamblado de los filamentos contráctiles actina/miosina y por tanto regula las fuerzas de contracción y retracción, necesarias en el cuerpo celular y en el borde trasero. Rac y Cdc42 se necesitan en el frente celular de las células que migran ya que regulan la polimerización de actina para formar protrusiones periféricas activas, lamelipodios y filopodios, respectivamente. Además Rho, Rac y Cdc42 promueven el ensamblado de los complejos de adhesión basados en integrina. Aparte de sus efectos en la actina, estas tres GTPasas ejercen influencia en otras actividades bioquímicas. Cdc42 se

necesita para establecer la polaridad celular. Rho, Rac y Cdc42 pueden afectar al citoesqueleto de microtúbulos, aunque de diferentes modos (Raftopoulou and Hall, 2004; Guarino, 2007; Kai *et al.*, 2019).

La subfamilia Rac incluye Rac1, Rac2 y Rac3. Estimulan la formación de lamelipodios y pliegues de membrana. Rac1 se expresa de forma ubicua, mientras que Rac2 y Rac3 se expresan en las células hematopoyéticas y en el cerebro respectivamente. Los animales tienen 3 isoformas de Rho, RhoA, RhoB y RhoC. RhoA y RhoC juegan un papel importante en la regulación de la contractilidad de la actomiosina y en la locomoción celular, mientras que RhoB, principalmente localizada en los endosomas, regula el tránsito intracelular y la supervivencia celular (Parri and Chiarugi, 2010).

La migración celular en las matrices extracelulares es un proceso que involucra cambios en el citoesqueleto, adhesiones célula-sustrato y componentes de la ECM. La migración se inicia generalmente en respuesta a estímulos extracelulares. Además de mediar la formación de estructuras que contienen actina, las proteínas Rho regulan procesos relevantes para la migración celular como son la adhesión célula-sustrato, adhesión célula-célula, secreción de proteínas y el tráfico de vesículas. La migración celular consta de diversos pasos: 1) extensión del lamelipodio en el borde frontal, 2) formación de nuevos complejos de adhesión focal, 3) secreción de proteasas de superficie a los contactos de la ECM y proteólisis focalizada, 4) contracción del cuerpo celular mediante complejos de actomiosina y 5) separación del borde trasero (figura 14) (Parri and Chiarugi, 2010). Las proteínas WASP/WAVE son diana de las GTPasas Cdc42 y Rac activadas y estimulan el complejo Arp2/3 para inducir la polimerización de actina en los filamentos sub membrana y formar así protrusiones (Guarino, 2007). La activación de Rac por receptores con actividad tirosina quinasa (RTK) o receptores acoplados a proteínas G, es dependiente de la actividad de PI3K. La formación de nuevos complejos de adhesión focal se localiza en los lamelipodios en la mayor parte de las células que migran. Rac es necesaria para la formación de los complejos focales. La secreción de proteasas de superficie a los contactos de la ECM y la proteólisis focalizada son cruciales para la migración. Hay indicios de que las Rho GTPasas podrían jugar cierto papel regulando la secreción y/o activación de las proteasas secretadas. Un ejemplo de ello es que Rac activada puede inducir la expresión de MMP-1 en fibroblastos. En la línea celular de fibrosarcoma HT1080, Rac1 media la activación y expresión de MMP-2 y MT1-MMP. La contracción del cuerpo celular depende de la contractilidad de la actomiosina (Parri and Chiarugi, 2010). Rho es responsable de la contracción del cuerpo celular y de la retracción de la parte trasera a través de la activación de la Rho quinasa (ROCK). ROCK estimula el ensamblado del filamento actina-miosina y por tanto la contractilidad celular. ROCK es capaz de fosforilar y activar LIMK (LIM quinasa), estabilizando de este modo los filamentos de actina (Guarino, 2007). Rho actúa a través de ROCK para regular la fosforilación de MLC ya sea inhibiendo la MLC fosfatasa o fosforilando MLC (Parri and Chiarugi, 2010). ROCK fosforila e inactiva la MLC fosfatasa



incrementando de este modo los niveles de fosfomiosina, la cual puede entrecruzar filamentos de actina para generar contracción (Guarino, 2007).

La separación del eje de cola tiene lugar cuando las uniones célula-sustrato se interrumpen preferentemente en la parte posterior de la célula, mientras que el borde frontal permanece anclado a la ECM y se alarga aún más. Una disminución en la actividad de Rho podría inhibir la separación del borde celular trasero a través de una reducción en la contractilidad de la actomiosina (Parri and Chiarugi, 2010). La ondulación de la membrana está caracterizada por un movimiento dinámico y fluctuante de protrusiones que consisten en lamelipodios y filopodios localizados en el borde frontal. La fuerza que se origina de la polimerización de actina parece dirigir estas protrusiones. La actina en el área de las ondulaciones de membrana se está despolimerizando y polimerizando continuamente durante el movimiento celular. La fosforilación de MLC, regulada por Rho, en la zona de ondulación de membrana, parece contribuir también al movimiento celular junto con la fosforilación de MLC en la región posterior (Kaibuchi *et al.*, 1999).

La migración de célula única incluye estrategias de migración de tipo ameboide y mesenquimal. Las diferencias en la actividad extracelular de proteasas, adhesiones célula-matriz mediadas por integrina, adhesiones célula-célula mediadas por cadherina, la polaridad celular y la estructuración del citoesqueleto definen el tipo de migración celular e invasión.

La **motilidad mesenquimal** se caracteriza por una morfología elongada tipo fibroblasto, con polaridad celular establecida y dependiente de la degradación de la ECM por proteólisis. Es un tipo de motilidad relativamente lenta de unos 0.1-1 $\mu$ m/min. Tras diversos estímulos, se produce la polarización de la célula a través de la activación de Rac1, que a su vez organiza la polimerización de actina y la formación de lamelipodios. La activación de Cdc42 también puede promover la polimerización de actina. La direccionalidad del movimiento se mantiene por Cdc42, la cual coordina la polimerización de actina en el frente de la célula con el acoplamiento y alineación de microtúbulos. De forma conjunta estos eventos conducen a la formación de una protrusión rica en actina. El papel de RhoA y ROCK es complejo, ya que se necesita que su actividad se reduzca para extender las protrusiones del frente celular, mientras que su actividad es necesaria para generar las fuerzas de contracción y retracción.

El tipo de **motilidad ameboide** es bastante independiente del contacto célula-ECM y de la degradación de la matriz extracelular. Las células con este tipo de motilidad muestran una morfología redondeada y dependen de la fuerza propulsora de la contractilidad del citoesqueleto de actomiosina, sin polarización celular mediada por Rac pero requiriendo de la activación de Rho. La contracción cortical de actina mediada por Rho-ROCK a través de la activación de la miosina puede promover una rápida remodelación del córtex celular característico del movimiento ameboide. La

señalización del movimiento ameboide conduce a la desregulación del movimiento mesenquimal, principalmente a través de la inhibición de Rac1. Las uniones célula-ECM son mucho más difusas y débiles. No es necesaria la liberación de proteasas ya que estas células son capaces de estrecharse y pasar a través de huecos preexistentes en la ECM en lugar de degradarla, o de ejercer la suficiente fuerza para deformarla (Parri and Chiarugi, 2010; Paňková *et al.*, 2010).

### **1.3 CARDIOTOXICIDAD**

Las enfermedades cardiovasculares son la causa más común de mortalidad en adultos en los países desarrollados (Goncharov *et al.*, 2008). Bajo el nombre de enfermedad cardiovascular (CVD) se engloban un conjunto de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos que incluyen la enfermedad coronaria, cerebrovascular, enfermedad arterial periférica, cardiopatía reumática, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar (Perkins *et al.*, 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en 2019 murieron 17.9 millones de personas a causa de CVDs, lo cual representa el 32% de todas las muertes a nivel global. Dentro de los 17 millones de muertes prematuras (en menores de 70 años) debidas a enfermedades no transmisibles, un 38% fueron causadas por CVDs en 2019 (Organización Mundial de la Salud, 2021). Las enfermedades del corazón son también la principal causa de mortalidad durante la infancia. La patología subyacente en estos casos es frecuentemente la pérdida de cardiomiocitos que conduce a una insuficiencia cardíaca, o bien un incorrecto desarrollo de los cardiomiocitos durante la embriogénesis que conlleva a malformaciones cardíacas congénitas (Ieda *et al.*, 2010).

El factor de riesgo principal para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares es una elevada concentración de lípidos en suero, además de otros factores y enfermedades asociadas que incluyen la dieta, hábitos de vida sedentarios, factores genéticos, género, hábitos fumadores, diabetes tipo 2, hipertensión, niveles hormonales y el estrés (Goncharov *et al.*, 2008). Sin embargo, existen cada vez más indicios de que la exposición a ciertos agentes ambientales también puede incrementar el riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares. Este es el caso del Arsénico, el Cadmio y de contaminantes orgánicos persistentes como las dioxinas y los PCBs, los cuales se han relacionado como factores de riesgo para la arteriosclerosis, enfermedades coronarias e infartos (Navas-Acien *et al.*, 2005; Dalton *et al.*, 2001; Goncharov *et al.*, 2008). Los contaminantes medioambientales como los PCBs pueden contribuir directa o indirectamente al desarrollo de enfermedades cardiovasculares a través de la promoción de los factores de riesgo o de las enfermedades asociadas (Perkins *et al.*, 2016).

Hay que tener en cuenta además que la presencia de contaminantes durante el desarrollo fetal incrementa el riesgo de padecer enfermedades cardíacas congénitas. La etapa del desarrollo fetal es un periodo crítico para el desarrollo del corazón y para la función cardíaca normal, debido a la sensibilidad fetal y a que la habilidad para absorber toxinas y contaminantes químicos ambientales es mayor que la de los adultos (Li *et al.*, 2014).

Debido al peso significativo que tienen las enfermedades cardiovasculares en la tasa de mortalidad global, es fundamental evaluar los factores que pueden promover o empeorar la patogénesis de estas enfermedades (Perkins *et al.*, 2016).

### 1.3.1 Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias se derivan de las células de la masa interna, del ectodermo embrionario y de las células germinales primordiales de la cresta genital. Representan células pluripotentes indiferenciadas capaces de proliferación, auto renovación y de la generación de un gran número de tipos celulares. Sin embargo las células madre embrionarias (ES) no suelen generar los tejidos del trofoblasto, descartando la generación de una entidad viable (Weatherbee *et al.*, 2021). Según avanza el desarrollo y una célula madre se compromete a un linaje específico o disminuye su potencial proliferativo se la describe como célula progenitora. Las células progenitoras y las células madre adultas son capaces de originar múltiples tipos celulares, pero se cree que tienen un potencial más limitado que las células ES (Gadue *et al.*, 2005).

A partir de los embriones de mamíferos se han establecido tres tipos de líneas de células madre pluripotentes: células embrionarias de carcinoma (EC), células ES y células embrionarias germinales (EG). Las células ES y EG murinas necesitan cultivarse sobre *feeder layers* o capas nutricias (fibroblastos embrionarios murinos o líneas STO) y la adición de un factor inhibidor de la diferenciación como el LIF (factor inhibidor de la leucemia). Bajo estas condiciones, las células ES y EG mantienen un cariotipo relativamente estable y una habilidad ilimitada de auto renovación (Boheler *et al.*, 2002; Wobus and Boheler, 2005).

Existen trabajos previos en los que se han empleado cultivos celulares de líneas EC, ES y EG para generar cardiomiocitos *in vitro*. La morfología, estructura y función de estos cardiomiocitos ha sido extensamente estudiada. Además, su estudio genético y genómico ha permitido un mayor conocimiento sobre el programa del desarrollo cardíaco (Machado *et al.*, 2021; Hannes *et al.*, 2015).

### 1.3.2 Diferenciación de células ES a cardiomiocitos

La diferenciación *in vitro* de las células ES normalmente requiere de un paso inicial de agregación para formar estructuras denominadas cuerpos embrioides (*embryoid bodies* o EBs), que se diferencian en gran variedad de tipos celulares entre los que se incluyen los cardiomiocitos (figura 15). El número de células inicial en el EB, el medio de cultivo (presencia de suero bovino fetal, factores de crecimiento...), la línea de células ES empleada y el tiempo de cultivo en placa de los EBs son los factores que determinan el potencial de diferenciación de las células ES para formar cardiomiocitos en cultivo. Dentro del cuerpo embrioide en desarrollo, los cardiomiocitos se localizan entre una capa epitelial y una capa basal de células mesenquimales (Wobus *et al.*, 2002).

Los cardiomiocitos son fácilmente identificables ya que laten espontáneamente entre 1 y 4 días después de ser cultivados en adhesión sobre la placa. Con el paso del tiempo y la continua diferenciación, se incrementa el número de áreas que laten espontáneamente y todos los EBs acaban presentando zonas localizadas de células que laten. Dentro de cada área latiente, la velocidad de contracción se incrementa rápidamente con la diferenciación, seguida de una disminución en la velocidad media de latido con la maduración. Dependiendo del número de células empleadas para el cultivo en gota pendiente de las microgotas, el cambio en la tasa de latidos y la presencia de contracciones espontáneas puede continuar hasta los 30 días (Boheler *et al.*, 2002). Los cambios que sufren los cardiomiocitos durante el desarrollo *in vitro* ocurren de forma controlada y se pueden relacionar con la duración del tiempo en cultivo. Estos cambios en el patrón de expresión génica se corresponden con las 3 principales etapas de diferenciación: (1) temprana (con células similares al miocardio primario o *primary myocardial-like cells*) a los 4 días de diferenciación; (2) intermedia, con la formación de miofibrillas a los 7 días de diferenciación, y (3) terminal (con la presencia de cardiomiocitos postnatales, a los 12-15 días de diferenciación) (Neri *et al.*, 2011; Rebuzzini *et al.*, 2015).

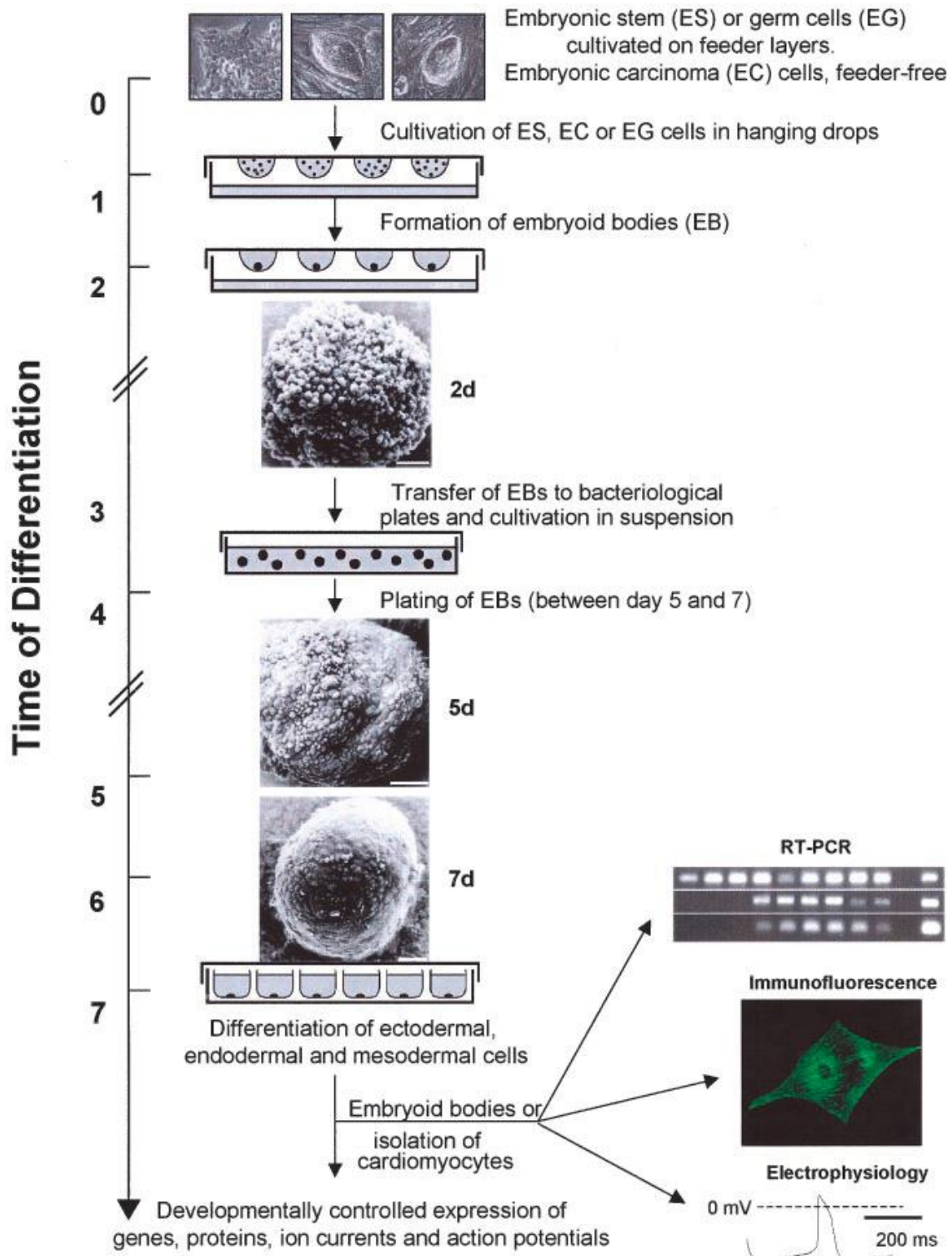
Durante las etapas iniciales de la diferenciación, los cardiomiocitos dentro de los EBs son pequeños y redondos. Dentro de esta etapa inicial, las miofibrillas emergentes son escasas y están organizadas de forma irregular, mientras que en otros casos contienen haces paralelos de miofibrillas que muestran indicios de la presencia de bandas I y bandas A. Los cardiomiocitos adyacentes a menudo presentan diferentes grados de organización de las miofibrillas. Con la maduración, los cardiomiocitos se vuelven elongados y presentan sarcómeros y miofibrillas bien desarrolladas. Las células que laten son principalmente mononucleadas y presentan uniones célula-célula congruentes con las uniones observadas en los cardiomiocitos que se desarrollan en el corazón.

Durante las etapas terminales de diferenciación se pueden observar haces de miofibrillas bien organizados y densamente compactados. En esta etapa los sarcómeros tienen bandas A, bandas I y discos Z claramente definidos. Además, se observan uniones gap, desmosomas y fascia adherens. La longitud, el diámetro, área, ultraestructura, la arquitectura miofibrilar y la longitud de los sarcómeros de los cardiomiocitos derivados de células ES murinas son similares a las de aquellos encontrados en los miocitos de roedores neonatos (Boheler *et al.*, 2002).

Los cardiomiocitos derivados de células ES expresan marcadores cardíacos de una forma controlada durante el desarrollo. Al igual de lo que ocurre en el desarrollo temprano del miocardio, encontramos en los cuerpos embrioides el ARNm de los factores de transcripción GATA-4 y Nkx2.5 antes en el desarrollo que el ARNm de ANF (factor natriurético auricular),  $\alpha$ -MHC (cadena pesada de la  $\alpha$ -miosina) y  $\beta$ -MHC (cadena pesada de la  $\beta$ -miosina). Las proteínas sarcoméricas también se establecen en orden durante el desarrollo: titina (disco Z),  $\alpha$ -actinina y Troponina T cardíaca. Podemos decir que la diferenciación *in vitro* recapitula los perfiles de expresión genética del desarrollo embrionario temprano y del desarrollo cardíaco. Los cuerpos embrioides derivados de células ES expresan transcritos de ARN característicos del desarrollo del ectodermo embrionario temprano (Oct-4 y FGF-5), endodermo (albumina y  $\alpha$ -fetoproteína), mesodermo (Brachyury) y tejido cardíaco (Nkx2.5, GATA-4,  $\beta$ -MHC, conexina 43 y el receptor cardíaco de rianodina) (Hannes *et al.*, 2015; Boheler *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2019).

Los cardiomiocitos derivados de células ES en fase temprana tienen características electrofisiológicas propias del miocardio primario, mientras que los cardiomiocitos de etapas terminales tienen características electrofisiológicas típicas de aquellos cardiomiocitos encontrados en los cardiomiocitos postnatales. Estos cardiomiocitos derivados en fase terminal de diferenciación también muestran las propiedades farmacológicas y fisiológicas del miocardio especializado. Funcionalmente muestran una sensibilidad contráctil al calcio normal (Boheler *et al.*, 2002; Wobus *et al.*, 2002).

Las células derivadas de las células ES diferenciadas *in vitro* se pueden emplear para el estudio de la embriogénesis, el desarrollo embrionario anormal y la genómica funcional. Para la evaluación de la toxicidad durante el desarrollo en modelos de experimentación animal son necesarias al menos dos generaciones. Lo cual hace que los estudios con animales de laboratorio sean costosos, requieran de un elevado número de animales y conlleven mucho tiempo. La rápida diferenciación de las células ES *in vitro* junto con las propiedades electrofisiológicas y contráctiles de los cardiomiocitos derivados abren una ventana de gran importancia para el estudio farmacotológico y la evaluación del potencial embriotóxico de compuestos teratogénos (Kim *et al.*, 2019; Boheler *et al.*, 2002; Van Dartel and Piersma, 2011).



**Figura 15:** Proceso de diferenciación de células ES a cardiomiocitos. Cuando se deja que las células ES, EG y EC formen agregados, estos se diferencian espontáneamente en células pertenecientes a las 3 capas germinales (endodermo, ectodermo y mesodermo). Las células ES se cultivan en gota pendiente durante 2 días para formar EBs, posteriormente los EBs formados se cultivan en suspensión entre 3 y 5 días y finalmente se transfieren a placas de cultivo gelatinizadas para su crecimiento en adhesión. Tras el proceso de diferenciación se pueden estudiar las propiedades de los cardiomiocitos mediante diversas técnicas como la RT-PCR, inmunofluorescencia y electrofisiología (obtenido de Boheler *et al.*, 2002).

### 1.3.3 Biomarcadores cardíacos

Cuando se verifica la diferenciación de los cardiomiocitos es importante observar la expresión de factores de transcripción. Los factores de transcripción representan marcadores cardíacos tempranos e indican progenitores de los cardiomiocitos. Brachyury y MESP1 son marcadores de mesodermo y mesodermo cardíaco. Nkx2.5 es un gen específico cardíaco y marcador de la diferenciación a cardiomiocito. En los ratones, Nkx2.5 es esencial para la interpretación de las señales que actúan como patrón dentro del tubo cardíaco primitivo. Tbx5 es otro factor de transcripción relacionado con el desarrollo del corazón y juega un papel importante en el desarrollo del septo cardíaco así como en el sistema eléctrico que coordina las contracciones del corazón. Nkx2.5 y Tbx5 actúan de forma sincronizada durante la formación de los compartimentos auricular y ventricular izquierdo para regular de forma positiva la transcripción. Isl1 es otro factor empleado para señalar progenitores cardíacos. Nkx2.5 y Tbx5 se asocian con miembros de la familia GATA (GATA4/5/6) y con el factor de respuesta a suero (SRF) para activar genes estructurales cardíacos como la actina, miosina y troponina. Las proteínas GATA-4 y GATA-6 sirven como marcadores cardíacos adicionales. Ambos factores de transcripción son de vital importancia para una adecuada función celular ya que forman parte de una red de factores de transcripción que interactúan estrechamente para crear células cardíacas operativas. GATA-4 tiene un papel temprano en la formación del tubo cardíaco a través de la regulación del endodermo extra embrionario y del plegamiento del embrión. GATA-4 es además esencial para la formación del proepicardio y el desarrollo del músculo. La importancia de GATA-4 es de tal magnitud que la delección de este gen provoca el fallo del corazón del feto debido a malformación (Forough *et al.*, 2011; Mummery *et al.*, 2012).

El miocardio maduro del corazón consiste en 3 tipos principales de proteínas: proteínas miofibrilares (transforman la energía química del ATP en el trabajo mecánico del corazón), proteínas metabólicas (localizadas en el citosol y mitocondrias, proporcionan energía para la contracción) y proteínas extracelulares. La mayoría de las proteínas miofibrilares (80%) están involucradas en la contracción (actina y miosina), mientras que un 10% están involucradas en la regulación (troponina y tropomiosina) y el otro 10% restante en el mantenimiento de la estructura miofibrilar ( $\alpha$ -actinina y titina). La  $\alpha$ -actinina es una proteína estructural de unos 400 KDa localizada en las líneas Z (Adamcová *et al.*, 2006). Varias proteínas miofibrilares que se expresan únicamente en el corazón pueden servir como marcadores de los cardiomiocitos. Dos de estas proteínas son la Troponina I cardíaca (cTnI) y la Troponina T cardíaca (cTnT). Las troponinas actúan como sensores de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en los miocitos y regulan la interacción de las cabezas de miosina con los filamentos finos. Esta interacción es la que genera la fuerza de contracción. La cTnT es una proteína reguladora de 38 KDa localizada en los miofilamentos finos. La Troponina T es un componente del complejo de troponina que regula la contracción del músculo

cardíaco. La presencia de troponinas cardíacas es importante ya que funcionan estrechamente con las proteínas contráctiles esenciales de los cardiomiocitos. Por ejemplo, la Troponina T une sus subunidades a la tropomiosina. De hecho, la inhibición del entrecruzamiento actina-miosina se media directamente por la tropomiosina, no por la cTnT. La unión de la troponina T a la tropomiosina confiere a los miofilamentos su actividad ATPasa dependiente de concentración de calcio (Forough *et al.*, 2011; Adamcová *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 1995; Nishii *et al.*, 2008).

Mientras que la presencia de marcadores intracelulares proporciona evidencia de la diferenciación celular, la presencia de marcadores de superficie permite verificar las células musculares cardíacas. El corazón posee la característica única de presentar discos intercalados. Estos discos sirven para mantener la contracción sincronizada del tejido cardíaco. La conexina 43 es una importante proteína de superficie cardíaca debido a su implicación en la conducción del impulso eléctrico. Esto es debido a que forma hemicanales y uniones gap dentro del corazón, y además es visible en los discos intercalados del músculo cardíaco. Las uniones GAP permiten la conexión eléctrica y metabólica entre los cardiomiocitos, proporcionando al tejido del miocardio un comportamiento de sincitio. Las uniones GAP están concentradas en los discos intercalados entre los miocitos, localizados en los extremos longitudinales. El signo distintivo de las células cardíacas es su habilidad para latir de forma espontánea, lo cual implica necesariamente la comunicación del potencial de acción intracelular. De hecho, la mayoría de los estudios consideran la capacidad de las células para latir de forma rítmica como marcador determinante de la identidad del cardiomiocito (Forough *et al.*, 2011; Oliver-Gelabert *et al.*, 2020).

#### **1.3.4 Frecuencia cardíaca y riesgo cardiovascular**

La frecuencia cardíaca es el principal factor determinante de la demanda de oxígeno del miocardio y afecta prácticamente a todas las etapas de las enfermedades cardiovasculares, desde los factores de riesgo vascular a la insuficiencia cardíaca. El continuo de las enfermedades cardiovasculares incluye aquellos factores de riesgo que inician un proceso que conlleva al daño tisular y la consiguiente cadena de eventos que resulta en la enfermedad cardiovascular a término. Una elevada frecuencia cardíaca en reposo representa un factor de riesgo cardiovascular y ha demostrado ser un importante indicador pronóstico de mortalidad en enfermedades cardiovasculares, como el infarto de miocardio, la enfermedad de las arterias coronarias (EAC) y la insuficiencia cardíaca crónica. La evidencia clínica y experimental sugiere que incrementos sostenidos en la frecuencia cardíaca juegan un papel directo en la patogénesis de la arteriosclerosis y las lesiones en el miocardio, afectan también la iniciación y progresión así como la severidad de la enfermedad, y contribuyen a la precipitación de los eventos vasculares (Reil *et al.*, 2011; Custodis *et al.*, 2013).



Un ejemplo de la importancia de este incremento es que la literatura científica recoge que un incremento en la frecuencia cardíaca de 10 latidos por minuto se asocia con un aumento de un 20% en el riesgo de muerte cardíaca, el mismo porcentaje observado con un incremento en la presión sanguínea sistólica de 10 mm Hg (Perret-Guillaume *et al.*, 2009).

Numerosos estudios han demostrado además que la taquicardia se asocia frecuentemente con la hipertensión tanto en hombres como en mujeres. Esta relación entre taquicardia e hipertensión es significativa incluso después de tener en cuenta diversos factores como el índice de masa corporal, la edad y parámetros metabólicos. Una elevada frecuencia cardíaca se considera precursora de la hipertensión, obesidad y diabetes (Palatini, 2011).

## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis doctoral han sido los siguientes:

- 2.1 Analizar el efecto de la contaminación ambiental por PCBs en la viabilidad y propiedades metastáticas de líneas de melanoma y carcinoma de mama humanas.
- 2.2 Determinar los mecanismos moleculares que median la alteración de las propiedades invasivas en presencia de PCBs
- 2.3 Analizar el efecto de los PCBs durante la diferenciación *in vitro* de los cardiomiocitos

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 CULTIVOS CELULARES**

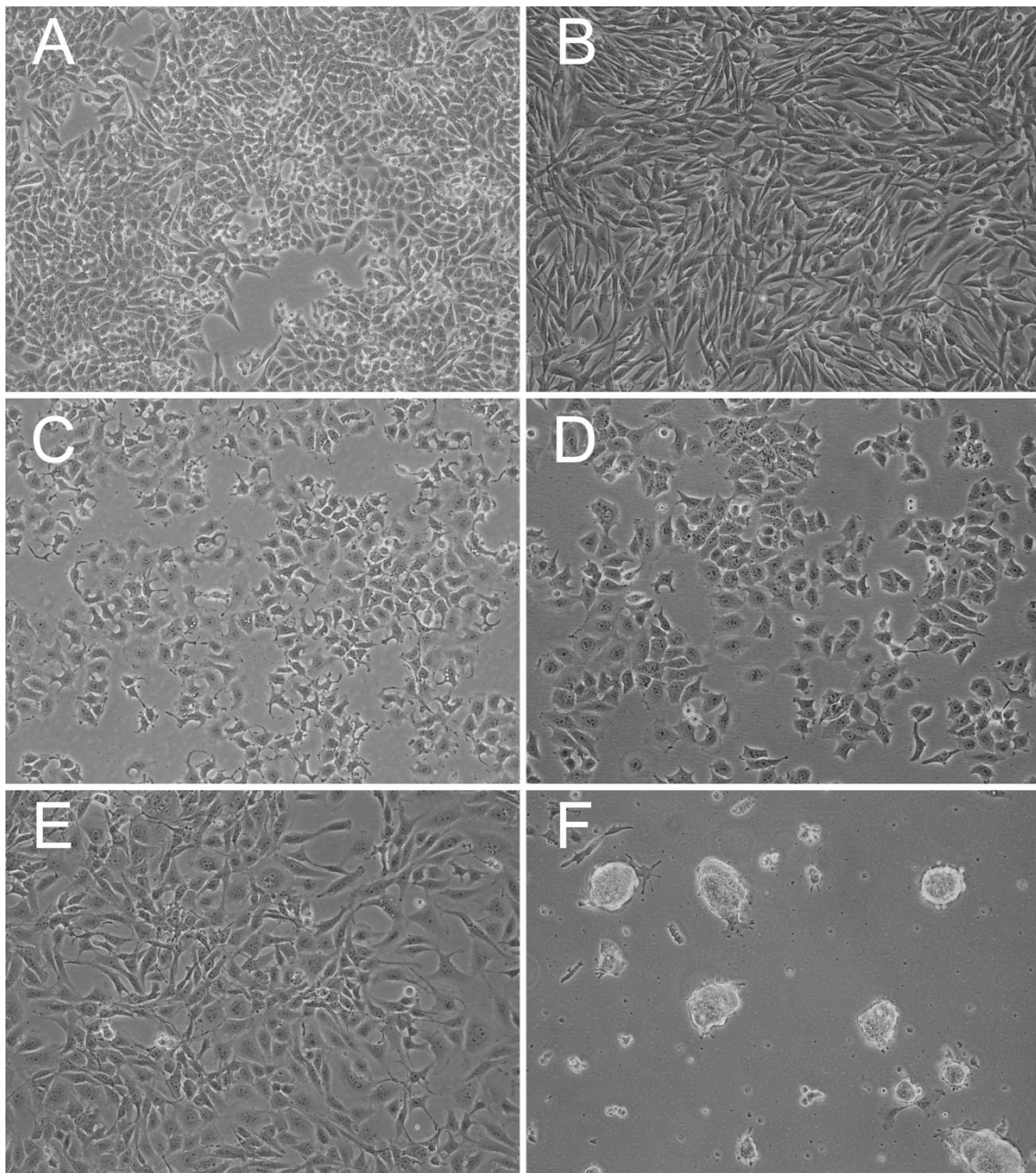
##### **3.1.1 Líneas celulares empleadas**

Se emplearon dos líneas de melanoma (A375 y HT-144), dos líneas de carcinoma de mama (MCF-7/6 y MCF-7/AZ), una línea de fibroblastos embrionarios (STO) y una línea de células madre embrionarias (R1). Todas ellas presentan crecimiento en adhesión y fueron obtenidas a partir de la *American Type Culture Collection* (ATCC), salvo las variantes MCF-7/6 y MCF-7/AZ que fueron cedidas a nuestro laboratorio por el Dr. Olivier de Wever, del Hospital Universitario de Gante (Bélgica), y la línea R1, cedida por el Dr. Nagy del *Samuel Lunenfeld Research Institute* (Hospital Monte Sinaí, Toronto, Canadá).

La línea A375 (figura 16A) fue obtenida por D.J. Giard en 1973 a partir de un melanoma maligno (tumor primario) de una mujer caucásica de 54 años. Las células de esta línea presentan una morfología epitelial y dan lugar a tumores subcutáneos amelanóticos cuando son inoculadas en ratones atímicos (Giard *et al.*, 1973).

La línea HT-144 (figura 16B) procede de una metástasis subcutánea de un melanoma maligno de un varón caucásico de 29 años. Sus células presentan una morfología fibroblástica.

La línea MCF-7 se aisló por primera vez en 1970 a partir del tejido mamario de una mujer caucásica de 69 años. De las dos mastectomías que se le realizaron, la primera reveló que el tejido extraído era benigno. Cinco años después, una segunda operación reveló un adenocarcinoma maligno en un derrame pleural del que se obtuvo la línea MCF-7. Establecida *in vitro* de un derrame pleural (Soule *et al.*, 1973), la línea ha mantenido algunas características particulares del epitelio mamario. Entre ellas se incluye la habilidad de las MCF-7 de procesar el estrógeno en forma de estradiol a través de receptores de estrógeno localizados en el citoplasma celular. Esto hace que la línea MCF-7 se considere una línea de referencia como control positivo para el receptor de estrógeno. A partir de la línea MCF-7 se derivaron dos sublíneas (MCF-7/AZ y MCF-7/6) que difieren en cuanto a sus propiedades invasivas en diferentes modelos de invasión: en fragmentos de corazón de embrión de pollo (Bracke *et al.*, 1991), en invasión en Matrigel® y en colágeno tipo I (De Weber *et al.*, 2010). La línea MCF-7/6 (figura 16D) se derivó de la línea parental de carcinoma de mama MCF-7 mediante selección del potencial metastático por pasaje seriado en ratones desnudos (Mao *et al.*, 2010).



**Figura 16:** Imagen de contraste de fases de cultivos celulares de las líneas de melanoma humano (A) A375 y (B) HT-144, de las variantes de carcinoma de mama (C) MCF-7/AZ y (D) MCF-7/6, de fibroblastos murinos (E) STO y de (F) células madre embrionarias (R1).

A diferencia de la variante MCF-7/AZ (figura 16C), la línea MCF-7/6 es invasiva en los modelos de invasión citados anteriormente (ensayo de invasión en colágeno tipo I, Matrigel® y corazón de pollo). La línea MCF-7/6 metastatiza además espontáneamente en ratones desnudos tras inyección subcutánea, al contrario que la variante MCF-7/AZ. El análisis proteómico comparativo de estas dos variantes ha revelado un patrón increíblemente idéntico, excepto por una proteína de 230 KDa presente en la variante

invasiva MCF-7/6 pero apenas detectable en la variante no invasiva MCF-7/AZ. Esta proteína es la cadena pesada de la miosina tipo IIA no muscular (NMIIA) y parece ser una proteína decisiva en la mediación de la invasividad en la línea MCF-7 (Derycke *et al.*, 2011), ya que su inhibición es capaz de bloquear la invasividad de la línea MCF-7/6 en fragmentos de corazón de pollo y en geles de colágeno tipo I.

La línea STO (figura 16E) es una línea de fibroblastos embrionarios murinos empleada habitualmente como *feeder layer* o capa nutricia para el crecimiento de células madre embrionarias tras su inactivación mediante irradiación o tratamiento con mitomicina C.

La línea R1 (figura 16F) es una línea de células madre embrionarias (células ES) murinas provenientes de la masa celular interna del blastocisto. Se estableció en 1991 a partir de un blastocisto de 3.5 días post coito (dpc) producido mediante el cruce de dos subcepas de ratones 129 (129S1/SvImJ y 129X1/SvJ). Son células adherentes que crecen como colonias esféricas. Para el mantenimiento del estado de indiferenciación característico de las células madre es necesaria la presencia de un factor inhibitorio de la diferenciación, como el LIF (*leukemia inhibitory factor*), en el medio de cultivo así como el cocultivo con fibroblastos previamente inactivados.

### 3.1.2 Metodología general de cultivo

La manipulación de todos los cultivos celulares se realizó en condiciones de esterilidad en el interior de campanas de flujo laminar de bioseguridad tipo IIA (Telstar BioUltra). Los cultivos celulares se mantuvieron en condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) a humedad saturada, 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C de temperatura (Heraeus 6000).

Las células se cultivaron en monocapa sobre frascos de plástico o placas cubiertas con gelatina al 0.1% durante 30 min a 37°C.

La mayoría de las líneas celulares que crecen adheridas a sustrato sufren una parada en su crecimiento a densidades elevadas. Esta parada está impuesta por el proceso de inhibición por contacto. Dependiendo de la morfología y propiedades de la línea, las células paran de dividirse, bien cuando ocupan toda la superficie de la placa, o bien cuando todas están en contacto con otras (sin necesidad de cubrir completamente el plástico). A este momento o grado de densidad celular se le denomina *confluencia* del cultivo. Una vez que los cultivos alcanzan la subconfluencia (cuando las células cubren aproximadamente el 70-80% de la superficie), se encuentran en fase de crecimiento exponencial, y es necesario realizar el pase de las células a otro frasco o placa. Para el pase de las células se desecha el medio de cultivo, se lava el frasco con PBS (tampón fosfato salino que elimina restos de suero y proteínas que interfieren con la actividad de la tripsina) y se despegan las células de la superficie mediante una solución de tripsina al 0.25% y EDTA al 0.2% (Sigma, T4049). Se añade medio de cultivo completo al

frasco (el suero presente en el medio neutraliza la actividad residual de la tripsina) y se recoge la suspensión celular. Es importante minimizar la exposición de las células a la tripsina activa para preservar la máxima viabilidad. Finalmente la suspensión celular se reparte en nuevos frascos de cultivo. Una proporción de subcultivo adecuada suele encontrarse entre una proporción 1:3 y una proporción 1:10 dependiendo de la línea celular.

<b>Tampón PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)</b>	
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
<b>pH: 7.2-7.4</b>	

El almacenamiento de las líneas celulares para su conservación se realizó por criopreservación en contenedores criogénicos con nitrógeno líquido. Las células se criopreservan para evitar pérdidas por contaminación, para minimizar cambios genéticos en líneas continuas y evitar la transformación en líneas finitas. Para la criopreservación es necesario en primer lugar despegar con tripsina los cultivos en fase exponencial. La suspensión celular resultante de la inactivación de la tripsina con medio de cultivo nuevo se centrifuga, a 250 g durante 5min, y el *pellet* obtenido se resuspende en medio de congelación (suero bovino fetal (SBF) o DMEM (Lonza) completo con un 10% de DMSO (Sigma)). El DMSO actúa como agente crioprotector evitando la formación de cristales de hielo intracelulares. La suspensión celular en el medio de congelación se reparte en crioviales a razón de 10<sup>6</sup> células por criovial. La congelación se realiza de forma progresiva con una disminución de temperatura de un grado por minuto hasta alcanzar los -80°C. Para conseguir una velocidad de congelación controlada de -1°C por minuto se usan contenedores de congelación celular a base de alcohol iso-propílico al 100%. Una vez alcanzados los -80°C conservamos los crioviales en nitrógeno líquido a -196°C.

El proceso de descongelación, al contrario, debe de ser un proceso rápido ya que el DMSO a una concentración del 10% resulta tóxico para las células. Siendo necesario minimizar el tiempo que las células pasan a temperatura ambiente en presencia de DMSO.

La descongelación se realiza directamente retirando el criovial del tanque de nitrógeno líquido y descongelándolo parcialmente en un baño de agua termostaticado a 37°C.



Una vez que el vial se ha descongelado parcialmente, diluimos el contenido en 10 ml de medio de cultivo para disminuir la concentración de DMSO presente en el medio. Centrifugamos la suspensión a 250 g durante 5 min. El *pellet* obtenido se resuspende en medio de cultivo fresco y la suspensión se transfiere a un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.

La determinación del número de células en la suspensión celular se realizó mediante recuento en una cámara cuentaglóbulos tipo Bürker (Blaubrand). El porcentaje de células vivas en la misma se determinó diluyendo una muestra de la suspensión celular con una solución de azul tripán al 0.4% en PBS. El azul tripán es una molécula de 960 Da impermeable al paso por la membrana celular de modo que solo es capaz de pasar al interior de las células que tengan la membrana comprometida. Una vez en el interior celular, el azul tripán se une a proteínas intracelulares dejando las células de un color azulado. El ensayo de exclusión por azul tripán permite de este modo la identificación directa de las células vivas (no coloreadas) y muertas (azules) en una población dada.

### **3.1.2.1 Cultivo de las líneas de melanoma (A375 y HT-144) y adenocarcinoma de mama (MCF-7/6 y MCF-7/AZ)**

Estas líneas tumorales humanas se cultivaron en medio DMEM completo, que contiene DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Lonza) suplementado con un 10% de SBF (HyClone), un 1% de Penicilina/Estreptomicina (Penicilina (100 U/mL) / Estreptomicina (100 µg/mL)) (Sigma) y L-glutamina 2 mM (Sigma).

<b>Medio DMEM completo</b>	
DMEM	440 ml
SBF	50 ml
L-Glutamina 200 mM	5 ml
Penicilina / Estreptomicina (100X)	5 ml

Para el subcultivo de la línea se desecha en primer lugar el medio de cultivo del frasco, se hace un lavado con PBS y se despegan las células con una solución de tripsina (0.25%)-EDTA (0.20%). Se añade medio de cultivo nuevo para inactivar la tripsina y se recoge la suspensión celular resultante. Centrifugamos 5 min a 250 g. Finalmente se resuspende el *pellet* en 1 ml de DMEM completo. La proporción adecuada para el subcultivo es una proporción 1:3 para las líneas HT-144, MCF-7/6 y MCF-7/AZ y una proporción 1:10 para la línea A375.

### 3.1.2.2 Cultivo de la línea STO

El medio de cultivo empleado para el mantenimiento de la línea STO es medio DMEM suplementado con un 10% de SBF, un 0.5% de Penicilina/Estreptomicina (Penicilina (50 U/mL) / Estreptomicina (50 µg/mL)), 4 mM de L-glutamina, β-mercaptoetanol 0.1 mM (Sigma) y gentamicina (40 µg/ml) (Gibco).

Las células STO se usan como *feeder layer* de la línea R1 y se cultivan sobre placas de petri de 100x20mm previamente tratadas con gelatina al 0.1% (Sigma) durante 30 min. Para el subcultivo se aspira el medio de cultivo, se hace un lavado con PBS y las células se despegan con una solución de tripsina (0.25%)-EDTA (0.20%). Inactivamos la tripsina con medio de cultivo y repartimos la suspensión celular a proporción 1:3 en una nueva placa tratada con gelatina.

Medio para la línea STO	
DMEM	435 ml
SBF	50 ml
β-mercaptoetanol 0.1 M	500 µl
Penicilina / Estreptomicina (100X)	2.5 ml
L-Glutamina 200 mM	10 ml
Gentamicina (10 mg/ml)	2 ml

### 3.1.2.3 Cultivo de la línea R1

El medio empleado para el cultivo de la línea R1 es medio de cultivo de células madre que contiene Knockout-DMEM (Gibco) suplementado con un 15% de ES SBF (SBF cualificado para el cultivo de células madre embrionarias) (Gibco), 2 mM de L-glutamina, solución de aminoácidos no esenciales 1X (MEM-NEAA, *MEM Non Essential Amino Acids*), un 0.5% de Penicilina/Estreptomicina (Penicilina (50 U/mL) / Estreptomicina (50 µg/mL)), β-mercaptoetanol 0.1 mM y 500 U/ml de ESGRO® LIF (Millipore).

El LIF es una citocina pleiotrópica que promueve el mantenimiento a largo plazo del estado de pluripotencia de las células madre embrionarias, bien suprimiendo la diferenciación espontánea o bien promoviendo la auto renovación. Tras la retirada del LIF y de la *feeder layer* de STO, las células ES son capaces de diferenciarse espontáneamente en distintos tipos celulares de las tres hojas embrionarias (Graf *et al.*, 2011).

Para el cultivo de la línea R1 es necesario inactivar previamente con mitomicina C (Sigma) una placa con STO. Para ello retiramos el medio de cultivo y añadimos medio de cultivo nuevo de STO con una concentración de 10 µg/ml de mitomicina C. Dejamos inactivar durante 2 a 4 h. La mitomicina inhibe la síntesis de ADN. Reacciona de manera covalente con el ADN formando entrecruzamientos entre cadenas complementarias de ADN. Esta interacción previene la separación de las cadenas de ADN complementarias y por lo tanto inhibe la replicación. Una vez transcurrido el tiempo de inactivación, se aspira el medio con mitomicina y las células se lavan con abundante PBS. Se realizan un total de 3 lavados para eliminar todos los restos de mitomicina que puedan inactivar posteriormente las células R1. Por último se añade medio de cultivo de células ES.

<b>Medio para células ES</b>	
KO-DMEM	412 ml
ES SBF	75 ml
β-mercaptoetanol 0.1 M	500 µl
Penicilina / Estreptomicina (100X)	2.5 ml
L-Glutamina 200 mM	5 ml
MEM-NEAA (100X)	5 ml
LIF (10 <sup>7</sup> U/ml)	25 µl

Para el subcultivo de la línea R1 se aspira el medio de cultivo, se realiza un lavado con PBS y se despegan las células con tripsina-EDTA (0.05%) (Gibco). La suspensión celular con tripsina se inactiva con medio de cultivo y se centrifuga 5 min a 250 g. El *pellet* resultante se resuspende muy bien para evitar subcultivar agregados celulares y conseguir una suspensión de células individuales. Las células se subcultivan a proporción 1:3 en una placa con STO inactivados previamente. El subcultivo se realiza cada 48 h alternando un cultivo sobre *feeder layer* de STO seguido de dos cultivos seriados sobre una placa gelatinizada.

La línea R1 crece como colonias que se subcultivan cuando alcanzan una densidad del 70-80%. Las células no deben sembrarse muy escasamente (cuando son necesarios 4-5 días para alcanzar la subconfluencia) ni deben subcultivarse una vez han sobrepasado una confluencia del 90%. Ambas condiciones inducen diferenciación.

➤ Signos de diferenciación:

- Las colonias aparecen rodeadas de células aplanadas que difieren morfológicamente de las células indiferenciadas en el centro de la colonia. Estas células aparecen frecuentemente oscuras y puntiagudas.
- Colonias grandes con centros necróticos, aparecen como células con límites definidos: ocurre con las células que no han sido pasadas durante varios días.
- Las colonias aparecen como células individuales, a menudo el núcleo es claramente visible.

### **3.1.3 Tratamiento con Aroclor 1254**

El Aroclor 1254 (SUPELCO y AccuStandar) se disolvió en DMSO para hacer una solución stock a 20 mg/ml.

### **3.2 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTT)**

La medida de la viabilidad y la proliferación celular constituye la base de numerosos ensayos *in vitro* destinados a comprobar la respuesta de la población celular a factores externos. El uso más habitual es testar si un determinado compuesto (fármaco, tóxico...) tiene efectos en la proliferación celular o si por el contrario muestra efectos citotóxicos que puedan conducir a la muerte celular.

Existen gran variedad de ensayos que pueden emplearse para estimar el número de células eucariotas viables. Entre ellos se incluyen la reducción del tetrazolio y la resazurina y los ensayos de actividad proteasa. Todos estos ensayos requieren de la incubación de la población de células viables con un reactivo, que será empleado por las células como sustrato que transformarán a un compuesto coloreado o fluorescente que puede ser detectado con un lector de placas.

Existen gran variedad de compuestos de tetrazolio empleados para detectar células viables. Los más comunes son el MTT, MTS, XTT y WST-1. Pueden clasificarse en dos categorías: 1) el MTT que está cargado positivamente y atraviesa fácilmente las células y 2) aquellos como el MTS, XTT y el WST-1 que están cargados negativamente y atraviesan con dificultad la membrana.

La reducción de sales de tetrazolio es aceptada como un método fiable para examinar la proliferación celular. El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

(MTT) es una sal de tetrazolio de color amarillo que es reducida por células activas metabólicamente, en parte por la acción de enzimas deshidrogenasas (como la succinato deshidrogenasa), para generar equivalentes reductores como el NADH y el NADPH. Como resultado de la actividad mitocondrial se genera un precipitado insoluble de color morado (formazán) que puede ser solubilizado y cuantificado mediante espectrofotometría.

El ensayo de MTT mide la tasa de proliferación celular y del mismo modo, cuando los eventos metabólicos conducen a apoptosis o necrosis, la reducción en la viabilidad celular.

La cantidad de células vivas se considera directamente proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para nuestro ensayo se siembran 5.000 células por pocillo de una placa de 96 pocillos. Por cada condición se siembran 6 réplicas. A las 24 h de la siembra se aspira el medio de cultivo y se añade el medio con el tratamiento correspondiente (control con 0.1% de DMSO o Aroclor 1254). Las placas se procesan a las 24, 48 y 72 h de exposición al Aroclor 1254. Se prepara un stock de MTT a una concentración de 5 mg/ml en PBS. La solución se filtra y se almacena en oscuridad a 4°C. Para determinar la viabilidad celular se desecha el medio de cultivo y se añade medio nuevo con MTT (Sigma) a una concentración final de 0.5 mg/ml (10 µl del stock de MTT por cada 100 µl de medio de cultivo). Se deja que las células metabolicen el MTT durante 2 a 4 h. Pasado este tiempo se retira el medio con MTT y se añaden 100 µl de DMSO para solubilizar los cristales de formazán del interior celular. Medimos la absorbancia a 540 nm en un lector de placas.

La viabilidad se determina como:

$$\text{Viabilidad} = \text{D.O del tratamiento} / \text{D.O del control}$$

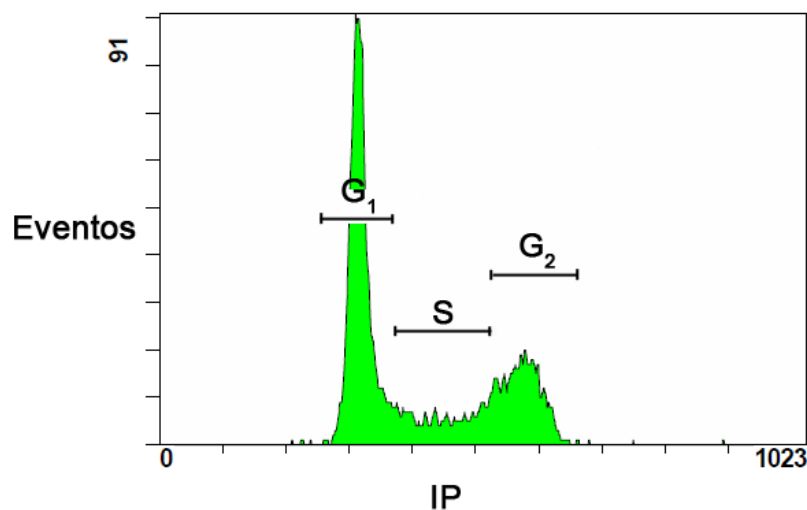
(D.O = densidad óptica)

### **3.3 CITOMETRÍA DE FLUJO**

#### **3.3.1 Análisis del ciclo celular**

El ioduro de propidio (IP) es un fluorocromo que se une estequiométricamente a los ácidos nucleicos de doble hebra y que una vez unido a estos adquiere una capacidad de fluorescencia unas 30 veces superior a la de la molécula libre. Esta característica

permite establecer una relación directa entre la cantidad de ADN de una célula (y su fase del ciclo celular correspondiente) y la fluorescencia del IP (620 nm). Es necesario un tratamiento previo con RNAsa, ya que el IP se une indistintamente al ADN y al ARN. Para realizar el análisis del ciclo celular las células, previamente expuestas al Aroclor 1254 durante 48 h, se despegaron mediante tripsina-EDTA. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS. El *pellet* obtenido tras los dos lavados se resuspendió en 1 ml de PBS y se añadieron lentamente 2.33 ml de etanol a 4°C mientras se agitaba el tubo (quedando el etanol a una concentración final del 70%). Se fijaron las células durante 1 hora a 4°C. Tras la fijación, las células se lavaron 2 veces en PBS frío y se ajustó la concentración celular a  $10^6$  células/ml. Por último, las células se tiñeron con IP (20 µg/ml) en presencia de RNAsa A (250 µg/ml) (Sigma) durante al menos 1 hora a 4°C y se analizaron por citometría de flujo midiendo la fluorescencia a 620 nm (Galios, Beckman Coulter) (figura 17).



**Figura 17:** Representación obtenida mediante análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Se distinguen los picos correspondientes a las fases  $G_1$ , S y  $G_2$ .

### 3.3.2 Análisis de apoptosis mediante Anexina V –IP

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada caracterizado por características morfológicas distinguidas y por mecanismos bioquímicos dependientes de energía. La apoptosis se considera un componente vital de varios procesos entre los cuales se encuentran el recambio celular normal (mantenimiento de la homeostasis), el desarrollo embrionario, el funcionamiento del sistema inmune y la muerte inducida por determinados compuestos químicos. La alteración en la regulación de la apoptosis está implicada en distintas enfermedades como la neurodegeneración, desordenes

autoinmunes y determinados tipos de cáncer (Elmore, 2007). El programa apoptótico está caracterizado por características morfológicas entre las que se encuentran la pérdida de asimetría de la membrana plasmática, pérdida de adhesión, condensación del citoplasma y del núcleo y fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos.

Los fosfolípidos de la membrana celular se distribuyen de forma asimétrica entre la capa externa e interna de la membrana. En células viables, la fosfatidilcolina y la esfingomiélinina se encuentran expuestas en la superficie externa de la bicapa lipídica y la fosfatidilserina se observa predominantemente en la superficie intracelular. Durante la apoptosis, la fosfatidilserina experimenta una traslocación a la superficie externa en un fenómeno conocido como *flip-flop*. Esto ocurre durante las fases tempranas de la apoptosis, durante las cuales la membrana permanece intacta. La anexina V es una proteína de 35-36 KDa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  con una alta afinidad por la fosfatidilserina, por lo que la anexina V conjugada con algún fluorocromo se utiliza habitualmente como marcador de células apoptóticas mediante citometría de flujo. La traslocación de la fosfatidilserina es previa a la pérdida de la integridad de la membrana que permite la entrada de moléculas catiónicas como el yoduro de propidio. Por lo tanto, mediante la tinción combinada con IP y anexina V-FITC, es posible identificar a las células no apoptóticas (anexina negativas/IP negativas), las células en apoptosis temprana (anexina positivas/IP negativas), las células en apoptosis tardía (anexina positivas/IP positivas) o necróticas (anexina negativas/IP positivas). Para el análisis de la apoptosis se utilizó un kit de anexina V-FITC con IP (Immunostep).

<b>Annexin V Binding Buffer, 10X</b>	
HEPES	0.1 M
NaOH	0.1 M
<b>pH: 7.4</b>	
NaCl	1.4 M
CaCl <sub>2</sub>	25 mM

Las células se cultivaron con los tratamientos durante 48 h. Transcurrido este tiempo las células se despegaron con tripsina, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 1X *Annexin-binding buffer* a una concentración de  $10^6$  células/ml. Por cada 100  $\mu\text{l}$  de suspensión celular se añaden 5  $\mu\text{l}$  de Anexina V-FITC y 5  $\mu\text{l}$  de IP. Dejamos incubar las células durante 15 min a temperatura ambiente (25°C) en oscuridad. Tras el periodo de incubación se añaden 400  $\mu\text{l}$  del *Annexin-binding buffer*

1X a los 100  $\mu$ l de suspensión. Analizar por citometría de flujo dentro de la hora posterior.

### **3.4 ENSAYOS DE INVASIÓN**

#### **3.4.1 Ensayo de invasión en Matrigel**

La membrana basal es una matriz extracelular especializada compuesta por distintos componentes biológicos entre los que se encuentran distintos tipos de colágenos, lamininas y proteoglicanos. Estos forman estructuras que separan el tejido epitelial del estroma adyacente del tejido conectivo, dando lugar a una barrera entre ambos que impide el paso de células y ciertas macromoléculas. Aunque esta barrera se vuelve permeable durante el desarrollo del tejido, durante los procesos de reparación y en los lugares de inflamación para permitir a las células del sistema inmune alcanzar el sitio. Además, es reabsorbida en áreas donde la membrana basal contacta con el tumor invasivo.

La invasión de las células tumorales a través de la membrana basal es uno de los pasos fundamentales durante el proceso de metástasis. Las células tumorales cruzan inicialmente la membrana basal e invaden los lechos vascular y linfático durante su diseminación y vuelven a atravesarla para penetrar en el órgano diana donde originarán tumores secundarios. Este proceso implica una serie de eventos interdependientes que incluyen: la adhesión de las células tumorales a ciertos componentes de la membrana basal, la degradación de la misma mediante enzimas proteolíticas y finalmente la migración de las células tumorales al órgano diana inducida por estímulos quimiotácticos específicos.

Para evaluar *in vitro* la capacidad invasiva de las células tumorales se han desarrollado gran cantidad de sistemas. Algunos de los cuales utilizan extractos de membranas de diversos tejidos como el amnios y la membrana corioalantoidea de pollo. Sin embargo, la reproducibilidad de los resultados usando estos sustratos es a menudo difícil debido a la heterogeneidad inherente a la preparación del tejido. Por otro lado, el proceso de obtención de estos sustratos resulta un proceso técnicamente difícil y largo. Para hacer frente a todos estos inconvenientes se han desarrollado matrices extracelulares reconstituidas como sustrato alternativo para el estudio *in vitro* de la invasividad. Uno de estos ejemplos es el Matrigel.

El Matrigel es una preparación de membrana basal solubilizada obtenida a partir de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un tumor rico en proteínas de la matriz extracelular. Su componente principal es la laminina, seguido del colágeno tipo IV, proteoglicanos y entactina/nidógeno, todos componentes de la membrana basal.



El ensayo de invasión en Matrigel se basa en la preparación de geles sobre insertos tipo *Transwell*, que tienen en su base una membrana con un tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$ . El inserto se pone sobre un pocillo de una placa de 24 pocillos, dividiéndolo en dos compartimentos: uno superior donde se siembran las células cuya invasividad se quiere testar, y otro inferior, donde se dispone medio de cultivo con un agente quimiotáctico. Las membranas cubiertas de Matrigel actúan como barreras a la invasión de las células tumorales y a la posterior migración a través de los poros en las membranas.

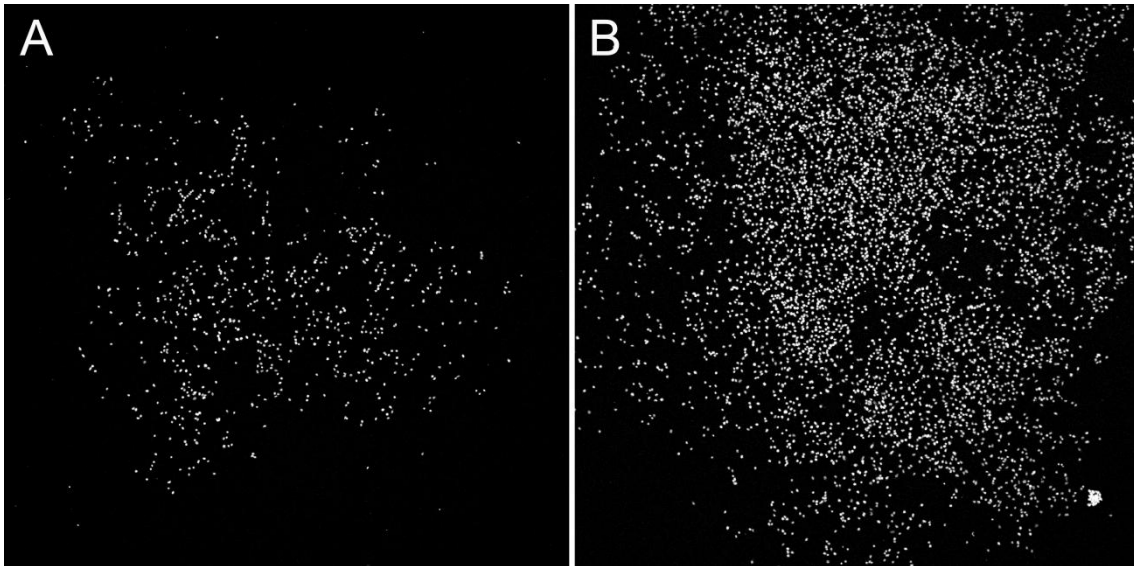
#### **3.4.1.1 Preparación de los geles de Matrigel**

Los experimentos se realizaron en placas de 24 pocillos en los que se introdujeron los insertos tipo *Transwell* (Costar, 3422), provistos de una membrana de policarbonato de 0.33  $\text{cm}^2$  de superficie con poros de 8  $\mu\text{m}$  de diámetro. El Matrigel debe dejarse descongelando a 4°C la noche anterior. Se partió de una solución de Matrigel® (BD 354234) diluida en medio DMEM sin SBF a una proporción 1:3. Toda la manipulación del Matrigel se realizó en hielo ya que empieza a gelificar a una temperatura superior a los 10°C. Se cubrieron los filtros del *Transwell* con 35  $\mu\text{l}$  de la solución diluida de Matrigel y se dejaron gelificar durante 2 h a 37°C.

Para inhibir la ruta Rho/ROCK se utilizó el inhibidor Y27632 a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . Se trata de un inhibidor selectivo de ROCK que se encuentra en la misma ruta corriente abajo de RhoA.

#### **3.4.1.2 Ensayo de invasión y análisis de los resultados**

Una vez que los geles estuvieron polimerizados se sembraron sobre ellos las células (50.000 por pocillo) en medio sin SBF. Los tratamientos se añadieron 2 h después de la siembra para permitir la adhesión previa de las células. En la parte inferior del pocillo se puso 1 ml de medio DMEM con un 10% de SBF. El suero que contiene el medio actuará como quimioatrayente. Tras 24 h de incubación, el compartimento superior de los insertos se limpió con bastoncillos de algodón para eliminar el Matrigel y las células no invasivas. Posteriormente, los filtros se lavaron con PBS, se fijaron con metanol frío (15 min a 4°C) y se incubaron con Hoescht (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS, 15 min) para teñir los núcleos de las células invasivas. La zona central de los filtros se fotografió mediante un microscopio confocal Olympus Fluoview FV500 con el objetivo 4x (figura 18). El número de células en cada campo se cuantificó mediante el software ImageJ.



**Figura 18:** Ensayo de invasión en Matrigel. Imagen de microscopía confocal de los filtros con células de la línea HT-144 (A) control y (B) tratadas con 1 µg/ml de Aroclor 1254.

### 3.4.2 Ensayo de invasión en colágeno tipo I

El ensayo de invasión en colágeno tipo I constituye otro método eficaz y representativo de la invasión tumoral ya que el colágeno tipo I es el principal componente intersticial de la matriz en los tumores sólidos (De Weber *et al.*, 2010).

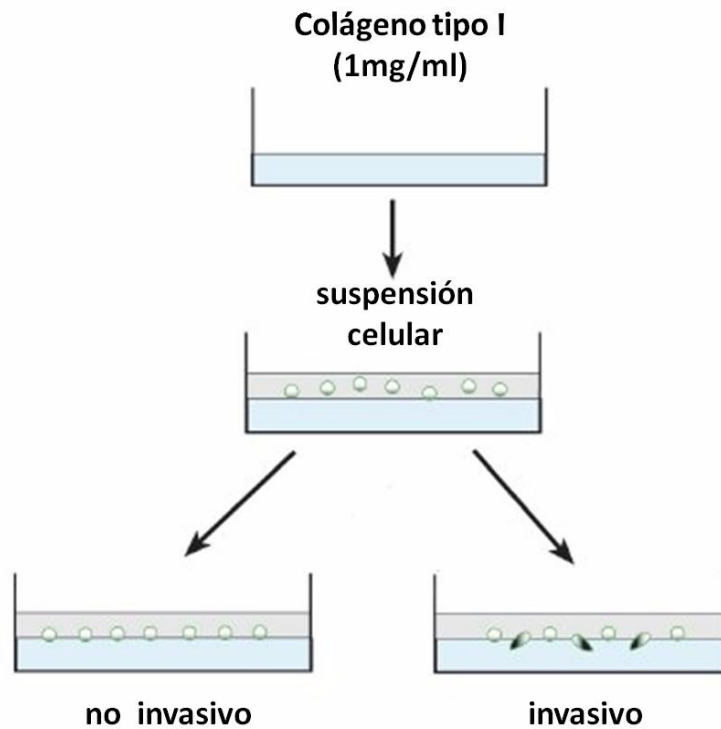
#### 3.4.2.1 Preparación de los geles de colágeno tipo I

La mezcla para los geles de colágeno se preparó en hielo a una concentración final de colágeno de 1 mg/ml según la siguiente fórmula:

<b>Gel de colágeno tipo I (1mg/ml)</b>	
Colágeno tipo I (BD 354236)	360 µl
CMF-HBSS	445 µl
MEM 10X (Gibco 21430-020)	90 µl
NaHCO <sub>3</sub> 0.25 M	90 µl
NaOH 1 M	25 µl
DMEM	250 µl

A continuación se repartió la mezcla en placas de 6 pocillos (1.25 ml por pocillo) y se dejó polimerizar por lo menos 1 h a 37°C. Se sembraron entre 70.000 y 100.000 células

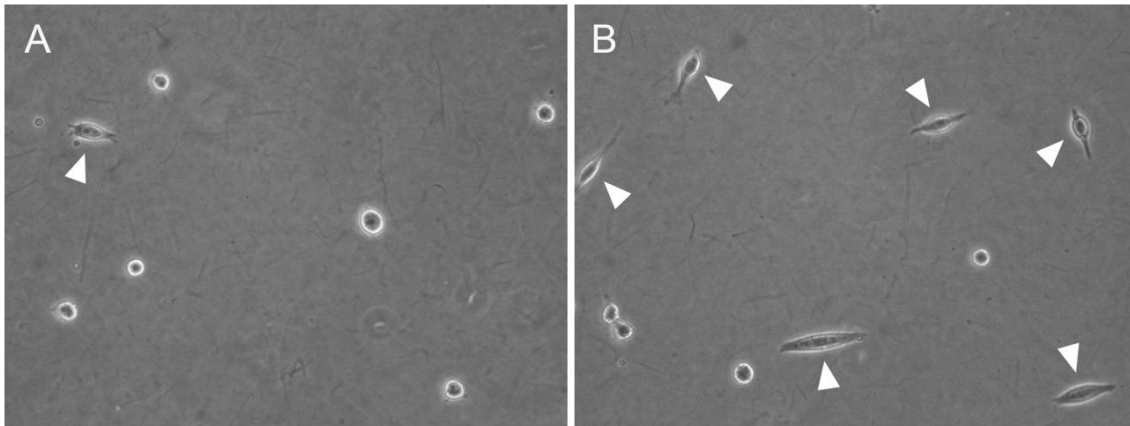
por pocillo en 1 ml de medio de cultivo con el tratamiento correspondiente. Tras 24 h de incubación se fotografiaron los cultivos en un microscopio invertido de contraste de fases (20x). Los bordes de las células aparecen más brillantes, como con un halo de luz, en comparación con el fondo.



**Figura 19:** Metodología del ensayo de invasión en colágeno tipo I. En primer lugar se prepara la mezcla del gel de colágeno a una concentración final de 1 mg/ml. Se siembra la suspensión celular y a las 24 h se observan los cultivos en un microscopio confocal en busca de las células invasivas que son aquellas que presentan protrusiones oscuras (adaptado de De Weber *et al.*, 2010).

Las células invasivas se identificaron por la presencia de prolongaciones oscuras (figuras 19 y 20), en contraste con el aspecto redondeado de las células no invasivas. Estas extensiones celulares que invaden el colágeno aparecen oscuras porque están localizadas fuera de fase (De Weber *et al.*, 2010). El porcentaje de invasión se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Invasión (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ células invasivas}}{n^{\circ} \text{ células totales}} \times 100$$



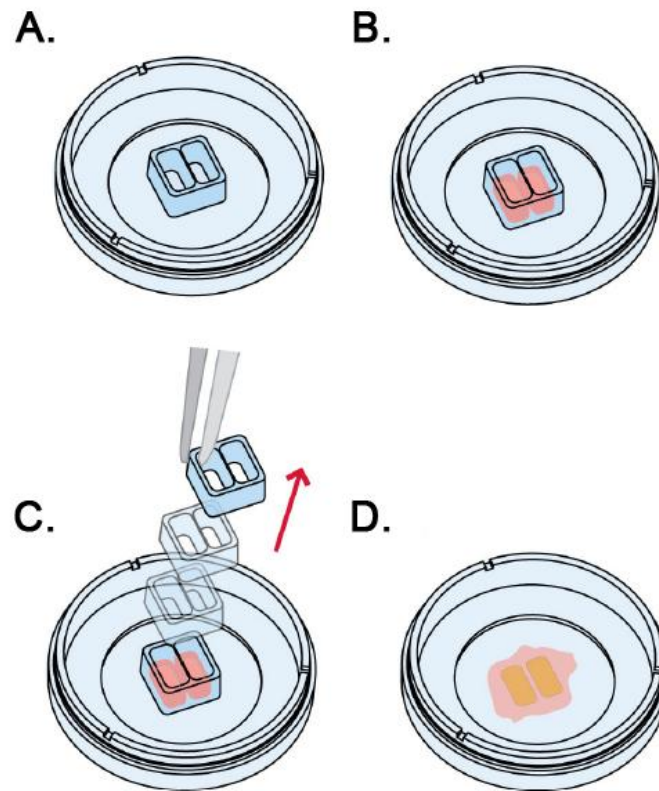
**Figura 20:** Ensayo de invasión en colágeno tipo I en la línea HT-144. (A) Control DMSO y (B) tratamiento con Aroclor 1254 (0.08 µg/ml). Las flechas señalan las células consideradas como invasivas en base a la presencia de protrusiones. Imagen de contraste de fases (20x).

### 3.5 ENSAYOS DE MIGRACIÓN

#### 3.5.1 Ensayo de cicatrización (*wound healing*)

El ensayo de *wound healing* es un método económico y directo para estudiar la migración celular *in vitro*. Este método está basado en la observación de que tras la creación de un hueco artificial en una monocapa de células confluentes, las células situadas en el borde de la herida creada se moverán hacia la abertura para cerrar la herida hasta que se establezcan nuevos contactos celulares (Liang *et al.*, 2007). El ensayo consiste en la creación de una herida en la monocapa de células, la captura de imágenes al inicio y a intervalos regulares durante la migración para cerrar la herida y la comparación de las imágenes para determinar la tasa de migración celular.

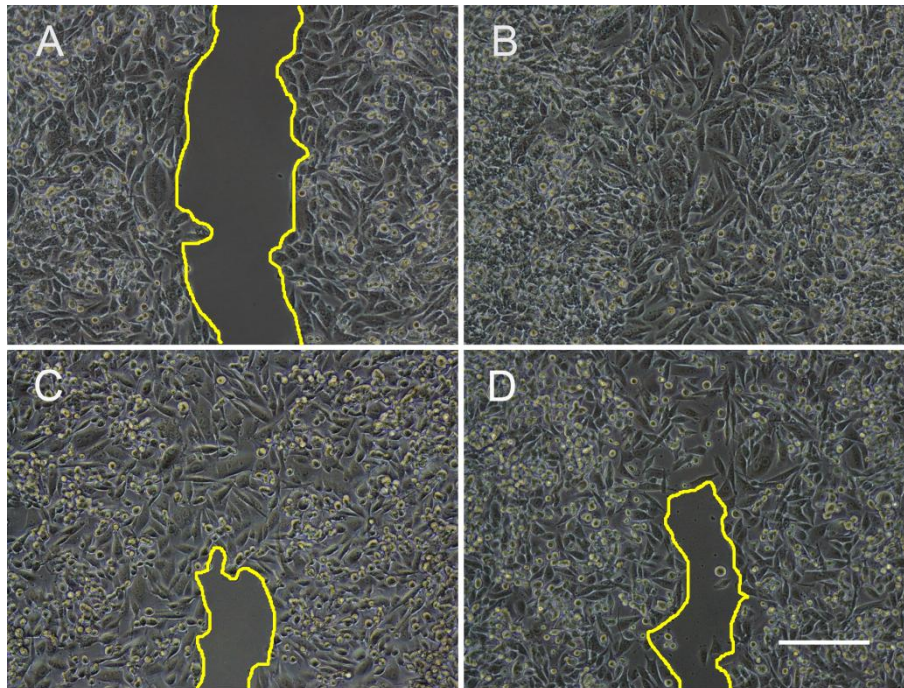
Para nuestro ensayo, en vez de realizar una herida en la monocapa de células, usamos insertos (Ibidi). Estos insertos constan de dos pocillos a ambos lados de un tabique central en los cuales sembramos las células. La retirada del inserto permite obtener una herida de una longitud constante (500 µm) al contrario de lo que ocurre cuando se infringe una herida en la monocapa de células con una punta de pipeta. Además, permite que los experimentos sean reproducibles y facilita la cuantificación. Los insertos están fabricados de una silicona biocompatible y poseen un extremo adhesivo. De este modo adherimos el inserto (figura 21A) a la superficie adecuada para el ensayo, en nuestro caso pocillos de una placa de 12 pocillos, sembramos las células a ambos lados del tabique central (figura 21B) y esperamos 24 h a que se adhieran. Pasadas las 24 h observamos si las células están confluentes y retiramos el inserto con unas pinzas estériles (figura 21C).



**Figura 21:** Metodología del ensayo de cicatrización: (A) adhesión del inserto, (B) siembra de las células, (C) retirada del inserto tras 24 h de la siembra y (D) comienzo de la migración (tiempo 0). (Obtenido de <https://ibidi.com/>).

Para el ensayo sembramos 70  $\mu$ l de una suspensión con 800.000 células por ml a ambos lados del tabique. Transcurridas 24 h se retira el inserto, se hace un lavado con PBS y se añade medio de cultivo con el tratamiento correspondiente (control DMSO o 0.08, 1 y 5  $\mu$ g/ml de Aroclor 1254). Para las líneas de cáncer de mama MCF-7/6 y MCF-7/AZ sacamos imágenes a las 0, 24 y 48 h. En el caso de la línea de melanoma HT-144 sacamos las fotos a las 0, 24 y 28 h, ya que debido a su capacidad de migración pasado este tiempo la herida está completamente cerrada. El ensayo no se pudo realizar con A375 ya que esta línea de melanoma no cierra la herida de forma homogénea, sino que las células se distribuyen de forma heterogénea a lo largo de la misma.

Para el análisis cuantitativo, se cuantificó el área de la cicatriz abierta a los distintos intervalos con el programa ImageJ mediante selección manual del límite de la herida (figura 22). Los datos se representan relativizados con respecto a la media del valor obtenido a tiempo 0 h.



**Figura 22:** Ensayo de *wound healing* en la línea HT-144. Imagen de contraste de fases de la cicatriz a las 28 h. (A) Control y tratamientos de Aroclor 1254 a concentraciones de (B) 0.08 µg/ml, (C) 1 µg/ml y (D) 5 µg/ml. Barra de escala 200 µm. La línea amarilla muestra la selección realizada para la cuantificación del área de la cicatriz mediante el programa ImageJ.

### 3.6 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

#### 3.6.1 *Western blot*

##### 3.6.1.1 Lisado celular

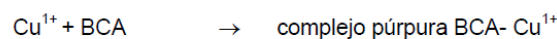
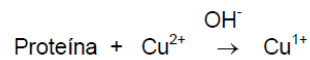
Las células se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> y la duración del tratamiento con Aroclor 1254 se prolongó durante 24 h.

Transcurridas las 24 h de tratamiento se desecha el medio de cultivo y se hacen 3 lavados cortos con PBS. A partir de este momento trabajamos en frío. Los frascos se dejan en hielo en posición vertical durante 1 min adicional para eliminar el remanente de PBS que se retira por aspiración. Se añade a los frascos tampón de Laemmli 1X al que previamente le hemos añadido cóctel inhibidor de proteasas 1X (Sigma). Para las líneas tumorales, por frasco de 75 cm<sup>2</sup> se corresponden 600 µl de tampón Laemmli 1X. Las células se despegan de los frascos con un *cell scraper*, moviendo el lisado hacia una esquina y recogéndolo con una pipeta en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 ml. La muestra se sonica en un sonicador con un diámetro de punta de 2.5 mm (BANDELIN, SONOPULS mini20) a una amplitud del 30% durante 10 segundos. Posteriormente el lisado se centrifuga 5 min a 15.000 g (4°C). Se descarta el precipitado y se utiliza el

sobrenadante para la cuantificación de la proteína y la preparación de las muestras de *western blot*.

### 3.6.1.2 Determinación de la cantidad de proteína por colorimetría

El método se basa en la realización previa de una recta patrón. La cantidad de proteína se determina mediante el uso de ácido bicinconónico (BCA) (Sigma B-9643). Éste método se basa en la capacidad que presentan las proteínas para reducir el  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ . El BCA, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo de color púrpura intenso (con absorbancia máxima a 562 nm) con los iones  $\text{Cu}^+$  en medio alcalino. Este reactivo es la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) producido en una reacción entre las proteínas con el ion cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) en medio alcalino (reacción de Biuret):



La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos.

La absorbancia se determina a 562 nm y el rango de sensibilidad de este método abarca desde los 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a los aproximadamente 1.2  $\text{mg}/\text{ml}$ . De este modo, la absorbancia de las muestras a la longitud de onda dada será proporcional a la concentración de proteína en las mismas.

Para el ensayo debemos preparar en primer lugar una mezcla de BCA y  $\text{CuSO}_4$  en proporción 50:1 (1 parte de  $\text{CuSO}_4$  al 4% en agua bidestilada y 50 partes de la solución de BCA). Se añade 1 ml de la mezcla a la dilución de la muestra y a los tubos de la recta patrón, elaborada con concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA):

Recta patrón	[BSA]: 0 mg/ml	[BSA]: 0.2 mg/ml	[BSA]: 0.4 mg/ml	[BSA]: 0.6 mg/ml	[BSA]: 0.8 mg/ml	[BSA]: 1 mg/ml
BSA (1 mg/ml)	0 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O miliQ	50 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	0 $\mu\text{l}$



Las muestras se incubaron 30 min a 37°C. Posteriormente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 562 nm. Una vez conocida la concentración de las muestras estas se ajustaron a una concentración final de 1 mg/ml en *buffer* de desnaturalización. Posteriormente las muestras se hirvieron 5 min a 95°C para desnaturalizar las proteínas y se conservaron a -20°C hasta su uso.

### **3.6.1.3 Electroforesis de proteínas**

En primer lugar, los cristales para preparar los geles se limpian con metanol. El gel de migración se prepara a la concentración de acrilamida correspondiente según el tamaño de la proteína de interés. Se añade la mezcla de poliacrilamida para el gel *running* entre los cristales y se cubre con agua destilada para evitar la formación de meniscos de modo que la superficie del gel quede recta. Se deja polimerizar durante 30-45 min. Una vez ha polimerizado el gel *running* se prepara el gel concentrador (*stacking gel*) y sobre éste se coloca el peine, dejando que polimerice otros 30-45 min. Se cargan 25 µl de muestra (previamente ajustada a 1 mg/ml) por calle y 4 µl de marcador. La electroforesis se migró durante 1 h a 150 V (Mini Protean II de BioRad).

### **3.6.1.4 Western blot**

La transferencia de las proteínas del gel de electroforesis a la membrana de nitrocelulosa se realizó durante 45 min a 100V (Mini Protean II de BioRad). Posteriormente se tiñó la membrana con rojo Ponceau para comprobar el estado de las bandas y la aparición de posibles burbujas. Las membranas se destiñeron 5 min en agua destilada. Tras desteñir la membrana se hace un lavado en TBS y se deja secar al aire durante 20-30 min. Pasado este tiempo se transfiere a TBST (solución de TBS con Tween 20 al 0.05%) durante 15 min para permitir que se rehidrate. La membrana se bloqueó durante 30 minutos en una solución de TBST al 5% de leche desnatada. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario correspondiente. El anticuerpo se diluyó en TBST y se incubó durante 2-3 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Tras la incubación, la membrana se lavó una vez en 50 ml de TBST durante 1 min. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario adecuado en TBST durante 1 h a temperatura ambiente. Se hicieron 5 lavados de 10 min en TBST. Finalmente se reveló con ECL. El líquido de revelado empleado fue *Luminata Forte HRP Substrate* (Millipore) que tiene un rango de detección de proteína que alcanza los 400 femtogramos.

En los casos en los que la proteína de interés tiene un peso molecular similar a la proteína normalizadora (tubulina en nuestro caso) y no es posible cortar la membrana para incubar los dos anticuerpos primarios por separado, fue necesario realizar un *stripping*. En estos casos, tras la incubación con el primer anticuerpo primario y



posterior revelado del mismo se procedió a lavar la membrana 20 min en *stripping buffer*. Posteriormente se realizaron 2 lavados con TBST y se procedió a bloquear con TBST al 5% de leche desnatada e incubar con el anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina.

La densitometría de las imágenes de las bandas obtenidas se realizó con el programa de análisis de imagen ImageJ.

### Anticuerpos empleados

	Huésped	Referencia	Dilución	Tamaño
<b>E-cadherina</b>	Ratón	Santa Cruz sc-21791	1:100	120 KDa
<b>N-cadherina</b>	Ratón	Sigma C1821	1:1000	135 KDa
<b>Vimentina</b>	Ratón	Sigma V6389	1:2000	58 KDa
<b>RhoA</b>	Ratón	Cytoskeleton ARH04	1:500	23 KDa
<b>Rac1</b>	Ratón	Cytoskeleton ARC03	1:500	21 KDa
<b>Cdc42</b>	Ratón	Cytoskeleton ACD03	1:250	21 KDa
<b><math>\alpha</math>-tubulina</b>	Ratón	Sigma T5168	1:4000	55 KDa
<b>Anti-ratón HRP</b>	Oveja	Santa Cruz sc-2005	1:4000	

**Tabla 1:** Lista de anticuerpos empleados para el *western blot*.

### 3.6.2 Inmunoprecipitación

#### 3.6.2.1 Pull down de GTPasas Rho: RhoA, Cdc42 y Rac1 activas

La familia de pequeñas GTPasas Rho consiste en al menos 20 miembros, de los cuales los mejor y más ampliamente caracterizados son las proteínas Rac1, RhoA y Cdc42. En común con el resto de pequeñas proteínas G, las proteínas Rho actúan como interruptores moleculares que transmiten las señales celulares a través de diversas proteínas efectoras. Esta familia media un gran número de respuestas celulares entre las que se encuentran la reorganización del citoesqueleto, la regulación de la transcripción, la síntesis de ADN, el tráfico de membrana y la apoptosis. Las GTPasas Rho constituyen pequeñas moléculas (21-25 KDa) que comparten homología estructural.

El mecanismo de las GTPasas Rho funciona alternando entre una forma activa, o estado de unión a GTP, y una forma inactiva o estado de unión a GDP. Las proteínas efectoras de la familia Rho reconocen específicamente la forma unida a GTP. De este modo, el

nivel de acción de estas proteínas está regulado por el balance entre el estado de activación y el de inactivación.

El ensayo de inmunoprecipitación de RhoA emplea el dominio de unión de Rho (*Rho binding domain* o RBD) de la proteína efectora de Rho denominada rotekina. El motivo proteico RBD se une específicamente a la forma de Rho unida a GTP. La proteína rotekina-RBD empleada contiene los aminoácidos 7-89 de la rotekina RBD expresada como una fusión GST en *E.Coli* unida a bolas coloreadas de glutatión-sefarosa. Esto permite inmunoprecipitar el complejo Rho-GTP con las bolas rotekina RBD. La cantidad de RhoA activada se determina mediante *western blot* usando un anticuerpo específico para RhoA.

Para el ensayo de inmunoprecipitación de Rac1/Cdc42 se emplea el denominado dominio de unión de p21 (*p21 Binding Domain* o PBD) de la proteína efectora de Rac1/Cdc42 denominada quinasa I activada de p21 (o PAK). El motivo proteico PBD se une específicamente a la forma de Rac1 o Cdc42 unida a GTP. La proteína PAK-PBD empleada contiene los aminoácidos 67-160, lo cual incluye la región altamente conservada de PBD (aminoácidos 74-88) además de las secuencias requeridas para la interacción de alta afinidad con Rac1-GTP y Cdc42-GTP.

Para el ensayo, las células se cultivaron sobre frascos de 75cm<sup>2</sup> para poder obtener la cantidad de proteína necesaria. El tratamiento con Aroclor 1254 se mantuvo durante 48 h. Durante las 48 h que dura el tratamiento se llevó a cabo una deprivación de suero ya que la deprivación reduce los niveles de GTPasas Rho activas y así es posible apreciar con mayor claridad los cambios en la activación producidos por un determinado compuesto. De este modo, durante las primeras 24 h que dura el tratamiento las células se cultivaron en DMEM al 1% de SBF, y en DMEM sin SBF durante las últimas 24 h. Transcurrido este tiempo se desecha el medio de cultivo y se realiza un lavado con abundante PBS (10 ml) frío. Los frascos se dejan en vertical sobre hielo durante un minuto para drenar los restos de PBS que puedan quedar y que pueden afectar negativamente al ensayo. A partir de este punto trabajamos en hielo. Se realizó un lisado total a partir de cada frasco de 75 cm<sup>2</sup> en 500 µl de *cell lysis buffer* (50 mM de Tris pH=7, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 M NaCl y 2% de Igepal) al que le hemos añadido previamente 1X de cóctel inhibidor de proteasas (solución 100X: 62 µg/ml de leupeptina, 62 µg/ml de pepstatina A, 14 mg/ml de benzamida y 12 mg/ml de metiléster de N-p-tosil-L-arginina). Para lisar las células se utilizó un *cell scraper* como se ha explicado anteriormente. El lisado se centrifugó a 10.000 g durante 1 min, a 4°C. Recogemos el sobrenadante y lo repartimos en dos tubos tipo Eppendorf. En uno de ellos guardamos una alícuota de 20 µl que se usará posteriormente para la cuantificación con bicinonínico. Para minimizar la pérdida de la forma GTP durante el procesamiento, se congelan los lisados en nitrógeno líquido durante unos segundos y se almacenan a -80°C hasta su uso.

Las muestras se diluyeron hasta una concentración de 1 mg/ml en el *cell lysis buffer* con cóctel inhibidor de proteasas. Por condición o tratamiento se incubó 1 ml de muestra a 1 mg/ml con 50 µg de las bolas de rotekina-RBD en el caso de la inmunoprecipitación de RhoA-GTP o con 10 µg de bolas PAK-PBD para el caso de las muestras destinadas al ensayo de inmunoprecipitación de Rac1-GTP y Cdc42-GTP.

Para el ensayo debemos poner además un control positivo y uno negativo. Para ello se toman 0.3 ml de muestra y se añade *buffer* de carga. Se corresponden 70 µl del *buffer* de carga por cada 1 ml de lisado. Inmediatamente se añaden 10 µl de GTPγS (es un análogo no hidrolizable del GTP que constituye un buen sustrato para las bolas y resulta en una fuerte señal positiva) por cada 990 µl de lisado (concentración final 0.2 mM). Se incubó el control durante 15 min en rotación y a temperatura ambiente. La reacción se para transfiriendo el tubo a 4°C y añadiendo una décima parte de volumen de *STOP buffer*. Esta muestra se usa inmediatamente para el ensayo de inmunoprecipitación. El control negativo se realiza de manera idéntica al control positivo salvo que en vez de añadir GTPγS se añade GDP (a una concentración final 1 mM). Lo cual resulta en una muy baja señal tras la incubación con las bolas.

Una vez tenemos preparados los controles positivos y negativos y las muestras ajustadas a 1 mg/ml, añadimos 50 µg de bolas rotekina-RBD o 10 µg de bolas PAK-PBD. Incubamos los lisados con las bolas a 4°C y en rotación durante 1 h.

Transcurrida la hora de incubación se centrifugó a 5.000 g durante 1 min a 4°C para precipitar las bolas y se realizó un lavado con 500 µl de tampón de lavado (25 mM Tris pH 7.5, 30 mM MgCl<sub>2</sub> y 40 mM NaCl). Se centrifugó a 5.000 g durante 3 min y se desechó el sobrenadante con mucho cuidado, evitando resuspender el *pellet* e intentando eliminar el máximo volumen de tampón posible. Posteriormente se resuspendieron las bolas en 20 µl de *buffer* de desnaturalización y se hirvieron las muestras 3 min a 95°C para desnaturalizar la GTPasa y permitir que se despegue de las bolas. La cantidad de RhoA, Cdc42 y Rac1 activas se determinó por *western blot* empleando anticuerpos específicos para las 3 GTPasas estudiadas (RhoA/Rac1/Cdc42 Activation Assay Combo Biochem Kit™, Cytoskeleton).

### **3.6.3 Zimografía de gelatina**

Esta es una técnica cromatográfica empleada en la detección de proteasas mediante el uso de geles de poliacrilamida a los que se añade una proteína que actúa como sustrato de las proteasas cuya actividad queremos detectar. En este caso se añadió gelatina al medio con el fin de detectar las gelatinasas MMP-2 y MMP-9. Al teñir los geles con *azul de Coomassie* se observan las bandas sin teñir debido a la degradación de las proteínas por parte de las proteasas (Kleiner and Stetlerstevenson, 1994).

Para el estudio de las gelatinasas liberadas al medio partimos de cultivos celulares confluentes sembrados en frascos de 25 cm<sup>2</sup> de superficie. Los cultivos se lavan dos veces con PBS y se les añade el tratamiento correspondiente (DMSO o 0.08, 1 y 5 µg/ml de Aroclor 1254) diluido en 4 ml de DMEM sin rojo fenol y sin SBF. Transcurridas 24 h, los medios de cultivo se procesaron de la siguiente forma:

a) Los medios se recogen y se centrifugan a 250 g durante 5 min, con el objetivo de retirar los restos celulares que pudieran contener.

b) El sobrenadante se hace pasar a través de filtros de celulosa con un tamaño de poro de 0.22 µm de diámetro.

c) Se midió la concentración de proteína como se ha descrito anteriormente y se igualó en todas las muestras.

d) Para cada pocillo se mezclaron 20 µl de medio y 10 µl de tampón de carga. Estas muestras no deben hervirse antes de cargarlas. El gel se preparó con un 10% de poliacrilamida y un 0.1% de gelatina, y se cargaron 25 µl de muestra en cada calle. La migración del gel se hizo a 200 V. Al terminar la electroforesis, los geles se lavaron 2 veces durante 30 min con Tritón X-100 al 2% para retirar el SDS, seguido de un lavado de 5 min con agua destilada. Posteriormente se sumergieron en *MMP substrate buffer* y se incubaron toda la noche a 37°C.

e) Al día siguiente los geles se lavaron durante 5 min en agua destilada y se tiñeron durante unos 20 min con *azul de Coomassie*. Finalmente se destiñeron con la solución desteñidora hasta la aparición de las bandas.

### **3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa GraphPad (Prism4). Los resultados fueron evaluados estadísticamente utilizando la distribución de t-Student, para determinar si las muestras tratadas eran significativamente diferentes de las muestras control. Se consideró  $p < 0.05$  estadísticamente significativo.

### **3.8 ANÁLISIS DE IMAGEN**

Las imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases, fluorescencia y confocal fueron analizadas mediante el software Image J y posteriormente editadas en Photoshop CS3.

### 3.9 ENSAYO DE DIFERENCIACIÓN A CARDIOMIOCITO

Durante el periodo gestacional el feto puede verse afectado por la exposición a gran variedad de compuestos químicos a través de la exposición materna y el subsecuente transporte a la placenta. El corazón es el primer órgano en formarse en los vertebrados durante la embriogénesis. En animales vertebrados la supervivencia del embrión en desarrollo depende del corazón y del sistema circulatorio, de modo que las alteraciones cardíacas no solo pueden causar un aborto espontáneo sino que también pueden afectar seriamente la calidad de vida después del nacimiento (Leitolis *et al.*, 2019).

Las células madre embrionarias (células ES) son células pluripotentes derivadas de la masa celular interna de los blastocistos y son capaces de diferenciarse *in vitro* en una gran variedad de tipos celulares representativos de las tres hojas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). Bajo las condiciones apropiadas de cultivo algunas de ellas son capaces de diferenciarse en cardiomiocitos que laten espontáneamente. El uso de células madre embrionarias permite establecer un interesante modelo *in vitro* para el estudio de las etapas de peri-implantación del desarrollo de mamíferos, ya que recapitulan los procesos del desarrollo celular y los patrones de expresión génica de la embriogénesis temprana durante su diferenciación *in vitro*, resultando en la formación de distintos tipos celulares especializados y funcionalmente competentes. Por otro lado, el uso de células madre permite solventar los problemas derivados del alto número de animales que son necesarios para los ensayos de toxicología.

Para estudiar el efecto de los PCBs durante la cardiomiogénesis temprana hemos empleado un modelo de diferenciación *in vitro* a partir de células ES murinas. Este modelo permite recapitular las principales fases del desarrollo fetal del corazón (etapa temprana, a los 4 días de la diferenciación, con compromiso cardíaco y células primarias “*myocardial-like*”; etapa intermedia a los 7 días, con la formación de las miofibrillas; y la terminal a los 12-15 días, con cardiomiocitos diferenciados postnatales) a través de la formación de cuerpos embrioides (Neri *et al.*, 2011; Rebuzzini *et al.*, 2015). La exposición a la mezcla ambiental de PCBs (Aroclor 1254 a concentraciones de 0.1, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) tuvo lugar durante todo el proceso de diferenciación, desde el día 0 al día 15.

Para el ensayo de diferenciación a cardiomiocito partimos de células de la línea R1 en el tercer pase en gelatina. Es necesario que las células se hayan subcultivado durante tres veces consecutivas en una placa únicamente gelatinizada (sin *feeder layer*) para eliminar la máxima cantidad de células STO que puedan actuar como contaminantes y disminuyan la eficiencia de la diferenciación. Durante todo el ensayo se emplea medio de cultivo para células ES sin LIF. Es muy importante eliminar el LIF del medio ya que su retirada promueve la diferenciación espontánea.

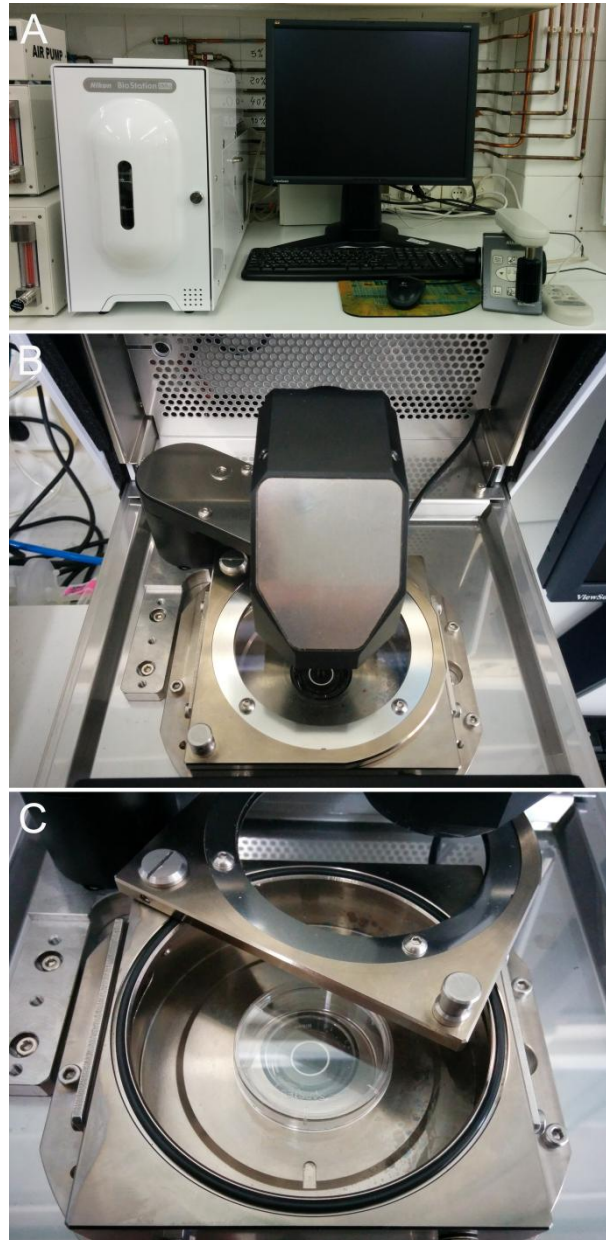
A día 0 se despegan las células R1 y se centrifugan. Con el *pellet* resultante se prepara una suspensión celular de 50.000 células/ml. Se siembran microgotas de 20 µl en la tapa de una placa de petri de 10 cm de diámetro. Se siembran al menos 70 microgotas por placa. En la base de la placa debemos de poner 8 ml de PBS para evitar la evaporación del medio de cultivo de las microgotas. A día 3 se realiza la transferencia de los cuerpos embrioides (C.E) formados debido al cultivo en gota pendiente. La transferencia se realiza a una placa previamente tratada con agarosa al 0.1% para evitar el crecimiento en adhesión. Se ponen 10 ml de medio de cultivo por placa y se deja que los cuerpos embrioides crezcan durante 2 días adicionales. A día 5 pasamos los cuerpos embrioides bien a placas de petri de 35 mm con fondo de vidrio (previamente tratadas con gelatina al 0.1%), en el caso de los C.E que se usen para la adquisición de vídeos, o bien a una placa de 12 pocillos para aquellos cuerpos embrioides que vayan destinados posteriormente a la extracción de ARN o la disgregación para la realización de inmunofluorescencias. El día 7 es el día crítico en la diferenciación de las células ES a cardiomiocitos, ya que es el día en el que los cardiomiocitos comienzan a latir espontáneamente. El comienzo del latido suele ser un acontecimiento perfectamente sincronizado ya que comienzan a latir justo 48 h después del momento en el que se han transferido los cuerpos embrioides. Durante los 7 días posteriores, los cardiomiocitos se dividen y se observa en los cuerpos embrioides áreas cada vez mayores con cardiomiocitos que laten espontáneamente. Los cardiomiocitos continúan latiendo hasta el día 20-25 de la diferenciación. Durante este periodo el medio se renueva cada 2 días. Para ello, se desecha la mitad del medio de cultivo y se renueva con medio de cultivo nuevo. El cambio completo del medio provoca que los cardiomiocitos dejen de latir, ya que en el medio de cultivo se encuentran factores que promueven el crecimiento y el latido en los cuerpos embrioides.

### **3.9.1 Análisis de las grabaciones de los cardiomiocitos**

En el caso de la grabación de vídeos se emplean cardiomiocitos a día 15 de la diferenciación. Para la realización de las grabaciones se emplea un incubador de CO<sub>2</sub> que incluye además un microscopio y una cámara para la observación *in vivo* de las células así como para la obtención de imágenes de *time-lapse* (figura 23).

Los cardiomiocitos creciendo sobre una placa de 35 mm con fondo de vidrio se colocan en el interior de la Biostation (BioStation IM-Q, Nikon). La BioStation es un microscopio invertido con técnica de contraste de fases que se encuentra en un incubador, lo que permite mantener controladas las condiciones de temperatura (37°C), CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y con una humedad relativa superior al 95%. Por cada tratamiento y experimento seleccionamos en el monitor asociado a la Biostation 10 puntos en los que haya sincitios que laten espontáneamente, y por cada punto se graba un vídeo de una duración de 40 seg con el programa "snagit". Estos vídeos se analizaron

posteriormente con el programa "Video Spot Tracker" (VST) (<https://cismm.web.unc.edu/software/>) y fueron procesados de acuerdo con el algoritmo de procesamiento de imagen desarrollado por ingenieros de la Universidad de Pavía (Italia) basado en el lenguaje de programación del programa Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) (Fassina *et al.*, 2011).



**Figura 23:** Biostation (Nikon). (A) Imagen de la Biostation, monitor y mando de control que nos permite controlar el movimiento direccional en X, Y y Z además de la magnificación y filtros de fluorescencia.; (B) y (C) cámara del incubador de CO<sub>2</sub> donde se coloca la placa con los cultivos a grabar. En la imagen (B) la cámara aparece asociada a una iluminación LED roja que permite la toma de imágenes de contraste de fases. La imagen (C) muestra la cámara del incubador abierta con una placa de Petri en su interior y en la que puede verse el objetivo en la parte inferior.

El programa "Video Spot Tracker" se usa para rastrear el movimiento de uno o varios puntos en vídeos con extensión ".AVI". Por cada vídeo se han seleccionado 12 puntos posicionados sobre el primer fotograma del vídeo. Reproduciendo los vídeos en el programa VST, fotograma a fotograma, el programa rastreó y registró las coordenadas espacio-temporales X, Y y T para cada marcador. Las coordenadas X e Y están expresadas en [pixel] mientras que la coordenada T en [s]. Posteriormente, empleando el algoritmo de procesamiento de imagen desarrollado por ingenieros de la Universidad de Pavía (Italia), se calcularon las trayectorias de los distintos marcadores (Fassina *et al.*, 2011). Para estimar el efecto ergotrópico, esto es, el consumo de energía necesario para originar el movimiento de contracción, se ha evaluado la energía cinética media del sincitio que late. La frecuencia cardíaca media se midió contando los picos de desplazamiento durante el movimiento de contracción. Además, se ha identificado y medido la velocidad de contracción máxima y en consecuencia hemos evaluado la contractilidad media del sincitio como su valor medio. Finalmente, se ha estudiado la fuerza de contracción del sincitio cardíaco por mecánica Hamiltoniana, donde la fuerza se considera como el gradiente de la energía total.

El análisis estadístico de los datos obtenidos del análisis de los vídeos se llevó a cabo mediante el programa "Matlab". Los resultados fueron evaluados estadísticamente utilizando la distribución de Anova para determinar si las muestras tratadas eran significativamente diferentes de las muestras control. Se consideró  $p < 0.05$  estadísticamente significativo.

### **3.10 Q-RT-PCR**

La extracción de ARN se realizó a los días 4, 7 y 15 del proceso de diferenciación de los cardiomiocitos. El tóxico ambiental estuvo presente durante toda la diferenciación.

Para la extracción de ARN se retira el medio de cultivo, se hace un lavado con PBS y se despegan las células con un *cell scraper*. La suspensión celular se centrifuga y se hace un lavado adicional con PBS. Se elimina la máxima cantidad de tampón posible y se congela el *pellet* por inmersión en nitrógeno líquido. Almacenamos a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

El ARN se extrajo con el kit "GenElute Mammalian Total RNA Kit" (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las posibles trazas de contaminación por ADN se eliminaron empleando un kit de digestión de DNasa (DNase I digestion kit (Sigma)).

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen total de mezcla de reacción de 20  $\mu\text{l}$  que contiene: 1  $\mu\text{g}$  de ARN, 1X de PCR *buffer* II, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM de cada dNTP, 2.5  $\mu\text{M}$  oligod (T)<sub>16</sub>, 20 U del inhibidor de RNasa, y 50 U de la transcriptasa reversa MuLV (Applera).



La reacción de retrotranscripción se realizó en un termociclador GeneAmp 9700 de Applied Biosystems. Los pasos del programa para la retrotranscripción fueron los siguientes: 25°C durante 10 min, 42°C durante 15 min y 99°C durante 5 min.

Para la PCR cuantitativa a tiempo real se amplificó una veinteaava parte del cDNA resultante en 20 µl de una mezcla de reacción que contiene una concentración de 200 nM de cada *primer* o cebador específico y el denominado *MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR assay no ROX sample* (Eurogentec) a una concentración final 1X. La reacción de amplificación fue la siguiente: 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 10 s, 60°C durante 15 s y 72°C durante 20 s. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Rotorgene 6000 (Corbett Life Science). Se utilizó el software del termociclador (Rotorgene 6000 Series Software 1.7) para el análisis comparativo. Se empleó la expresión de la β-2-microglobulina para la normalización de las muestras.

La secuencia de los *primers* o cebadores fue la siguiente: **β-2-microglobulina**, Forward 5' GAATTCACCCCACTGAGACT 3', Reverse 5' TGCTTGATCACATGTCTCGAT 3'; **Brachyury**, Forward 5' CTCTAAGGAACCACCGGTCA 3', Reverse 5' AGCATGGACAGACAAGCAGA 3'; **Nkx-2.5**, Forward 5' GATGGGAAAGCTCCCACTATG 3', Reverse 5' GAGACACCAGGCTACGTCAATA 3'; **GATA-4**, Forward 5' AGTTGTGCAGCTAATGCCACT 3', Reverse 5' CTGCTTTGGTAGCAGGTTTTG 3'.

### 3.11 INMUNOFLUORESCENCIA

Los cardiomiocitos utilizados para el análisis de inmunofluorescencia se aislaron a partir de cuerpos embrioides a día 15 de la diferenciación, usando un protocolo modificado de Maltsev *et al.*, 1994. Como en el resto de experimentos, el Aroclor 1254 (0.1, 0.5, 1 y 2 µg/ml) estuvo presente durante todo el proceso de diferenciación cardíaca.

Para el análisis mediante inmunofluorescencia, lavamos los cuerpos embrioides con PBS y los despegamos mecánicamente con un *cell scraper*. Son necesarios aproximadamente 150 C.E para el ensayo. Recogemos la suspensión celular y la centrifugamos a 200 g durante 5 min. Resuspendemos el *pellet* en 1 ml de *low Ca<sup>2+</sup>-medium* e incubamos durante 15 min a temperatura ambiente. Este medio contiene 120 mM de NaCl, 5.4 mM de KCl, 5 mM de piruvato sódico, 20 mM de glucosa, 20 mM de taurina y 10 mM de HEPES. Posteriormente las células se incuban en el *enzyme medium* (es *low Ca<sup>2+</sup>-medium* suplementado con 1 mg/ml de colagenasa y 30 mM de CaCl<sub>2</sub>) durante 30 min a 37°C. La disgregación de los cuerpos embrioides se completa vortexando la suspensión durante 1 min. Finalmente las células se centrifugan a 200 g durante 5 min. El *pellet* se resuspende en el medio de cultivo de células ES sin LIF y se reparte a razón de 50.000 células por pocillo de una placa de 24 en el que previamente

habremos puesto una lamela gelatinizada. Transcurridas las 24 h lavamos los pocillos con PBS y fijamos las células con paraformaldehído (PAF al 4% en PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ ) 20 min a 4°C. Dejamos a 4°C los cubres sumergidos en PBS hasta su uso.

Para evaluar la organización de las proteínas sarcoméricas de los cardiomiocitos se emplearon anticuerpos contra la  $\alpha$ -actinina cardíaca y la isoforma cardíaca de la troponina T (cTnT, isoforma cardíaca Ab-1). Se empleó también un anticuerpo para la conexina 43 (Cx43) para identificar la presencia de uniones gap entre los cardiomiocitos.

	Huésped	Referencia	Dilución
<b>Anti-<math>\alpha</math>-actinina</b>	Ratón	Sigma (A7811)	1:800
<b>Anti-troponina T</b>	Ratón	Thermo Scientific (MS-295-P1)	1:200
<b>Anti-conexina 43</b>	Conejo	Cell signaling (3512S)	1:75
<b>Anti-mouse Alexa 488</b>	Cabra	Molecular Probes (A28175)	1:500
<b>Anti-rabbit TRITC</b>	Cabra	Sigma (T6778)	1:200

**Tabla 2:** Anticuerpos empleados en el ensayo de inmunofluorescencia.

Para la inmunofluorescencia con los anticuerpos anti- $\alpha$ -actinina sarcomérica, anti-conexina 43 y anti-troponina T (isoforma cardíaca Ab-1) lavamos con PBS los cubres previamente fijados con paraformaldehído, 2 veces durante 5 min.

### 3.11.1 Inmunofluorescencia con $\alpha$ -actinina

Permeabilizamos las células con Tritón X-100 al 0.1% en PBS durante 5 min. Bloqueamos con PBS al 3% de suero de STO y 0.1% de Tween 20, 10 min a temperatura ambiente. Hacemos un lavado con PBS. Incubamos con el anticuerpo primario anti- $\alpha$ -actinina (1:800) en PBS durante 1 h a 37°C. Lo incubamos sobre una microgota de 25 a 30  $\mu\text{l}$  puesta sobre parafilm en una cámara húmeda. Lavamos los cubres 3 veces con PBS durante 5 min. Incubamos con el anticuerpo secundario anti-mouse Alexa 488 (1:500) en PBS 1 h a 37°C. Lavamos con PBS 3 veces, 5 min. Teñimos los núcleos con DAPI a 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS durante 5 min. Realizamos 2 lavados con PBS durante 5 min. Montamos el cubre sobre el portaobjetos con medio de montaje VECTASHIELD® (Vector Labs). Las imágenes se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX60 y fueron capturadas con una cámara DP72 (Olympus).

### **3.11.2 Inmunofluorescencia con troponina-T y conexina 43**

Permeabilizamos las células con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 10 min. Bloqueamos con PBS al 5% de suero de STO y 0.2% de Tween 20, 20 min a temperatura ambiente. Hacemos un lavado con PBS. Incubamos con el anticuerpo primario anti-troponina T (1:200) o anti-conexina 43 (1:75) en PBS al 5% de SBF de STO y 0.2% de Tween 20, 1 h a 37°C. Lo incubamos sobre una microgota de 25 a 30 µl puesta sobre parafilm en una cámara húmeda. Lavamos los cubres 3 veces con PBS durante 5 min. Incubamos con el anticuerpo secundario anti-mouse Alexa 488 (1:500) para el caso de la troponina T y con el anticuerpo anti-rabbit TRITC (1:200) para la conexina 43, en PBS 1 h a 37°C. Lavamos con PBS 3 veces, 5 min. Teñimos los núcleos con DAPI a 0.2 µg/ml en PBS durante 5 min. Realizamos 2 lavados con PBS durante 5 min. Montamos el cubre sobre el portaobjetos con medio de montaje VECTASHIELD® (Vector Labs). Las imágenes se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX60 y fueron capturadas con una cámara DP72 (Olympus).

### 3.12 OTRAS SOLUCIONES EMPLEADAS

<b>Tampón de electroforesis 5X</b>	
Tris	15.15 g
Glicina	72.1 g
SDS	5 g
H <sub>2</sub> O miliQ	hasta 1 L

<b>Stripping Buffer</b>	
NaCl	2.92 g
Glicina	3.75 g
SDS (20%)	5 ml
H <sub>2</sub> O	hasta 500 ml
<b>pH: 3</b>	

<b>Laemmli 2X</b>	
SDS	4 %
Glicerol	20 %
Tris-HCl	120 mM
<b>pH: 6.8</b>	

<b>TBS</b>	
Tris base	10 mM
NaCl	150 mM
<b>pH: 7.5</b>	

<b>Buffer de desnaturalización</b>	
Laemmli 1.5X	1 ml
β-mercaptoetanol	50 μl
Azul de bromofenol (stock 2.5mg/ml)	50 μl

<b>Tampón de transferencia</b>	
Tris	5.8 g
Glicina	29 g
SDS	1 g
Metanol	200 ml
H <sub>2</sub> O miliQ	hasta 1 L

<b>Solución Rojo Ponceau</b>	
Ponceau S	2.5 g
Ácido acético glacial	5 ml
H <sub>2</sub> O miliQ	hasta 500 ml

<b>Running gel (Western blot)</b>	<b>7.5 %</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>	<b>18%</b>
Acril-bisacrilamida 30%	3.8 ml	5 ml	6 ml	7.5 ml	9 ml
Tris-HCl 2M pH 8.8	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
H <sub>2</sub> O miliQ	9 ml	7 ml	6 ml	4.5 ml	3 ml
20% SDS	75 μl	75 μl	75 μl	75 μl	75 μl
10% APS	75 μl	75 μl	75 μl	75 μl	75 μl
TEMED	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl

<b>Stacking gel (Western blot)</b>		<b>4%</b>
Acril-bisacrilamida 30%		1 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8		750 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O miliQ		5.75 ml
20% SDS		37.5 $\mu$ l
10% APS		62.5 $\mu$ l
TEMED		6.25 $\mu$ l

<b>Tampón de carga para zimografía</b>	
SDS	100 mg/ml
Sacarosa	40 mg/ml
Azul de bromofenol	0.25 %
Disolver todo en Tris	0.25 M
<b>pH: 6.8</b>	

<b>Solución desteñidora</b>	
Metanol	100 ml
Ácido acético	50 ml
H <sub>2</sub> O	350 ml

<b>Solución Azul de Coomassie</b>	
Metanol	200 ml
Ácido acético	50 ml
Coomassie blue R250	0.5 g
H <sub>2</sub> O	hasta 500 ml

<b>MMP Substrate Buffer</b>	
Tris	
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	
NaN <sub>3</sub>	
Disolver en 800 ml de H <sub>2</sub> O y ajustar a pH 7.5.	
Completar con H <sub>2</sub> O hasta 1 L.	
Mantener a 4°C.	

<b>Geles para zimografía de gelatina:</b>	
<b>Stacking gel</b>	
H <sub>2</sub> O destilada	2,04 ml
Acrilamida 30%	498 $\mu$ l
Tris 0.5 M pH 6.8	378 $\mu$ l
20% SDS	30 $\mu$ l
10% APS	30 $\mu$ l
TEMED	3 $\mu$ l
<b>Running gel</b>	
H <sub>2</sub> O destilada	1.8 ml
Gelatina 1%	0.6 ml
Acrilamida 30%	1.98 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	1.5 ml
20% SDS	60 $\mu$ l
10% APS	60 $\mu$ l
TEMED	2.4 $\mu$ l

## RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### 4.1 EFECTO DEL AROCLOR 1254 SOBRE LAS PROPIEDADES METASTÁTICAS DE LÍNEAS TUMORALES HUMANAS

Para determinar el efecto de una mezcla ambiental de PCBs en las propiedades metastáticas de líneas tumorales humanas empleamos dos líneas de melanoma y dos líneas de carcinoma de mama. Las líneas de melanoma humano seleccionadas fueron A375 y HT-144, negativas para el receptor de estrógeno. El origen de A375 deriva de un tumor primario y el de HT-144 de una metástasis. Las líneas celulares de cáncer de mama empleadas fueron MCF-7/6 y MCF-7/AZ, ambas derivadas de la línea parental MCF-7 y positivas para el receptor de estrógeno. La línea MCF-7 deriva de una metástasis (derrame pleural), sin embargo la variante MCF-7/6 es invasiva y capaz de metastatizar espontáneamente en ratones desnudos tras inyección subcutánea, al contrario que la variante MCF-7/AZ.

Los PCBs son clasificados como disruptores endocrinos. Se ha descrito que estos contaminantes orgánicos persistentes son capaces de alterar el sistema endocrino de animales y humanos debido a su actividad estrogénica que imita e interfiere la acción de hormonas endógenas. Además, se ha propuesto que la combinación de diferentes PCBs podría actuar de manera sinérgica en su capacidad disruptora. Para imitar la exposición real por PCBs se seleccionó una mezcla comercial denominada Aroclor 1254, representativa de la contaminación ambiental por PCBs. Se emplearon dos líneas negativas para el receptor de estrógeno, A375 y HT-144, y dos líneas positivas para el receptor de estrógeno, MCF-7/AZ y MCF-7/6, para discriminar si pueden existir efectos dependientes o no del receptor de estrógeno. Por otro lado, los PCBs han sido considerados como agentes etiológicos de diversos tipos de cáncer, siendo implicados recientemente en la promoción y progresión del cáncer de mama. Sin embargo, todavía existe gran debate en cuanto a la existencia de una relación positiva entre la exposición a los PCBs y el desarrollo del cáncer de mama, y la relación con otros tipos de cáncer como el melanoma aun no ha sido estudiada en detalle.

El rango de concentración de PCBs detectado en suero humano es muy amplio. En la bibliografía se han descrito niveles de PCBs en la población que varían principalmente entre los 0.1 y los 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . De modo que consideraremos estos valores como normales o estándar en la población, donde la principal vía de entrada de los PCBs en el organismo es la ingesta (pescado, carne, leche, aceite vegetal...), seguida de la inhalación. El valor medio documentado ronda entre los 0.5 y 1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La exposición en el útero se ha estimado en 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y en aproximadamente 0.18  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en la leche de madres lactantes (Zietz *et al.*, 2008). Se han detectado valores de hasta 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en grupos poblacionales especialmente expuestos.

#### **4.1.1 Efecto del Aroclor 1254 sobre la viabilidad celular**

Las líneas de melanoma, A375 y HT-144, y cáncer de mama, MCF-7/AZ y MCF-7/6, fueron expuestas a concentraciones crecientes de Aroclor 1254, para evaluar la supervivencia y la proliferación celular a las 24, 48 y 72 h de exposición al contaminante. Las células se expusieron a un rango de concentraciones entre los 10 µg/ml y los 0.08 µg/ml de Aroclor 1254 mediante dilución seriada ½ en DMSO.

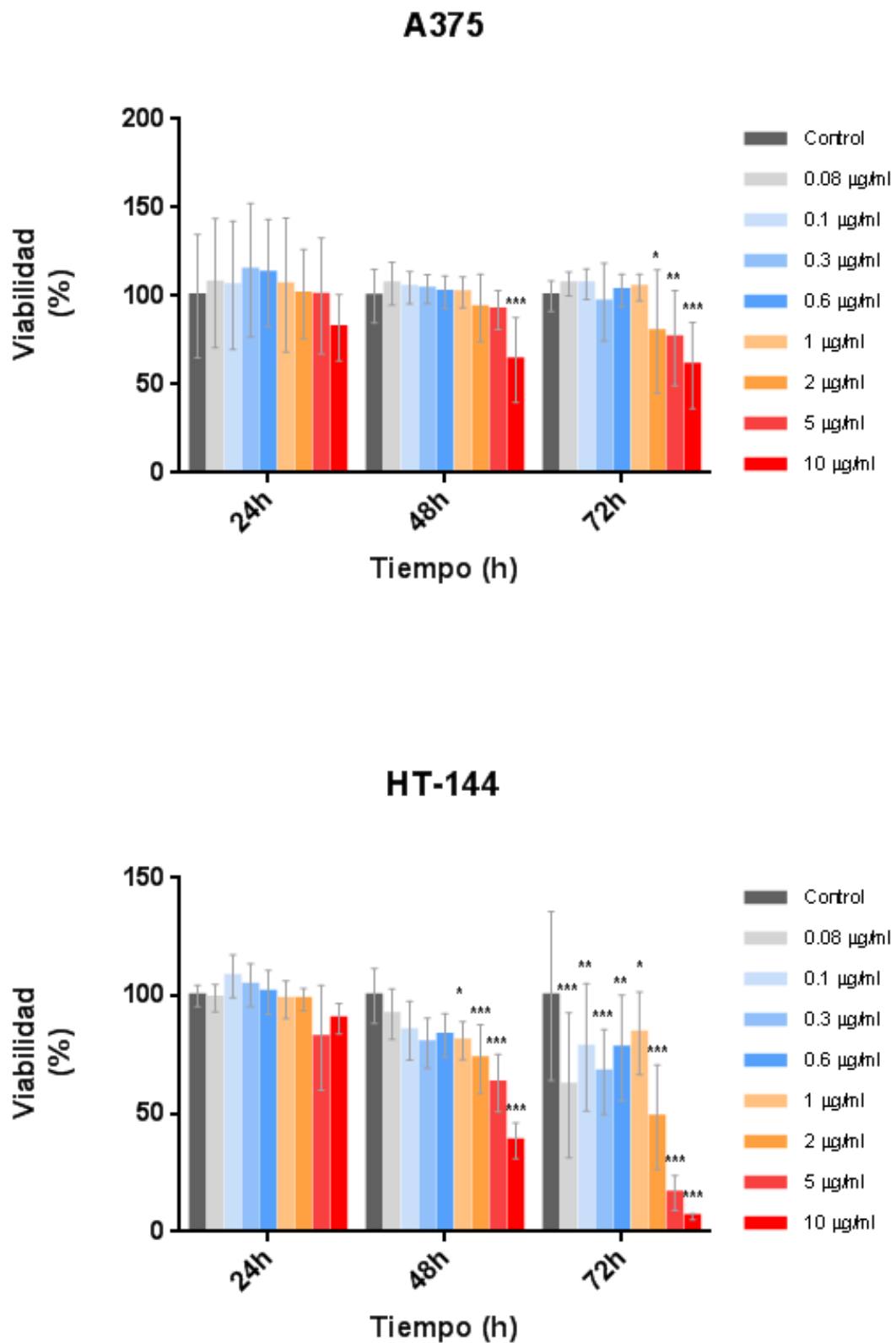
Como se observa en las figuras 24 y 25, el Aroclor 1254 induce una pérdida de la supervivencia celular a partir de las 48 h de exposición salvo para la línea MCF-7/AZ, en la cual comienza a observarse una disminución en la viabilidad celular ya en las primeras 24 h a las concentraciones de 5 y 10 µg/ml. La pérdida de viabilidad a las 48 h se da para las concentraciones más altas en las líneas A375, MCF-7/6 y MCF-7/AZ. La línea HT-144 parece ser la más sensible al efecto de los PCBs. Se observa que las células de la línea de melanoma metastático HT-144 muestran una significativa pérdida de viabilidad a partir de la exposición a 1 µg/ml de Aroclor 1254 a las 48 h.

A las 72 h el Aroclor 1254 ejerce un notable efecto citotóxico en las células de la línea HT-144, ya que para todas las concentraciones testadas, incluso las más bajas, induce pérdida de supervivencia. La viabilidad llega a ser inferior al 20% a las concentraciones de 5 y 10 µg/ml de Aroclor 1254 en esta línea de melanoma (figura 24). A las 72 h de exposición al tóxico ambiental, la viabilidad disminuye sólo a las concentraciones más altas en la variante invasiva de cáncer de mama MCF-7/6, y a partir de 2 µg/ml en A375 y MCF-7/AZ.

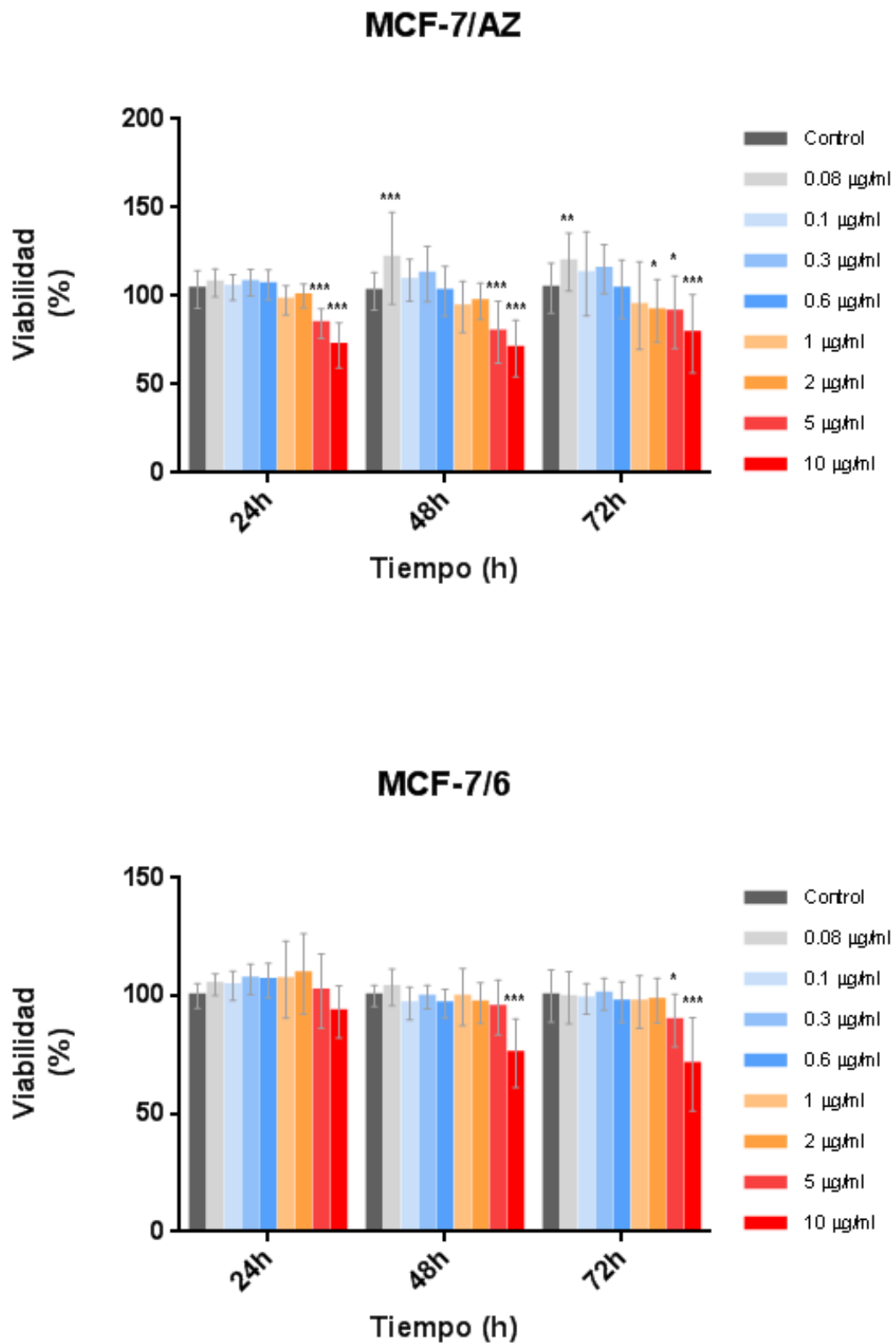
Como efecto contrario, cabe destacar que el Aroclor 1254 parece actuar como agente inductor de la proliferación a la concentración más baja estudiada en la variante de cáncer de mama no invasiva MCF-7/AZ. Tras la exposición a 0.08 µg/ml de la mezcla ambiental de PCBs, se observa en esta línea un crecimiento un 20% superior al del control. Dicho incremento en la proliferación parece mantenerse en el tiempo (a las 48 y 72 h).

En base a los resultados del ensayo de viabilidad y a la bibliografía consultada seleccionamos tres concentraciones de Aroclor 1254 (0.08, 1 y 5 µg/ml). Cada una de estas dosis representa una concentración baja (0.08 µg/ml), una concentración considerada como normal o estándar en la población (1 µg/ml) y una concentración elevada (5 µg/ml) respectivamente. A partir de este momento utilizaremos dichas concentraciones de trabajo para el resto de ensayos realizados con las líneas tumorales.

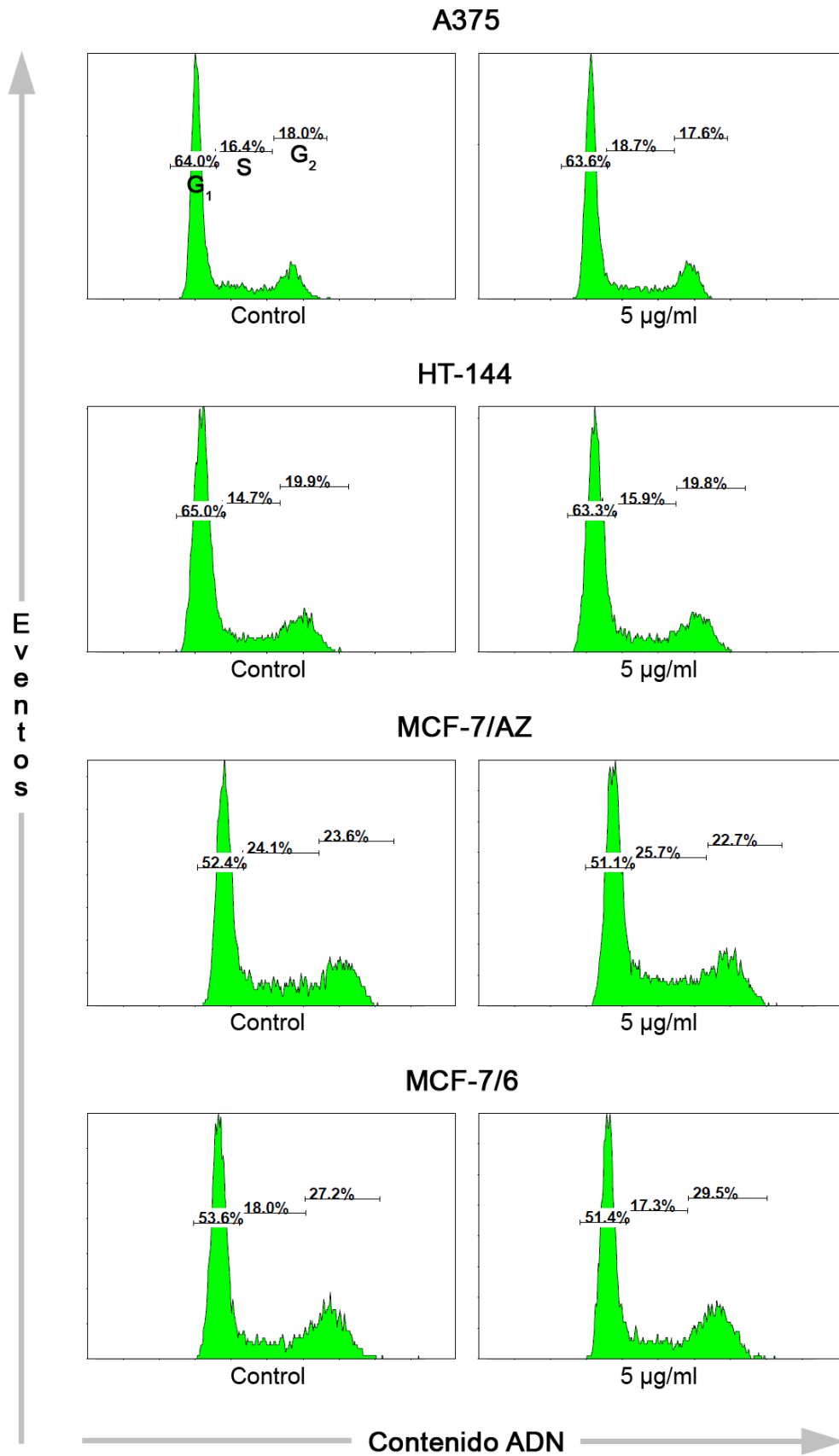




**Figura 24:** Efecto sobre la viabilidad celular en las líneas de melanoma humano (A375 y HT-144) tras la exposición a diversas concentraciones de Aroclor 1254 a las 24, 48 y 72 h.



**Figura 25:** Efecto sobre la viabilidad celular en las dos variantes de carcinoma de mama MCF-7 (MCF-7/6 y MCF-7/AZ) tras la exposición a diversas concentraciones de Aroclor 1254 a las 24, 48 y 72 h.

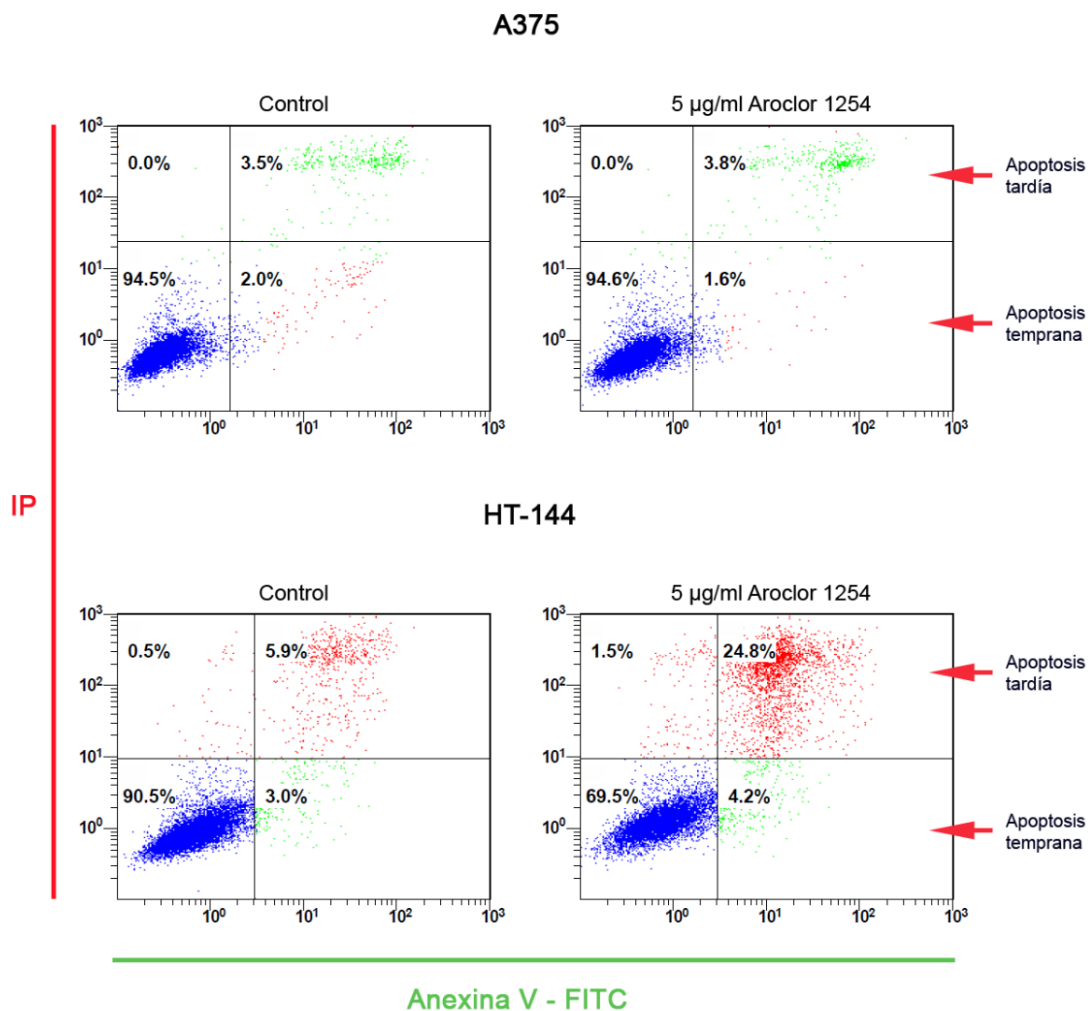


**Figura 26:** Efecto del Aroclor 1254 sobre el ciclo celular en las líneas de melanoma y cáncer de mama, A375, HT-144, MCF-7/6 y MCF-7/AZ, a las 48 h de tratamiento.

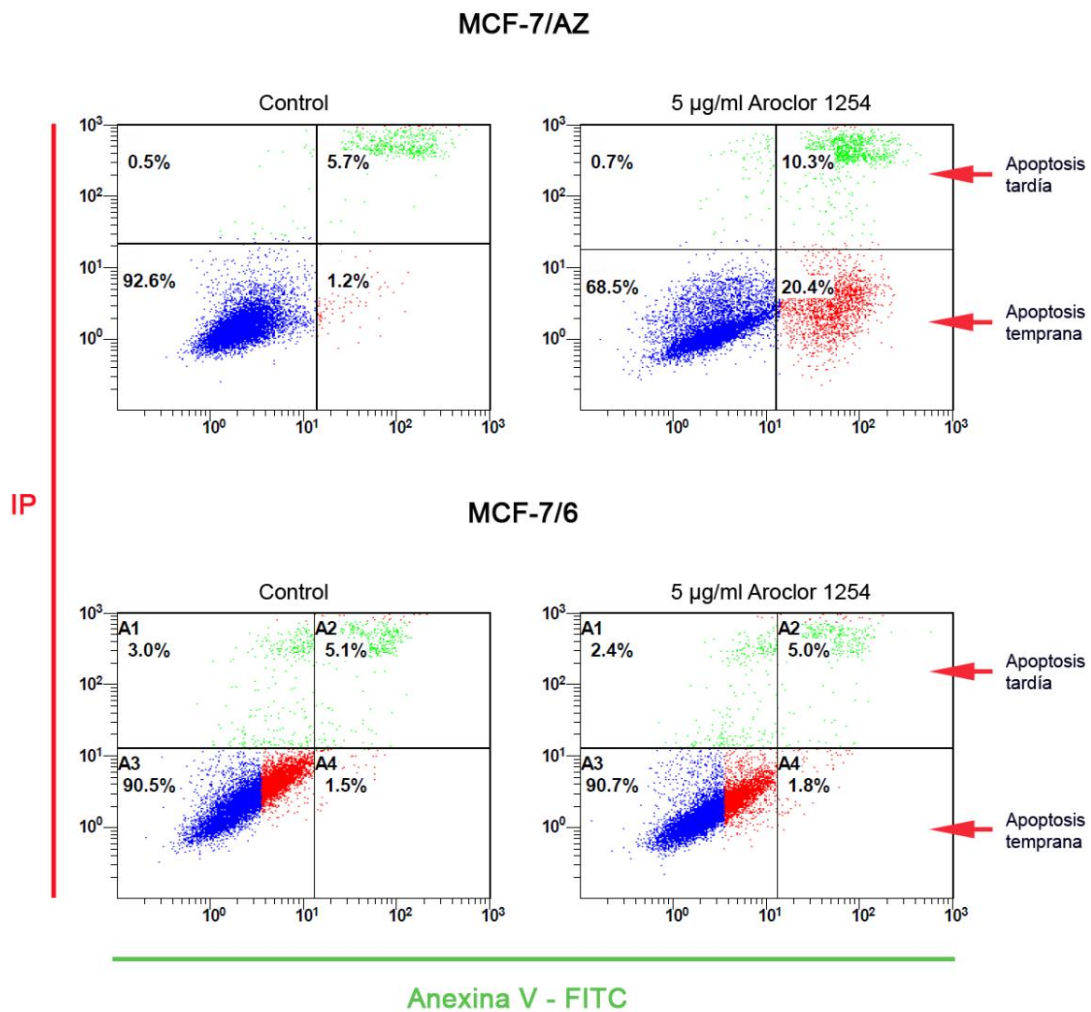
#### 4.1.2 Efecto sobre el ciclo celular e inducción de apoptosis

Para determinar si la exposición al Aroclor 1254 es capaz de perturbar la proliferación celular, las líneas de melanoma y cáncer de mama se incubaron con una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  de Aroclor 1254 durante 48 h y se analizó la distribución de las distintas fases del ciclo celular ( $G_1$ , S y  $G_2$ ) midiendo el contenido de ADN por citometría de flujo. Los histogramas representativos se muestran en la figura 26. El tratamiento con Aroclor 1254 no mostró ningún cambio significativo en la progresión del ciclo celular comparado con el control para ninguna de las líneas estudiadas.

Debido a la pérdida de viabilidad observada tras la exposición al Aroclor 1254, se decidió comprobar si esta era debida a la inducción de apoptosis. Para ello utilizamos un doble marcaje con yoduro de propidio y anexina V.

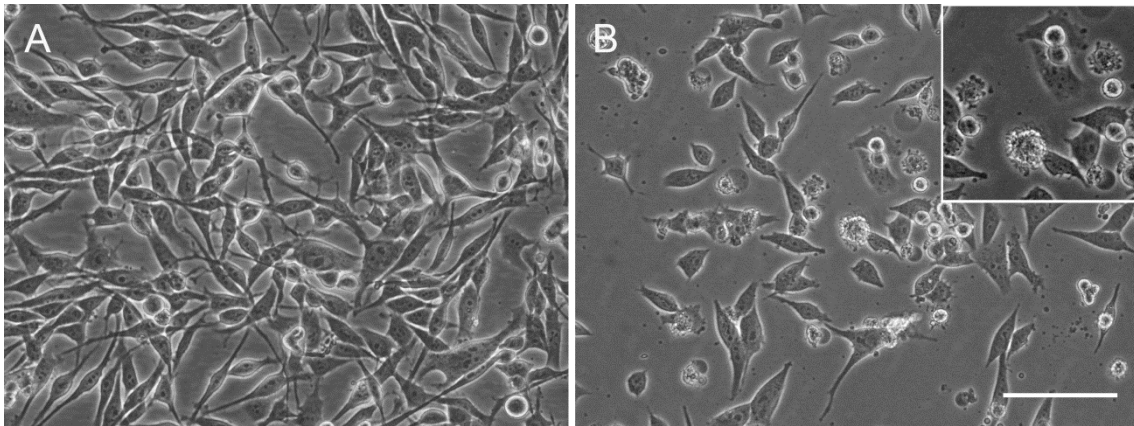


**Figura 27:** Análisis de la apoptosis inducida por el Aroclor 1254, tras 48 h de exposición, en las líneas de melanoma mediante marcaje con yoduro de propidio y anexina V. Las células en apoptosis tardía (cuadrante superior derecho) y en apoptosis temprana (abajo a la derecha) se indican mediante flechas.



**Figura 28:** Análisis de la apoptosis inducida por el Aroclor 1254, tras 48 h de exposición, en las líneas de cáncer de mama mediante marcaje con yoduro de propidio y anexina V. Las células en apoptosis tardía (cuadrante superior derecho) y en apoptosis temprana (abajo a la derecha) se indican mediante flechas.

Las líneas tumorales se trataron con Aroclor 1254 (5 µg/ml) durante 48 h. El análisis por citometría de flujo confirmó que el tratamiento con Aroclor 1254 induce apoptosis en las líneas HT-144 y MCF-7/AZ, como se muestra por el incremento de células en apoptosis temprana y tardía, 29% VS 8.9% en HT-144 y 30.7% VS 6.9% en MCF-7/AZ, en comparación con el control (figuras 27 y 28). En las líneas A375 y MCF-7/6 no se observa inducción de apoptosis a las 48 h, en concordancia con los resultados del ensayo de viabilidad, en el cual no se observa una disminución significativa en la supervivencia celular a dicha concentración hasta las 72 h de tratamiento.



**Figura 29:** Imagen de contraste de fases de la morfología celular de células de la línea HT-144 control (A) y tratadas (B) con una concentración de 5 µg/ml de Aroclor 1254 durante 48 h. El recuadro superior derecho muestra un grupo de células en fase de *blebbing*. Barra de escala 100 µm.

En la figura 29B puede verse la distintiva morfología apoptótica en células de la línea HT-144 expuestas a una concentración de 5 µg/ml de Aroclor 1254 tras 48 h. En el recuadro superior derecho puede apreciarse un grupo de células apoptóticas en fase de *blebbing*. Esta fase tardía de la apoptosis está caracterizada por la aparición de protuberancias de la membrana morfológicamente distintivas que parecen ser las precursoras de los cuerpos apoptóticos.

El efecto citotóxico observado previamente en el ensayo de MTT parece ser debido principalmente a la inducción de apoptosis y no a un bloqueo en el ciclo celular.

#### 4.1.3 Efecto sobre la invasividad

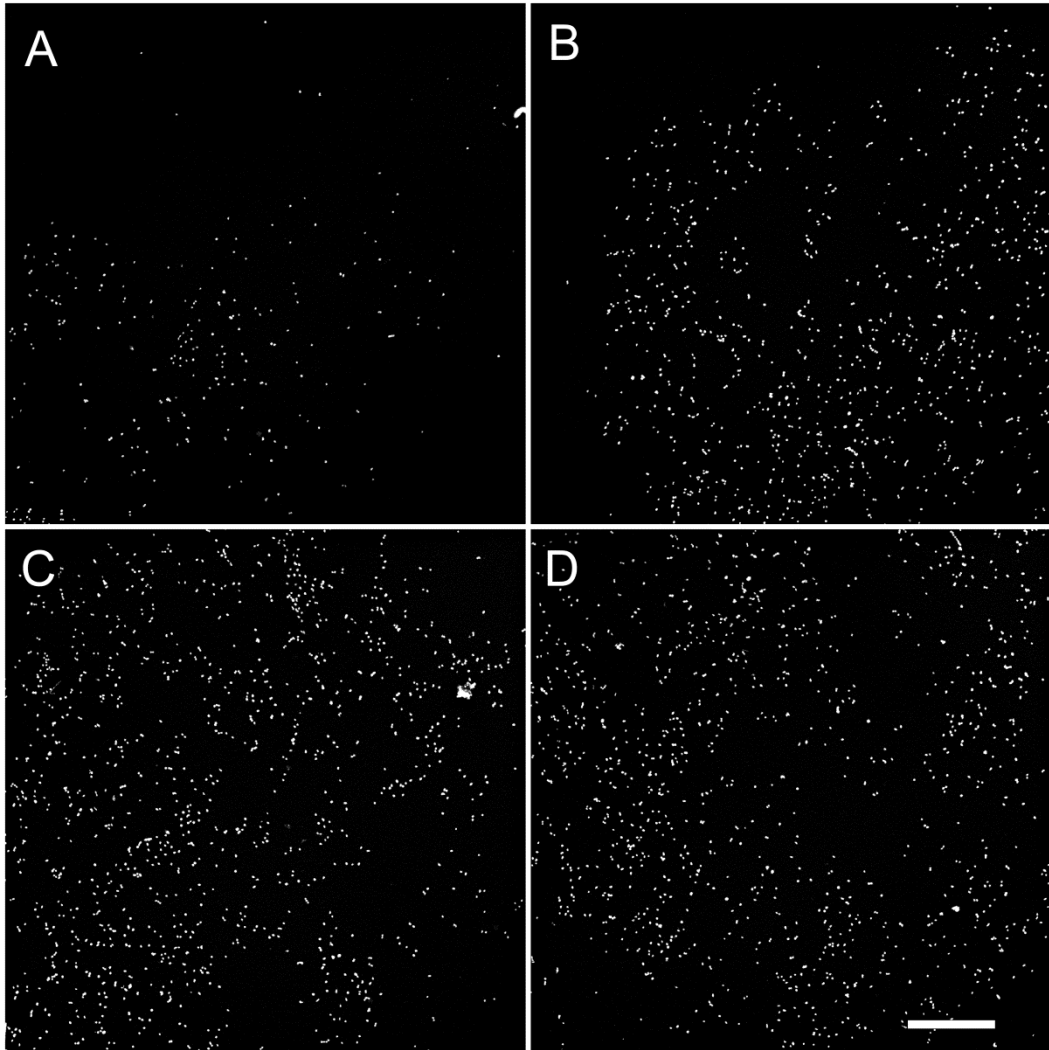
Los estudios previos indican que los PCBs están correlacionados con cánceres más agresivos y una peor prognosis. Por ello se determinó la influencia de los PCBs en la movilidad e invasividad celular mediante ensayos de invasión *in vitro* en matrices de Matrigel y colágeno tipo I.

##### 4.1.3.1 Invasión en Matrigel

La matriz de Matrigel constituye una buena aproximación para los ensayos de invasión *in vitro*, ya que se trata de una membrana basal solubilizada rica en laminina, colágeno tipo IV y proteoglicanos, todos ellos componentes de la membrana basal.

Para determinar si los PCBs tienen un efecto estimulador de la invasividad, las células tumorales se sembraron en la parte superior de insertos cubiertos con Matrigel, a una densidad de 50.000 células por inserto. Se ensayaron las líneas A357, HT-144 y MCF-

7/6. Como se ha comentado anteriormente, la línea MCF-7/AZ no es invasiva en Matrigel. En la parte inferior del inserto tipo *Transwell* se puso medio de cultivo con SBF (10%) como agente quimioatrayente. Los tratamientos de Aroclor 1254 (0.08, 1 y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) se añadieron en la parte superior del filtro, junto con las células, durante un periodo de 24 h.

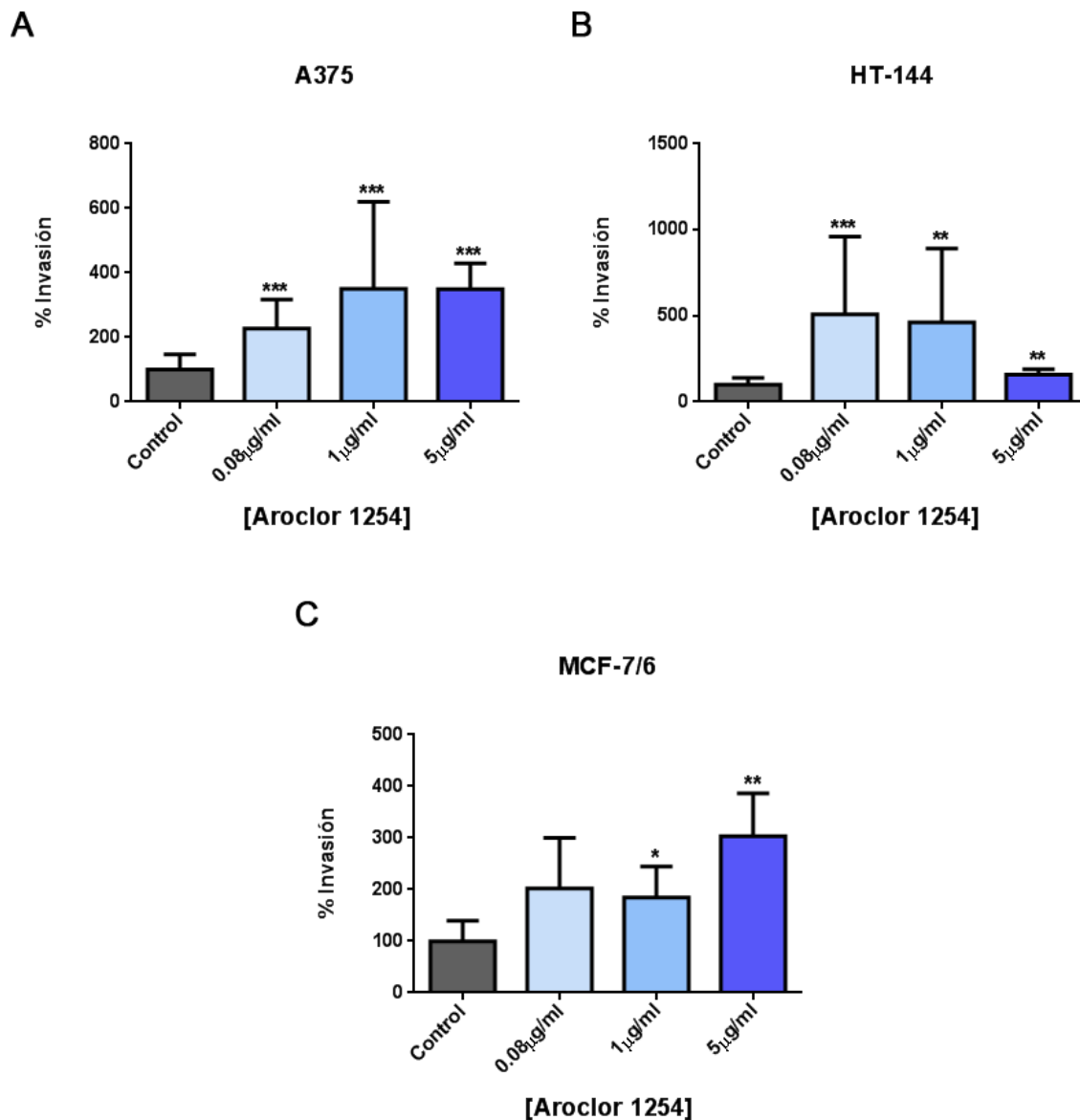


**Figura 30:** Invasión en Matrigel en la línea A375. Imagen de microscopía confocal de las células migradas a lo largo del filtro y teñidas con DAPI. (A) células control, (B) células tratadas con 0.08  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Aroclor 1254, (C) 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Aroclor 1254 y (D) 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Aroclor 1254. 24 h de exposición al tratamiento. Barra de escala 500  $\mu\text{m}$ .

En la figura 30 puede verse una imagen de microscopía confocal donde se aprecian los núcleos de las células de la línea A375 que han atravesado el filtro cubierto con el gel de Matrigel. El recuento del número de células se realizó con el programa Image J. En la imagen se aprecia un fuerte fenómeno inductor de la invasividad bajo la exposición a la

mezcla ambiental de PCBs (figuras 30B, 30C y 30D) en comparación con el control (figura 30A).

Como se muestra en la figura 31, la estimulación con Aroclor 1254 (0.08, 1 y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 24 h incrementó significativamente el potencial invasivo en todas las líneas tumorales estudiadas.

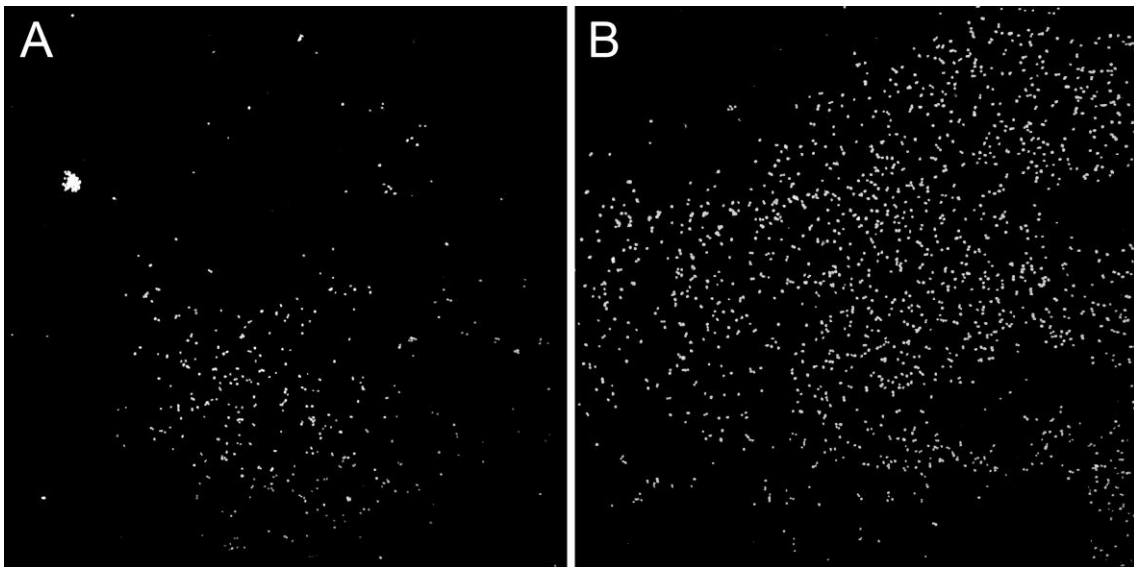


**Figura 31:** Efecto del Aroclor 1254 (0.08, 1 y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en la capacidad invasiva de las líneas A375, HT-144 y MCF-7/6 expuestas durante 24 h. La capacidad de invasión se representa como el porcentaje de invasión sobre el control al que se le asigna un valor del 100%.



En las líneas A375 y MCF-7/6 la invasividad parece incrementarse de manera dosis-dependiente, mientras que en la línea HT-144 el valor máximo de invasividad se da a la concentración más baja estudiada (0.08  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y disminuye con el incremento en la concentración de Aroclor 1254. Esto puede ser debido presumiblemente al notable efecto citotóxico que ejerce el Aroclor 1254 en la línea HT-144. La tasa de invasión tras la exposición al tóxico ambiental alcanzó un nivel hasta 5 veces superior al control en la línea HT-144, 4 veces superior en A375 y hasta 3 veces superior en la línea MCF-7/6.

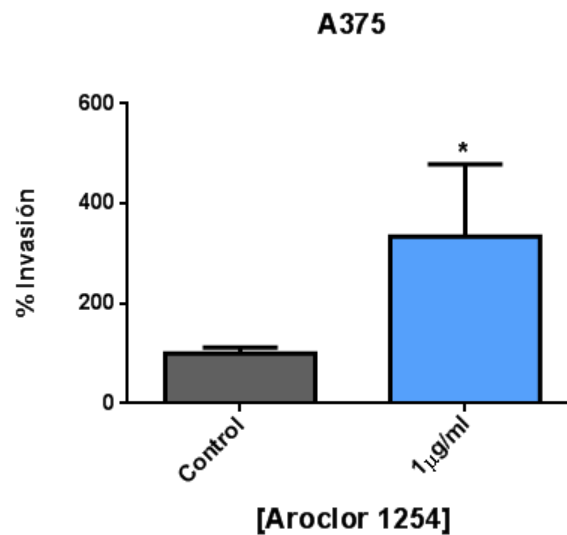
De manera complementaria, se realizó un ensayo en Matrigel para determinar la capacidad estimuladora de medios condicionados en presencia de PCBs. Se emplearon células de la línea A375 que se sembraron a una densidad de 50.000 células por inserto en medio de cultivo sin tratamiento. En el caso del tratamiento, se empleó como agente quimioatrayente medio de cultivo condicionado por células de A375 expuestas a Aroclor 1254 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 24h. El agente quimioatrayente del control fue medio de cultivo condicionado por células de A375 en ausencia del tóxico.



**Figura 32:** Invasión en Matrigel en la línea A375. Imagen de microscopía confocal de las células migradas a lo largo del filtro y teñidas con DAPI. (A) células control y (B) células tratadas en cuyo caso se ha empleado como agente quimioatrayente medio condicionado durante 24 h con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Aroclor 1254.

Como se muestra en las figuras 32 y 33, la exposición al medio condicionado por A375 en presencia de una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Aroclor 1254 incrementa significativamente la movilidad. Cuando se emplea como quimioatrayente medio condicionado por las células en presencia de Aroclor 1254, la línea A375, adquiere una capacidad invasiva 3 veces superior a la del control (figura 33). Si lo comparamos con los datos obtenidos cuando el Aroclor 1254 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) está presente en el medio de

cultivo en lugar de como quimioatrayente, vemos que en ambos casos se triplica la tasa de invasividad de la línea tumoral (figuras 31A y 33). De modo que el Aroclor 1254 es capaz no solo de promover la capacidad invasiva de las células tumorales cuando las células se hallan expuestas al mismo, sino que su presencia también induce la secreción al medio de factores que promueven la invasividad.



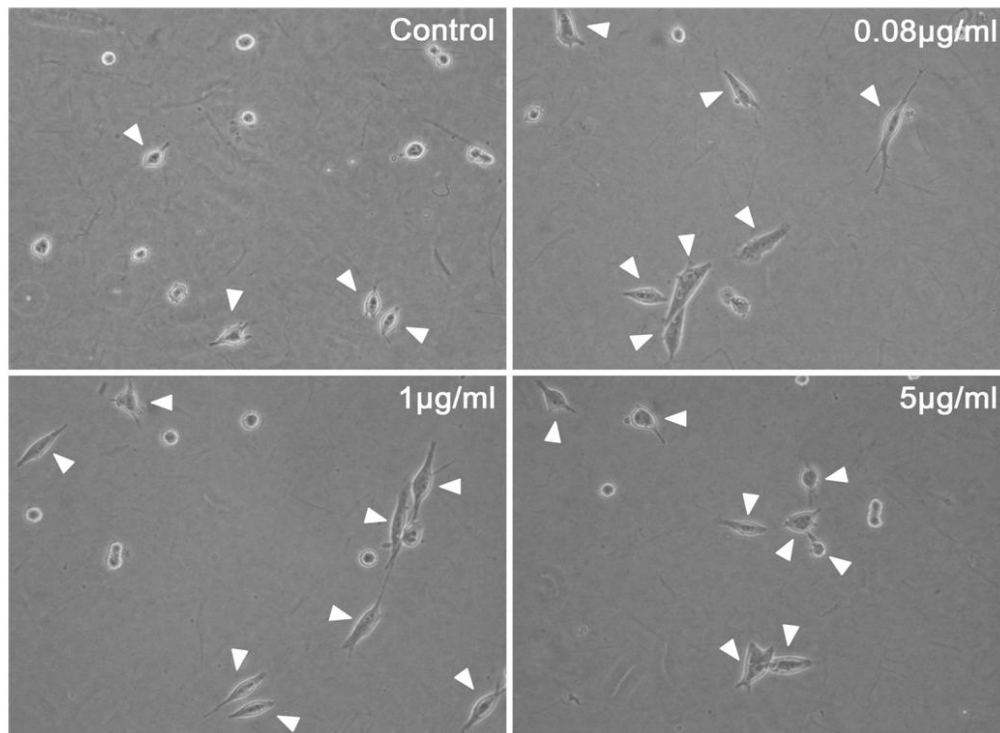
**Figura 33:** Ensayo de invasión en Matrigel. El control emplea como quimioatrayente medio de cultivo condicionado por células de A375 y el tratamiento utiliza medio de cultivo condicionado por células de A375 en presencia de Aroclor 1254 a 1 µg/ml.

#### 4.1.3.2 Invasión en colágeno tipo I

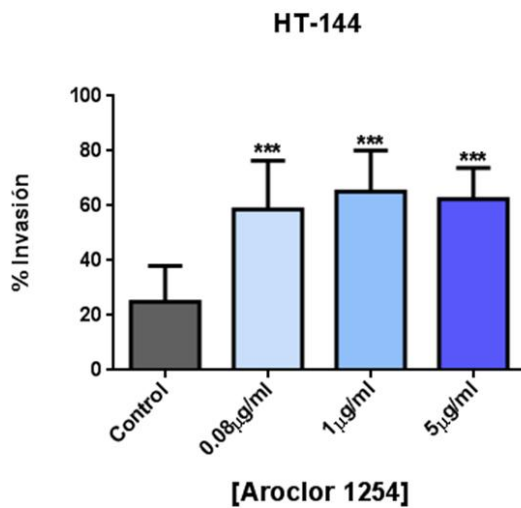
El ensayo de invasión en colágeno tipo I constituye otro método representativo de invasividad tumoral, ya que el colágeno tipo I es el principal componente intersticial de la matriz en los tumores sólidos (De Weber *et al.*, 2010).

El ensayo se realizó para las líneas HT-144 y MCF-7/6, ya que las líneas A375 y MCF-7/AZ no resultan invasivas sobre estos geles de colágeno. Las células se expusieron a la mezcla de tóxico ambiental durante 24 h. Transcurridas 24 h se tomaron imágenes con el microscopio invertido de contraste de fases (20x), representativas de cada una de las condiciones, y para cada imagen se determinó el número de células invasivas frente al número total. Se consideran como células invasivas aquellas que presentan extensiones celulares o protrusiones oscuras, en contraste con el aspecto redondeado de las no invasivas. En la figura 34A pueden observarse las células consideradas como invasivas señaladas con flechas.

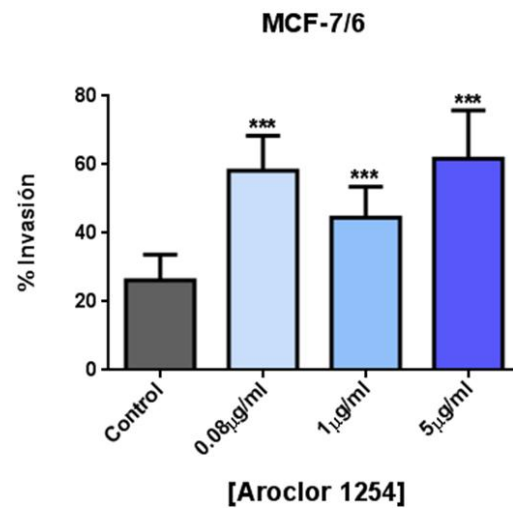
A



B



C



**Figura 34:** Efecto pro invasivo del Aroclor 1254 en matrices de colágeno tipo I. (A) Imagen de contraste de fases (20x) de células individuales de HT-144 sobre geles de colágeno tipo I y cultivadas en medio de cultivo control o en presencia de diferentes concentraciones de Aroclor 1254 (0.08, 1 y 5 µg/ml). Las flechas indican las extensiones invasivas. (B) Cuantificación de la invasión en colágeno mediante el cálculo del número de células invasivas sobre el número total de células cuantificadas (%) para cada condición en las líneas HT-144 y MCF-7/6.

Como se observa en las figuras 34B y 34C, el Aroclor 1254 provoca un incremento significativo en la capacidad invasiva de MCF-7/6 y HT-144 para todas las concentraciones ensayadas. La tasa de invasión en respuesta al tratamiento con Aroclor 1254 alcanzó valores máximos en torno al 60-70% en ambas líneas, valores notablemente superiores al grupo control cuya invasividad ronda aproximadamente el 25%.

#### 4.1.4 Efecto sobre la migración

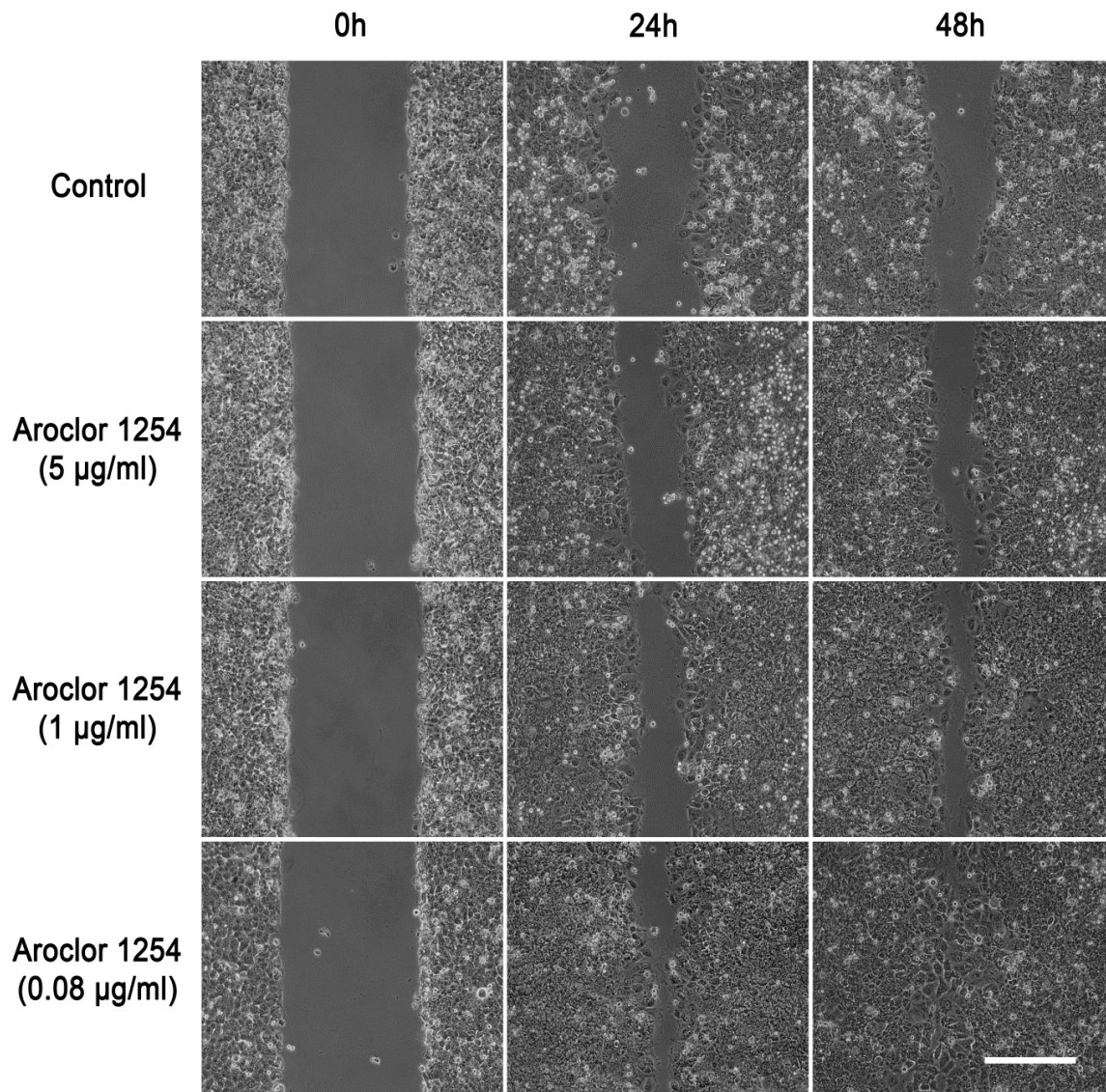
Para determinar los posibles efectos del Aroclor 1254 en la capacidad de migración, las células de las líneas de melanoma y cáncer de mama se sembraron a ambos lados de un tabique de silicona para imitar la creación de una cicatriz artificial. Tras la retirada del inserto (tiempo 0 h), las células localizadas en el borde de la herida se mueven para cerrar la abertura hasta que se establezcan nuevos contactos celulares.

Se tomaron imágenes a intervalos regulares (a las 0, 24 y 48 h para las líneas de carcinoma de mama y a las 0 y 28 h para HT-144) y se cuantificó el área abierta para cada una de las condiciones y tiempos. En las figuras 35 y 36 se muestra la progresión de imágenes tomadas a tiempo 0 y a las 24 y 48 h, para el control y los tratamientos con Aroclor 1254 (0.08, 1 y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en MCF-7/6 y MCF-7/AZ. En la figura 37 pueden observarse las distintas imágenes obtenidas del ensayo de cicatrización a las 0 y 28 h en la línea HT-144. No fue posible realizar el ensayo con la línea de melanoma A375, ya que no cierra la herida de manera homogénea, lo cual no permite cuantificar el área abierta de manera precisa.

Los resultados del ensayo de cicatrización *in vitro* (figura 38) mostraron que la capacidad de migración celular aumentó de forma significativa en respuesta a la exposición a la mezcla de PCBs para todas las líneas celulares y dosis ensayadas.

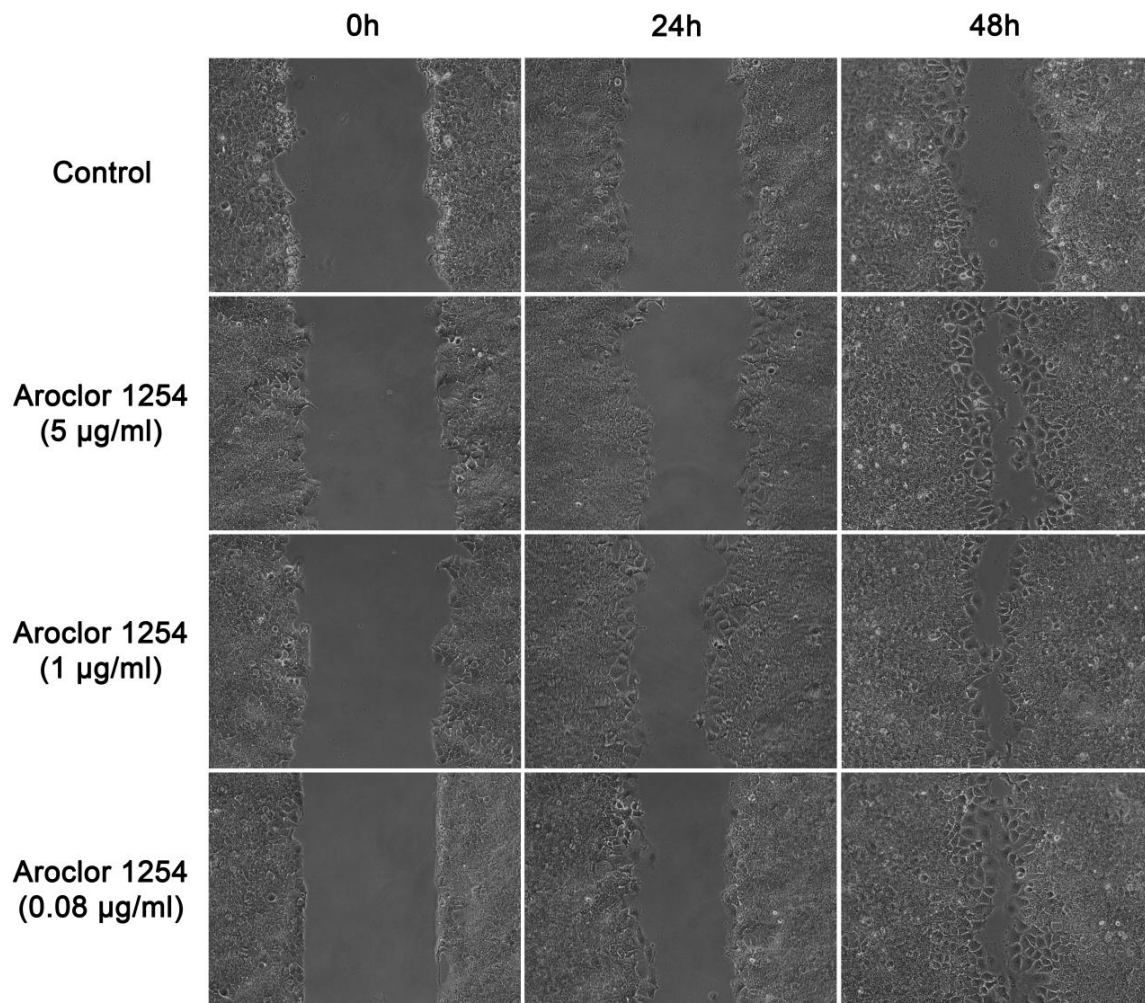
El porcentaje de área cubierta por las células de las líneas HT-144, MCF-7/6 y MCF-7/AZ se incrementó de manera inversamente proporcional a la dosis de Aroclor 1254, de manera que a la concentración de 0.08  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Aroclor 1254 se da la máxima capacidad de migración.

En la línea de melanoma metastático HT-144, las células tratadas con Aroclor 1254 habían cerrado un 85-90 % del área abierta estimada a tiempo 0, frente a un escaso 60% cerrado por el control, transcurridas 28 h de la exposición al tóxico ambiental.



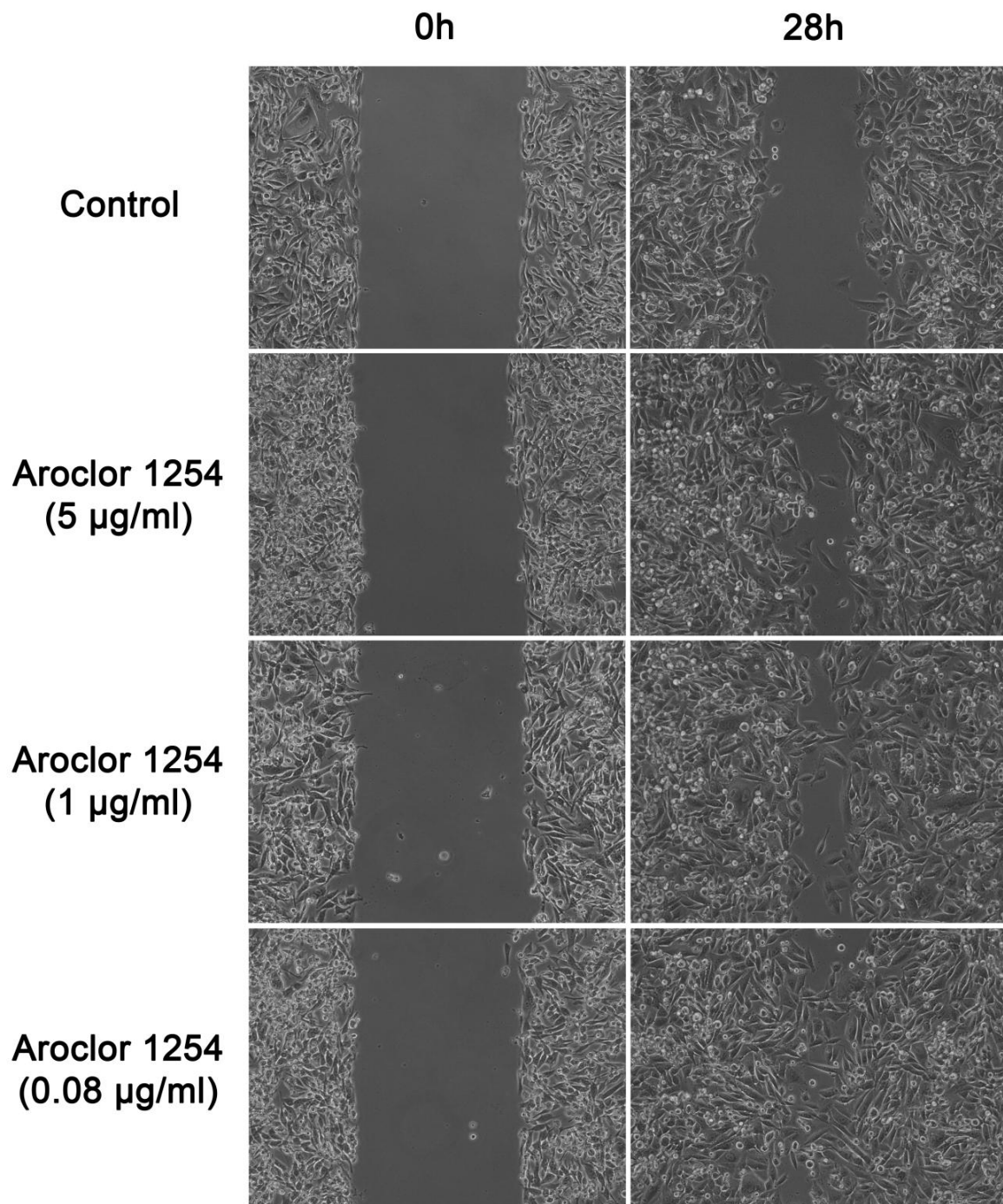
**Figura 35:** Ensayo de *wound healing*. Migración celular en la línea de cáncer de mama MCF-7/6 tras el tratamiento con Aroclor 1254 (0.08, 1 y 5 µg/ml) durante diferentes periodos de tiempo (0, 24 y 48 h). Las imágenes representan la capacidad de migración y fueron obtenidas con los mismos aumentos (10x) y tiempo tras el tratamiento. Barra de escala 300 µm.

En MCF-7/6, la exposición a la concentración de 0.08 µg/ml de Aroclor 1254 triplicó la tasa de movilidad celular del control a las 48 h de tratamiento. A las dosis de 1 y 5 µg/ml de Aroclor 1254 la capacidad de migración se duplicó (figura 38B, 48 h). Un patrón similar se observa en la variante no invasiva MCF-7/AZ, donde la exposición a la mezcla de PCBs durante 48 h disminuyó el porcentaje de herida abierta a la mitad del valor del grupo control.

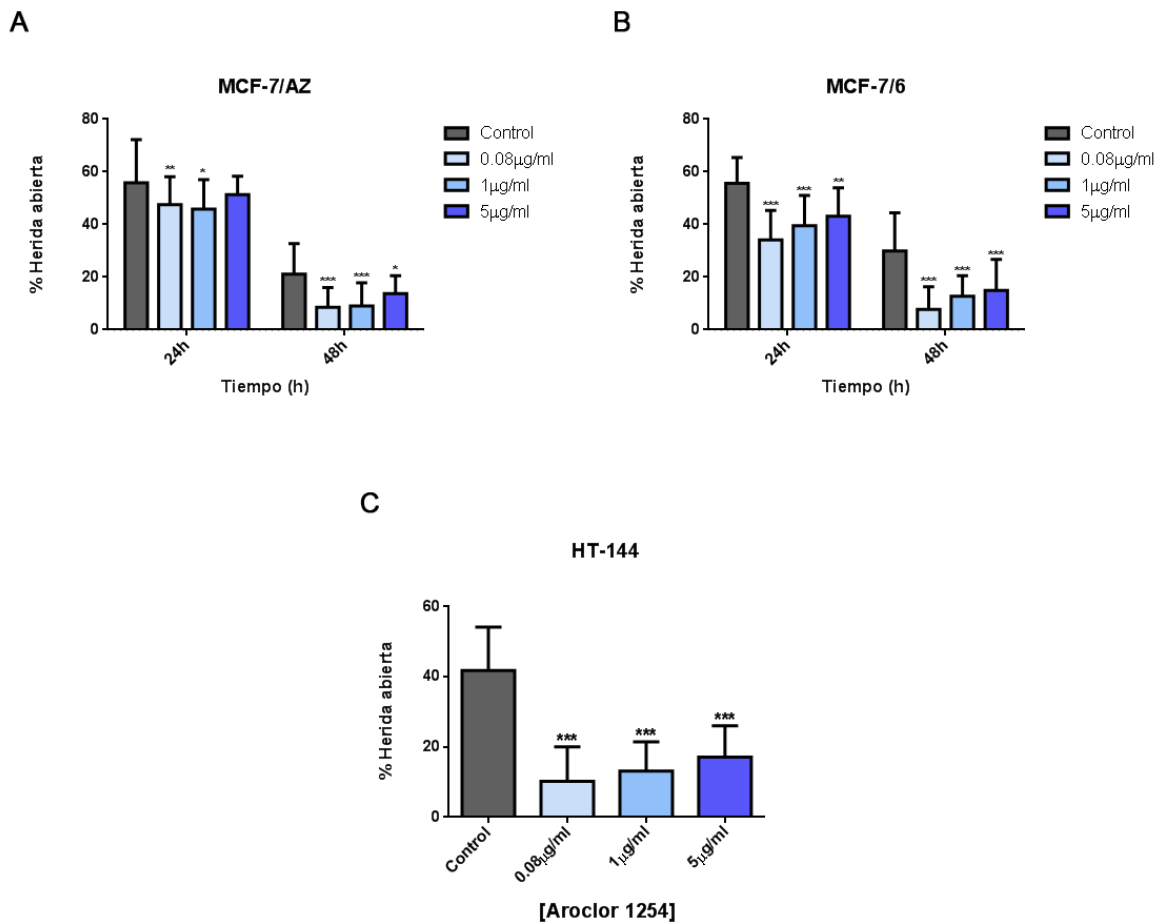


**Figura 36:** Ensayo de *wound healing*. Migración celular en la línea de cáncer de mama MCF-7/AZ, control y tras el tratamiento con Aroclor 1254 (0.08, 1 y 5 µg/ml) durante diferentes periodos de tiempo (0, 24 y 48 h). Las imágenes representan la capacidad de migración y fueron obtenidas con los mismos aumentos (10x) y tiempo tras el tratamiento.

Tanto los resultados obtenidos de los ensayos de invasión (Matrigel y colágeno tipo I), como los obtenidos del ensayo de cicatrización, muestran como los PCBs promueven significativamente el potencial invasivo y la capacidad de migración celular de las líneas de melanoma y carcinoma de mama humano. Este hecho sugiere además que la presencia del receptor de estrógeno no es un requisito indispensable para el efecto pro invasivo mediado por los PCBs.



**Figura 37:** Ensayo de *wound healing* o cicatrización celular. Migración celular en la línea de melanoma HT-144 control y tras el tratamiento con Aroclor 1254 (0.08, 1 y 5 µg/ml) a tiempo 0 y 28 h. Las imágenes mostradas representan la capacidad de migración y fueron obtenidas con los mismos aumentos (10x).



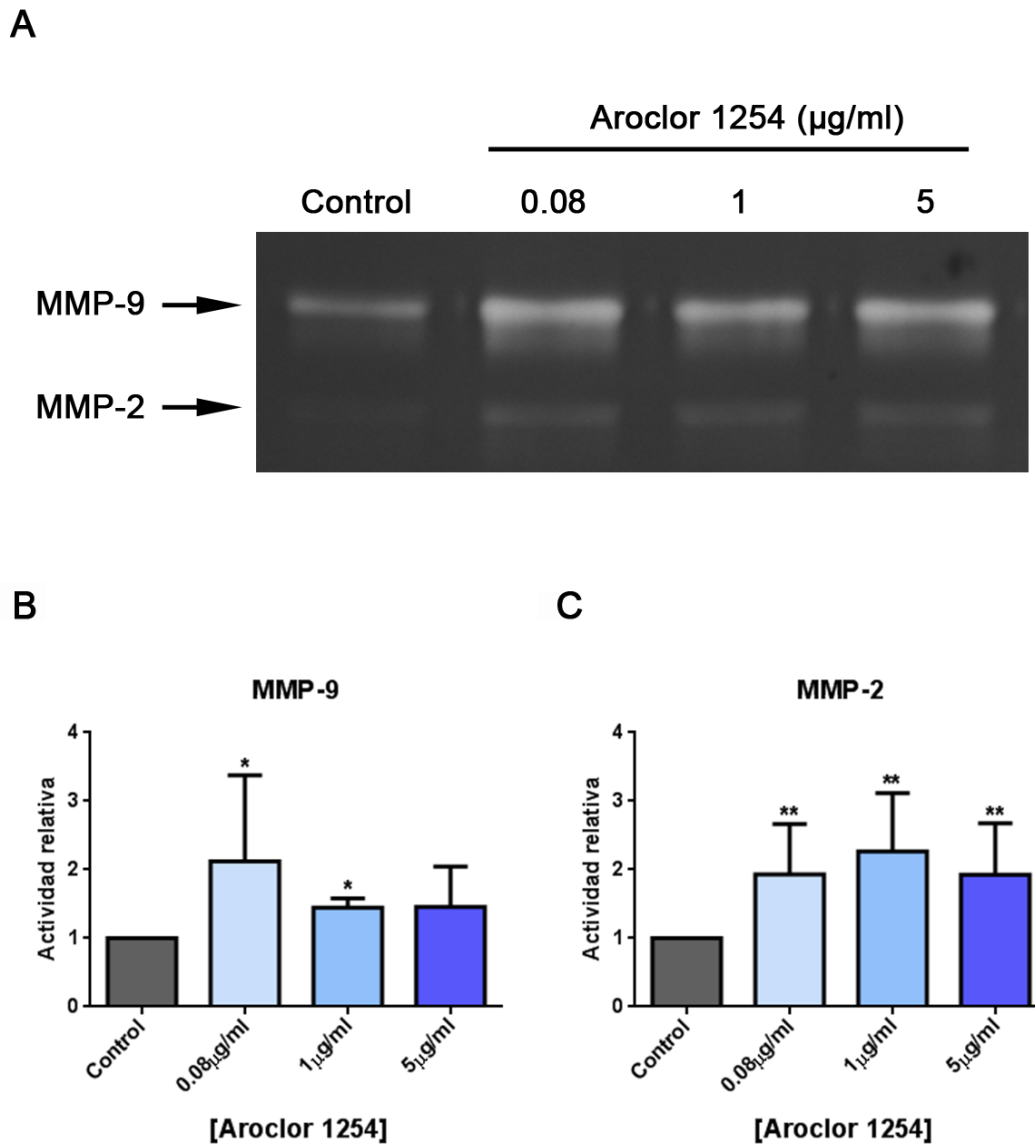
**Figura 38:** Migración celular tras el tratamiento con Aroclor 1254 (0.08, 1 y 5 µg/ml) en las líneas MCF-7/AZ, MCF-7/6 y HT-144. Representación en base al área abierta con respecto al valor medio cuantificado a tiempo 0 h (%). El seguimiento se realiza a las 0, 24 y 48 h en MCF-7/6 y MCF-7/AZ, y a las 0 y 28 h en HT-144.

#### 4.1.5 Efecto en la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9

La degradación y remodelación de la matriz extracelular son etapas esenciales en los procesos de migración, invasión y metástasis. Estos procesos son mediados principalmente por dos tipos de enzimas proteolíticas: los componentes del sistema de activación del plasminógeno y las metaloproteasas de la matriz (MMPs).

Las MMPs pertenecen a una familia de al menos 20 endopeptidasas y son capaces de degradar los distintos componentes de la membrana basal y de la matriz extracelular (Bozzuto *et al.*, 2010).





**Figura 39:** Efecto del Aroclor 1254 sobre la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9. (A) Zimografía de gelatinas realizada con medio condicionado de A375, control y tratado con Aroclor 1254 (0.08, 1 y 5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 h. (B) Actividad de MMP-2 y MMP-9 en A375 control y tratamiento con Aroclor 1254 cuantificada mediante densitometría, se expresa como actividad relativa con respecto al control.

La MMP-2 (gelatinasa A) es la metaloproteasa más ampliamente distribuida y se expresa de forma constitutiva por la mayoría de células incluyendo las células endoteliales y epiteliales (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). Tanto la MMP-2 como la MMP-9 (gelatinasa B) tienen un papel importante en el recambio de la membrana basal y son capaces de degradar componentes como la gelatina, elastina, fibronectina, laminina y colágeno (tipo I/IV/V/VI/X/XI). Dentro de las MMPs humanas, las gelatinasas A y B son abundantemente expresadas en tumores malignos (Johnsen *et al.*, 1998) y son consideradas como enzimas clave en la invasión tumoral y la metástasis (Liabakk *et al.*, 1996).

Se ha descrito que estas endopeptidasas no solo juegan un papel importante en la progresión tumoral y la metástasis sino que desempeñan además un rol crucial en la proliferación celular, la migración y la angiogénesis. Es por todo ello que decidimos estudiar su posible implicación en el efecto pro invasivo mediado por PCBs.

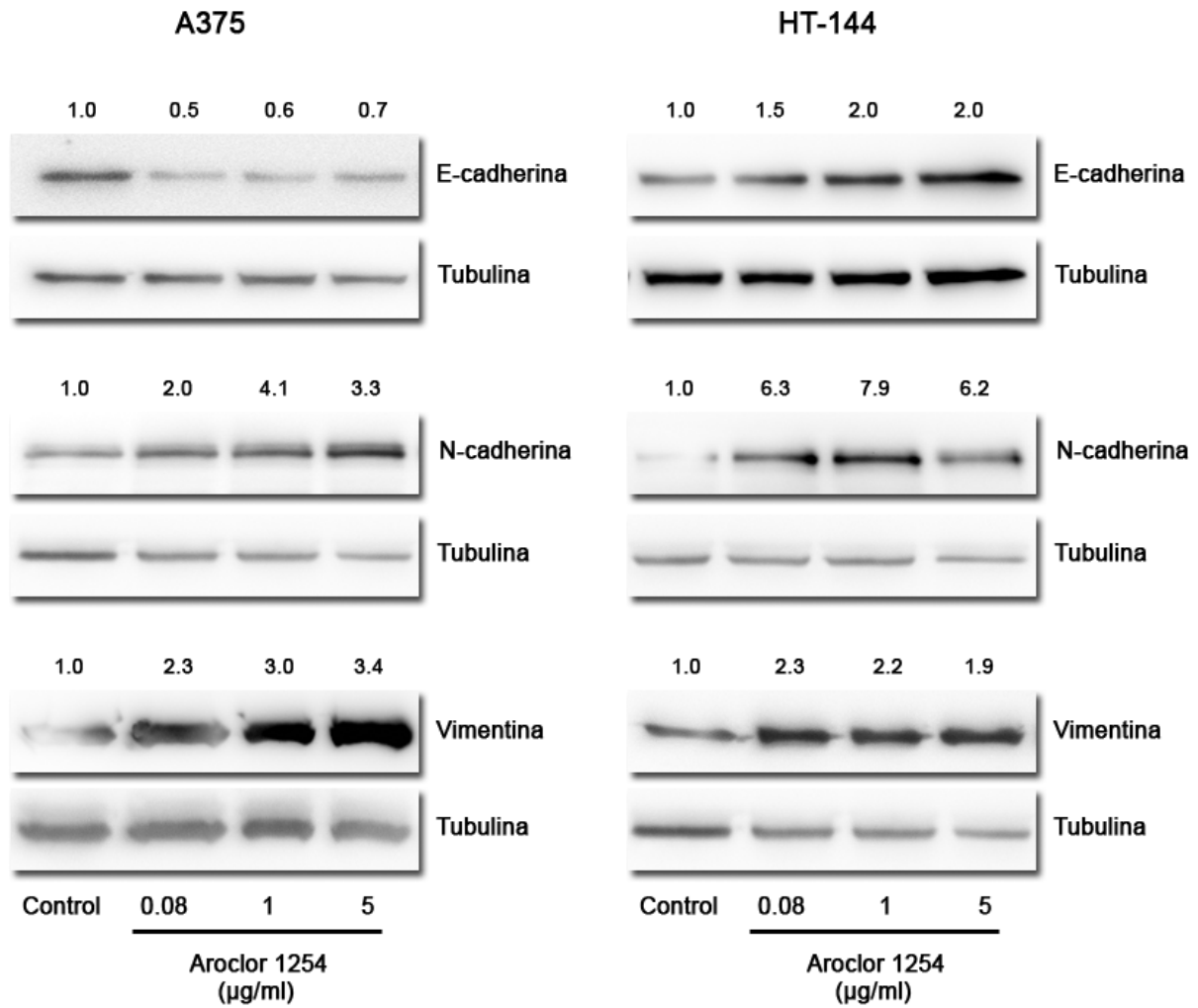
Se realizó una zimografía de gelatina con el medio condicionado por A375 en presencia de DMSO (control) o de Aroclor 1254 (0.08, 1 y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para comprobar el efecto del contaminante en la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9. En la figura 39A puede verse la imagen de un gel de zimografía donde se aprecian las bandas atribuidas a la MMP-2 y a la MMP-9 en base a su peso molecular. Estas bandas se corresponden con la actividad de degradación del sustrato que es cuantificada mediante densitometría. La actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 se expresa relativizada con respecto al control, al que se le asigna un valor de referencia de 1 (figuras 39B y 39C).

Como se muestra en la figura 39, la exposición al Aroclor 1254 incrementa la actividad de ambas metaloproteasas de manera significativa. La actividad de MMP-2 se duplica tras la exposición a todas las dosis de Aroclor 1254 ensayadas. Las concentraciones de 1 y 0.08  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Aroclor 1254 incrementan la actividad de MMP-9 en un 50 y un 100% respectivamente.

#### **4.1.6 Transición epitelio-mesénquima**

Para invadir, las células tumorales de origen epitelial tienen que migrar de la masa del tumor primario, mediante la rotura de los contactos celulares conocidos como uniones adherentes.

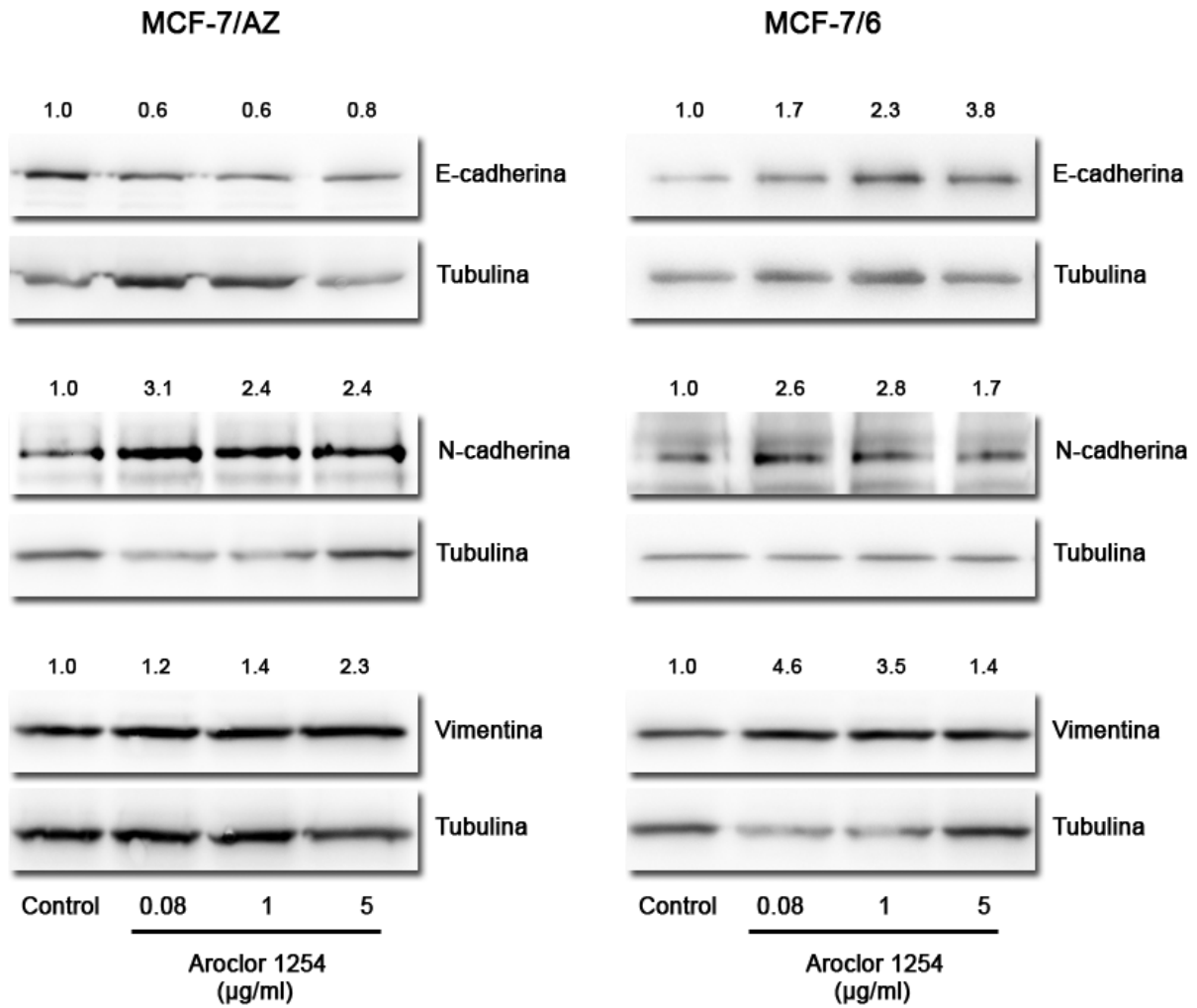
La molécula de adhesión E-cadherina es una proteína presente en la superficie celular responsable de las interacciones entre célula-célula y célula-matriz extracelular. Esta proteína está generalmente ausente o es disfuncional en la mayoría de los cánceres de mama y otros carcinomas epiteliales en fase avanzada, indiferenciados y agresivos. Además, la pérdida de E-cadherina en las células tumorales confiere un fenotipo invasivo/metastático. En los tumores, el aumento de la expresión de otra molécula de adhesión, la N-cadherina, se ha asociado con un incremento en el potencial invasivo. La regulación a la baja o la pérdida de marcadores epiteliales como la E-cadherina está acompañada por el aumento en la expresión de marcadores mesenquimales como la N-cadherina y la vimentina. Este proceso es lo que se conoce como transición epitelio-mesénquima y está caracterizado por una pérdida de adhesiones célula-célula, por una remodelación del citoesqueleto y un incremento en la movilidad celular (Montenegro *et al.*, 2013). Además se ha asociado con un incremento en la expresión de MMPs. Tras el proceso de transición epitelio-mesénquima las células pierden las uniones epiteliales y comienzan a producir filamentos de vimentina.



**Figura 40:** Análisis por *western blot* de marcadores de transición epitelio-mesénquima en las líneas de melanoma A375 y HT-144, tras 48 h de exposición al Aroclor 1254 (0.08, 1 y 5 µg/ml). Los marcadores analizados son E-cadherina, N-cadherina y Vimentina. El valor numérico asociado representa el valor medio de los distintos ensayos realizados y relativizados con respecto al control, al que se le asigna el valor de 1.

Para conocer si los PCBs inducen una transición epitelio-mesénquima realizamos un ensayo de *western blot* con ambas líneas de melanoma y cáncer de mama para analizar posibles cambios en la expresión de los marcadores E-cadherina, N-cadherina y vimentina (figuras 40 y 41).

Como se observa en las figuras 40 y 41, la expresión de los marcadores mesenquimales analizados (N-cadherina y vimentina) aumentó significativamente en todas las líneas tumorales en respuesta al tratamiento con la mezcla ambiental de PCBs.



**Figura 41:** Análisis por *western blot* de marcadores de transición epitelio-mesénquima en las líneas de cáncer de mama MCF-7/6 y MCF-7/AZ, tras 48 h de exposición al Aroclor 1254 (0.08, 1 y 5 µg/ml). Los marcadores analizados son E-cadherina, N-cadherina y Vimentina. El valor numérico asociado representa el valor medio de los distintos ensayos realizados y relativizados con respecto al control, al que se le asigna el valor de 1.

La expresión de N-cadherina y vimentina aumentó notablemente para todas las concentraciones de Aroclor 1254 estudiadas. La expresión de la N-cadherina llegó a ser hasta 4 y 8 veces superior al control en A375 y HT-144 respectivamente (figura 40). En ambas líneas de carcinoma de mama, la N-cadherina llegó a alcanzar un valor hasta 3 veces superior al del control (figura 41). El filamento intermedio mesenquimal vimentina incrementó significativamente su expresión con el tratamiento de Aroclor 1254, y alcanzó valores hasta 3 y 4 veces superiores al control en A375 y MCF-7/6 respectivamente. En HT-144 y MCF-7/AZ la expresión de vimentina se duplicó tras la exposición a la mezcla ambiental de PCBs.

En el caso del marcador epitelial E-cadherina, la expresión disminuyó en las líneas A375 y MCF-7/AZ, donde su expresión se redujo hasta aproximadamente un 50-60% de la expresión basal del control. En las variantes de melanoma y carcinoma de mama más invasivas/metastáticas (HT-144 y MCF-7/6) la expresión de E-cadherina se incrementó significativamente y de una manera dosis-dependiente.

#### 4.1.7 Implicación de las GTPasas Rho (RhoA, Rac1 y Cdc42)

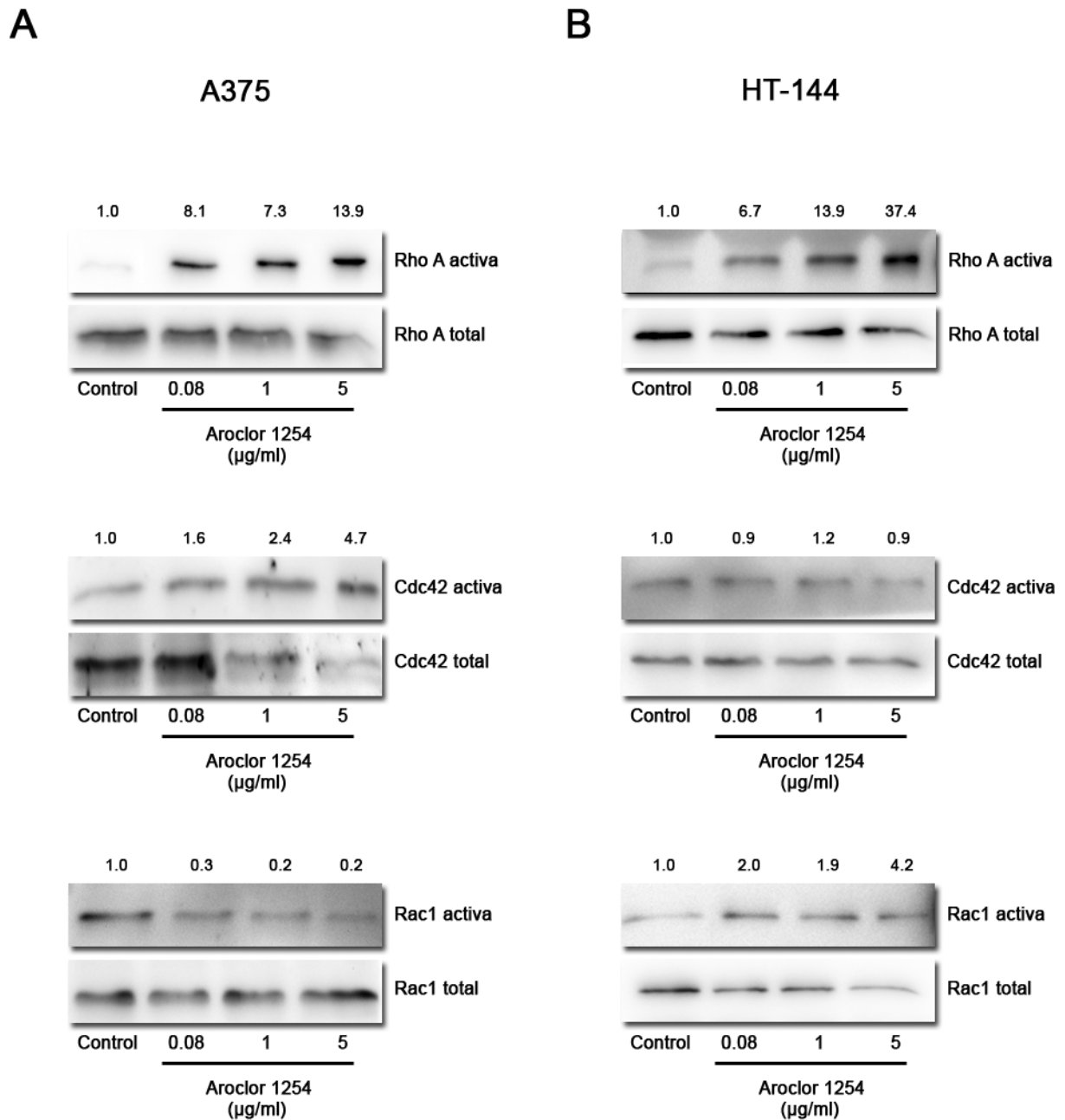
Las GTPasas Rho representan una familia de pequeñas proteínas de unión a GTP involucradas en funciones celulares esenciales como la organización del citoesqueleto, la migración, la adhesión, la transcripción, la proliferación y la polaridad celular. En particular, las GTPasas Rho son reguladores cruciales en la progresión del cáncer a través de la modulación de la proliferación, la apoptosis y en especial de la invasión y la formación de metástasis. Son pequeñas moléculas (21-25 KDa) que se activan solo cuando se unen al GTP.

Dentro de los miembros mejor caracterizados se encuentran RhoA, Rac1 y Cdc42. La señalización de RhoA activa la familia de quinasas ROCK, promoviendo la formación de fibras de estrés de actina y la generación de la fuerza contráctil de actomiosina que es requerida para la retracción de la parte posterior de la célula en el movimiento de tipo mesenquimal. Cdc42 es activada en el extremo delantero del lamelipodio y es requerida para el ensamblaje de actina dependiente de Arp2/3. Además la existencia de una relación antagonista entre Rac1 y RhoA explica el movimiento polarizado durante la migración celular dirigida. La actividad de Rac1 está limitada al extremo delantero para extender las protrusiones en el frente, mientras que RhoA dirige la contracción en la parte trasera de la célula que migra.

Debido a la implicación de las GTPasas Rho, y en especial a RhoA, Cdc42 y Rac1, en la movilidad de las células tumorales decidimos estudiar si son susceptibles a la regulación por PCBs.

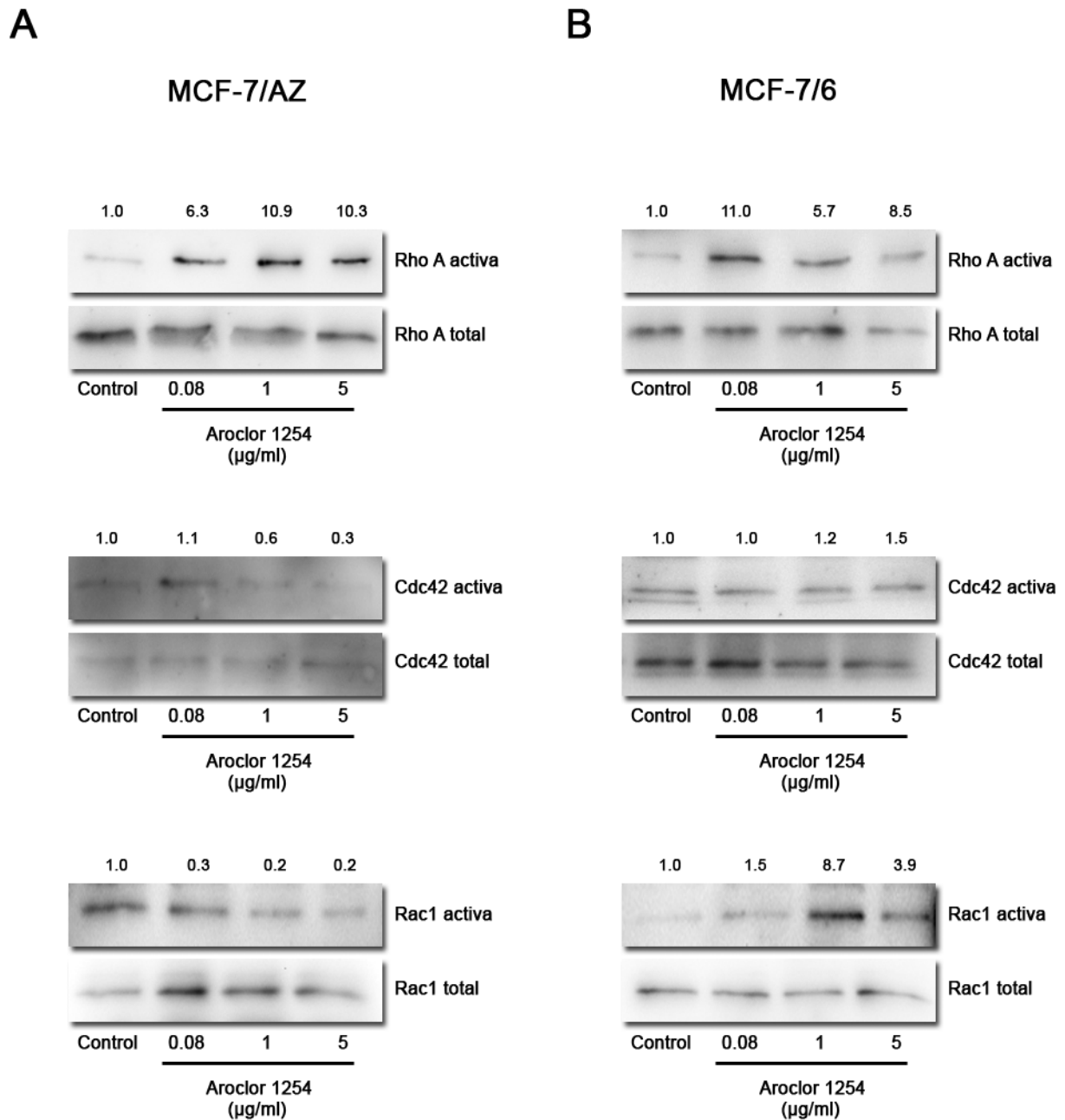
Para determinar si el Aroclor 1254 afecta al estado de unión GTP/GDP de las GTPasas Rho en el cáncer de mama y en el melanoma humano, investigamos los niveles de las formas de unión a GTP de RhoA, Rac1 y Cdc42 mediante inmunoprecipitación y posterior ensayo de *western blot*.

Como puede verse en las figuras 42 y 43, la forma activa RhoA-GTP se incrementa fuertemente en todas las líneas estudiadas y para todas las concentraciones de Aroclor 1254 ensayadas. El nivel de activación es tal que alcanza un valor hasta 37 veces superior al control en HT-144, 14 veces superior en A375 y hasta 11 veces superior en MCF-7/6 y MCF-7/AZ.



**Figura 42:** Efecto del Aroclor 1254 sobre la activación de las GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42 en las líneas de melanoma (A) A375 y (B) HT-144. Análisis mediante *western blot*. Ambas líneas fueron expuestas durante 48 h a concentraciones del tóxico de 0.08, 1 y 5 µg/ml.

Cdc42 incrementa el ratio GTP/GDP en A375 y en MCF-7/6, tras la exposición al Aroclor 1254. En la línea MCF-7/AZ, Cdc42 experimenta una disminución de la forma activa con el tratamiento, y en HT-144 no se observan diferencias significativas con respecto al control.

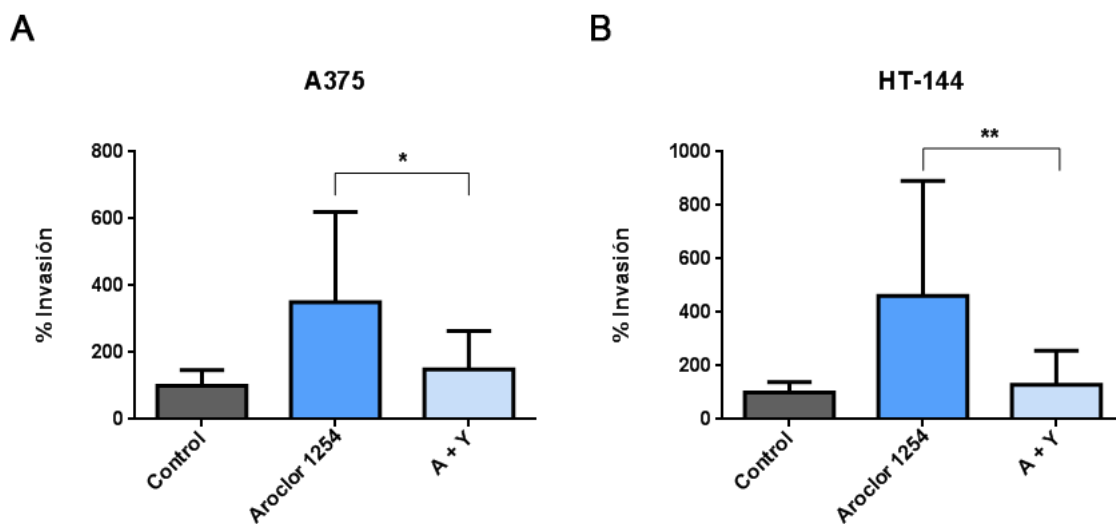


**Figura 43:** Efecto del Aroclor 1254 sobre la activación de las GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42 en las líneas de carcinoma de mama (A) MCF-7/AZ y (B) MCF-7/6. Análisis mediante *western blot*. Ambas líneas fueron expuestas durante 48 h a concentraciones del tóxico de 0.08, 1 y 5 µg/ml.

La activación de Rac1 cae a niveles de 0.2, con respecto al control, en A375 y MCF-7/AZ. En las variantes MCF-7/6 y en HT-144, Rac1 experimenta una notable activación con el tratamiento de Aroclor 1254, alcanzando valores 8 y 4 veces superiores al grupo control respectivamente (figuras 43B y 42B).

#### 4.1.8 Inhibición de ROCK mediante el inhibidor selectivo Y27632

Las quinasas asociadas a Rho, ROCK1 y ROCK2, a las que se refiere conjuntamente como ROCK, son las principales mediadoras de la actividad de Rho. ROCK está implicada en la regulación de la invasión y migración *in vitro* y en la metástasis *in vivo*, ya que es responsable de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) y de la inhibición de la actividad de la fosfatasa de MLC (MLCP). ROCK fosforila e inhibe la actividad de MLCP, esta inhibición resulta en un incremento en la fosforilación de MLC y en consecuencia se produce un incremento en la contractilidad del complejo actina-miosina, el cual parece inducir y mantener las fibras de estrés.



**Figura 44:** Ensayo de invasión en Matrigel realizado con las líneas (A) A375 y (B) HT-144, control y tratadas con Aroclor 1254 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o expuestas a la combinación de Aroclor 1254 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y el inhibidor de ROCK, Y27632 (1  $\mu\text{M}$ ) (A + Y), durante 24 h.

En base al fuerte incremento observado en la activación de RhoA decidimos inhibir la ruta Rho/ROCK, con el fin de determinar su papel en la promoción de la actividad invasiva en presencia de PCBs. Para ello empleamos un inhibidor selectivo de ROCK denominado Y27632 (Sigma).

El tratamiento de las células con el inhibidor específico de ROCK redujo significativamente el incremento de la invasividad mediado por PCBs hasta colocarse a niveles equiparables a los del control (figura 44). Esto indica que la actividad de Rho/ROCK es necesaria para el incremento del potencial metastático inducido por la presencia de PCBs.



#### 4.2 EFECTO DEL AROCLOR 1254 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS A CARDIOMIOCITOS

Debido a que el impacto potencial de los compuestos tóxicos durante el desarrollo embrionario es significativo, los estudios que evalúan la embriotoxicidad son de gran importancia.

Durante el periodo gestacional el feto puede verse afectado por la exposición a gran variedad de compuestos químicos a través de la exposición materna y el subsecuente transporte a la placenta. El corazón es el primer órgano en formarse en los vertebrados durante la embriogénesis. En animales vertebrados la supervivencia del embrión en desarrollo depende del corazón y del sistema circulatorio, de modo que las alteraciones cardíacas no solo pueden causar un aborto espontáneo sino que pueden afectar seriamente la calidad de vida después del nacimiento. El corazón en especial es extremadamente sensible a cambios en el ambiente embrionario durante el desarrollo. Si bien se ha descrito que la exposición a contaminantes orgánicos, como los PCBs, está correlacionada con la aparición de enfermedades cardíacas, la cardiotoxicidad de los PCBs apenas ha sido documentada y los pocos estudios al respecto hacen referencia a ensayos con cultivos primarios de cardiomiocitos adultos. Siendo aún menos conocidos sus efectos durante la cardiomiogénesis (desarrollo y diferenciación de los cardiomiocitos).

Las células madre embrionarias pueden diferenciarse en los distintos tipos celulares derivados de las tres hojas embrionarias, incluyendo los cardiomiocitos. El uso de células madre embrionarias (células ES) permite establecer un interesante modelo *in vitro* para el estudio de las etapas de peri-implantación del desarrollo de mamíferos, ya que recapitulan los procesos del desarrollo celular y los patrones de expresión génica de la embriogénesis temprana durante su diferenciación *in vitro*, resultando en la formación de distintos tipos celulares especializados y funcionalmente competentes. Por otro lado, el uso de células madre permite solventar los problemas derivados del alto número de animales que son necesarios para los ensayos de toxicología.

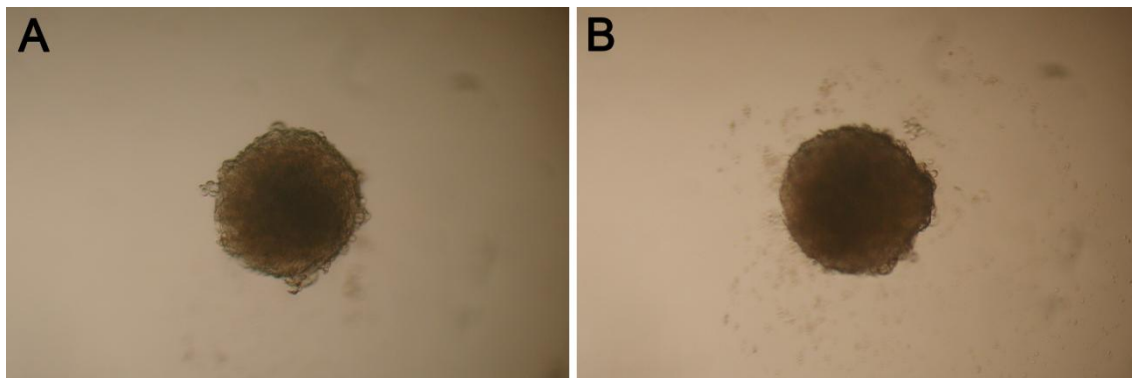
Para estudiar el efecto de los PCBs durante la cardiomiogénesis temprana hemos empleado un modelo de diferenciación *in vitro* a partir de células ES murinas. Este modelo permite recapitular las fases principales del desarrollo fetal del corazón (etapa temprana, a los 4 días de la diferenciación, con células primarias “myocardial-like”; etapa intermedia a los 7 días, con la formación de las miofibrillas y; la terminal a los 15 días) a través de la formación de agregados tridimensionales conocidos como cuerpos embrioides. Durante la diferenciación, tanto genes específicos del linaje cardíaco, como proteínas, receptores y canales de intercambio iónico se expresan en un continuo temporal que recapitula de forma minuciosa el patrón de desarrollo de la cardiomiogénesis temprana.

La exposición a contaminantes orgánicos persistentes como los PCBs constituye un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades coronarias y de infarto agudo de miocardio entre la población adulta (Sergeev and Carpenter, 2005) lo cual sugiere que la exposición durante el estadio fetal podría correlacionarse con alteraciones cardíacas que emergerían con posterioridad.

#### 4.2.1 Efecto del Aroclor 1254 en el tamaño de los cuerpos embrioides

Para determinar si el tratamiento con Aroclor 1254 induce cambios en el tamaño de los cuerpos embrioides, las células R1 fueron tratadas desde el día 0 con Aroclor 1254 (a concentraciones 0.1, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y con 0.03% DMSO (control).

En la figura 45 puede observarse como el tamaño de los cuerpos embrioides derivados de células ES murinas no se ve alterado por el tratamiento con la mezcla ambiental de PCBs (Aroclor 1254 a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

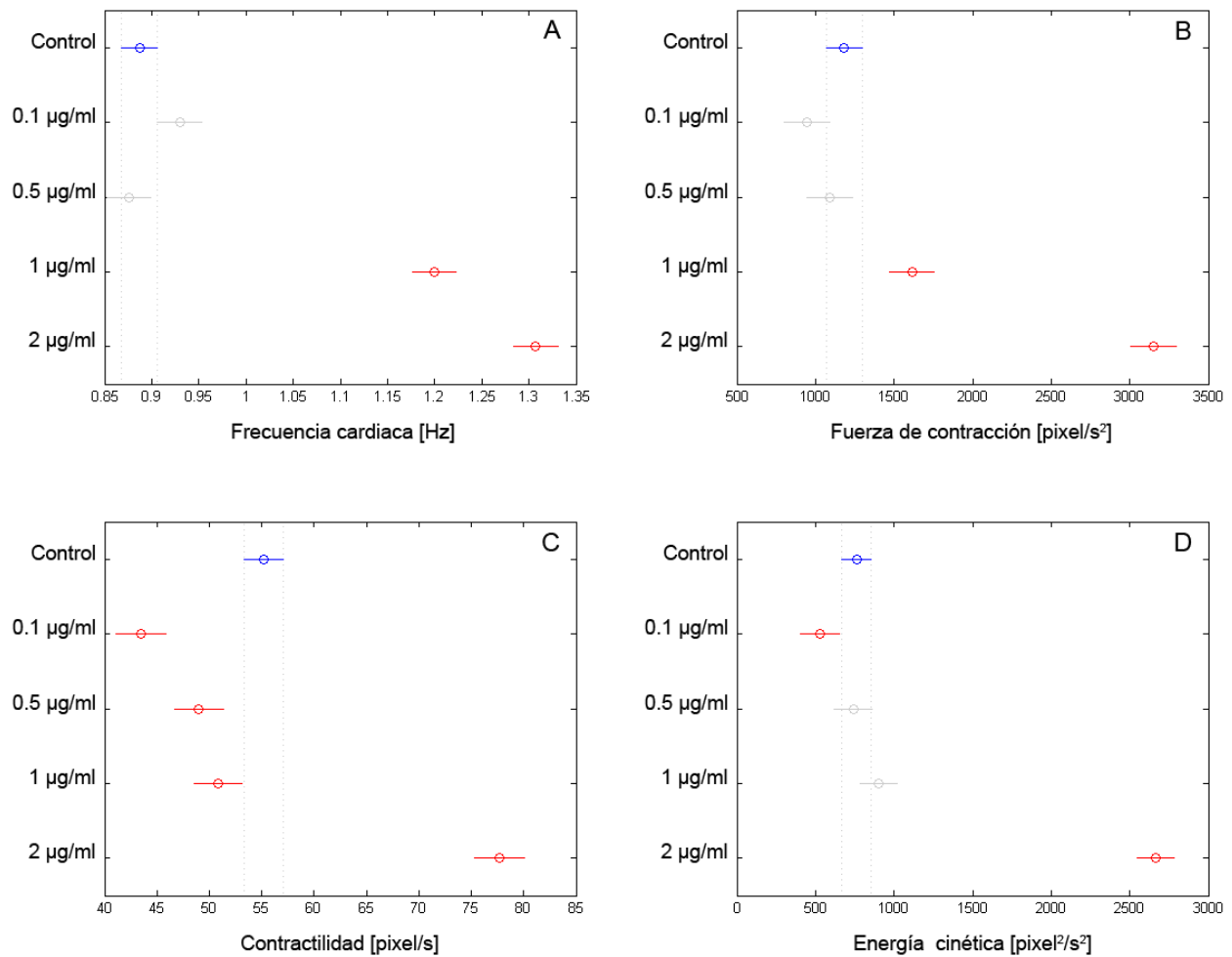


**Figura 45:** Imagen de (A) cuerpo embrioide control y (B) tratado con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Aroclor 1254, a las 72 h de formación.

#### 4.2.2 Análisis de la cinética y las propiedades contráctiles de los cardiomiocitos

##### 4.2.2.1 Exposición al contaminante durante 15 días

La adquisición espontánea de la actividad contráctil es una característica inherente de los cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias. Para evaluar las propiedades contráctiles del sincitio cardíaco monitorizamos las áreas latientes a día 15 de la diferenciación. A partir de las grabaciones obtenidas en formato ".AVI" medimos las características cinemáticas y dinámicas para los cardiomiocitos control y tratados con 0.1, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Aroclor 1254.



**Figura 46:** Propiedades contráctiles del sincitio cardíaco latiente control y diferenciado en presencia de 0.1, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{g/ml}$  de Aroclor 1254, a los 15 días del proceso de diferenciación. (A) Frecuencia cardíaca [Hz], (B) fuerza de contracción [ $\text{pixel/s}^2$ ], (C) contractilidad [ $\text{pixel/s}$ ] y (D) energía cinética [ $\text{pixel}^2/\text{s}^2$ ]. Las barras horizontales representan los intervalos de confianza (95%) de las diferencias entre medias, de acuerdo con el test estadístico "Least Significant Difference". El color rojo en las barras horizontales se corresponde con los tratamientos para los cuales existen diferencias significativas con respecto al control (color azul),  $p < 0.05$ .

El tratamiento con las distintas concentraciones de Aroclor 1254 se mantuvo ininterrumpidamente durante todo el proceso de diferenciación (desde el día 0 al día 15). Los efectos cronotrópico (frecuencia cardíaca [Hz]), inotrópico (fuerza de contracción [ $\text{pixel/s}^2$ ] y contractilidad [ $\text{pixel/s}$ ]) y ergotrópico (consumo de ATP para la energía cinética [ $\text{pixel}^2/\text{s}^2$ ]) fueron calculados matemáticamente a partir del movimiento del sincitio latiente (figura 46). Este análisis reveló que los cardiomiocitos que se habían diferenciado en presencia de 1 y 2  $\mu\text{g/ml}$  de Aroclor 1254 incrementaron sobremanera (1.4 y 1.5 veces respectivamente) su frecuencia cardíaca en comparación

con el control (figura 46A). A las concentraciones de 0.1 y 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , aunque los cardiomiocitos mantuvieron inalterada su frecuencia cardíaca sí que mostraron una disminución en los parámetros de contractilidad (1.3 y 1.2 veces respectivamente) y de energía cinética (1.6 veces con el tratamiento de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de Aroclor 1254).

La diferenciación en presencia de 1  $\mu\text{g/ml}$  de Aroclor 1254 no solo altera la frecuencia cardíaca de los cardiomiocitos, sino que también disminuye la contractilidad e incrementa la fuerza de contracción en un orden de 1.4 veces, sin modificar el gasto energético. A la concentración más elevada de Aroclor 1254 (2  $\mu\text{g/ml}$ ) se ven alterados todos los parámetros: se incrementan significativamente la frecuencia cardíaca (1.5 veces), la fuerza de contracción (2.8 veces), la contractilidad (1.4) y el gasto de ATP (3.8 veces).

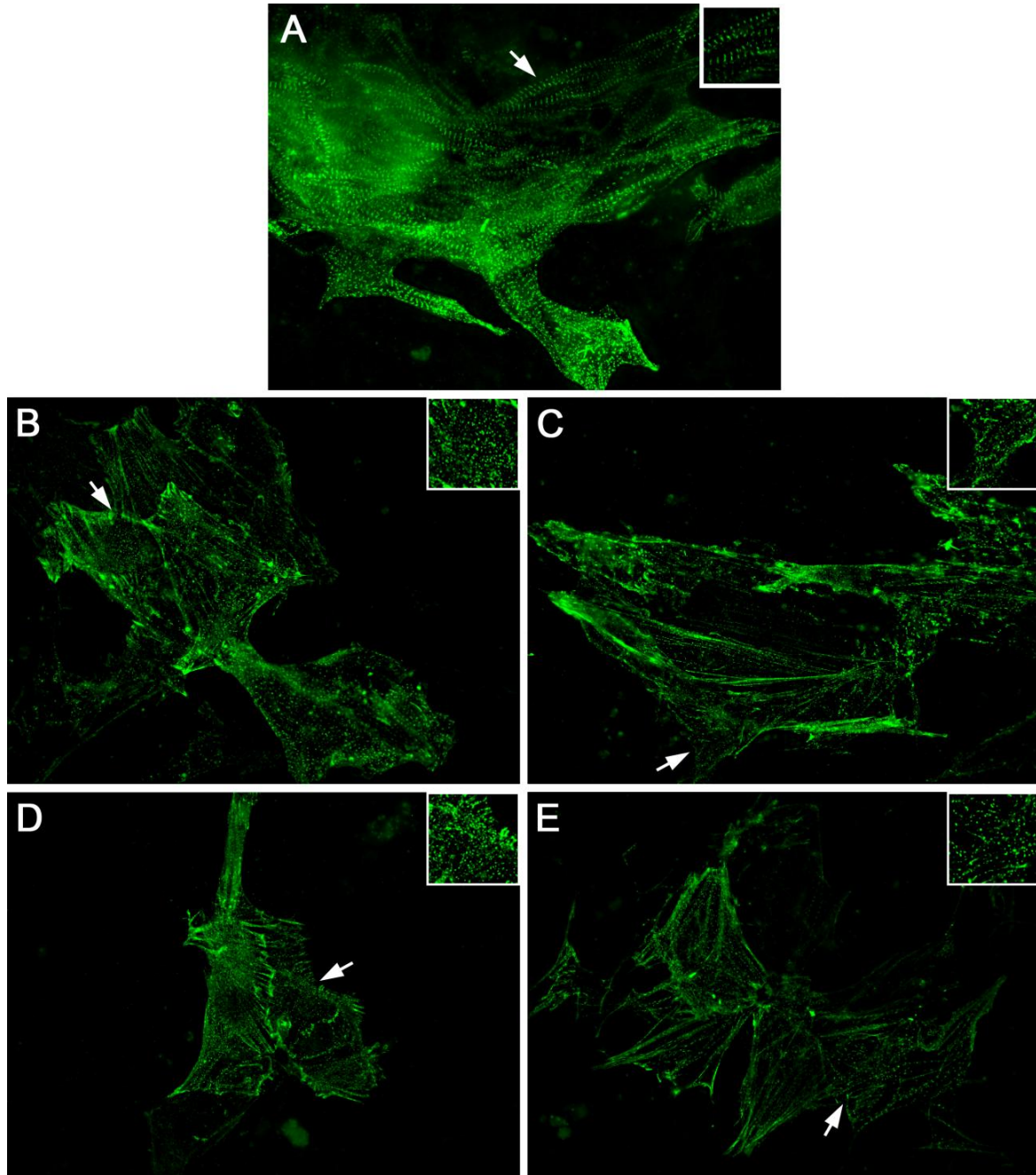
La contractilidad es una característica inherente de los cardiomiocitos derivados de células ES y las alteraciones en este parámetro reflejan trastornos estructurales y/o funcionales. La disminución en el valor de los parámetros de contractilidad sugiere una posible reducción en la sincronización entre cardiomiocitos o bien una alteración en su organización estructural.

#### **4.2.3 Organización sarcomérica de los cardiomiocitos**

Debido a las alteraciones detectadas en la contractilidad de los cardiomiocitos tratados con la mezcla ambiental de PCBs, se decide estudiar si la causa subyacente es una reducción en la sincronización o una alteración estructural. Por ello, a día 15 del proceso de diferenciación, se evaluaron mediante inmunofluorescencia la localización de las proteínas sarcoméricas Troponina T y  $\alpha$ -actinina, así como de la proteína de superficie conexina 43.

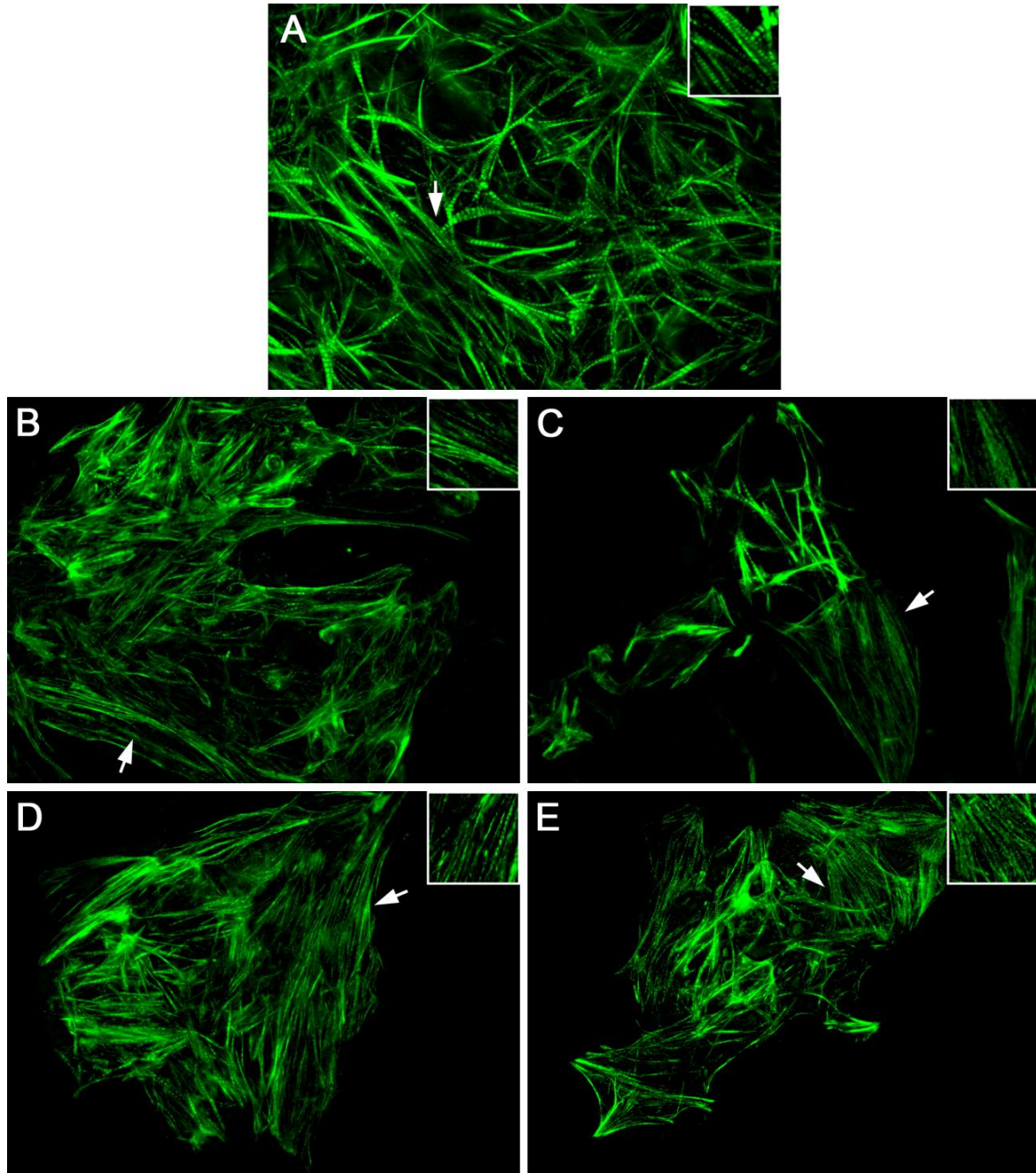
La  $\alpha$ -actinina es una proteína estructural localizada en las líneas Z. La Troponina T cardíaca (cTnT) pertenece al complejo de troponina que regula la contracción del músculo cardíaco.

La conexina 43 es una proteína de superficie que identifica la presencia de uniones gap entre los cardiomiocitos. Las uniones gap son las responsables de la conexión eléctrica y metabólica entre los cardiomiocitos y proporcionan el comportamiento de sincitio.

4.2.3.1  $\alpha$ -Actinina

**Figura 47:** Inmunolocalización de  $\alpha$ -actinina en sincitios cardíacos (A) control y tratados con (B) 0.1, (C) 0.5, (D) 1 y (E) 2  $\mu\text{g/ml}$  de Aroclor 1254 durante los 15 días de la diferenciación a cardiomiocito. Los cuadrados localizados en la parte superior derecha de cada imagen muestran una toma ampliada de la región marcada por la flecha blanca.

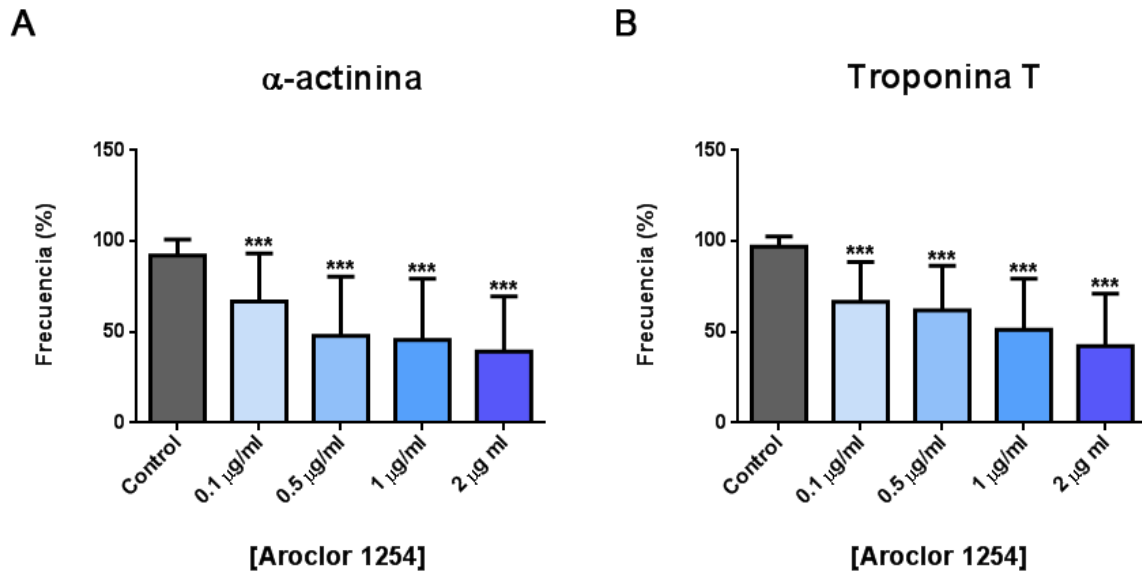
## 4.2.3.2 Troponina T



**Figura 48:** Inmunolocalización de Troponina T en sincitios cardíacos (A) control y tratados con (B) 0.1, (C) 0.5, (D) 1 y (E) 2  $\mu\text{g/ml}$  de Aroclor 1254 durante los 15 días de la diferenciación a cardiomiocito. Los cuadrados localizados en la parte superior derecha de cada imagen muestran una toma ampliada de la región marcada por la flecha blanca.



#### 4.2.3.3 Análisis de la frecuencia de cardiomiocitos con organización sarcomérica correcta

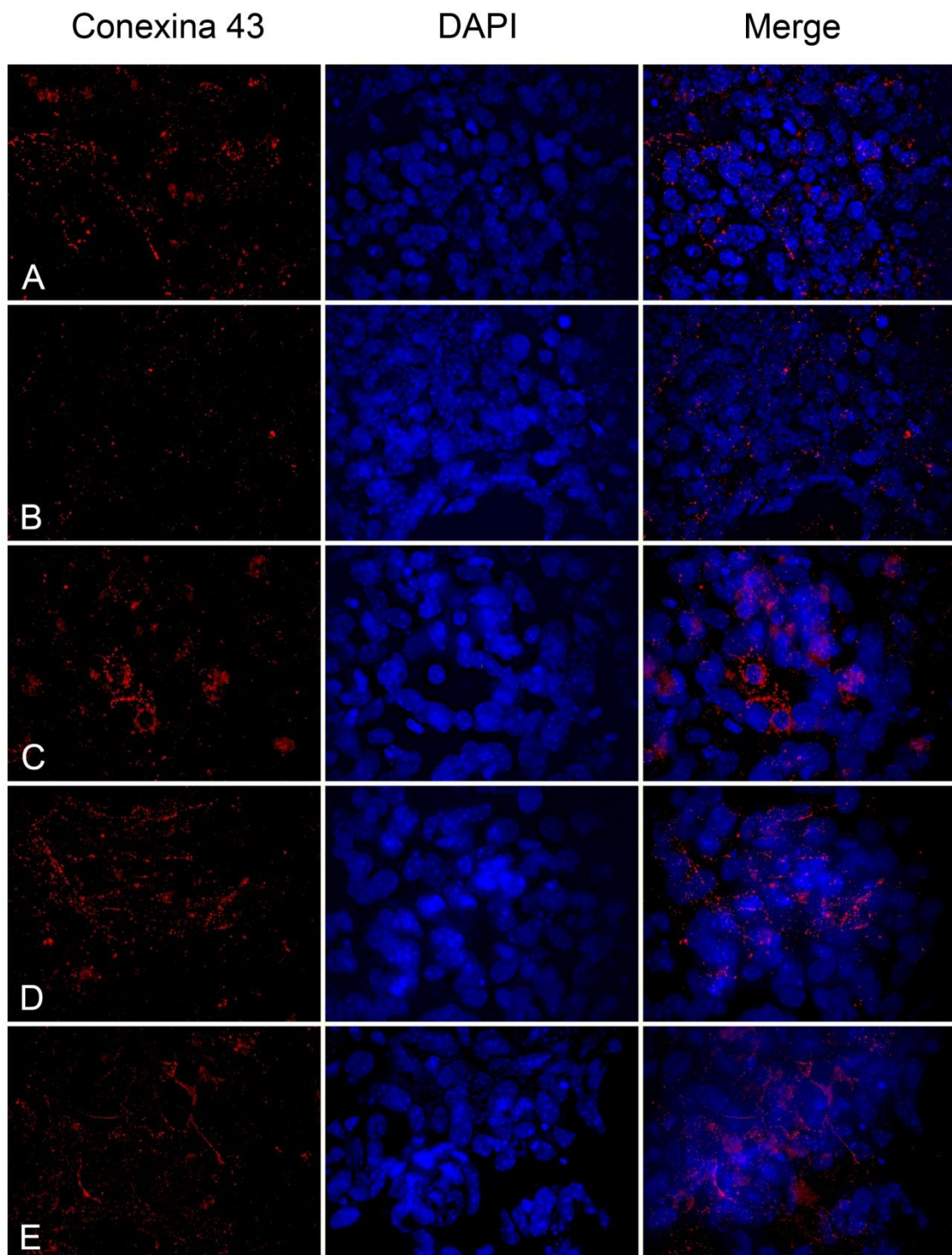


**Figura 49:** Análisis de la frecuencia de cardiomiocitos con organización sarcomérica correcta. La frecuencia está calculada en base al porcentaje de sincitio cardíaco con una organización correcta en la que los cardiomiocitos muestran la estructura de organización típica de la (A)  $\alpha$ -actinina y de la (B) troponina T.

En los cardiomiocitos control, la  $\alpha$ -actinina y la troponina T mostraron el patrón estriado característico del sarcómero (figuras 47A y 48A). Por el contrario, los cardiomiocitos expuestos a Aroclor 1254 presentan sarcómeros desorganizados y desorientados con una evidente alteración de las miofibrillas y ausencia de la configuración estriada típica de la  $\alpha$ -actinina (figuras 47B, 47C, 47D y 47E) y la troponina T (figuras 48B, 48C, 48D y 48E). Esta desorganización se observa para todas las concentraciones de Aroclor 1254 analizadas.

En las figuras 49A y 49B se analiza la frecuencia con la que aparece la estructura organizada típica de la  $\alpha$ -actinina y de la Troponina T, en el control y en cada uno de los tratamientos de Aroclor 1254 estudiados. Para ambas proteínas sarcoméricas se observa el mismo patrón tras la exposición al contaminante ambiental, el porcentaje de sincitios con una organización sarcomérica correcta disminuye de manera inversamente proporcional a la dosis de Aroclor 1254 ensayada. A la concentración de 2  $\mu$ g/ml tan sólo un 40% del sincitio cardíaco muestra una correcta organización de la  $\alpha$ -actinina y de la Troponina T.

## 4.2.3.4 Conexina 43



**Figura 50:** Inmunolocalización de la conexina 43 en sincitios cardíacos (A) control y tratados con (B) 0.1, (C) 0.5, (D) 1 y (E) 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Aroclor 1254 durante los 15 días del proceso de diferenciación a cardiomiocito.

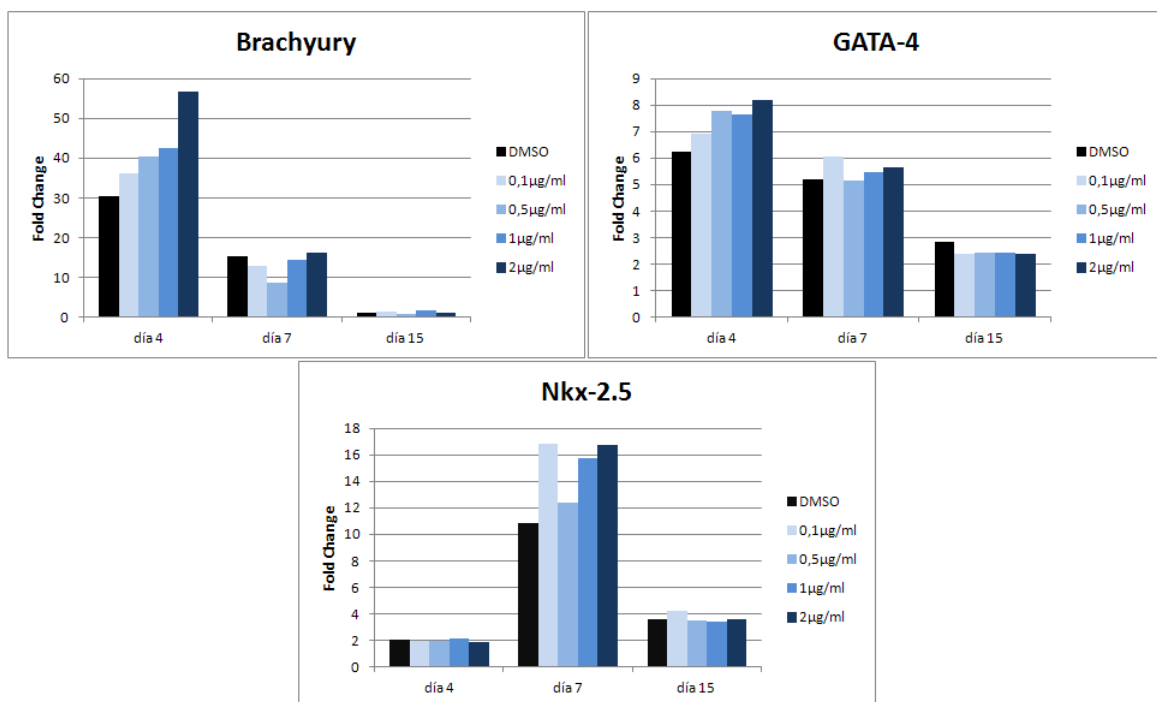


En el caso del marcaje para la conexina 43 (figura 50) no se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos.

La disrupción de la estructura del sarcómero y de la organización del sincitio que observamos podría conllevar a la disfunción de los parámetros cinemáticos de los cardiomiocitos que se ha observado con anterioridad.

#### 4.2.4 Efecto del Aroclor 1254 en la expresión de genes marcadores de diferenciación cardíaca

En los cardiomiocitos derivados de células madre, la expresión de los genes asociados al linaje cardíaco es una función del tiempo de diferenciación del mismo modo que ocurre durante el desarrollo cardíaco normal.



**Figura 51:** Perfil de expresión de genes marcadores de mesodermo (Brachyury) y mesodermo cardíaco (GATA-4 y Nkx 2.5) en cuerpos embrioides control y expuestos a Aroclor 1254 (0.1, 0.5, 1 y 2 µg/ml).

Analizamos a día 4, 7 y 15 el perfil de expresión de genes marcadores específicos de mesodermo (Brachyury) y de mesodermo cardíaco (GATA-4 y Nkx 2.5), con el fin de

comprobar si además de cambios estructurales, la presencia de PCBs provoca cambios en la expresión a nivel de ARNm durante el desarrollo *in vitro*.

La expresión de los cultivos de células ESm (a día 0) sin tratar se usó como valor de referencia (valor de 1) para el cálculo del *fold change* durante el proceso de diferenciación.

Se observó un incremento en la expresión de Brachyury y GATA-4 a día 4 de la diferenciación y en la expresión de Nkx 2.5 a día 7 en los cardiomiocitos tratados con Aroclor 1254 (figura 51). Sin embargo, las diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ), por lo que el papel de los PCBs durante el proceso de diferenciación parece ser una alteración estructural y funcional de los sincitios cardíacos sin que se vea alterado el patrón de expresión genética.

## DISCUSIÓN

## 5. DISCUSIÓN

El cáncer y las enfermedades cardiovasculares son en la actualidad las principales causas de mortalidad a nivel mundial. El rápido desarrollo socioeconómico experimentado en el último siglo ha provocado cambios profundos en el estilo de vida. Cambios que a su vez han ido acompañados de un incremento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer, ambas en continuo ascenso (Sung *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la primera o segunda causa principal de mortalidad en menores de 70 años para 112 países. En 2020 se estimaron unos 19.3 millones de nuevos casos de cáncer y casi 10 millones de muertes provocadas por el cáncer en todo el mundo, siendo el cáncer de mama el tipo más frecuentemente diagnosticado. De forma global, la incidencia de cáncer es de 2 a 3 veces superior en países desarrollados que en países en vías de desarrollo. Se espera que la incidencia de cáncer sea de 28.4 millones en 2040, lo cual supone un incremento del 47% con respecto a 2020. Tanto la incidencia como la mortalidad provocadas por el cáncer se están incrementando rápidamente a nivel mundial. Esta tendencia refleja no solo el envejecimiento y el crecimiento del tamaño poblacional, sino que también va asociada a cambios en la prevalencia y distribución de factores de riesgo relacionados con el desarrollo socioeconómico (Sung *et al.*, 2021).

Las enfermedades cardiovasculares son una clase de enfermedades que involucran al corazón o los vasos sanguíneos. Las CVD incluyen la enfermedad de las arterias coronarias (angina e infarto de miocardio) y enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares como la cardiopatía isquémica, la enfermedad cardíaca hipertensiva, cardiomiopatías y miocarditis entre otras. Más de 17 millones de personas murieron en 2017 debido a enfermedades cardiovasculares, casi el doble de muertes de las causadas por el cáncer. No solo es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial sino también de discapacidad crónica. Dentro de los principales factores de riesgo se encuentran el riesgo conductual (dieta), el riesgo metabólico (colesterol y alta presión arterial sistólica) y el riesgo ambiental/ocupacional (Li *et al.*, 2021).

El concepto de ambiente se usa frecuentemente en la literatura científica para referirse a factores no genéticos, como la dieta, el estilo de vida y a agentes infecciosos. En este sentido tan amplio el ambiente estaría implicado en el origen de la mayor parte de los cánceres. Sin embargo, en un sentido más específico, los factores ambientales incluyen únicamente aquellos agentes con los que se encuentran los seres humanos durante su vida diaria y sobre los cuales tienen un nulo o limitado control. Los contaminantes presentes en el aire, agua, tierra y alimentos son factores que estarían incluidos en la exposición ambiental (Boffetta, 2006). Existe una creciente evidencia que relaciona la exposición a determinados factores ambientales y el riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Boffetta, 2006; Burroughs Peña and Rollins, 2017).

La expansión y el envejecimiento poblacional que han tenido lugar desde la segunda guerra mundial no son capaces de explicar completamente la creciente incidencia del cáncer a nivel mundial. Por ello, hay científicos que plantean la hipótesis de que los factores ambientales juegan un papel más importante en el origen del cáncer de lo que se les atribuye normalmente. Entre los datos que aportan se encuentran que: 1) la obesidad se ha incrementado en muchos países y, sin embargo, la creciente incidencia del cáncer también afecta a cánceres no relacionados con la obesidad o ligados al estilo de vida; 2) en las últimas dos a tres décadas, el consumo de alcohol y tabaco han decrecido; 3) existe evidencia de que el ambiente ha cambiado en la misma escala de tiempo en la cual se ha incrementado la incidencia de cáncer. Además, este cambio incluye la acumulación de nuevos factores carcinógenos en el ambiente; 4) la susceptibilidad genética al cáncer debido a polimorfismos no puede haber cambiado a lo largo de una generación; 5) la creciente incidencia de cáncer se ha detectado en todas las categorías de edad, incluyendo los niños, siendo los fetos especialmente vulnerables a factores exógenos (Belpomme, Irigaray, Sasco *et al.*, 2007).

La revolución industrial trajo consigo la síntesis, producción e introducción en el ambiente de millones de sustancias químicas elaboradas por el hombre. Como resultado, de acuerdo a la Comisión Europea, se han comercializado unos 100.000 productos químicos desde la última guerra mundial sin suficiente control toxicológico. Estos productos podrían actuar como contaminantes tóxicos persistentes y contaminar el aire, la tierra, el agua y los alimentos. Muchos de ellos son moléculas carcinógenas y/o mutagénicas y pueden actuar como mutágenos, agentes promotores o ambos, o bien ser cocarcinógenos, lo cual significa que pueden contribuir a la génesis del cáncer y, por tanto, al incremento actual en la incidencia de cáncer. Entre estas sustancias se encuentran el asbesto (amianto), los ftalatos, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y compuestos organoclorados como las dioxinas y los PCBs (Belpomme, Irigaray, Hardell *et al.*, 2007).

Los PCBs son compuestos químicos orgánicos que han sido fabricados para su comercialización desde el año 1920. Se han empleado como fluidos dieléctricos en transformadores y condensadores, como fluidos refrigerantes en sistemas hidráulicos, en la formulación de aceites lubricantes, en pesticidas y compuestos ignífugos e incluso en pinturas, papel autocopiativo, adhesivos, aislantes y plásticos. Su estabilidad y propiedades propiciaron su uso comercial y en consecuencia que se distribuyeran a nivel mundial en el medio ambiente (Robertson and Ludewig, 2011).

Los PCBs son compuestos clasificados actualmente como contaminantes orgánicos persistentes. Son altamente persistentes en el ambiente y se bioacumulan en la grasa animal debido a su elevada lipofilidad. Es precisamente esta característica la responsable de que los PCBs hayan entrado en la cadena alimenticia y se detecten en alimentos como la carne, pescado, huevo, cereales, vegetales e incluso leche materna.

Hoy en día los PCBs siguen detectándose en alimentos como la leche materna humana en niveles que exceden los valores de referencia establecidos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Estos productos se acumulan a lo largo de la vida de la madre y se transfieren posteriormente al feto a través de la ruta transplacentaria (exposición prenatal) y durante el amamantamiento (exposición postnatal). Además, los PCBs se absorben con gran eficiencia en el tracto digestivo de los infantes, lo cual los hace especialmente vulnerables a este tipo de contaminantes (Hernández *et al.*, 2020).

Los PCBs encontrados en los productos alimenticios tienen generalmente un grado de cloración mayor y son muy resistentes a su descomposición metabólica. Entre los congéneres predominantes encontrados en los alimentos, la leche materna, suero y tejido adiposo humano se encuentran el PCB 138, 153, 180 y 183 (Robertson and Ludewig, 2011; Fernandez *et al.*, 2008). Los PCBs 138 y 153 se encuentran entre los PCBs más estables debido a su alto grado de cloración y presentan una vida media en sangre de 16 y 28 años respectivamente (Yakushiji *et al.*, 1984).

Aunque la producción de PCBs se prohibió a nivel mundial por la Convención de Estocolmo en el año 2001, en España este plan se implementó en 2007 y haciendo una excepción para permitir el uso de equipamiento que contenga PCBs hasta el año 2025 (Huetos *et al.*, 2014). Todo ello unido a su resistencia a la degradación física y biológica y a su capacidad para transportarse a larga distancia hace que los PCBs estén ampliamente distribuidos en el ambiente a nivel mundial (Espandiani *et al.*, 2004; Ceci *et al.*, 2022). En España, los PCBs siguen detectándose a día de hoy en el aire ambiental exterior (López *et al.*, 2021). Hay que tener en cuenta que, de forma indirecta, estos contaminantes atmosféricos pueden depositarse en el suelo y la vegetación y bioacumularse a lo largo de la cadena alimenticia, donde acaban acumulándose en el tejido graso humano (López *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2010).

Tras el cese de su producción, la ingesta es la fuente principal de entrada de PCBs en el organismo (>90%). En términos de evaluación de riesgo, se estima que el 22% de la población adulta y el 58% de la población joven podrían exceder la ingesta semanal tolerable de PCBs (Quijano *et al.*, 2018). Aunque la inhalación de aire contaminado con PCBs constituye una pequeña parte de la exposición total, es especialmente importante en áreas cercanas a zonas industriales, como es el caso de zonas con incineradores municipales de residuos sólidos.

La IARC ha concluido recientemente que existe suficiente evidencia de que los PCBs tienen potencial carcinogénico (son capaces de causar cáncer en humanos), encontrando una asociación positiva entre la exposición a estos compuestos y diferentes tipos de cáncer. Es por ello por lo que en el año 2016 la IARC reevaluó la toxicidad de los PCBs y los categorizó en el grupo 1, es decir, como agentes carcinógenos para los humanos (IARC, 2016).

Numerosos estudios han documentado un amplio espectro de efectos biológicos causados en la salud humana tras la exposición a estos compuestos (Liu *et al.*, 2010). Entre la toxicidad ejercida por los PCBs se encuentran la inmuno (Stølevik *et al.*, 2013) y neurotoxicidad (Klocke *et al.*, 2020), actividad estrogénica y antiestrogénica (Tam *et al.*, 2022; Oenga *et al.*, 2004), carcinogénesis (Aronson *et al.*, 2000) y cardiotoxicidad (Donat-Vargas *et al.*, 2015; Sergeev and Carpenter, 2005).

Actualmente los PCBs son conocidos agentes carcinógenos capaces de provocar la aparición de cáncer en individuos expuestos. La carcinogénesis consta de 3 etapas: iniciación, promoción y progresión. La promoción representa la etapa de crecimiento y formación del tumor. La progresión es la última de estas etapas y es exclusiva de la transformación maligna, ya que implica la capacidad de invasión de tejidos adyacentes y a distancia (De Civetta and Civetta, 2011). Los experimentos clásicos en la investigación de la carcinogénesis química (capacidad de un agente para originar neoplasias) identifican y diferencian a aquellos agentes químicos que tienen capacidad bien de iniciación del tumor o bien de promoción tumoral o ambas capacidades (carcinógenos completos) (Rünger, 2016). Mecánicamente, un iniciador puede definirse como un agente que altera irreversiblemente la secuencia de ADN, mientras que un agente promotor actúa alterando la expresión de la información genética de la célula (Robertson and Ludewig, 2011). Diversos estudios han documentado la mutagenicidad (capaces de provocar mutaciones), genotoxicidad (rotura de cromosomas y daño oxidativo en el ADN) y la capacidad iniciadora de la carcinogénesis (Espandiari *et al.*, 2004; Robertson and Ludewig, 2011; Zettner *et al.*, 2007; Lehmann *et al.*, 2007; Cillo *et al.*, 2007) de los PCBs. Sin embargo, en la literatura científica aún existe a día de hoy gran controversia sobre la relación entre los niveles de PCBs en tejido mamario o suero y su correlación con el riesgo de padecer cáncer de mama (Wielsøe *et al.*, 2017; Donat-Vargas *et al.*, 2016; Aronson *et al.*, 2000; Demers *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 1997; He *et al.*, 2017). Por otro lado, hay estudios que sugieren una posible asociación entre el riesgo de padecer melanoma maligno cutáneo y la concentración en plasma de PCBs (Cao *et al.*, 2019; Donat-Vargas *et al.*, 2017; Gallagher *et al.*, 2011; Ruder *et al.*, 2006). Si bien otros artículos de metaanálisis no encontraron evidencias de que la exposición a PCBs pueda incrementar el riesgo de melanoma (Magoni *et al.*, 2018; Boffetta *et al.*, 2018; Zani *et al.*, 2017). La discrepancia existente hace necesarias investigaciones adicionales para determinar la asociación entre la exposición a los PCBs y el riesgo de cáncer, y si esta exposición podría estar implicada en la promoción y progresión del melanoma y el cáncer de mama. Uno de los objetivos de esta tesis es aportar un mayor conocimiento sobre este aspecto. Para ello, el uso de líneas tumorales humanas nos permitirá conocer si además de conducir la iniciación del cáncer, los PCBs son capaces de promover el crecimiento y la invasividad de tumores y/o metástasis previamente establecidas.

Como tóxico ambiental para la tesis se eligió la mezcla comercial de PCBs conocida como Aroclor 1254. La elección de esta mezcla se basa en que contiene congéneres similares y no similares a la dioxina y es representativa de la contaminación ambiental por PCBs (An *et al.*, 2012). Dentro del Aroclor 1254 son especialmente abundantes los PCBs 52, 101, 118, 138 y 153, congéneres considerados como buenos indicadores de la contaminación en alimentos y predominantes en leche materna humana, sangre y tejido adiposo (Robertson and Ludewig, 2011; Fernandez *et al.*, 2008; Wingfors *et al.*, 2006).

Para el estudio del efecto de los PCBs sobre el potencial invasivo de líneas tumorales humanas se emplearon cuatro líneas celulares, de las cuales dos líneas fueron de carcinoma de mama y dos líneas fueron de melanoma maligno cutáneo. Las líneas de melanoma utilizadas fueron A375 y HT-144 y las de cáncer de mama fueron MCF-7/AZ y MCF-7/6. Ambas líneas de melanoma empleadas difieren en cuanto a su origen. Las células de la línea A375 tienen su origen en un tumor primario y presentan una morfología epitelial, mientras que las HT-144 se aislaron de una metástasis subcutánea y presentan una morfología fibroblástica. El melanoma es un tumor de piel maligno caracterizado por una elevada tasa de mortalidad. Los melanomas se desarrollan a partir de células tumorales iniciales que presentan crecimiento radial y vertical, y que conduce en última instancia a la metástasis. La radiación UV es considerada como el factor ambiental más importante en la generación del melanoma (Kamenisch *et al.*, 2016). Se estima que aproximadamente el 65% de los melanomas malignos cutáneos a nivel mundial pueden ser atribuidos a la radiación ultravioleta (Gallagher *et al.*, 2011). El uso de líneas de melanoma nos permite evaluar a su vez la existencia de otros factores ambientales potenciales, además de la radiación ultravioleta (UV), involucrados en el origen, promoción y progresión de este tipo de cáncer (Rünger, 2016). Las líneas MCF-7/AZ y MCF-7/6 derivan de la línea parental MCF-7. Ambas líneas mantienen la habilidad de las MCF-7 de procesar el estrógeno en forma de estradiol a través de receptores de estrógeno localizados en el citoplasma celular. Por ello, MCF-7/AZ y MCF-7/6 se consideran controles positivos para el receptor de estrógeno. Debemos recordar que en la fase de promoción tumoral participan factores de crecimiento y receptores de los factores de crecimiento. Algunas hormonas ejercen acciones similares a las de los factores de crecimiento tras la unión a sus respectivos receptores. Este es el caso del estrógeno, cuyo efecto proliferativo en el epitelio mamario es ampliamente reconocido (De Civetta and Civetta, 2011). Del mismo modo, los contaminantes que actúan como disruptores endocrinos tienen la capacidad para imitar o interferir la actividad de hormonas endógenas, como es el caso de los PCBs (Bonefeld-Jørgensen *et al.*, 2001). El uso de las dos líneas de cáncer de mama nos servirá para discriminar si pueden existir o no efectos proliferativos dependientes del receptor de estrógeno. Por otro lado, MCF-7/AZ y MCF-7/6 difieren en cuanto a su potencial invasivo y metastático. MCF-7/6 se derivó de la línea parental mediante selección de su potencial metastático por pasaje seriado en ratones desnudos. Por ello,



MCF-7/6 resulta invasiva en modelos de invasión en colágeno tipo I y Matrigel y además metastatiza espontáneamente en ratones desnudos, al contrario que MCF-7/AZ (Mao *et al.*, 2010; Derycke *et al.*, 2011). Las líneas celulares A375 y HT-144 difieren también en cuanto a su potencial metastático, ya que A375 tiene su origen en el tumor primario mientras que HT-144 deriva de la propia metástasis (Giard *et al.*, 1973).

En primer lugar se quiso evaluar el efecto del Aroclor 1254 sobre la viabilidad celular. Para ello, las líneas A375, HT-144, MCF-7/AZ y MCF-7/6 fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de PCBs (entre los 10  $\mu\text{g/ml}$  y 0.08  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24, 48 y 72 h. Ya en las primeras 24 h se observa una disminución significativa de la viabilidad en las células de la línea MCF-7/AZ con las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de Aroclor 1254. En A375 y MCF-7/6 la mezcla ambiental de PCBs ejerce un efecto citotóxico a partir de las 48 h en las concentraciones más altas. En la línea HT-144, los PCBs muestran un notable efecto citotóxico en las primeras 48 h y a partir de la concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ . HT-144 es la línea que más acusa el efecto citotóxico de los PCBs, ya que a las 72 h todas las concentraciones de tóxico empleadas disminuyen la viabilidad celular de forma significativa. De hecho, las células de HT-144 en presencia de 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de Aroclor 1254 muestran una viabilidad inferior al 20% a las 72 h. Este efecto citotóxico de los PCBs en líneas tumorales apoya los resultados obtenidos por autores como Liu *et al.*, 2010, que demostraron que una mezcla de 7 congéneres de PCBs inducía pérdida de viabilidad en la línea de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Por el contrario, la concentración de 0.08  $\mu\text{g/ml}$  de Aroclor 1254 indujo proliferación en las células de la línea MCF-7/AZ, observándose un crecimiento un 20% superior al del control y mantenido en el tiempo (a las 48 y 72 h). Por lo que la mezcla ambiental de PCBs parece actuar como agente inductor de la proliferación en la línea de cáncer de mama no invasiva a bajas concentraciones. Los PCBs son conocidos disruptores endocrinos y en la literatura científica se ha reportado tanto la actividad estrogénica como anti-estrogénica de los PCBs en diferentes líneas tumorales de cáncer de mama (Tam *et al.*, 2022; Bonefeld-Jørgensen *et al.*, 2001; Oenga *et al.*, 2004; Nesaretnam *et al.*, 1996; Connor *et al.*, 1997). Dado que el efecto estimulador de la proliferación sólo se observa en la línea de carcinoma de mama MCF-7/AZ y no en las líneas de melanoma (negativas para el receptor de estrógeno), la principal teoría es que este efecto derive de una actividad estrogénica de la mezcla de PCBs. Este resultado nos indica además que los PCBs son capaces de inducir la promoción tumoral, la conocida como etapa de crecimiento y formación del tumor.

En base a los datos obtenidos del ensayo de viabilidad celular y a la bibliografía consultada, se decide trabajar con las concentraciones de 0.08, 1 y 5  $\mu\text{g/ml}$  de Aroclor 1254. La concentración de 0.08  $\mu\text{g/ml}$  se corresponde con la concentración más baja detectada en España (Huetos *et al.*, 2014). El valor medio de PCBs en sangre/tejido adiposo encontrado en la literatura científica ronda los 0.5-1.5  $\mu\text{g/ml}$  (Agudo *et al.*,

2009; Wingfors *et al.*, 2000), y se han detectado niveles de 1 µg/ml en el útero (Zietz *et al.*, 2008). En cuanto a los valores más altos referenciados, se han llegado a detectar valores de 4-14 µg/ml en poblaciones especialmente expuestas (Petrik *et al.*, 2006; Turrio-Baldassarri *et al.*, 2008).

Tras observar una pérdida de viabilidad celular con las concentraciones más altas de Aroclor 1254, se estudió la posibilidad de que ésta se deba a la inducción de apoptosis. Para ello se realizó un análisis cuantitativo del porcentaje de células viables, en apoptosis (temprana y tardía) y necrosis, mediante marcaje con yoduro de propidio y anexina V-FITC y posterior citometría de flujo. Se observó que el Aroclor 1254 induce apoptosis en las líneas MCF-7/AZ y HT-144 a las 48 h de exposición. Ambas líneas mostraron en torno a un 30% de células en apoptosis en presencia del contaminante. Estos datos concuerdan con los resultados del ensayo de MTT en el que puede verse una notable pérdida de viabilidad en ambas líneas tumorales para la concentración de 5 µg/ml. En A375 y MCF-7/6 no se observa apoptosis, ya que estas líneas no mostraron pérdida de viabilidad con la dosis de 5 µg/ml hasta las 72 h de exposición, mientras que el ensayo de apoptosis se realizó a tiempo 48 h. También se investigó la posibilidad de que la exposición a la contaminación ambiental por PCBs pudiera inducir alteraciones en el ciclo celular y perturbar la proliferación. Sin embargo, la exposición a una concentración de 5 µg/ml de Aroclor 1254 durante 48 h no provocó alteración alguna sobre la progresión del ciclo celular en las líneas tumorales estudiadas. Todos estos experimentos muestran que el efecto de las diferentes concentraciones de PCBs sobre la viabilidad, proliferación e inducción de apoptosis varía dependiendo del tipo celular analizado.

Ciertos artículos sugieren una posible correlación entre la exposición ambiental a PCBs y el riesgo de padecer cánceres más agresivos y una peor prognosis (Parada *et al.*, 2016; Woolcott *et al.*, 2001). Para determinar si la exposición a PCBs es capaz de alterar y promover el potencial invasivo y la capacidad de migración de las células tumorales, realizamos ensayos de invasión en colágeno tipo I, Matrigel y ensayos de cicatrización celular. Cuando se emplea el término de invasividad en el cáncer, se refiere a la capacidad de las células tumorales para alterar la matriz extracelular y penetrar en el estroma subyacente. El ensayo con geles de colágeno tipo I y Matrigel nos permite conocer la capacidad de invasión tumoral en los dos tipos principales de matriz extracelular existentes, la membrana basal y la matriz intersticial. El colágeno tipo I es el principal componente de la matriz intersticial del tejido conectivo. Por otro lado, el Matrigel es una preparación de membrana basal solubilizada rica en laminina, colágeno tipo IV, proteoglicanos, entactina y nidógeno.

Un paso crítico en las metástasis es la invasión de las membranas basales. Las membranas basales son láminas delgadas y continuas de matriz extracelular que representan una barrera para el paso de macromoléculas y células (Albini, 1998). En el

ensayo de invasión en Matrigel se observó un fortísimo incremento (hasta 5 veces superior al control) en la invasividad celular para todas las líneas y concentraciones de Aroclor 1254 estudiadas. Las líneas celulares HT-144, A375 y MCF-7/6 expuestas a la mezcla ambiental de PCBs presentaron un potencial invasivo hasta 5, 4 y 3 veces superior al control respectivamente. En HT-144 el efecto pro invasivo a la concentración más alta ensayada (5  $\mu$ /ml) fue notablemente inferior al resto de concentraciones, presumiblemente debido al efecto citotóxico mencionado con anterioridad. De forma adicional, se decidió estudiar el efecto de medios condicionados por células cultivadas en presencia de PCBs sobre la invasividad. La exposición al medio condicionado por A375 en presencia de 1  $\mu$ g/ml de Aroclor 1254 incrementó de forma significativa la invasividad de estas células, que vieron triplicado su potencial metastático.

La membrana basal se encuentra estrechamente conectada a la matriz intersticial subyacente a través de diferentes fibrillas de colágeno (Theocharis *et al.*, 2019). El ensayo de invasión en colágeno tipo I es representativo de la invasividad tumoral, ya que el colágeno tipo I es el principal componente intersticial de la matriz en los tumores sólidos, con lo cual supone un método complementario al ensayo de Matrigel (De weber *et al.*, 2010). La exposición al tóxico incrementó significativamente la capacidad invasiva de las líneas tumorales para todas las dosis ensayadas. Tanto para HT-144 como para MCF-7/6, la exposición al Aroclor 1254 llegó a triplicar su potencial invasivo. Estos datos van en consonancia con los resultados obtenidos del ensayo de invasión en Matrigel. De ambos experimentos se concluye que los PCBs incrementan notablemente las características tumorigénicas y el potencial metastático de las células tumorales. Además, la exposición a la mezcla ambiental de PCBs es capaz de inducir la secreción al medio de factores quimioatrayentes que modulan el fenotipo celular promoviendo la motilidad e invasividad.

La migración celular es un proceso clave involucrado en diversos procesos biológicos entre los que se encuentran la formación del tejido, la inflamación y el cáncer. La migración, junto con la invasión y la adhesión celular son los pilares indispensables en el desarrollo y progresión del cáncer (Pijuan *et al.*, 2019). Se realizó un ensayo de cicatrización para medir la capacidad de migración celular *in vitro* de las líneas HT-144, MCF-7/6 y MCF-7/AZ en presencia del tóxico. Los resultados demostraron que la presencia de PCBs es capaz de promover la capacidad de migración de todas las líneas tumorales de forma significativa. Los PCBs incrementaron significativamente la tasa de migración a las tres concentraciones de tóxico estudiadas. El porcentaje de herida abierta disminuyó con el tiempo de manera dosis dependiente, siendo la dosis de 0.08  $\mu$ g/ml la que más incrementa la capacidad de migración de las células tumorales. En ambas líneas de carcinoma de mama la tasa de migración en presencia de Aroclor 1254 fue entre 2 y 3 veces superior al control. Las células HT-144 expuestas a 0.08  $\mu$ g/ml de Aroclor cuadruplicaron su capacidad de migración con respecto al control.

En conjunto, los ensayos de motilidad utilizados (Matrigel, colágeno tipo I y cicatrización celular) permiten generar datos cuantitativos capaces de describir el comportamiento migratorio de las células tumorales desde diferentes perspectivas (Pijuan *et al.*, 2019). De todos ellos se deduce que los PCBs son potentes inductores de la invasividad y migración tumoral, pudiendo contribuir de manera importante a la progresión del cáncer. El efecto sobre la motilidad celular promovido por la exposición a PCBs se observa tanto en las líneas de cáncer de mama como en las de melanoma. Esto sugiere además que la presencia del receptor de estrógeno y su señalización no es indispensable para el incremento en la invasión y migración mediadas por PCBs. Los resultados observados sobre la invasividad de las líneas de melanoma A375 y HT-144 apoya la teoría de autores como Gallagher *et al.*, 2011 que sugieren que existen factores ambientales diferentes de la radiación UV que juegan un papel en la génesis y progresión del melanoma, como es el caso de los PCBs.

Para que la invasión tenga lugar, las células tumorales deben crear pasajes a través de la ECM (Welch and Hurst, 2019). La remodelación de la matriz mediante la ruptura gradual de sus componentes contribuye a la progresión del cáncer mediante el incremento en la movilidad de las células tumorales (Yuzhalim, Lim *et al.*, 2018). Esta degradación/remodelación de la ECM se considera una etapa clave para la migración, invasión y metástasis de las células cancerígenas. Las metaloproteasas de la matriz son las principales enzimas proteolíticas encargadas de la degradación y remodelación de la ECM (Bozzuto *et al.*, 2010). Las MMPs son capaces de degradar de forma conjunta todas las proteínas de la matriz extracelular (Bonnans *et al.*, 2014). El nivel de MMPs suele ser elevado en la mayor parte de los cánceres, donde se asocia con un peor pronóstico de la enfermedad (Fares *et al.*, 2020). La secreción de MMP-2 y MMP-9 es elevada en diversos tipos de cáncer, entre los que se encuentran el cáncer de ovario, de mama, próstata y melanoma. Se cree que ambas gelatinasas juegan un papel clave en la degradación de la gelatina y el colágeno tipo IV, componentes principales de la ECM (Roomi *et al.*, 2009). Es por ello por lo que realizamos ensayos de zimografía para determinar si la expresión de estas dos gelatinasas es la responsable del incremento en la capacidad de migración e invasión observada bajo la presencia de PCBs. Los resultados de la zimografía muestran un importante incremento en la actividad de MMP-2 y de MMP-9 tras la exposición al Aroclor 1254, llegando a duplicar los valores del control. Por lo que el aumento en la capacidad metastática observado previamente parece ser debido a la actividad de estas dos gelatinasas. Se trata de un dato relevante dado que diversos estudios han documentado que un incremento en los niveles de MMP-2 y MMP-9 se correlaciona con un aumento en la agresividad del cáncer, sirviendo como factor pronóstico de la enfermedad (Roomi *et al.*, 2009). Nuestros resultados apoyan los resultados de otros autores que documentan la inducción de MMPs tras la exposición a PCBs en diferentes tipos de cáncer. Se ha descrito un incremento en la expresión de MMP-9 en la línea celular de hepatoma HepG2 (Yufang *et al.*, 2015) y de MMP-2 y MMP-9 en líneas tumorales de cáncer de próstata (Ali *et al.*,

2016). Por otro lado, Leijts *et al.*, 2021 encontraron una correlación positiva entre una mayor expresión de MMP-9 en biopsias de piel de trabajadores especialmente expuestos a PCBs y niveles elevados de PCBs en plasma. Los resultados obtenidos en esta tesis confirmarían que los PCBs son capaces de inducir la expresión de MMPs en este tipo de tejidos. Debemos tener en cuenta que la importancia de las MMPs va más allá del papel que juegan destruyendo la restrictiva barrera que supone la matriz extracelular. Las MMPs facilitan, además, cambios estructurales que permiten la exposición de sitios críticos funcionales que regulan el comportamiento invasivo. Por otro lado, la degradación de la matriz extracelular puede liberar localmente factores de crecimiento y moléculas de señalización que contribuyen a la migración y al crecimiento del tumor e incrementan la angiogénesis aberrante (Theocharis *et al.*, 2019; Yuzhalim, Lim *et al.*, 2018). Es conocido que proteasas como la MMP-9 facilitan la liberación de VEGF secuestrado en la matriz extracelular, incrementando por tanto su biodisponibilidad local. Se ha descrito que este VEGF liberado estimularía la permeabilidad vascular y la angiogénesis (Cretu and Brooks, 2007). También se ha descrito que la degradación de la ECM mediada por la MMP-2 libera la forma activa de TGF- $\beta$ , el cual es capaz de modular la invasión, la respuesta inmune y la proliferación celular (Walker *et al.*, 2018). Visto en conjunto, el incremento en la actividad gelatinasa detectado sería el responsable de promover la progresión del cáncer tras la exposición ambiental a PCBs y además, potencialmente podría liberar factores de crecimiento, que en última instancia estimularían la angiogénesis aberrante y el crecimiento del tumor *in vivo*.

Para que la cascada metastática tenga lugar, las células tumorales además de remodelar la matriz extracelular deben alterar las adhesiones célula-célula y célula-matriz (Welch and Hurst, 2019). El tejido epitelial normal tiene contactos célula-célula que son los responsables del correcto desarrollo, homeostasis y arquitectura del epitelio. Las células tumorales epiteliales pierden esta restricción en las últimas etapas de la tumorigénesis al mismo tiempo que pierden sus características epiteliales y adquieren motilidad. Esta conversión en el fenotipo es lo que se conoce como transición epitelio-mesénquima (Boyer *et al.*, 2000). Durante este proceso, las células pierden sus características epiteliales y adquieren propiedades de células mesenquimales. La EMT se asocia con una disminución en la expresión de marcadores epiteliales como la E-cadherina y con un aumento de marcadores mesenquimales como la N-cadherina y la vimentina. El cambio en la expresión de las moléculas de adhesión hace que las células se separen del epitelio y adquieran la habilidad de migrar a zonas distantes (Mikesh *et al.*, 2010). Para comprobar si la transición epitelio-mesénquima es responsable junto con la secreción de MMPs del incremento en la invasividad observado bajo la exposición ambiental a PCBs, realizamos ensayos de *western blot* para verificar cambios en los patrones de expresión de marcadores epiteliales (E-cadherina) y mesenquimales (N-cadherina y vimentina). Debemos de tener en cuenta que aunque los melanocitos no se consideran epiteliales, la migración

de los melanocitos desde la cresta neural del ectodermo está facilitada por un fenotipo mesenquimal transitorio. Al igual que las células epiteliales, los melanocitos adultos expresan E-cadherina. Los melanocitos adultos son negativos para la N-cadherina, pero las células de melanoma pueden expresarla. En las células de melanoma se ha descrito también un cambio en la expresión de E-cadherina a N-cadherina. Además, las células de melanoma son capaces de expresar la proteína mesenquimal vimentina, lo cual sugiere que cierto grado de transición mesenquimal puede ser constitutivo de algunos melanomas. En nuestro caso tanto las células de melanoma A375 como HT-144 control son positivas para los 3 marcadores (E-cadherina, N-cadherina y vimentina) estudiados. La exposición al Aroclor 1254 incrementa significativamente la expresión de los marcadores mesenquimales N-cadherina y vimentina en todas las líneas tumorales de estudio y para las tres dosis de Aroclor 1254 ensayadas. La expresión de N-cadherina llega a ser 8 y 4 veces superior al control en HT-144 y A375 respectivamente. En las líneas de cáncer de mama, la expresión de N-cadherina llega a triplicar los valores del control. MCF-7/6 y A375 son las líneas que más incrementan la expresión del filamento intermedio mesenquimal vimentina (4 y 3 veces respectivamente). Tomado en conjunto, la exposición a PCBs incrementa notablemente la expresión de marcadores mesenquimales asociados a un fenotipo migratorio y agresivo. Durante la EMT el estatus de los filamentos intermedios cambia de una red rica en queratina, que se conecta a uniones adherentes y hemidesmosomas, a una red rica en vimentina que se conecta a adhesiones focales (Kokkinos *et al.*, 2007). La expresión de vimentina se ha asociado con una peor prognosis en numerosos tipos de cáncer, entre los que se encuentran el cáncer de mama y el melanoma, donde la expresión de este marcador mesenquimal se localiza preferentemente en estadios avanzados y se correlaciona con la malignidad (Liu *et al.*, 2015; Korsching *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010; Kokkinos *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 1996; Domagala *et al.*, 1990). Se ha documentado que la expresión de N-cadherina es mayor en células de melanoma metastático en comparación con las del no metastático, sugiriendo una posible asociación entre la transición mesenquimal y el potencial metastático del melanoma. En el melanoma, la N-cadherina permite la unión de las células de melanoma a fibroblastos dérmicos y a las células endoteliales vasculares en el estroma tumoral, lo cual facilitaría la metástasis (Mikesh *et al.*, 2010). De modo que el intercambio de cadherinas, de la E- a la N-cadherina, durante el desarrollo del melanoma libera a estas células melanocíticas del control que ejercen los queratinocitos y además confiere una ventaja metastática a las células de melanoma. Por otro lado, la interacción celular mediada por N-cadherina promueve la supervivencia en las células de melanoma, incrementando la viabilidad y resistencia a la apoptosis (Li *et al.*, 2001; Alonso *et al.*, 2007). La expresión de N-cadherina en el carcinoma de mama también está asociada con una mayor agresividad del tumor y un mayor potencial para metastatizar, contribuyendo a la progresión del tumor (Nagi *et al.*, 2005; Hazan *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007). Con respecto a la E-cadherina, el patrón observado difiere entre las líneas obtenidas de metástasis y/o con mayor

potencial invasivo (HT-144 y MCF-7/6) y las líneas derivadas de tumor primario y menor capacidad invasiva (A375 y MCF-7/AZ). En A375 y MCF-7/AZ, la expresión de E-cadherina disminuyó hasta un 50-60% del valor de referencia control, mientras que en las variantes más metastáticas HT-144 y MCF-7/6 la expresión de E-cadherina aumenta significativamente. Tras la exposición a la mezcla de PCBs, la expresión de E-cadherina llegó a cuadruplicar su valor en MCF-7/6 y a duplicar su valor en HT-144 con respecto al control. En la literatura científica está documentado que durante la progresión del melanoma y el carcinoma de mama se observa una pérdida gradual en la expresión de E-cadherina (Li *et al.*, 2001; Oka *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 2001). Si bien está descrito que la pérdida de E-cadherina en células de melanoma y carcinoma de mama contribuye al fenotipo invasivo y al potencial metastático (Mikesh *et al.*, 2010; Sommers *et al.*, 1994; Rakha *et al.*, 2005), también hay estudios que señalan que la expresión de E-cadherina o la coexpresión de E-cadherina y marcadores mesenquimales (N-cadherina y vimentina) se traduce en cánceres con un mayor grado histológico, una peor prognosis, mayor quimiorresistencia y por tanto menor tasa de supervivencia que aquellos tumores que muestran el intercambio de cadherinas clásico (de E- a N-cadherina) (Karsten *et al.*, 2021; Yoshida *et al.*, 2001; Yamashita *et al.*, 2018; Loh *et al.*, 2019; Padmanaban *et al.*, 2019). Según diversos autores, la reducción o pérdida de expresión de E-cadherina parece estar asociada con el potencial de metastatizar a distancia (Yoshida *et al.*, 2001), mientras que la expresión de E-cadherina no solo es capaz de promover la metástasis, sino que además se correlacionaría con una mayor tasa de recurrencia del tumor, menor tiempo de recurrencia y una menor tasa de supervivencia que la de aquellos cánceres que muestran disminución o pérdida de E-cadherina (Karsten *et al.*, 2021; Yamashita *et al.*, 2018). Autores como Yamashita *et al.*, 2018 detectaron en su estudio, llevado a cabo con cáncer de mama, que la expresión de E-cadherina era mayor en las metástasis que en sus respectivos tumores primarios para la mitad de los casos estudiados. Además, observaron que las muestras que presentaban una elevada expresión de E-cadherina y que eran positivas para vimentina (E-cadherina+/vimentina+) se asociaban con el fenotipo más agresivo y la peor prognosis de todas las combinaciones posibles (E-cadherina+/vimentina-; E-cadherina-/vimentina+; E-cadherina-/vimentina-), tanto en tumores primarios como en las metástasis. Nuestros datos concuerdan con los de Yamashita *et al.*, 2018 ya que el incremento en la expresión de E-cadherina que observamos se da únicamente en las variantes HT-144 y MCF-7/6. Por otro lado, al igual que observan estos autores, tanto HT-144 como MCF-7/6 presentan un incremento en E-cadherina y vimentina, con lo que la agresividad de estas líneas podría ser aún mayor que las que presentan sus homólogas A375 y MCF-7/AZ tras la exposición a PCBs. Para otros autores, como Nieman *et al.*, 1999, la expresión de N-cadherina es dominante sobre la de E-cadherina, ya que observan que incluso en células de cáncer de mama que presentan altos niveles de E-cadherina, el incremento en la expresión de N-cadherina es capaz de promover la motilidad. Hazan *et al.*, 2000

obtuvieron resultados similares. Estos investigadores transfectaron con N-cadherina células MCF-7 poco metastáticas y que expresaban E-cadherina. Las células transfectadas resultantes expresaban ambas cadherinas y vieron que migraban más eficientemente, eran más invasivas en Matrigel, se adherían más eficientemente a monocapas de células endoteliales y eran capaces de metastatizar a gran diversidad de órganos, al contrario que la línea original. Según Hazan *et al.*, 2000, la explicación podría ser o bien un efecto dominante de la N- sobre la E-cadherina, debido a un mayor ratio N-/E-cadherina, o bien que la N-cadherina sea capaz de activar una ruta metastática coordinada por MMP-9 que sea capaz de evitar la señal supresiva de E-cadherina. El fenotipo encontrado en HT-144 y MCF-7/6, que muestran un incremento de E- y N-cadherina y vimentina, puede ser explicado desde el punto de vista de la EMT-MET parcial. Se ha postulado recientemente que la transición fenotípica entre el estado epitelial y mesenquimal no es un proceso binario como típicamente se había asumido (Jolly *et al.*, 2017). La EMT y su opuesto el MET son procesos complejos y graduales, en los cuales las células experimentan diferentes estados de transición durante el desarrollo del tumor. Estos fenotipos "híbridos" están definidos por diferentes combinaciones de marcadores mesenquimales y epiteliales y pueden ser más tumorigénicos y quimiorresistentes que las células tumorales con fenotipo predominantemente mesenquimal o epitelial (Loh *et al.*, 2019; Karsten *et al.*, 2021; Campbell and Casanova, 2016). El máximo potencial tumorigénico posible y la mayor capacidad de quimiorresistencia estarían asociados a estas células híbridas que coexpresan marcadores epiteliales y mesenquimales (Jolly *et al.*, 2017). Un ejemplo de ello es que la re-expresión de E-cadherina en las metástasis activa señales de supervivencia, suprime la anoikis e incrementa la resistencia de las células tumorales a la muerte celular inducida por agentes quimioterápicos (Yao *et al.*, 2011; Chao *et al.*, 2010). En las células tumorales circulantes, la coexpresión de marcadores epiteliales y mesenquimales hace que estas células sean más resistentes a la apoptosis y que extravasen del sistema circulatorio de forma más eficiente (Jolly *et al.*, 2015). De modo que en nuestro caso, el incremento en la expresión de N-cadherina y vimentina sería dominante sobre la E-cadherina para promover el fenotipo invasivo, mientras que el incremento en la expresión de E-cadherina podría conferir adicionalmente una ventaja de supervivencia, inhibiendo la anoikis e incrementando la resistencia a la muerte celular inducida por agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer. La exposición a la mezcla ambiental de PCBs induce la transición epitelio-mesénquima a través del incremento en la expresión de los marcadores mesenquimales N-cadherina y vimentina, ambos asociados a cánceres más agresivos. Las líneas A375 y MCF-7/AZ muestran el patrón clásico de EMT con el intercambio de E- a N-cadherina, mientras que HT-144 y MCF-7/6 muestran una EMT parcial con la expresión conjunta de marcadores epiteliales y mesenquimales que se ha demostrado tener una mayor tasa de recurrencia y una menor tasa de supervivencia que incluso aquellas células que muestran pérdida de E-cadherina. De forma conjunta, la exposición a PCBs incrementa



sobremanera el fenotipo migratorio e invasivo de las líneas tumorales, dando lugar a tumores más agresivos y con un peor pronóstico.

Durante la EMT se alteran las uniones celulares, las células pierden su polaridad, expresan marcadores mesenquimales y se reorganiza el citoesqueleto de actina. Como resultado, las células tumorales pierden el contacto con las células vecinas, adquieren motilidad, interaccionan con la matriz extracelular, invaden territorios adyacentes y adquieren la capacidad de metastatizar (Alonso *et al.*, 2007). Las Rho GTPasas son las principales proteínas que activan la maquinaria de motilidad celular a través de la reorganización del citoesqueleto en las células tumorales. Esta reorganización es necesaria para la adquisición de las propiedades migratorias. Las Rho GTPasas mejor caracterizadas son Rho, Rac y Cdc42. Estas GTPasas actúan como interruptores moleculares, alternando entre un estado inactivo de unión a GDP y un estado activo de unión a GTP, controlando por tanto las dinámicas y el ensamblaje de la actina. La maquinaria de locomoción está gobernada por un lado por Cdc42 y Rac y por otro lado por Rho. Rac y Cdc42 promueven la polimerización de actina en el frente celular para formar protrusiones activas, lamelipodios y filopodios respectivamente. Rho regula el ensamblaje de los filamentos de actina-miosina generando fuerzas de tracción en el córtex celular y en la parte trasera (Guarino, 2007). Las células exhiben distintos tipos de estrategias de migración en ambientes tridimensionales. El movimiento tipo mesenquimal se caracteriza por una forma celular más elongada, requiere de proteólisis celular y depende de la polarización celular mediada por la distribución espacial de cdc42 y de la formación de lamelipodios por Rac. En el movimiento ameboide las células presentan una morfología más redondeada, no requieren de la polarización de la célula mediada por Rac pero si de una prominente activación de Rho. La señalización del movimiento ameboide conduce a la desregulación del movimiento mesenquimal preferentemente a través de la inhibición de Rac1. Las células tumorales muestran una elevada plasticidad, cambiando según la necesidad entre el movimiento mesenquimal y el ameboide o bien presentando fenotipos intermedios (Parri and Chiarugi, 2010; Gandalovičová *et al.*, 2016).

Para conocer la implicación de las Rho GTPasas en el incremento de la motilidad tumoral mediado por la exposición a PCBs, realizamos ensayos de inmunoprecipitación y *western blot* para determinar la existencia de cambios en los patrones de activación de RhoA, cdc42 y Rac1. Observamos que la exposición ambiental a PCBs incrementa sobremanera la activación de RhoA en todas las líneas tumorales y para todas las dosis estudiadas. En las líneas de melanoma A375 y HT-144 la activación de RhoA llega a ser 37 y 14 veces superior al control respectivamente. En las líneas de cáncer de mama la activación de RhoA llega a ser 11 veces superior al control en ambos casos. Lo cual sugiere que es la activación de RhoA la que domina la reorganización del citoesqueleto tras la exposición al Aroclor 1254. En lo que a la activación de Cdc42 refiere, esta se incrementa notablemente en A375 y ligeramente en MCF-7/6, disminuye en MCF-7/AZ

y se mantiene estable en HT-144. La activación de Rac1 cae en las variantes A375 y MCF-7/AZ a un 20% del valor control. En HT-144 y MCF-7/6 la actividad del principal señalizador del movimiento mesenquimal, Rac1, se incrementa hasta llegar a valores 4 y 8 veces superiores al control respectivamente. La transición desde el estado epitelial diferenciado a un estado migratorio e invasivo es un proceso gradual durante el cual las células tumorales adquieren diversos modos de invasión. El estado no móvil está representado por las células epiteliales diferenciadas. La adquisición de un fenotipo invasivo es el resultado de un proceso de múltiples pasos que tiene lugar en las células tumorales que experimentan la EMT. Las células que sufren la EMT pierden la polaridad apico-basal y migran de modo mesenquimal. Estas células que presentan movimiento tipo mesenquimal pueden perder a su vez dependencia de la ECM e incrementar la contractilidad de la actomiosina y experimentar una transición mesenquimal-ameboide (MAT), de modo que son capaces de invadir de modo ameboide. En el movimiento tipo mesenquimal, la actividad de Rac y Cdc42, localizadas en el frente celular, se incrementa para generar y extender lamelipodios y/o filopodios, mientras que RhoA se localiza en la parte trasera de la célula para generar el movimiento de contracción/retracción. El movimiento tipo ameboide requiere una elevada actividad de RhoA, ya que depende de la fuerza propulsora de la contractilidad del citoesqueleto de actomiosina, y una disminución en la actividad de Rac y Cdc42. Es característico del movimiento ameboide que la actividad de RhoA esté distribuida por todo el córtex celular para promover una rápida remodelación. Según autores como Gandalovičová *et al.*, 2016, si percibimos la EMT como un conjunto de pasos reversibles e interconvertibles, veremos que los distintos tipos de invasión tumoral asemejan a su vez a un determinado paso de la EMT. De este modo, los distintos tipos de invasión marcan una desdiferenciación gradual que acompaña la pérdida de las características epiteliales. Según el modelo propuesto por estos autores, en el nivel de desdiferenciación más bajo se produce una migración colectiva con ganancia de algunas características mesenquimales. En el nivel intermedio tenemos las células que han completado la EMT y adquieren un modo de invasión tipo mesenquimal, pero que aún forman activamente adhesiones con la ECM. Finalmente, en el nivel de mayor desdiferenciación tenemos a las células que utilizan el tipo de movimiento ameboide y que presentan una dependencia reducida o transitoria a la adhesión tanto célula-célula como célula-ECM. Las células que migran de un modo son a menudo capaces de emplear otro modo, y es precisamente esta plasticidad en la modalidad de migración la responsable en parte de la problemática del cáncer (Gandalovičová *et al.*, 2016). Nuestros resultados muestran que los PCBs son capaces de alterar el balance de las Rho GTPasas Cdc42, Rac1 y RhoA, incrementando sobremanera la actividad de RhoA, conductora de la invasión ameboide. Los modos de invasión mesenquimal y ameboide son conducidos por un incremento en la señalización de Rac y RhoA respectivamente (Gandalovičová *et al.*, 2016), existiendo híbridos intermedios que presentan elevados niveles de RhoA y Rac (Huang *et al.*, 2014). En nuestro caso, MCF-7/AZ presenta una

clara transición a un fenotipo ameboide (RhoA $\uparrow$ , Cdc42 $\downarrow$  y Rac1 $\downarrow$ ), con una elevada activación de RhoA e inhibición de Rac1 y Cdc42. A375 presenta un patrón RhoA $\uparrow$ , Cdc42 $\uparrow$  y Rac1 $\downarrow$ . El incremento en la activación de Cdc42 en líneas de melanoma se ha relacionado tanto con el fenotipo ameboide, donde contribuye a la contractilidad de la actomiosina, como con el fenotipo mesenquimal (Gadea *et al.*, 2008). En este caso vemos que el incremento de Cdc42 se acompaña del aumento en la actividad de RhoA y la inhibición de Rac1, indicadores de una transición ameboide. Por ello sugerimos que la expresión de Cdc42 en esta línea contribuye a la contractilidad del citoesqueleto de actomiosina en el tipo de movimiento ameboide. HT-144 (RhoA $\uparrow$ , Cdc42= y Rac1 $\uparrow$ ) y MCF-7/6 (RhoA $\uparrow$ , Cdc42 $\uparrow$  y Rac1 $\uparrow$ ) muestran una transición parcial (MAT parcial) hacia el movimiento ameboide, con fenotipos híbridos ameboide-mesenquimal que pueden presentar diferentes morfologías entre las que se encuentran lamelipodios con *blebs* y lobopodios (Huang *et al.*, 2014). La exposición a la mezcla ambiental de PCBs conduciría a las variantes A375 y MCF-7/AZ a experimentar una transición al fenotipo ameboide, un estado más desdiferenciado que el fenotipo puro mesenquimal. En el melanoma, la adquisición del fenotipo ameboide se ha asociado a características similares a las de células madre (Taddei *et al.*, 2014). Además, se ha descrito que la sobreexpresión de RhoA en células de melanoma promueve la radiorresistencia (Zeng *et al.*, 2020). En HT-144 y MCF-7/6 esta transición sería parcial presentando un fenotipo combinado con características tanto mesenquimales como ameboides que las confiere gran plasticidad y habilidad de adaptación. Por último, destacar que las variantes que presentan el fenotipo híbrido mesenquimal/ameboide (A375 y HT-144) coinciden con aquellas que presentaban una transición epitelio-mesénquima parcial, con marcadores tanto epiteliales como mesenquimales. Una de las explicaciones posibles se atribuye a que la formación de adhesiones celulares mediadas por E-cadherina se ha descrito que induce la activación de Rac1 (Nakagawa *et al.*, 2001).

La señalización de RhoA activa la familia de quinasas ROCK. La ruta Rho/ROCK promueve la formación de fibras de estrés de actina y la generación de la fuerza contráctil de actomiosina, necesaria para la retracción de la parte trasera en el tipo de movimiento mesenquimal. En el movimiento ameboide, unos altos niveles de señalización RhoA/ROCK generan el ensamblaje de la actina cortical y altos niveles de contractilidad de la actomiosina (Gadea *et al.*, 2008). Rho/ROCK activan la contracción de la actomiosina promoviendo la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC). ROCK activa la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), la cual a su vez fosforila MLC, activando de este modo la actividad motora de la miosina II. Además, ROCK inhibe la actividad de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) que desfosforila MLC. ROCK también contribuye a la localización de MLC en los haces de actina del córtex celular. Estos haces se orientan de forma perpendicular a la dirección del movimiento para generar la fuerza necesaria para el movimiento. De forma general, la ruta RhoA/ROCK controla el ratio entre MLC fosforilada y no fosforilada, que es lo que determina el nivel de contractilidad celular (Gandalovičová *et al.*, 2016). Es

por ello por lo que una elevada expresión de ROCK está asociada a estadios avanzados en el cáncer (Li *et al.*, 2010; Mokady and Meiri, 2015). Debido a la llamativa sobre activación de RhoA inducida por PCBs y a la importancia de la señalización RhoA/ROCK, tanto en el movimiento ameboide como mesenquimal, nos planteamos determinar si la inhibición de ROCK podría revertir los efectos proinvasivos inducidos por la mezcla ambiental del tóxico. Para ello, tratamos las células tumorales expuestas a Aroclor 1254 (1 µg/ml) con un inhibidor específico de ROCK (Y27632) y verificamos su capacidad invasiva en comparación con las células control (sin tratamiento Y27632 ni Aroclor 1254) y con células expuestas a Aroclor 1254 sin Y27632. Observamos que el tratamiento con Y27632 revirtió completamente el incremento en la invasividad promovido por los PCBs, rebajándolo a niveles equiparables a los de las células control. Por tanto, la señalización RhoA/ROCK es responsable del efecto proinvasivo observado y necesaria para el avance en la progresión tumoral inducido por PCBs.

La exposición ambiental a PCBs promueve notablemente las capacidades invasivas y metastáticas de las células tumorales de cáncer de mama y melanoma y, por tanto, la progresión y el avance de la enfermedad. La exposición a estos contaminantes persistentes induce la secreción de las MMP-2 y MMP-9, lo que les permite la degradación y remodelación de la matriz extracelular para facilitar la invasión local y a distancia. De forma simultánea, se favorece la transición epitelio-mesenquima a través del incremento en la expresión de los marcadores mesenquimales vimentina y N-cadherina, asociados a un fenotipo migratorio. Además, tras la exposición, se alteran las dinámicas celulares a través de un notable incremento en la señalización de RhoA para potenciar la motilidad a través de la estrategia de movimiento ameboide y ameboide/mesenquimal. La inhibición de ROCK supone una aproximación terapéutica para el tratamiento del cáncer influenciado por la exposición a PCBs. La riqueza en la plasticidad del fenotipo confiere a las células tumorales gran plasticidad durante la migración y la capacidad de adaptación a cambios en el microambiente, jugando un papel importante en la diseminación del cáncer. El efecto proinvasivo observado es independiente de la señalización del receptor de estrógeno. La exposición a los PCBs se asocia por tanto con la expresión de marcadores indicadores de una peor prognosis en los pacientes con cáncer y por tanto con una menor tasa de supervivencia.

Mientras que la contaminación ambiental frecuentemente evoca una relación con el cáncer y las enfermedades pulmonares, también se deben de tener en consideración las enfermedades cardiovasculares, debido a la elevada mortalidad que causan a nivel mundial. Conocer el impacto de la exposición ambiental en el cáncer y las enfermedades cardiovasculares nos permitirá tener una mayor comprensión del coste humano que ha tenido el desarrollo económico. Cada vez existe una mayor evidencia de la asociación entre la exposición a contaminantes ambientales y el desarrollo de CVD. Sin embargo, es necesaria una mayor investigación para caracterizar mejor el

alcance de la exposición ambiental en la población adulta e infantil (Burroughs Peña and Rollins, 2017).

Las enfermedades cardíacas no sólo son la principal causa de mortalidad en adultos, sino también durante la infancia. En la mayor parte de los casos, la patología que subyace es la pérdida de cardiomiocitos, que conduce a un fallo cardíaco o un desarrollo inadecuado de los cardiomiocitos durante la embriogénesis, lo que provoca malformaciones cardíacas congénitas. Los cardiomiocitos postnatales tienen poca o nula capacidad de regeneración, con lo que las aproximaciones terapéuticas en la actualidad son muy limitadas (Ieda *et al.*, 2010). El periodo de desarrollo fetal es crítico para el correcto desarrollo del corazón, debido a la sensibilidad del feto y a que la capacidad para absorber contaminantes ambientales es mayor que en los adultos (Li *et al.*, 2014). Debido a la creciente asociación entre los contaminantes ambientales y las enfermedades cardíacas y a la importancia del correcto desarrollo de los cardiomiocitos durante la embriogénesis para evitar un fallo cardíaco o malformaciones en el feto, decidimos estudiar el efecto de la exposición a la mezcla ambiental de PCBs (Aroclor 1254) durante el desarrollo embrionario cardíaco *in vitro*.

Para el estudio del efecto de la exposición a PCBs durante el desarrollo embrionario cardíaco, empleamos un modelo *in vitro* de diferenciación a cardiomiocito a partir de células ES que se considera equivalente al desarrollo embrionario cardíaco hasta el momento postnatal. La rápida diferenciación de las células ES *in vitro*, junto con las propiedades electrofisiológicas y contráctiles de los cardiomiocitos derivados, nos permiten evaluar el potencial embriotóxico de contaminantes ambientales como los PCBs, sin las dificultades asociadas a los estudios *in vivo*. En comparación con los ensayos *in vivo*, nuestro modelo *in vitro* nos permite una definición más precisa de los efectos del contaminante en un tipo celular específico. Por ejemplo, en comparación con el corazón entero, permite medir el efecto específicamente sobre la población de cardiomiocitos. Además, el modelo *in vitro* nos facilita la identificación de efectos primarios que *in vivo* serían más difíciles de distinguir de los efectos secundarios originados por daños en otros tejidos u órganos. Por último, nuestro modelo de diferenciación *in vitro* permite investigar con menos limitaciones los efectos de los PCBs en las distintas fases clave del desarrollo embrionario (Neri *et al.*, 2011; Rebuzzini *et al.*, 2021). Debemos de tener en cuenta también que los modelos de investigación toxicológica *in vitro* tienen algunas limitaciones. Una de estas limitaciones es la ausencia de un metabolismo sistémico en las condiciones de cultivo. Las reacciones sistémicas no se pueden simular *in vitro* debido a la ausencia de interacciones entre diferentes tipos celulares (Kim *et al.*, 2019).

En este trabajo se han empleado células madre embrionarias murinas para el ensayo de diferenciación. La exposición a diferentes concentraciones de Aroclor 1254 (0.1, 0.5, 1 y 2 µg/ml) se da desde el día 0, con la siembra de las microgotas para la formación de

los cuerpos embrioides, hasta la fase terminal de la diferenciación con la obtención de los cardiomiocitos maduros (día 15). La selección de las dosis empleadas se basa en que el valor medio de la exposición en útero se ha visto que es aproximadamente de 1  $\mu\text{g/ml}$  y de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  en la leche de madres lactantes, con un nivel máximo detectado de 2  $\mu\text{g/ml}$  (Zietz *et al.*, 2008). Otros autores como Grandjean *et al.*, 2001 detectan un valor medio de 1  $\mu\text{g/ml}$  en cordón umbilical, siendo el valor mínimo detectado de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . Por ello decidimos emplear las dosis de 0.1, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{g/ml}$ .

En primer lugar, se estudió si el tratamiento con Aroclor 1254 inducía alteraciones en el tamaño de los cuerpos embrioides a día 3 de la diferenciación, pero no se detectaron cambios significativos entre el tamaño de los cuerpos embrioides control y tratados con PCBs. Posteriormente, decidimos comprobar si la exposición a dicho contaminante ambiental durante el desarrollo embrionario es capaz de alterar la cinética y las propiedades contráctiles del sincitio cardíaco latiente. A día 15 de la diferenciación, se analizaron los vídeos obtenidos de los sincitios latientes para cada tratamiento. Estos vídeos se analizaron con el programa VST y se procesaron con el procesamiento de imagen desarrollado por ingenieros de la Universidad de Pavía (Italia) (Fassina *et al.*, 2011), lo que nos permitió estimar el efecto ergotrópico (consumo de energía, ATP, para generar la contracción), el efecto cronotrópico (frecuencia cardíaca) y el efecto inotrópico (contractilidad y fuerza de contracción del sincitio). La exposición a la mezcla ambiental de PCBs durante el desarrollo del sincitio cardíaco produjo alteraciones significativas en los distintos parámetros de estudio. La dosis de 1  $\mu\text{g/ml}$ , que es la considerada como la exposición en útero y cordón umbilical (Zietz *et al.*, 2008; Grandjean *et al.*, 2001), incrementó en un 40% tanto la frecuencia cardíaca como la fuerza de contracción y disminuyó la contractilidad del sincitio sin modificar el gasto energético con respecto al control. La dosis más alta ensayada (2  $\mu\text{g/ml}$ ) incrementó sobremanera la frecuencia cardíaca, que resultó ser un 50% superior a la de los cardiomiocitos control. El resto de parámetros también resultaron afectados por el tratamiento de 2  $\mu\text{g/ml}$  de Aroclor 1254. A dicha dosis, se incrementaron la fuerza de contracción y la contractilidad y el gasto de ATP llegó a cuadruplicar el valor control. La exposición a las concentraciones de 0.1 y 0.5  $\mu\text{g/ml}$  no alteró ni la frecuencia cardíaca ni la fuerza de contracción de los sincitios, pero sí que fue capaz de disminuir significativamente la contractilidad en ambos casos, y además el gasto energético a la dosis de 0.1  $\mu\text{g/ml}$ . La contractilidad cayó en un 30% a la concentración de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  y un 20% a la dosis de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . Una de las primeras respuestas del miocardio a la exposición a contaminantes ambientales es la disfunción del metabolismo energético. Esta disfunción se traduce en un metabolismo energético aberrante, que tiene como consecuencia una disminución en la producción y/o un incremento en el consumo de ATP (Kang, 2001), como se observa para las dosis de 0.1 y 2  $\mu\text{g/ml}$  de Aroclor 1254 ensayadas. Las alteraciones observadas en la frecuencia cardíaca y en la contractilidad son especialmente indicativas del potencial embriotóxico de los PCBs. Por un lado, debemos recordar que las alteraciones en la frecuencia cardíaca afectan y van ligadas a

prácticamente a todas las etapas de las enfermedades cardiovasculares, desde los factores de riesgo cardiovascular a la insuficiencia cardíaca. Una elevada frecuencia cardíaca en reposo supone un factor de riesgo cardiovascular y, además, es un importante indicador pronóstico de mortalidad en enfermedades cardiovasculares como el infarto de miocardio y la insuficiencia cardíaca crónica, entre otras. Se ha documentado que los incrementos sostenidos en la frecuencia cardíaca juegan un papel directo en la patogénesis de la arteriosclerosis y lesiones en el miocardio, afectando a la iniciación y progresión de la enfermedad y contribuyendo a la precipitación de eventos vasculares (Reil *et al.*, 2011; Custodis *et al.*, 2013). En la literatura científica se recoge que el incremento de 10 latidos por minuto en la frecuencia cardíaca está asociado con un incremento de un 20% en el riesgo de muerte cardíaca (Perret-Guillaume *et al.*, 2009). Además, una elevada frecuencia cardíaca se considera como precursora de la obesidad, hipertensión y diabetes (Palatini, 2011). Por otro lado, la contractilidad se considera una característica inherente a los cardiomiocitos derivados de células ES. Las alteraciones en este parámetro son signos de alarma, ya que suelen reflejar trastornos tanto estructurales como funcionales en los sincitios cardíacos. Una reducción en los parámetros de contractilidad sugiere una posible disminución en la sincronización entre los cardiomiocitos y/o una alteración en su organización estructural. Es por ello por lo que decidimos analizar si la organización del sarcómero o la conducción del impulso eléctrico están afectados.

Para determinar si la exposición a PCBs ocasiona alteraciones en la organización estructural o en la conducción del impulso eléctrico decidimos analizar mediante inmunofluorescencia los marcadores sarcoméricos  $\alpha$ -actinina y troponina T y el marcador de superficie conexina 43. La troponina T y la  $\alpha$ -actinina son proteínas miofibrilares involucradas en la regulación y en el mantenimiento de la estructura miofibrilar, respectivamente. La  $\alpha$ -actinina es una proteína estructural localizada en las líneas Z del sarcómero (Adamcová *et al.*, 2006). La Troponina T es una proteína específica cardíaca localizada en los miofilamentos finos que regula la interacción de las cabezas de miosina con los filamentos finos para generar la fuerza de contracción del músculo cardíaco (Forough *et al.*, 2011; Adamcová *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 1995; Nishii *et al.*, 2008). Otro marcador importante es la conexina 43, proteína de superficie cardíaca implicada en la conducción del impulso eléctrico. Esta proteína forma hemicanales y uniones GAP dentro del corazón y además es visible en los discos intercalados del músculo cardíaco. Las uniones GAP permiten la conexión eléctrica y metabólica de los cardiomiocitos, proporcionando al tejido del miocardio un comportamiento de sincitio. Estas uniones están concentradas en los discos intercalados entre los miocitos (Forough *et al.*, 2011; Oliver-Gelabert *et al.*, 2020). La inmunofluorescencia realizada en los cardiomiocitos control a día 15 de diferenciación reveló que estos presentaban el característico patrón estriado del sarcómero y la presencia de uniones GAP, propios del miocardio especializado. Por el contrario, en los sincitios tratados con Aroclor 1254 se pierde la estriación típica del sarcómero para

todas las dosis estudiadas. Mediante el marcaje para  $\alpha$ -actinina y troponina T se observa que la exposición al contaminante ambiental produce alteraciones en la organización y orientación de ambas proteínas miofibrilares. La frecuencia en los sincitios de áreas con organización sarcomérica correcta disminuye de forma inversamente proporcional a la concentración de PCBs. De forma que a la dosis de 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Aroclor 1254, entre un 60-70% del sincitio cardíaco presenta la organización típica estriada, mientras que a las dosis más altas sólo un 40%. El marcaje de la conexina 43 no muestra diferencias entre control y tratamientos, con lo que la conducción del impulso eléctrico no parece estar comprometida. La disrupción de la estructura del sarcómero parece ser la responsable del efecto inotrópico negativo observado anteriormente.

La ultraestructura, la arquitectura miofibrilar y la longitud de los sarcómeros de los cardiomiocitos derivados de células ES murinas son similares a las de los cardiomiocitos de roedores neonatos (Boheler *et al.*, 2002), lo que permite hacer una extrapolación de los resultados obtenidos durante la diferenciación *in vitro* de los cardiomiocitos derivados de células ES a los de los cardiomiocitos neonatales murinos. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el efecto nocivo de los PCBs durante el desarrollo embrionario. Estos contaminantes persistentes incrementan la frecuencia cardíaca (efecto cronotrópico positivo) y son capaces además de alterar las propiedades contráctiles y ocasionar disfunciones en la organización estructural que afecta a los sarcómeros de los sincitios cardíacos. A la vista de los resultados obtenidos, podemos afirmar que la exposición ambiental a PCBs puede suponer un grave riesgo, ya que las alteraciones reportadas están ligadas estrechamente al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, obesidad, hipertensión y diabetes y a un incremento en el riesgo de mortalidad cardíaca.

Finalmente, decidimos verificar si los PCBs son capaces de alterar la expresión de distintos genes característicos del mesodermo (Brachyury) y del mesodermo cardíaco (GATA-4 y Nkx2.5) a lo largo del proceso de diferenciación de células ES a cardiomiocitos. Las células ES murinas se diferencian a cardiomiocitos a través de la formación de cuerpos embrioides, que recapitulan las distintas fases características del desarrollo fetal del corazón (Neri *et al.*, 2011). Los cambios en el patrón de expresión génica que sufren los cardiomiocitos durante el desarrollo *in vitro* ocurren de forma controlada, de modo que la diferenciación *in vitro* recapitularía los perfiles de expresión genética del desarrollo embrionario temprano y del desarrollo cardíaco. Los cuerpos embrioides derivados de células ES expresan por tanto transcritos de ARN característicos del desarrollo del ectodermo (Oct-4), endodermo (albumina), mesodermo (Brachyury) y tejido cardíaco (GATA-4, Nkx2.5 y conexina 43) (Boheler *et al.*, 2002). Estos cambios en la expresión se corresponden con las principales etapas de diferenciación: temprana (a los 4 días), intermedia (a los 7 días, con la formación de miofibrillas) y terminal (cardiomiocitos postnatales, de los 12 a 15 días) (Neri *et al.*,



2011; Rebuzzini *et al.*, 2015). En el análisis mediante Q-RT-PCR se observa un incremento en la expresión de Brachyury y GATA-4 a día 4, y de Nkx2.5 a día 7 de la diferenciación tras el tratamiento con Aroclor 1254. Si bien se trata sólo de una tendencia, ya que este incremento no resultó ser significativo. Borlak and Thum, 2002, trataron cultivos primarios de cardiomiocitos adultos y no detectaron tampoco alteración alguna en la expresión de Nkx2.5, pero sí un incremento significativo de GATA-4. Tras lo observado, podemos decir que los PCBs son compuestos cardiotóxicos que actúan alterando la cinemática y dinámica de los cardiomiocitos y causando una disfunción estructural en los sincitios, sin que se vea alterado de manera significativa el perfil de expresión génica durante el desarrollo cardíaco.

En la literatura, otros autores han reportado un efecto cardiotóxico de los PCBs. Wang *et al.*, 2021, reportaron alteraciones en el metabolismo cardíaco correlacionadas con el desarrollo de hipertrofia cardíaca y fibrosis tras administrar PCB126 durante 8 semanas a ratones adultos. Jo *et al.*, 2001, reportan, al igual que nosotros, un efecto inotrópico negativo en miocitos ventriculares aislados de cobayas tratadas con PCB19. Park *et al.*, 2012, detectaron afecciones en la electrofisiología cardíaca tras el tratamiento con PCBs 126 en corazones de cobayas, pero no observaron cambios significativos en la frecuencia cardíaca tras la exposición. En pez cebra, la exposición al Aroclor 1254 durante el desarrollo indujo anomalías cardíacas, malformaciones en los embriones y muerte de las larvas de manera tiempo y dosis dependiente. Además, se detectaron cambios en la función contráctil del corazón y una disminución de la frecuencia cardíaca (Li *et al.*, 2014). Otros autores como Bae *et al.*, 1999 detectaron que la mezcla de Aroclor 1242 incrementaba significativamente la frecuencia de contracción en el músculo liso del útero, a través del incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ . Por último, Rebuzzini *et al.*, 2018, utilizando el mismo modelo de diferenciación *in vitro* a cardiomiocito que el de esta tesis reportan una disminución significativa en la frecuencia cardíaca, energía cinética (consumo de APT) y las características inotrópicas del sincitio tras la exposición a 1 y 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Aroclor 1254 durante 24 h. Nosotros, por el contrario, detectamos un efecto cronotrópico positivo que incrementa la frecuencia cardíaca de los cardiomiocitos. Hemos de tener en cuenta que una diferencia importante con respecto al artículo de Rebuzzini *et al.*, 2018 es que, en su caso, el tratamiento con Aroclor 1254 se añade a los cardiomiocitos ya maduros (a día 15 de la diferenciación) y dura 24 h, mientras que en nuestro modelo de ensayo, la exposición al Aroclor 1254 está presente durante todo el proceso de diferenciación. Las diferencias entre los resultados obtenidos por Rebuzzini *et al.*, 2018 y los nuestros podrían deberse a que los resultados de esta tesis serían los equivalentes a la exposición ambiental a PCBs durante la cardiomiogénesis temprana y los suyos a la exposición ambiental a PCBs en la etapa postnatal. Las disfunciones en la frecuencia cardíaca que ejercen los PCBs podrían variar dependiendo del tiempo de exposición y de la etapa de desarrollo sobre la cual estén presentes. Si bien existe discrepancia en la literatura con respecto al efecto de los PCBs sobre la frecuencia cardíaca, el efecto

inotrópico negativo parece característico de estos contaminantes (Jo *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2014; Rebuzzini *et al.*, 2018) y confirmado en esta tesis.

Los fetos son especialmente vulnerables a los contaminantes debido a las altas tasas de proliferación celular y de diferenciación, así como a su menor capacidad de detoxificación celular y reparación del ADN. Además, debido a que no hay ninguna barrera protectora entre el feto en desarrollo y su madre, tiene lugar la exposición transplacentaria del feto a hormonas naturales o sintéticas y compuestos químicos (Belpomme, Irigaray, Sasco *et al.*, 2007). El corazón es el primer órgano en formarse durante la embriogénesis en los vertebrados. En animales vertebrados, la supervivencia del embrión en desarrollo depende del corazón y del sistema circulatorio (Li *et al.*, 2014). Las alteraciones cardíacas observadas tanto en la cinemática y dinámica como en la estructura podrían ser responsables de un fallo cardíaco en el feto, con la consecuencia de un aborto espontáneo o bien de alteraciones cardíacas que pueden emerger con posterioridad, afectando seriamente la calidad de vida tras el nacimiento.

La habilidad de las células tumorales para metastatizar es la principal causa de mortalidad en pacientes con cáncer (Karsten *et al.*, 2021). Nuestros resultados muestran que los PCBs están implicados en la promoción de la progresión tumoral conduciendo a cánceres con mayor potencial para metastatizar, más agresivos y por tanto con una peor prognosis y menor tasa de supervivencia. El potencial nocivo de los PCBs no sólo radica en su capacidad de promoción y progresión tumoral sino que también se extiende al desarrollo embrionario cardíaco. Su presencia durante la embriogénesis cardíaca es capaz de alterar la organización estructural sarcomérica del sincitio cardíaco además de alterar las propiedades contráctiles e incrementar sobremanera la frecuencia cardíaca, actuando por tanto como agentes cardiotóxicos y cronotrópicos positivos. Marcadores claramente ligados al riesgo de enfermedad cardiovascular. Estos resultados, junto con la amplia distribución ambiental de contaminantes como los PCBs apoyaría la teoría de D. Belpomme (Belpomme, Irigaray, Hardell, *et al.*, 2007; Belpomme, Irigaray, Sasco, *et al.*, 2007) y otros autores (Stillerman *et al.*, 2008; Mone *et al.*, 2004) según la cual la exposición involuntaria a diversos contaminantes jugaría un papel más importante en el incremento en la incidencia del cáncer, en el riesgo cardiovascular y en el desarrollo de alteraciones durante el embarazo de lo que se establece habitualmente. Los resultados observados ponen de manifiesto la necesidad de un mayor conocimiento del riesgo actual que suponen contaminantes ambientales como los PCBs en la etiología del cáncer y las enfermedades cardiovasculares.

## **CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

- 1) Los PCBs son capaces de alterar la viabilidad y la proliferación celular, e inducir apoptosis en las líneas celulares analizadas.
- 2) Los PCBs son potentes inductores de la migración e invasividad tumoral. Este efecto se debería, entre otros factores, al incremento de la expresión de MMPs, a la secreción de factores quimio-atrayentes, a la alteración del balance de Rho GTPasas y a una transición epitelio-mesénquima aberrante.
- 3) La inhibición de ROCK es capaz de revertir el incremento en la invasividad inducida por los PCBs, lo que abre una posible aproximación terapéutica para el tratamiento del cáncer originado por la exposición a PCBs.
- 4) Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el efecto cardiotoxico de los PCBs durante el desarrollo embrionario, debido a un incremento de la frecuencia cardíaca y a la disfunción de la organización estructural de los sarcómeros de los sincitios cardíacos.

En conjunto, la exposición a estos contaminantes ubicuos y persistentes promovería la expresión de marcadores tumorales que generaría un fenotipo migratorio e invasivo asociado a cánceres más agresivos y con peor pronóstico, lo que podría contribuir de manera importante a la progresión del cáncer en la población.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Adamcová, M., Štěřba, M., Šimůnek, T., Potáčová, A., Popelová, O., & Geršl, V. (2006). Myocardial regulatory proteins and heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 8(4), 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2005.09.007>

Agudo, A., Goñi, F., Etxeandia, A., Vives, A., Millán, E., López, R., Amiano, P., Ardanaz, E., Barricarte, A., Dolores Chirlaque, M., Dorronsoro, M., Jakszyn, P., Larrañaga, N., Martínez, C., Navarro, C., Rodríguez, L., José Sánchez, M., José Tormo, M., & González, C. A. (2009). Polychlorinated biphenyls in Spanish adults: Determinants of serum concentrations. *Environmental Research*, 109(5), 620–628. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.03.009>

Albini, A. (1998). Tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. The matrigel chemoinvasion assay as a tool for dissecting molecular mechanisms. *Pathology Oncology Research : POR*, 4(3), 230–241. <https://doi.org/10.1007/BF02905254>

Ali, I., Julin, B., Glynn, A., Högberg, J., Berglund, M., Johansson, J. E., Andersson, S. O., Andrén, O., Giovannucci, E., Wolk, A., Stenius, U., & Åkesson, A. (2016). Exposure to polychlorinated biphenyls and prostate cancer: Population-based prospective cohort and experimental studies. *Carcinogenesis*, 37(12), 1144–1151. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw105>

Alonso, S. R., Tracey, L., Ortiz, P., Pérez-Gómez, B., Palacios, J., Pollán, M., Linares, J., Serrano, S., Sáez-Castillo, A. I., Sánchez, L., Pajares, R., Sánchez-Aguilera, A., Artiga, M. J., Piris, M. A., & Rodríguez-Peralto, J. L. (2007). A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Research*, 67(7), 3450–3460. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3481>

Altenkirch, H., Stoltenburg, G., Haller, D., Hopmann, D., & Walter, G. (1996). Clinical data on three cases of occupationally induced PCB-intoxication. *NeuroToxicology*, 17(3–4), 639–644. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9086484/>

Amos, S. E., & Choi, Y. S. (2021). The Cancer Microenvironment: Mechanical Challenges of the Metastatic Cascade. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(February). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.625859>

An, J., Zou, W., Zhong, Y., Zhang, X., Wu, M., Yu, Z., & Ye, T. (2012). The toxic effects of Aroclor 1254 exposure on the osteoblastic cell line MC3T3-E1 and its molecular mechanism. *Toxicology*, 295(1–3), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.02.009>

Anderson, P. A. W., Greig, A., Mark, T. M., Malouf, N. N., Oakeley, A. E., Ungerleider, R. M., Allen, P. D., & Kay, B. K. (1995). Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart. *Circulation Research*, 76(4), 681–686. <https://doi.org/10.1161/01.RES.76.4.681>

Aronson, K. J., Miller, A. B., Wooleott, C. G., Sterns, E. E., McCready, D. R., Lickley, L. A., Fish, E. B., Hiraki, G. Y., Holloway, C., Ross, T., Hanna, W. M., SenGupta, S. K., & Weber, J. P. (2000). Breast adipose tissue concentrations of polychlorinated biphenyls and other organochlorines and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 9(1), 55–63.

ASTDR. (2000). Toxicological Profile for Polychlorinated Biphenyls (PCBs). In *United States Department of Health Services, Public Health Service* (Issue November). <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=142&tid=26>

ASTDR. (2014). 3. Chemical and Physical Information 3.1. *Identity*, 3–7.

Bae, J., Stuenkel, E. L., & Loch-Caruso, R. (1999). Stimulation of oscillatory uterine contraction by the PCB mixture Aroclor 1242 may involve increased  $[Ca^{2+}]_i$  through voltage-operated calcium channels. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 155(3), 261–272. <https://doi.org/10.1006/taap.1998.8614>

Ballschmiter, K., & Zell, M. (1980). Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography - Composition of technical aroclor- and Clophen-PCB mixtures. *Fresenius' Zeitschrift Für Analytische Chemie*, 302(1), 20–31. <https://doi.org/10.1007/BF00469758>

Barroso, A., Mahler, J. V., Fonseca-Castro, P. H., & Quintana, F. J. (2021). The aryl hydrocarbon receptor and the gut–brain axis. *Cellular and Molecular Immunology*, 18(2), 259–268. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00585-5>

Belpomme, D., Irigaray, P., Hardell, L., Clapp, R., Montagnier, L., Epstein, S., & Sascó, A. J. (2007). The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environmental Research*, 105(3), 414–429. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.07.002>

Belpomme, D., Irigaray, P., Sascó, A. J., Newby, J. A., Howard, V., Clapp, R., & Hardell, L. (2007). The growing incidence of cancer: Role of lifestyle and screening detection (Review). *International Journal of Oncology*, 30(5), 1037–1049. <https://doi.org/10.3892/ijo.30.5.1037>

Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., & Hanahan, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology*, 2(10), 737–744. <https://doi.org/10.1038/35036374>

Bertazzi, P. A., Riboldi, L., Pesatori, A., Radice, L., & Zocchetti, C. (1987). Cancer mortality of capacitor manufacturing workers. *American Journal of Industrial Medicine*, 11(2), 165–176. <https://doi.org/10.1002/ajim.4700110206>

- Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 21, Issue 6, pp. 167–223). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(00\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(00)00007-8)
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G. I., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., & Engler, J. A. (1993). Matrix metalloproteinases: A review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, *4*(2), 197–250. <https://doi.org/10.1177/10454411930040020401>
- Boffetta, P. (2006). Human cancer from environmental pollutants: The epidemiological evidence. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *608*(2), 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.02.015>
- Boffetta, P., Catalani, S., Tomasi, C., Pira, E., & Apostoli, P. (2018). Occupational exposure to polychlorinated biphenyls and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, *27*(1), 62–69. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000316>
- Boheler, K. R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H. T., Anisimov, S. V., & Wobus, A. M. (2002). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circulation Research*, *91*(3), 189–201. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000027865.61704.32>
- Böhle, A. S., & Kalthoff, H. (1999). Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbeck's Archives of Surgery*, *384*(2), 133–140. <https://doi.org/10.1007/s004230050183>
- Bonefeld-Jørgensen, E. C., Andersen, H. R., Rasmussen, T. H., & Vinggaard, A. M. (2001). Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology*, *158*(3), 141–153. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00368-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00368-1)
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(12), 786–801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>
- Borlak, J., & Thum, T. (2002). PCBs alter gene expression of nuclear transcription factors and other heart-specific genes in cultures of primary cardiomyocytes: Possible implications for cardiotoxicity. *Xenobiotica*, *32*(12), 1173–1183. <https://doi.org/10.1080/0049825021000022311>
- Boyer, B., Vallés, A. M., & Edme, N. (2000). Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochemical Pharmacology*, *60*(8), 1091–1099. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00427-5](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00427-5)



- Bozzuto, G., Ruggieri, P., & Molinari, A. (2010). Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, *46*(1), 66–80. <https://doi.org/10.4415/ANN-10-01-09>
- Bracke, M. E., Van Larebeke, N. A., Vyncke, B. M., & Mareel, M. M. (1991). Erratum: Retinoic acid modulates both invasion and plasma membrane ruffling of MCF-7 human mammary carcinoma cells in vitro (British Journal of Cancer (1991) (867-872)). *British Journal of Cancer*, *65*(3), 486.
- Breivik, K., Sweetman, A., Pacyna, J. M., & Jones, K. C. (2007). Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners - A mass balance approach. 3. An update. *Science of the Total Environment*, *377*(2–3), 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.026>
- Burroughs Peña, M. S., & Rollins, A. (2017). Environmental Exposures and Cardiovascular Disease: A Challenge for Health and Development in Low- and Middle-Income Countries. *Cardiology Clinics*, *35*(1), 71–86. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2016.09.001>
- Campbell, K., & Casanova, J. (2016). A common framework for EMT and collective cell migration. *Development (Cambridge)*, *143*(23), 4291–4300. <https://doi.org/10.1242/dev.139071>
- Cao, J., Fan, T., Li, W., & Xiao, S. (2019). Association study between plasma levels of polychlorinated biphenyls and risk of cutaneous malignant melanoma. *Environment International*, *126*(157), 298–301. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.014>
- Castro-Giner, F., & Aceto, N. (2020). Tracking cancer progression: From circulating tumor cells to metastasis. *Genome Medicine*, *12*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00728-3>
- Ceci, R., Diletti, G., Bellocci, M., Chiumiento, F., D'Antonio, S., De Benedictis, A., Leva, M., Pirito, L., Scortichini, G., & Fernandes, A. R. (2022). Brominated and chlorinated contaminants in food (PCDD/Fs, PCBs, PBDD/Fs PBDEs): Simultaneous determination and occurrence in Italian produce. *Chemosphere*, *288*(P1), 132445. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132445>
- Černá, M., Malý, M., Grabic, R., Batáriová, A., Šmíd, J., & Beneš, B. (2008). Serum concentrations of indicator PCB congeners in the Czech adult population. *Chemosphere*, *72*(8), 1124–1131. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.019>
- Chao, Y. L., Shepard, C. R., & Wells, A. (2010). Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Molecular Cancer*, *9*, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-179>

- Chow, A. K., Cena, J., & Schulz, R. (2007). Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *British Journal of Pharmacology*, *152*(2), 189–205. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707344>
- Chu, Y. W., Seftor, E. A., Romer, L. H., & Hendrix, M. J. C. (1996). Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human melanoma cells augments motility. *American Journal of Pathology*, *148*(1), 63–69. <https://doi.org/10.17615/pzpj-d090>
- Cillo, F., De Eguileor, M., Gandolfi, F., & Brevini, T. A. L. (2007). Aroclor-1254 affects mRNA polyadenylation, translational activation, cell morphology, and DNA integrity of rat primary prostate cells. *Endocrine-Related Cancer*, *14*(2), 257–266. <https://doi.org/10.1677/ERC-06-0081>
- Cocco, S., Secondo, A., Del Viscovo, A., Procaccini, C., Formisano, L., Franco, C., Esposito, A., Scorziello, A., Matarese, G., Di Renzo, G., & Canzoniero, L. M. T. (2015). Polychlorinated biphenyls induce mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129481>
- Coghlan, K., Chang, M., Jessup, D., Fragala, M., Mccrillis, K., & Lockhart, T. (2002). Characterization of Polychlorinated Biphenyls in Building Materials and Exposures in the Indoor Environment. *Indoor Air*, *4*, 147–152. <http://www.irbnet.de/daten/iconda/CIB7313.pdf>
- Collins, W. T., & Capen, C. C. (1980). Fine structural lesions and hormonal alterations in thyroid glands of perinatal rats exposed in utero and by the milk to polychlorinated biphenyls. *American Journal of Pathology*, *99*(1), 125–141.
- Connor, K., Ramamoorthy, K., Moore, M., Mustain, M., Chen, I., Safe, S., Zacharewski, T., Gillesby, B., Joyeux, A., & Balaguer, P. (1997). Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) as estrogens and antiestrogens: Structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *145*(1), 111–123. <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8169>
- Covaci, A., Jorens, P., Jacquemyn, Y., & Schepens, P. (2002). Distribution of PCBs and organochlorine pesticides in umbilical cord and maternal serum. *Science of the Total Environment*, *298*(1–3), 45–53. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00167-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00167-5)
- Cretu, A., & Brooks, P. C. (2007). Impact of the non-cellular tumor microenvironment on metastasis: Potential therapeutic and imaging opportunities. *Journal of Cellular Physiology*, *213*(2), 391–402. <https://doi.org/10.1002/jcp.21222>
- Custodis, F., Reil, J. C., Laufs, U., & Böhm, M. (2013). Heart rate: A global target for cardiovascular disease and therapy along the cardiovascular disease continuum. *Journal of Cardiology*, *62*(3), 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2013.02.018>

- Dalton, T. P., Kerzee, J. K., Wang, B., Miller, M., Dieter, M. Z., Lorenz, J. N., Shertzer, H. G., Nerbert, D. W., & Puga, A. (2001). Dioxin exposure is an environmental risk factor for ischemic heart disease. *Cardiovascular Toxicology*, *1*(4), 285–298. <https://doi.org/10.1385/CT:1:4:285>
- De Civetta, M. T. M., & Civetta, J. D. (2011). [Carcinogenesis]. *Salud Publica de Mexico*, *53*(5), 405–414. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342011000500008>
- De Felip, E., Abballe, A., Casalino, F., di Domenico, A., Domenici, P., Iacovella, N., Ingelido, A. M., Pretolani, E., & Spagnesi, M. (2008). Serum levels of PCDDs, PCDFs and PCBs in non-occupationally exposed population groups living near two incineration plants in Tuscany, Italy. *Chemosphere*, *72*(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.046>
- De Voogt, P., & Brinkman, U. A. T. (1989). Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. In *Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins and Related Products* (pp. 3–45). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-81029-8.50005-9>
- De Wever, O., Hendrix, A., De Boeck, A., Westbroek, W., Braems, G., Emami, S., Sabbah, M., Gespach, C., & Bracke, M. (2010). Modeling and quantification of cancer cell invasion through collagen type I matrices. *International Journal of Developmental Biology*, *54*(5), 887–896. <https://doi.org/10.1387/ijdb.092948ow>
- DeCaprio, A. P., Johnson, G. W., Tarbell, A. M., Carpenter, D. O., Chiarenzelli, J. R., Morse, G. S., Santiago-Rivera, A. L., & Schymura, M. J. (2005). Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure assessment by multivariate statistical analysis of serum congener profiles in an adult Native American population. *Environmental Research*, *98*(3), 284–302. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.09.004>
- Demers, A., Ayotte, P., Brisson, J., Dodin, S., Robert, J., & Dewailly, É. (2002). Plasma concentrations of polychlorinated biphenyls and the risk of breast cancer: A congener-specific analysis. *American Journal of Epidemiology*, *155*(7), 629–635. <https://doi.org/10.1093/aje/155.7.629>
- Derycke, L., Stove, C., Vercoutter-Edouart, A. S., De Wever, O., Dollé, L., Colpaert, N., Depypere, H., Michalski, J. C., & Bracke, M. (2011). The role of non-muscle myosin IIA in aggregation and invasion of human MCF-7 breast cancer cells. *International Journal of Developmental Biology*, *55*(7–9), 835–840. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113336ld>
- Diepenbruck, M., & Christofori, G. (2016). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: Yes, no, maybe? In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 43, pp. 7–13). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.06.002>

- Domagala, W., Lasota, J., Bartkowiak, J., Weber, K., & Osborn, M. (1990). Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction. *The American Journal of Pathology*, *136*(1), 219.  
[/pmc/articles/PMC1877466/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1877466/)
- Domingo, J. L., & Bocio, A. (2007). Levels of PCDD/PCDFs and PCBs in edible marine species and human intake: A literature review. *Environment International*, *33*(3), 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.12.004>
- Donat-Vargas, C., Akesson, A., Berglund, M., Glynn, A., Wolk, A., & Kippler, M. (2016). Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and risk of breast, endometrial and ovarian cancer in a prospective cohort. *British Journal of Cancer*, *115*(9), 1113–1121. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.282>
- Donat-Vargas, C., Berglund, M., Glynn, A., Wolk, A., & Åkesson, A. (2017). Dietary polychlorinated biphenyls, long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and incidence of malignant melanoma. *European Journal of Cancer*, *72*, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.11.016>
- Donat-Vargas, C., Gea, A., Sayon-Orea, C., De La Fuente-Arrillaga, C., Martinez-Gonzalez, M. A., & Bes-Rastrollo, M. (2015). Association between dietary intake of polychlorinated biphenyls and the incidence of hypertension in a Spanish Cohort: The Seguimiento Universidad de Navarra project. *Hypertension*, *65*(4), 714–721. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04435>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Eslami-S, Z., Cortés-Hernández, L. E., & Alix-Panabières, C. (2020). The Metastatic Cascade as the Basis for Liquid Biopsy Development. *Frontiers in Oncology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.01055>
- Espandiari, P., Glauert, H. P., Lehmler, H. J., Lee, E. Y., Srinivasan, C., & Robertson, L. W. (2004). Initiating activity of 4-chlorobiphenyl metabolites in the resistant hepatocyte model. *Toxicological Sciences*, *79*(1), 41–46. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh097>
- Everett, C. J., Mainous, A. G., Frithsen, I. L., Player, M. S., & Matheson, E. M. (2008). Association of polychlorinated biphenyls with hypertension in the 1999–2002 National Health and Nutrition Examination Survey. *Environmental Research*, *108*(1), 94–97. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.05.006>
- Falck, F., Ricci, A., Wolff, M. S., Godbold, J., & Deckers, P. (1992). Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Archives of Environmental Health*, *47*(2), 143–146. <https://europepmc.org/article/med/1567239>

- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Fassina, L., di Grazia, A., Naro, F., Monaco, L., de Angelis, M. G. C., & Magenes, G. (2011). Video evaluation of the kinematics and dynamics of the beating cardiac syncytium: An alternative to the langendorff method. *International Journal of Artificial Organs*, 34(7), 546–558. <https://doi.org/10.5301/IJAO.2011.8510>
- Fein, G. G., Jacobson, J. L., Jacobson, S. W., Schwartz, P. M., & Dowler, J. K. (1984). Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls: Effects on birth size and gestational age. *The Journal of Pediatrics*, 105(2), 315–320. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(84\)80139-0](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(84)80139-0)
- Fernandez, M. F., Kiviranta, H., Molina-Molina, J. M., Laine, O., Lopez-Espinosa, M. J., Vartiainen, T., & Olea, N. (2008). Polychlorinated biphenyls (PCBs) and hydroxy-PCBs in adipose tissue of women in Southeast Spain. *Chemosphere*, 71(6), 1196–1205. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.09.064>
- Forough, R., Scarcello, C., & Perkins, M. (2011). Cardiac biomarkers: A focus on cardiac regeneration. *Journal of Tehran University Heart Center*, 6(4), 179–186.
- Gadea, G., Sanz-Moreno, V., Self, A., Godi, A., & Marshall, C. J. (2008). DOCK10-Mediated Cdc42 Activation Is Necessary for Amoeboid Invasion of Melanoma Cells. *Current Biology*, 18(19), 1456–1465. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.08.053>
- Gadue, P., Huber, T. L., Nostro, M. C., Kattman, S., & Keller, G. M. (2005). Germ layer induction from embryonic stem cells. *Experimental Hematology*, 33(9), 955–964. <https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2005.06.009>
- Gallagher, E. J., & LeRoith, D. (2015). Obesity and diabetes: The increased risk of cancer and cancer-related mortality. *Physiological Reviews*, 95(3), 727–748. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2014>
- Gallagher, R. P., MacArthur, A. C., Lee, T. K., Weber, J. P., Leblanc, A., Mark Elwood, J., Borugian, M., Abanto, Z., & Spinelli, J. J. (2011). Plasma levels of polychlorinated biphenyls and risk of cutaneous malignant melanoma: A preliminary study. *International Journal of Cancer*, 128(8), 1872–1880. <https://doi.org/10.1002/ijc.25503>
- Gandalovičová, A., Vomastek, T., Rosel, D., & Brábek, J. (2016). Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness. *Oncotarget*, 7(18), 25022–25049. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7214>
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., & Parks, W. P. (1973). In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived

From a Series of Solid Tumors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1417–1423. <https://doi.org/10.1093/JNCI/51.5.1417>

Gobierno Vasco. (2016). *INVENTARIO RESIDUOS PELIGROSOS DEL PAÍS VASCO 2016 2*. [www.bibliotekak.euskadi.eus/WebOpac](http://www.bibliotekak.euskadi.eus/WebOpac)

Goncharov, A., Haase, R. F., Santiago-Rivera, A., Morse, G., McCaffrey, R. J., Rej, R., & Carpenter, D. O. (2008). High serum PCBs are associated with elevation of serum lipids and cardiovascular disease in a Native American population. *Environmental Research*, 106(2), 226–239. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.10.006>

Goncharov, A., Pavuk, M., Foushee, H. R., & Carpenter, D. O. (2011). Blood pressure in relation to concentrations of PCB congeners and Chlorinated pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 119(3), 319–325. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002830>

Gonzalez, C. A., Bleda, M. J., Kogevinas, M., Gadea, E., Huici, A., Bosch, A., & Ergo, O. P. (2000). Biomonitoring study of people living near or working at a municipal solid-waste incinerator before and after two years of operation. *Archives of Environmental Health*, 55(4), 259–267. <https://doi.org/10.1080/00039890009603416>

Graf, U., Casanova, E. A., & Cinelli, P. (2011). The role of the leukemia inhibitory factor (LIF) - Pathway in derivation and maintenance of murine pluripotent stem cells. *Genes*, 2(1), 280–297. <https://doi.org/10.3390/genes2010280>

Grandjean, P., Weihe, P., Burse, V. W., Needham, L. L., Storr-Hansen, E., Heinzow, B., Debes, F., Murata, K., Simonsen, H., Ellefsen, P., Budtz-Jorgensen, E., Keiding, N., & White, R. F. (2001). Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxicants. *Neurotoxicology and Teratology*, 23(4), 305–317. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(01\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(01)00155-6)

Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., & Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, 445(7130), 851–857. <https://doi.org/10.1038/nature05661>

Greenland, S., Salvan, A., Wegman, D. H., Hallock, M. F., & Smith, T. J. (1994). A case-control study of cancer mortality at a transformer-assembly facility. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 66(1), 49–54. <https://doi.org/10.1007/BF00386579>

Guarino, M. (2007). Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(12), 2153–2160. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.011>

Guarino, M., Rubino, B., & Ballabio, G. (2007). The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*, 39(3), 305–318. <https://doi.org/10.1080/00313020701329914>

- Gustavsson, P., & Hogstedt, C. (1997). A cohort study of Swedish capacitor manufacturing workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs). *American Journal of Industrial Medicine*, 32(3), 234–239. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0274\(199709\)32:3<234::AID-AJIM8>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0274(199709)32:3<234::AID-AJIM8>3.0.CO;2-X)
- Haass, N. K., Smalley, K. S. M., & Herlyn, M. (2004). The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. In *Journal of Molecular Histology* (Vol. 35, Issue 3, pp. 309–318). Springer. <https://doi.org/10.1023/B:HIJO.0000032362.35354.bb>
- Hallgren, S., & Darnerud, P. O. (2002). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and chlorinated paraffins (CPs) in rats - Testing interactions and mechanisms for thyroid hormone effects. *Toxicology*, 177(2–3), 227–243. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00222-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00222-6)
- Hannes, T., Wolff, M., Doss, M. X., Pfannkuche, K., Haustein, M., Müller-Ehmsen, J., Sachinidis, A., Hescheler, J., Khalil, M., & Halbach, M. (2015). Electrophysiological Characteristics of Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes are Cell Line-Dependent. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35(1), 305–314. <https://doi.org/10.1159/000369697>
- Hapach, L. A., Mosier, J. A., Wang, W., & Reinhart-King, C. A. (2019). Engineered models to parse apart the metastatic cascade. *Npj Precision Oncology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0092-3>
- Hazan, R. B., Phillips, G. R., Qiao, R. F., Norton, L., & Aaronson, S. A. (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *Journal of Cell Biology*, 148(4), 779–790. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.4.779>
- He, T. T., Zuo, A. J., Wang, J. G., & Zhao, P. (2017). Organochlorine pesticides accumulation and breast cancer: A hospital-based case-control study. *Tumor Biology*, 39(5). <https://doi.org/10.1177/1010428317699114>
- Heilmann, C., Budtz-Jørgensen, E., Nielsen, F., Heinzow, B., Weihe, P., & Grandjean, P. (2010). Serum concentrations of antibodies against vaccine toxoids in children exposed perinatally to immunotoxicants. *Environmental Health Perspectives*, 118(10), 1434–1438. <https://doi.org/10.1289/ehp.1001975>
- Helzlsouer, K. J., Alberg, A. J., Huang, H. Y., Hoffman, S. C., Strickland, P. T., Brock, J. W., Burse, V. W., Needham, L. L., Bell, D. A., Lavigne, J. A., Yager, J. D., & Comstock, G. W. (1999). Serum concentrations of organochlorine compounds and the subsequent development of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 8(6), 525–532.

Hennig, B., Meerarani, P., Slim, R., Toborek, M., Daugherty, A., Silverstone, A. E., & Robertson, L. W. (2002). Proinflammatory properties of coplanar PCBs: In vitro and in vivo evidence. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *181*(3), 174–183.

<https://doi.org/10.1006/taap.2002.9408>

Herlin, M., Öberg, M., Ringblom, J., Joseph, B., Korkalainen, M., Viluksela, M., Heimeier, R. A., & Håkansson, H. (2015). Inhibitory effects on osteoblast differentiation in vitro by the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 are mainly associated with the dioxin-like constituents. *Toxicology in Vitro*, *29*(5), 876–883.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.03.006>

Hernández, C. S., Pardo, O., Corpas-Burgos, F., Fernández, S. F., López, A., Coscollà, C., Vento, M., & Yusà, V. (2020). Biomonitoring of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCBs) in human milk: Exposure and risk assessment for lactating mothers and breastfed children from Spain. *Science of the Total Environment*, *744*, 140710.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140710>

Herrick, R. F., McClean, M. D., Meeker, J. D., Baxter, L. K., & Weymouth, G. A. (2004). An unrecognized source of PCB contamination in schools and other buildings. *Environmental Health Perspectives*, *112*(10), 1051–1053.

<https://doi.org/10.1289/ehp.6912>

Herrick, R. F., Meeker, J. D., Hauser, R., Altshul, L., & Weymouth, G. A. (2007). Serum PCB levels and congener profiles among US construction workers. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, *6*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-6-25>

Hodgson, S., Thomas, L., Fattore, E., Lind, P. M., Alfven, T., Hellström, L., Håkansson, H., Carubelli, G., Fanelli, R., & Jarup, L. (2008). Bone mineral density changes in relation to environmental PCB exposure. *Environmental Health Perspectives*, *116*(9), 1162–1166.

<https://doi.org/10.1289/ehp.11107>

Høyer, A. P., Grandjean, P., Jørgensen, T., Brock, J. W., & Hartvig, H. B. (1998). Organochlorine exposure and risk of breast cancer. *Lancet*, *352*(9143), 1816–1820.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)04504-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)04504-8)

Huang, B., Lu, M., Jolly, M. K., Tsarfaty, I., Onuchic, J., & Ben-Jacob, E. (2014). The three-way switch operation of Rac1/RhoA GTPase-based circuit controlling amoeboid-hybrid-mesenchymal transition. *Scientific Reports*, *4*, 1–11.

<https://doi.org/10.1038/srep06449>

Huetos, O., Bartolomé, M., Aragonés, N., Cervantes-Amat, M., Esteban, M., Ruiz-Moraga, M., Pérez-Gómez, B., Calvo, E., Vila, M., Aleixandre, J. M., Cañas, A. I., Cortés,



- M. V., Jimenez, J. A., López-Abente, G., López-Herranz, A., Mayor, J., Méndez, C. F., Molina, M. A., Navarro, C., ... Castaño, A. (2014). Serum PCB levels in a representative sample of the SPANISH adult population: The BIOAMBIENT.ES project. *Science of the Total Environment*, 493, 834–844. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.077>
- Hunter, D. J., Hankinson, S. E., Laden, F., Colditz, G. A., Manson, J. E., Willett, W. C., Speizer, F. E., & Wolff, M. S. (1997). Plasma Organochlorine Levels and the Risk of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 337(18), 1253–1258. <https://doi.org/10.1056/NEJM199710303371801>
- Hynes, R. O. (2009). *Extracellular matrix: not just pretty fibrils*. <https://doi.org/10.1126/science.1176009>
- Hynes, R. O., & Naba, A. (2012). Overview of the matrisome-An inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>
- IARC. (2016). Polychlorinated Biphenyls and Polybrominated Biphenyls. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 107, 9–500.
- Ieda, M., Fu, J.-D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G., & Srivastava, D. (2010). Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors. *Cell*, 142(3), 375–386. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.07.002>
- Inoue, M., Sawada, N., Matsuda, T., Iwasaki, M., Sasazuki, S., Shimazu, T., Shibuya, K., & Tsgane, S. (2012). Attributable causes of cancer in Japan in 2005-Systematic assessment to estimate current burden of cancer attributable to known preventable risk factors in Japan. *Annals of Oncology*, 23(5), 1362–1369. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr437>
- Irigaray, P., Newby, J. A., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S., & Belpomme, D. (2007). Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 61(10), 640–658. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2007.10.006>
- Itoh, T., Tanioka, M., Yoshida, H., Yoshioka, T., Nishimoto, H., & Itohara, S. (1998). Reduced Angiogenesis and Tumor Progression in Gelatinase A-deficient Mice. *Cancer Research*, 58(5).
- Jabłońska-Trypuć, A., Matejczyk, M., & Rosochacki, S. (2016). Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31, 177–183. <https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1161620>

Jacobson, J. L., & Jacobson, S. W. (1996). Intellectual Impairment in Children Exposed to Polychlorinated Biphenyls in Utero. *New England Journal of Medicine*, *335*(11), 783–789. <https://doi.org/10.1056/nejm199609123351104>

Jo, S. H., Choi, S. Y., Kim, K. T., & Lee, C. O. (2001). Effects of polychlorinated biphenyl 19 (2,2',6-trichlorobiphenyl) on contraction, Ca<sup>2+</sup> transient, and Ca<sup>2+</sup> current of cardiac myocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *38*(1), 11–20. <https://doi.org/10.1097/00005344-200107000-00002>

Johnsen, M., Lund, L. R., Rømer, J., Almholt, K., & Danø, K. (1998). Cancer invasion and tissue remodeling: Common themes in proteolytic matrix degradation. *Current Opinion in Cell Biology*, *10*(5), 667–671. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80044-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80044-6)

Jolly, M. K., Boareto, M., Huang, B., Jia, D., Lu, M., Onuchic, J. N., Levine, H., & Ben-Jacob, E. (2015). Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis. *Frontiers in Oncology*, *5*(JUN), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00155>

Jolly, M. K., Ware, K. E., Gilja, S., Somarelli, J. A., & Levine, H. (2017). EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? *Molecular Oncology*, *11*(7), 755–769. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12083>

Kai, F. B., Drain, A. P., & Weaver, V. M. (2019). The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. *Developmental Cell*, *49*(3), 332–346. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.03.026>

Kaibuchi, K., Kuroda, S., & Amano, M. (1999). Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annual Review of Biochemistry*, *68*, 459–486. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.68.1.459>

Kamenisch, Y., Baban, T. S. A., Schuller, W., von Thaler, A. K., Sinnberg, T., Metzler, G., Bauer, J., Schitteck, B., Garbe, C., Rocken, M., & Berneburg, M. (2016). UVA-Irradiation Induces Melanoma Invasion via the Enhanced Warburg Effect. *Journal of Investigative Dermatology*, *136*(9), 1866–1875. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.02.815>

Kang, Y. J. (2001). Molecular and cellular mechanisms of cardiotoxicity. *Environmental Health Perspectives*, *109*(SUPPL. 1), 27–34. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s127>

Karsten, N., Kolben, T., Mahner, S., Beyer, S., Meister, S., Kuhn, C., Schmoeckel, E., Wuerstlein, R., Harbeck, N., Ditsch, N., Jeschke, U., Friese, K., & Kolben, T. M. (2021). The role of E-Cadherin expression in primary site of breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s00404-021-06198-1>

Kim, J. B., Prunicki, M., Haddad, F., Dant, C., Sampath, V., Patel, R., Smith, E., Akdis, C., Balmes, J., Snyder, M. P., Wu, J. C., & Nadeau, K. C. (2020). Cumulative lifetime burden

of cardiovascular disease from early exposure to air pollution. *Journal of the American Heart Association*, 9(6), 1–20. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.014944>

Kim, T. W., Che, J. H., & Yun, J. W. (2019). Use of stem cells as alternative methods to animal experimentation in predictive toxicology. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 105, 15–29. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2019.03.016>

Kiriluk, K. J., Prasad, S. M., Patel, A. R., Steinberg, G. D., & Smith, N. D. (2012). Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 30(2), 199–211. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2011.10.010>

Kiviranta, H., Ovaskainen, M. L., & Vartiainen, T. (2004). Market basket study on dietary intake of PCDD/Fs, PCBs, and PBDEs in Finland. *Environment International*, 30(7), 923–932. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.03.002>

Kleiner, D. E., & Stetlerstevenson, W. G. (1994). Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases. *Analytical Biochemistry*, 218(2), 325–329. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1994.1186>

Klocke, C., Sethi, S., & Lein, P. J. (2020). The developmental neurotoxicity of legacy vs. contemporary polychlorinated biphenyls (PCBs): similarities and differences. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(9), 8885–8896. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-06723-5>

Kokkinos, M. I., Wafai, R., Wong, M. K., Newgreen, D. F., Thompson, E. W., & Waltham, M. (2007). Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer - Observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs*, 185(1–3), 191–203. <https://doi.org/10.1159/000101320>

Kontsas, H., Pekari, K., Riala, R., Bäck, B., Rantio, T., & Priha, E. (2004). Worker Exposure to Polychlorinated Biphenyls in Elastic Polysulphide Sealant Renovation. *Annals of Occupational Hygiene*, 48(1), 51–55. <https://doi.org/10.1093/annhyg/meg092>

Korsching, E., Packeisen, J., Liedtke, C., Hungermann, D., Wülfing, P., van Diest, P. J., Brandt, B., Boecker, W., & Buerger, H. (2005). The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: Epithelial- mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *Journal of Pathology*, 206(4), 451–457. <https://doi.org/10.1002/path.1797>

Labelle, M., & Hynes, R. O. (2012). The Initial Hours of Metastasis: The Importance of Cooperative Host–Tumor Cell Interactions during Hematogenous Dissemination. *Cancer Discovery*, 2(12), 1091–1099. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0329>

Laden, F., Ishibe, N., Hankinson, S. E., Wolff, M. S., Gertig, D. M., Hunter, D. J., & Kelsey, K. T. (2002). Polychlorinated biphenyls, cytochrome P450 1A1, and breast cancer risk in the Nurses' Health Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *11*(12), 1560–1565.

Laronha, H., & Caldeira, J. (2020). Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells* *2020*, Vol. 9, Page 1076, *9*(5), 1076.  
<https://doi.org/10.3390/CELLS9051076>

Lehmann, L., L.Esch, H., A.Kirby, P., W.Robertson, L., & Ludewig, G. (2007). 4-Monochlorobiphenyl (PCB3) induces mutations in the livers of transgenic Fisher 344 rats. *Carcinogenesis*, *28*(2), 471–478. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl157>

Leijts, M., Fietkau, K., Merk, H. F., Schettgen, T., Kraus, T., & Esser, A. (2021). Upregulation of CCL7, CCL20, CXCL2, IL-1 $\beta$ , IL-6 and MMP-9 in Skin Samples of PCB Exposed Individuals-A Preliminary Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(18). <https://doi.org/10.3390/IJERPH18189711>

Leitolis, A., Robert, A. W., Pereira, I. T., Correa, A., & Stimamiglio, M. A. (2019). Cardiomyogenesis Modeling Using Pluripotent Stem Cells: The Role of Microenvironmental Signaling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *7*, 164.  
<https://doi.org/10.3389/FCCELL.2019.00164/BIBTEX>

Li, G., Satyamoorthy, K., & Herlyn, M. (2001). N-Cadherin-mediated Intercellular Interactions Promote Survival and Migration of Melanoma Cells 1. *CANCER RESEARCH*, *61*, 3819–3825.

Li, Man, Zhang, B., Wang, X., Ban, X., Sun, T., Liu, Z., Zhao, X., & Sun, B. (2010). A novel function for vimentin: The potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *29*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-109>

Li, Mengmeng, Wang, X., Zhu, J., Zhu, S., Hu, X., Zhu, C., Guo, X., Yu, Z., & Han, S. (2014). Toxic effects of polychlorinated biphenyls on cardiac development in zebrafish. *Molecular Biology Reports*, *41*(12), 7973–7983. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3692-6>

Li, Z., Lin, L., Wu, H., Yan, L., Wang, H., Yang, H., & Li, H. (2021). Global, Regional, and National Death, and Disability-Adjusted Life-Years (DALYs) for Cardiovascular Disease in 2017 and Trends and Risk Analysis From 1990 to 2017 Using the Global Burden of Disease Study and Implications for Prevention. *Frontiers in Public Health*, *9*(October).  
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.559751>

- Liabakk, N. B., Talbot, I., Smith, R. A., Wilkinson, K., & Balkwill, F. (1996). Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Research*, *56*(1), 190–196.
- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, *2*(2), 329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Liu, C. Y., Lin, H. H., Tang, M. J., & Wang, Y. K. (2015). Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*, *6*(18), 15966–15983. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3862>
- Liu, S., Li, S., & Du, Y. (2010). Polychlorinated biphenyls (PCBs) enhance metastatic properties of breast cancer cells by activating rho-associated kinase (ROCK). *PLoS ONE*, *5*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011272>
- Loh, C. Y., Chai, J. Y., Tang, T. F., Wong, W. F., Sethi, G., Shanmugam, M. K., Chong, P. P., & Looi, C. Y. (2019). The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. In *Cells* (Vol. 8, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/cells8101118>
- Loomis, D., Browning, S. R., Schenck, A. P., Gregory, E., & Savitz, D. A. (1997). Cancer mortality among electric utility workers exposed to polychlorinated biphenyls. *Occupational and Environmental Medicine*, *54*(10), 720–728. <https://doi.org/10.1136/oem.54.10.720>
- López, A., Coscollà, C., Hernández, C. S., Pardo, O., & Yusà, V. (2021). Dioxins and dioxin-like PCBs in the ambient air of the Valencian Region (Spain): Levels, human exposure, and risk assessment. *Chemosphere*, *267*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128902>
- Lu, W., & Kang, Y. (2019). Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. In *Developmental Cell* (Vol. 49, Issue 3, pp. 361–374). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.010>
- Machado, R., Sachinidis, A., & Futschik, M. E. (2021). Detection of Novel Potential Regulators of Stem Cell Differentiation and Cardiogenesis through Combined Genome-Wide Profiling of Protein-Coding Transcripts and microRNAs. *Cells 2021, Vol. 10, Page 2477*, *10*(9), 2477. <https://doi.org/10.3390/CELLS10092477>
- Magoni, M., Apostoli, P., Donato, F., Manganoni, A., Comba, P., Fazzo, L., Speziani, F., Leonardi, L., Orizio, G., Scarcella, C., Calzavara Pinton, P., Terraroli, C., Coniglio, A., Zarrattini, G., Manca, G., Fostinelli, J., Festa, R., Conti, M., & Micheletti, S. (2018). Plasma levels of polychlorinated biphenyls and risk of cutaneous malignant melanoma: A hos-

pital-based case-control study. *Environment International*, 113(November 2017), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.01.018>

Maifredi, G., Donato, F., Magoni, M., Orizio, G., Gelatti, U., Maiolino, P., Zani, C., Vassallo, F., & Scarcella, C. (2011). Polychlorinated biphenyls and non-Hodgkin's lymphoma: A case-control study in Northern Italy. *Environmental Research*, 111(2), 254–259. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.12.006>

Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology and Therapy*, 10(10), 955–960. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.10.13879>

Maltsev, V. A., Wobus, A. M., Rohwedel, J., Bader, M., & Hescheler, J. (1994). Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circulation Research*, 75(2), 233–244. <https://doi.org/10.1161/01.RES.75.2.233>

Mandal, P. K. (2005). Dioxin: A review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 175(4), 221–230. <https://doi.org/10.1007/s00360-005-0483-3>

Mao, L., Yuan, L., Slakey, L. M., Jones, F. E., Burow, M. E., & Hill, S. M. (2010). Inhibition of breast cancer cell invasion by melatonin is mediated through regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Breast Cancer Research*, 12(6), R107. <https://doi.org/10.1186/bcr2794>

McGuinn, L. A., Ghazarian, A. A., Ellison, G. L., Harvey, C. E., Kaefer, C. M., & Reid, B. C. (2012). Cancer and environment: Definitions and misconceptions. *Environmental Research*, 112, 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.10.009>

Meeker, J. D., Maity, A., Missmer, S. A., Williams, P. L., Mahalingaiah, S., Ehrlich, S., Berry, K. F., Altshul, L., Perry, M. J., Cramer, D. W., & Hauser, R. (2011). Serum concentrations of polychlorinated biphenyls in relation to in vitro fertilization outcomes. *Environmental Health Perspectives*, 119(7), 1010–1016. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002922>

Micalizzi, D. S., Maheswaran, S., & Haber, D. A. (2017). A conduit to metastasis: Circulating tumor cell biology. *Genes and Development*, 31(18), 1827–1840. <https://doi.org/10.1101/gad.305805.117>

Mikesh, L. M., Kumar, M., Erdag, G., Hogan, K. T., Molhoek, K. R., Mayo, M. W., & Slingluff, C. L. (2010). Evaluation of molecular markers of mesenchymal phenotype in melanoma. *Melanoma Research*, 20(6), 485–495. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e32833fafb4>

- Miller, A. J., & Mihm, M. C. (2006). Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 355(1), 51–65. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052166>
- Miller, R. W. (1985). Congenital PCB poisoning: A reevaluation. *Environmental Health Perspectives*, VOL. 60(1), 211–214. <https://doi.org/10.1289/ehp.8560211>
- Mokady, D., & Meiri, D. (2015). RhoGTPases - A novel link between cytoskeleton organization and cisplatin resistance. *Drug Resistance Updates*, 19, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.01.001>
- Mone, S. M., Gillman, M. W., Miller, T. L., Herman, E. H., & Lipshultz, S. E. (2004). Effects of Environmental Exposures on the Cardiovascular System: Prenatal Period Through Adolescence. *Pediatrics*, 113(Supplement\_3), 1058–1069. <https://doi.org/10.1542/PEDS.113.S3.1058>
- Montenegro, R. C., de Vasconcellos, M. C., Barbosa, G. dos S., Burbano, R. M. R., Souza, L. G. S., Lemos, T. L. G., Costa-Lotufo, L. V., & de Moraes, M. O. (2013). A novel o-naphthoquinone inhibits N-cadherin expression and blocks melanoma cell invasion via AKT signaling. *Toxicology in Vitro*, 27(7), 2076–2083. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.07.011>
- Moysich, K. B., Shields, P. G., Freudenheim, J. L., Schisterman, E. F., Vena, J. E., Kostyniak, P., Greizerstein, H., Marshall, J. R., Graham, S., & Ambrosone, C. B. (1999). Polychlorinated biphenyls, cytochrome P4501A1 polymorphism, and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 8(1), 41–44.
- Mucci, L. A., Wedren, S., Tamimi, R. M., Trichopoulos, D., & Adami, H. O. (2001). The role of gene-environment interaction in the aetiology of human cancer: Examples from cancers of the large bowel, lung and breast. *Journal of Internal Medicine*, 249(6), 477–493. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2001.00839.x>
- Mummery, C. L., Zhang, J., Ng, E. S., Elliott, D. A., Elefanty, A. G., & Kamp, T. J. (2012). Differentiation of Human ES and iPS Cells to Cardiomyocytes: A Methods Overview. *Circulation Research*, 111(3), 344. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227512>
- Münzel, T., Hahad, O., Sørensen, M., Lelieveld, J., Duerr, G. D., Nieuwenhuijsen, M., & Daiber, A. (2021). Environmental risk factors and cardiovascular diseases: a comprehensive expert review. *Cardiovascular Research*, 1–23. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab316>
- Naba, A., Clauser, K. R., Ding, H., & Whittaker, C. A. (2016). The extracellular matrix : Tools and insights for the “ omics ” era. *Matrix Biology*, 49, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.06.003>

- Nagi, C., Guttman, M., Jaffer, S., Qiao, R., Keren, R., Triana, A., Li, M., Godbold, J., Bleiweiss, I. J., & Hazan, R. B. (2005). N-cadherin expression in breast cancer: Correlation with an aggressive histologic variant - Invasive micropapillary carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, *94*(3), 225–235. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-7727-5>
- Nakagawa, M., Fukata, M., Yamaga, M., Itoh, N., & Kaibuchi, K. (2001). Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *Journal of Cell Science*, *114*(10), 1829–1838. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.10.1829>
- Navas-Acien, A., Sharrett, A. R., Silbergeld, E. K., Schwartz, B. S., Nachman, K. E., Burke, T. A., & Guallar, E. (2005). Arsenic exposure and cardiovascular disease: A systematic review of the epidemiologic evidence. *American Journal of Epidemiology*, *162*(11), 1037–1049. <https://doi.org/10.1093/aje/kwi330>
- Neri, T., Merico, V., Fiordaliso, F., Salio, M., Rebuzzini, P., Sacchi, L., Bellazzi, R., Redi, C. A., Zuccotti, M., & Garagna, S. (2011). The differentiation of cardiomyocytes from mouse embryonic stem cells is altered by dioxin. *Toxicology Letters*, *202*(3), 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.02.008>
- Nesaretnam, K., Corcoran, O., Dils, R. R., & Darbre, P. (1996). 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl Acts As an Estrogen in Vitro and in Vivo. *Molecular Endocrinology*, *10*(8), 923–936. <https://doi.org/10.1210/me.10.8.923>
- Nieman, M. T., Prudoff, R. S., Johnson, K. R., & Wheelock, M. J. (1999). N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *The Journal of Cell Biology*, *147*(3), 631–643. <https://doi.org/10.1083/JCB.147.3.631>
- Nishii, K., Morimoto, S., Minakami, R., Miyano, Y., Hashizume, K., Ohta, M., Zhan, D. Y., Lu, Q. W., & Shibata, Y. (2008). Targeted disruption of the cardiac troponin T gene causes sarcomere disassembly and defects in heartbeat within the early mouse embryo. *Developmental Biology*, *322*(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.07.007>
- Oenga, G. N., Spink, D. C., & Carpenter, D. O. (2004). TCDD and PCBs inhibit breast cancer cell proliferation in vitro. *Toxicology in Vitro*, *18*(6), 811–819. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.04.004>
- Oka, H., Shiozaki, H., Kobayashi, K., Inoue, M., Tahara, H., Kobayashi, T., Takatsuka, Y., Matsuyoshi, N., Mirano, S., Takeichi, M., & Mori, T. (1993). Expression of E-Cadherin Cell Adhesion Molecules in Human Breast Cancer Tissues and Its Relationship to Metastasis. *CANCER RESEARCH*, *5*, 1696–1701.



Oliver-Gelabert, A., García-Mendívil, L., Vallejo-Gil, J. M., Fresneda-Roldán, P. C., Andelová, K., Fañanás-Mastral, J., Vázquez-Sancho, M., Matamala-Adell, M., Sorribas-Berjón, F., Ballester-Cuenca, C., Tribulova, N., Ordovás, L., Diez, E. R., & Pueyo, E. (2020). Automatic quantification of cardiomyocyte dimensions and connexin 43 lateralization in fluorescence images. *Biomolecules*, *10*(9), 1–25.

<https://doi.org/10.3390/biom10091334>

OMS. (2021). *Cardiovascular diseases (CVDs)*. Retrieved September 28, 2021, from [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

Padmanaban, V., Krol, I., Suhail, Y., Szczerba, B. M., Aceto, N., Bader, J. S., & Ewald, A. J. (2019). E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer. *Nature* *2019* *573*:7774, *573*(7774), 439–444. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1526-3>

Palatini, P. (2011). Role of elevated heart rate in the development of cardiovascular disease in hypertension. *Hypertension*, *58*(5), 745–750.

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.173104>

Paňková, K., Rösel, D., Novotný, M., & Brábek, J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(1), 63–71. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0132-1>

Parada, H., Wolff, M. S., Engel, L. S., Eng, S. M., Khankari, N. K., Neugut, A. I., Teitelbaum, S. L., & Gammon, M. D. (2016). Polychlorinated biphenyls and their association with survival following breast cancer. *European Journal of Cancer*, *56*, 21–30.

<https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2015.11.023>

Park, H., Lee, S. J., Kang, J. H., & Chang, Y. S. (2007). Congener-specific approach to human PCB concentrations by serum analysis. *Chemosphere*, *68*(9), 1699–1706.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.03.058>

Park, M. H., Park, W. S., & Jo, S. H. (2012). Acute alteration of cardiac ECG, action potential, I<sub>Kr</sub> and the human ether-a-go-go-related gene (hERG) K<sup>+</sup> channel by PCB 126 and PCB 77. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *262*(1), 60–69.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.04.019>

Parkin, D. M., Boyd, L., & Walker, L. C. (2011). The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *British Journal of Cancer*, *105*(S2), S77–S81. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.489>

Parri, M., & Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Communication and Signaling*, *8*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-23>

Patandin, S., Koopman-Esseboom, C., De Ridder, M. A. J., Weisglas-Kuperus, N., & Sauer, P. J. J. (1998). Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on birth size and growth in Dutch children. *Pediatric Research*, *44*(4), 538–545. <https://doi.org/10.1203/00006450-199810000-00012>

Patandin, S., Lanting, C. I., Mulder, P. G. H., Boersma, E. R., Sauer, P. J. J., & Weisglas-Kuperus, N. (1999). Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age. *Journal of Pediatrics*, *134*(1), 33–41. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(99\)70369-0](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(99)70369-0)

Pérez-García, L. J. (2004). Metaloproteinasas y piel. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, *95*(7), 413–423. [https://doi.org/10.1016/S0001-7310\(04\)76850-7](https://doi.org/10.1016/S0001-7310(04)76850-7)

Perkins, J. T., Petriello, M. C., Newsome, B. J., & Hennig, B. (2016). Polychlorinated biphenyls and links to cardiovascular disease. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(3), 2160–2172. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4479-6>

Perret-Guillaume, C., Joly, L., & Benetos, A. (2009). Heart Rate as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. *Progress in Cardiovascular Diseases*, *52*(1), 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2009.05.003>

Petrik, J., Drobna, B., Pavuk, M., Jursa, S., Wimmerova, S., & Chovancova, J. (2006). Serum PCBs and organochlorine pesticides in Slovakia: Age, gender, and residence as determinants of organochlorine concentrations. *Chemosphere*, *65*(3), 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.02.002>

Pickup, M. W., Mouw, J. K., & Weaver, V. M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Reports*, *15*(12), 1243–1253. <https://doi.org/10.15252/embr.201439246>

Pijuan, J., Barceló, C., Moreno, D. F., Maiques, O., Sisó, P., Marti, R. M., Macià, A., & Panosa, A. (2019). In vitro cell migration, invasion, and adhesion assays: From cell imaging to data analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *7*(JUN), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00107>

Pons, L. (2004). Metaloproteinasas y matriz extracelular dérmica. *Offarm*, *23*(5), 147–148. <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-mataloproteinasas-matriz-extracelular-dermica-13061808>

Quijano, L., Marín, S., Millan, E., Yusà, V., Font, G., & Pardo, O. (2018). Dietary exposure and risk assessment of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls of the population in the Region of Valencia (Spain). *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, *35*(4), 740–749. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1414960>

- Raftopoulou, M., & Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology*, 265(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.06.003>
- Rakha, E. A., Abd El Rehim, D., Pinder, S. E., Lewis, S. A., & Ellis, I. O. (2005). E-cadherin expression in invasive non-lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance. *Histopathology*, 46(6), 685–693. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02156.x>
- Rebuzzini, P., Cebal, E., Fassina, L., Alberto Redi, C., Zuccotti, M., & Garagna, S. (2015). Arsenic trioxide alters the differentiation of mouse embryonic stem cell into cardiomyocytes. *Scientific Reports*, 5(October). <https://doi.org/10.1038/srep14993>
- Rebuzzini, P., Civello, C., Fassina, L., Zuccotti, M., & Garagna, S. (2021). Functional and structural phenotyping of cardiomyocytes in the 3D organization of embryoid bodies exposed to arsenic trioxide. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02590-8>
- Rebuzzini, P., Zuccolo, E., Civello, C., Fassina, L., Arechaga, J., Izquierdo, A., Faris, P., Zuccotti, M., Moccia, F., & Garagna, S. (2018). Polychlorinated biphenyls reduce the kinematics contractile properties of embryonic stem cells-derived cardiomyocytes by disrupting their intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36333-z>
- Reil, J. C., Custodis, F., Swedberg, K., Komajda, M., Borer, J. S., Ford, I., Tavazzi, L., Laufs, U., & Böhm, M. (2011). Heart rate reduction in cardiovascular disease and therapy. *Clinical Research in Cardiology*, 100(1), 11–19. <https://doi.org/10.1007/s00392-010-0207-x>
- Riedel, F., Götte, K., Schwalb, J., Bergler, W., & Hörmann, K. (2000). Expression of 92-kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology*, 17(6), 1099–1105. <https://doi.org/10.3892/IJO.17.6.1099>
- Robertson, L. W., & Ludewig, G. (2011). Polychlorinated Biphenyl (PCB) carcinogenicity with special emphasis on airborne PCBs. *Gefahrstoffe, Reinhaltung Der Luft = Air Quality Control / Herausgeber, BIA Und KRdL Im VDI Und DIN*, 71(1–2), 25. [/pmc/articles/PMC3113507/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2113507/)
- Roomi, M. W., Monterrey, J. C., Kalinovsky, T., Rath, M., & Niedzwiecki, A. (2009). Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncology Reports*, 21(5), 1323–1333. [https://doi.org/10.3892/OR\\_00000358/HTML](https://doi.org/10.3892/OR_00000358/HTML)
- Ruder, A. M., Hein, M. J., Nilsen, N., Waters, M. A., Laber, P., Davis-King, K., Prince, M. M., & Whelan, E. (2006). Mortality among workers exposed to polychlorinated biphen-

- yls (PCBs) in an electrical capacitor manufacturing plant in Indiana: An update. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 18–23. <https://doi.org/10.1289/ehp.8253>
- Rünger, T. M. (2016). Mechanisms of Melanoma Promotion by Ultraviolet Radiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(9), 1751–1752. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.04.001>
- Safe, S. H. (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 24(2), 87–149. <https://doi.org/10.3109/10408449409049308>
- Saxena, M., & Christofori, G. (2013). Rebuilding cancer metastasis in the mouse. *Molecular Oncology*, 7(2), 283–296. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.02.009>
- Sergeev, A. V., & Carpenter, D. O. (2005). Hospitalization rates for coronary heart disease in relation to residence near areas contaminated with persistent organic pollutants and other pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 113(6), 756–761. <https://doi.org/10.1289/ehp.7595>
- Silberhorn, E. M., Glauert, H. P., & Robertson, L. W. (1990). Critical reviews in: Carcinogenicity of polyhalogenated biphenyls: PCBs and PBBs. In *Critical Reviews in Toxicology* (Vol. 20, Issue 6, pp. 440–496). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.3109/10408449009029331>
- Sinks, T., Steele, G., Smith, A. B., Watkins, K., & Shults, R. A. (1992). Mortality among Workers Exposed to Polychlorinated Biphenyls. *American Journal of Epidemiology*, 136(4), 389–398. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a116511>
- Šitum, M., Buljan, M., Kolić, M., & Vučić, M. (2014). Melanoma - Clinical, dermatoscopic, and histopathological morphological characteristics. *Acta Dermatovenerologica Croatica*, 22(1), 1–12.
- Sommers, C. L., Byers, S. W., Thompson, E. W., Torri, J. A., & Gelmann, E. R. (1994). Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. In *Breast Cancer Research and Treatment* (Vol. 31).
- Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2016). Carcinogenesis explained within the context of a theory of organisms. In *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (Vol. 122, Issue 1, pp. 70–76). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.07.004>
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma<sup>1,2</sup>. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409–1416. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409>

- Stillerman, K. P., Mattison, D. R., Giudice, L. C., & Woodruff, T. J. (2008). Environmental exposures and adverse pregnancy outcomes: A review of the science. *Reproductive Sciences*, *15*(7), 631–650. <https://doi.org/10.1177/1933719108322436>
- Stølevik, S. B., Nygaard, U. C., Namork, E., Haugen, M., Kvaem, H. E., Meltzer, H. M., Alexander, J., van Delft, J. H. M., Loveren, H. van, Løvik, M., & Granum, B. (2011). Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins is associated with increased risk of wheeze and infections in infants. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(8), 1843–1848. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.05.002>
- Stølevik, S. B., Nygaard, U. C., Namork, E., Haugen, M., Meltzer, H. M., Alexander, J., Knutsen, H. K., Aaberge, I., Vainio, K., van Loveren, H., Løvik, M., & Granum, B. (2013). Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from the maternal diet may be associated with immunosuppressive effects that persist into early childhood. *Food and Chemical Toxicology*, *51*(1), 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.027>
- Su, D. M., Zhang, Q., Wang, X., He, P., Zhu, Y. J., Zhao, J., Rennert, O. M., & Su, Y. A. (2009). Two types of human malignant melanoma cell lines revealed by expression patterns of mitochondrial and survival-apoptosis genes: Implications for malignant melanoma therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, *8*(5), 1292–1304. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-1030>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Suzuki, G., Nakano, M., & Nakano, S. (2005). Distribution of PCDDs/PCDFs and Co-PCBs in human maternal blood, cord blood, placenta, milk, and adipose tissue: Dioxins showing high toxic equivalency factor accumulate in the placenta. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *69*(10), 1836–1847. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1836>
- Taddei, M. L., Giannoni, E., Morandi, A., Ippolito, L., Ramazzotti, M., Callari, M., Gandellini, P., & Chiarugi, P. (2014). Mesenchymal to amoeboid transition is associated with stem-like features of melanoma cells. *Cell Communication and Signaling*, *12*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-12-24>
- Tam, N., Lai, K. P., & Kong, R. Y. C. (2022). Comparative transcriptomic analysis reveals reproductive impairments caused by PCBs and OH-PCBs through the dysregulation of ER and AR signaling. *Science of the Total Environment*, *802*, 149913. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149913>

- Taylor, R., Najafi, F., & Dobson, A. (2007). Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: Effects of study type and continent. *International Journal of Epidemiology*, 36(5), 1048–1059. <https://doi.org/10.1093/ije/dym158>
- Theocharis, A. D., Manou, D., & Karamanos, N. K. (2019). The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS Journal*, 286(15), 2830–2869. <https://doi.org/10.1111/febs.14818>
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 97, pp. 4–27). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends - An update. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 25(1), 16–27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>
- Turrio-Baldassarri, L., Abate, V., Battistelli, C. L., Carasi, S., Casella, M., Iacovella, N., Indelicato, A., Rocca, C. La, Scarcella, C., & Alivernini, S. (2008). PCDD/F and PCB in human serum of differently exposed population groups of an Italian city. *Chemosphere*, 73(1 SUPPL.), 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.01.081>
- Van Dartel, D. A. M., & Piersma, A. H. (2011). The embryonic stem cell test combined with toxicogenomics as an alternative testing model for the assessment of developmental toxicity. *Reproductive Toxicology*, 32(2), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.04.008>
- Verma, R. P., & Hansch, C. (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(6), 2223–2268. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.011>
- Walker, C., Mojares, E., & Del Río Hernández, A. (2018). Role of extracellular matrix in development and cancer progression. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/ijms19103028>
- Walkowiak, J., Wiener, J. A., Fastabend, A., Heinzow, B., Krämer, U., Schmidt, E., Steingrüber, H. J., Wundram, S., & Winneke, G. (2001). Environmental exposure to polychlorinated biphenyls and quality of the home environment: Effects on psychodevelopment in early childhood. *Lancet*, 358(9293), 1602–1607. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06654-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06654-5)
- Wang, C., Cui, R., Niu, C., Zhong, X., Zhu, Q., Ji, D., Li, X., Zhang, H., Liu, C., Zhou, L., Li, Y., Xu, G., & Wei, Y. (2021). Low-dose PCB126 exposure disrupts cardiac metabolism and causes hypertrophy and fibrosis in mice. *Environmental Pollution*, 290(August), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118079>

- Ward, E. M., Schulte, P., Grajewski, B., Andersen, A., Patterson, D. G., Turner, W., Jellum, E., Deddens, J. A., Friedland, J., Roeleveld, N., Waters, M., Ann Butler, M., Dipietro, E., & Needham, L. L. (2000). Serum organochlorine levels and breast cancer: A nested case-control study of Norwegian women. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 9(12), 1357–1367.
- Weatherbee, B. A. T., Cui, T., & Zernicka-Goetz, M. (2021). Modeling human embryo development with embryonic and extra-embryonic stem cells. *Developmental Biology*, 474, 91–99. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2020.12.010>
- Weisglas-Kuperus, N., Patandin, S., Berbers, G. A. M., Sas, T. C. J., Mulder, P. G. H., Sauer, P. J. J., & Hooijkaas, H. (2000). Immunologic Effects of Background Exposure to Polychlorinated Biphenyls and Dioxins in Dutch Preschool Children. *Environmental Health Perspectives*, 108(12), 1203. <https://doi.org/10.2307/3434834>
- Welch, D. R., & Hurst, D. R. (2019). Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Research*, 79(12), 3011–3027. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0458>
- Wielsøe, M., Kern, P., & Bonefeld-Jørgensen, E. C. (2017). Serum levels of environmental pollutants is a risk factor for breast cancer in Inuit: A case control study. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 16(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0269-6>
- Wingfors, H., Seldén, A. I., Nilsson, C., & Haglund, P. (2006). Identification of markers for PCB exposure in plasma from Swedish construction workers removing old elastic sealants. *The Annals of Occupational Hygiene*, 50(1), 65–73. <https://doi.org/10.1093/ANNHYG/MEI063>
- Wingfors, Håkan, Lindström, G., Van Bavel, B., Schuhmacher, M., & Hardell, L. (2000). Multivariate data evaluation of PCB and dioxin profiles in the general population in Sweden and Spain. *Chemosphere*, 40(9–11), 1083–1088. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00356-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00356-2)
- Wobus, A. M., Guan, K., Yang, H. T., & Boheler, K. R. (2002). Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 185, Issue June 2015). <https://doi.org/10.1385/1-59259-241-4:127>
- Wobus, Anna M., & Boheler, K. R. (2005). Embryonic stem cells: Prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiological Reviews*, 85(2), 635–678. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00054.2003>
- Wolff, M. S., Toniolo, P. G., Lee, E. W., Rivera, M., & Dubin, N. (1993). Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 85(8), 648–652. <https://doi.org/10.1093/jnci/85.8.648>

- Woolcott, C. G., Aronson, K. J., Hanna, W. M., SenGupta, S. K., McCready, D. R., Sterns, E. E., & Miller, A. B. (2001). Organochlorines and breast cancer risk by receptor status, tumor size, and grade (Canada). *Cancer Causes and Control*, *12*(5), 395–404. <https://doi.org/10.1023/A:1011289905751>
- Wyss, P. A., Mühlebach, S., & Bickel, M. H. (1986). Long-term pharmacokinetics of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (6-CB) in rats with constant adipose tissue mass. *Drug Metabolism and Disposition*, *14*(3).
- Yakushiji, T., Watanabe, I., Kuwabara, K., Tanaka, R., Kashimoto, T., Kunita, N., & Hara, I. (1984). Rate of decrease and half-life of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the blood of mothers and their children occupationally exposed to PCBs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *13*(3), 341–345. <https://doi.org/10.1007/BF01055285>
- Yamashita, N., Tokunaga, E., Imori, M., Inoue, Y., Tanaka, K., Kitao, H., Saeki, H., Oki, E., & Maehara, Y. (2018). Epithelial Paradox: Clinical Significance of Coexpression of E-cadherin and Vimentin With Regard to Invasion and Metastasis of Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, *18*(5), e1003–e1009. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.02.002>
- Yao, D., Dai, C., & Peng, S. (2011). Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Molecular Cancer Research*, *9*(12), 1608–1620. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0568>
- Yassi, A., Tate, R. B., & Routledge, M. (2003). Cancer incidence and mortality in workers employed at a transformer manufacturing plant: Update to a cohort study. *American Journal of Industrial Medicine*, *44*(1), 58–62. <https://doi.org/10.1002/ajim.10237>
- Yoon, S. O., Park, S. J., Yun, C. H., & Chung, A. S. (2003). Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, *36*(1), 128–137. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2003.36.1.128>
- Yoshida, R., Kimura, N., Harada, Y., & Ohuchi, N. (2001). The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *International Journal of Oncology*, *18*(3), 513–520. <https://doi.org/10.3892/ijo.18.3.513>
- Yufang, Z., Cen, C., Xiu, W., Panpan, G., Xinyu, Z., Zhiqiang, Y., & Jing, A. (2015). HBCD and PCBs enhance the cell migration and invasion of HepG2 via the PI3 K/Akt pathway. *Toxicology Research*, *4*(3), 677–685. <https://doi.org/10.1039/c4tx00108g>
- Yuzhalin, A. E., Lim, S. Y., Kutikhin, A. G., & Gordon-Weeks, A. N. (2018). Dynamic matrisome: ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, *1870*(2), 207–228. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.09.002>



- Yuzhalin, A. E., Urbonas, T., Silva, M. A., Muschel, R. J., & Gordon-Weeks, A. N. (2018). A core matrisome gene signature predicts cancer outcome. *British Journal of Cancer*, *118*(3), 435–440. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.458>
- Zani, C., Ceretti, E., Covolo, L., & Donato, F. (2017). Do polychlorinated biphenyls cause cancer? A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies on risk of cutaneous melanoma and non-Hodgkin lymphoma. *Chemosphere*, *183*, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.053>
- Zeng, R. J., Zheng, C. W., Chen, W. X., Xu, L. Y., & Li, E. M. (2020). Rho GTPases in cancer radiotherapy and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, *39*(4), 1245–1262. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09923-5>
- Zettner, M. A., Flor, S., Ludewig, G., Wagner, J., Robertson, L. W., & Lehmann, L. (2007). Quinoid metabolites of 4-monochlorobiphenyl induce gene mutations in cultured Chinese hamster V79 cells. *Toxicological Sciences*, *100*(1), 88–98. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm204>
- Zhang, F., Shi, Y., Zhang, L., Zhang, B., Wei, X., Yang, Y., Wang, R., & Niu, R. (2007). Epithelial-Mesenchymal Transitions and the Expression of Twist in MCF-7/ADR, Human Multidrug-Resistant Breast Cancer Cells. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, *4*(1). <https://doi.org/10.1007/s11805-007-00021-2>
- Zhang, Y., Wise, J. P., Holford, T. R., Xie, H., Boyle, P., Zahm, S. H., Rusiecki, J., Zou, K., Zhang, B., Zhu, Y., Owens, P. H., & Zheng, T. (2004). Serum polychlorinated biphenyls, cytochrome P-450 1A1 polymorphisms, and risk of breast cancer in Connecticut women. *American Journal of Epidemiology*, *160*(12), 1177–1183. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh346>
- Zhu, M., Yuan, Y., Yin, H., Guo, Z., Wei, X., Qi, X., Liu, H., & Dang, Z. (2022). Environmental contamination and human exposure of polychlorinated biphenyls (PCBs) in China: A review. *Science of the Total Environment*, *805*, 150270. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150270>
- Zietz, B. P., Hoopmann, M., Funcke, M., Huppmann, R., Suchenwirth, R., & Gierden, E. (2008). Long-term biomonitoring of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human milk from mothers living in northern Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *211*(5–6), 624–638. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2008.04.001>

## **PUBLICACIONES**

## 8. PUBLICACIONES

### Publicaciones durante el periodo pre-doctoral:

Rebuzzini, P., Zuccolo, E., Civello, C., Fassina, L., Arechaga, J., Izquierdo, A., Faris, P., Zuccotti, M., Moccia, F., & Garagna, S. (2018). **Polychlorinated biphenyls reduce the kinematics contractile properties of embryonic stem cells-derived cardiomyocytes by disrupting their intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics.** *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36333-z>