Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Acción del hexaclorobenceno en la migración, invasión y metástasis en modelos experimentales de cáncer de mama

Pontillo, Carolina Andrea

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Pontillo, Carolina Andrea. (2012). Acción del hexaclorobenceno en la migración, invasión y metástasis en modelos experimentales de cáncer de mama. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Pontillo, Carolina Andrea. "Acción del hexaclorobenceno en la migración, invasión y metástasis en modelos experimentales de cáncer de mama". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Acción del hexaclorobenceno en la migración, invasión y metástasis en modelos experimentales de cáncer de mama

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Carolina Andrea Pontillo

Directora de Tesis: Dra. Andrea Silvana Randi
Consejero de Estudios: Omar Coso

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, febrero 2012

ACCIÓN DEL HEXACLOROBENCENO EN LA MIGRACIÓN, INVASIÓN Y METÁSTASIS EN MODELOS EXPERIMENTALES DE CÁNCER DE MAMA

RESUMEN

El Hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado considerado como probable carcinógeno humano. A nivel regional, este contaminante fue encontrado en leche materna de puérperas y en muestras de leche vacuna para consumo humano. Es un tóxico tipo dioxina, y como tal se une al receptor de hidrocarburos aromáticos (RHA), un factor de transcripción que modula procesos tales como apoptosis, proliferación y migración celular. El RHA está presente en el citosol e interacciona con el complejo que contiene a la quinasa de tirosina c-Src. Cuando estos tóxicos se unen al RHA, se pueden desencadenar dos mecanismos: 1) que el complejo tóxico-RHA se transloque al núcleo y module la expresión de genes con elementos de respuesta a dioxinas (DREs) en sus promotores y 2) que se libere la c-Src del complejo citosólico y active receptores de factores de crecimiento, como el Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (HER1). Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que el HCB aumenta el desarrollo y malignidad de tumores mamarios inducidos por N-Nitroso-N-metilurea en rata. En este mismo modelo se observó que el HCB activa la vía de señalización de c-Src/HER1 y disminuye la actividad del receptor de estrógenos (REα) en los tumores mamarios. Por otro lado, en estudios *in vitro* se demostró que el tóxico incrementa la proliferación y la actividad de c-Src en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (+REα). La tumorigénesis ocurre frecuentemente como resultado de la sobreexpresión de proteínas como el HER1 y la c-Src, que están involucradas en procesos celulares normales. Estas proteínas están usualmente sobreexpresadas en cáncer de mama en estadíos tardíos, y cooperan en la formación y progresión tumoral al favorecer procesos como la proliferación, migración e invasión celular, actividad de metaloproteasas y metástasis.

Los objetivos de este trabajo fueron investigar en ensayos *in vitro*, utilizando una línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (-REα) los efectos del tóxico en: a) la migración e invasión celular, b) la actividad y expresión de c-Src y HER1, c) la estimulación de las vías de señalización de ERK1/2, Akt2 y STAT5b, d) la actividad y expresión de metaloproteasas 2 y 9 (MMP2 y 9), y e) si los efectos observados dependen de las vías de señalización en estudio y de la unión del pesticida al RHA. Por otro lado, nos propusimos estudiar en ensayos *in vivo*, la acción del HCB sobre el crecimiento tumoral y la metástasis en modelos espontáneos y experimentales.

Nuestros resultados muestran que el HCB estimula las vías de transducción de señales de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2, la migración e invasión celular, la expresión de MMP2 y 9, así como la secreción y actividad de MMP9 en la línea celular MDA-MB-231, *in vitro*. Observamos que la migración e invasión celular inducida por el tóxico están mediadas por c-Src, HER1 y el RHA. A su vez, la secreción y actividad de la MMP9 estimulada por el HCB depende de HER1 y del RHA, mientras que el aumento en la expresión de MMP2 depende tanto de c-Src, HER1 como del RHA. Asimismo, en un modelo de xenotrasplante con la línea celular MDA-MB-231 en ratones atímicos, demostramos que el pesticida estimula el crecimiento tumoral (0.3 y 3 mg/kg

p.c.), mientras que induce la activación de c-Src, HER1, ERK1/2 y STAT5b e incrementa los niveles proteicos de MMP2 y 9 en los tumores mamarios en todas las dosis ensayadas. Por otro lado, en estudios de metástasis espontánea con tumores C4-HI en ratones BALB-c, encontramos que el HCB (0.3 y 3 mg/kg p.c.) aumenta el crecimiento de los tumores mamarios y el número de micrometástasis en hígado y pulmón. En los estudios de metástasis experimental con la línea celular LM3 en ratones BALB-c, el pesticida (3 mg/kg p.c.) incrementa el tamaño de las metástasis en pulmón.

En conclusión, en el presente trabajo demostramos por primera vez, que el HCB promueve la migración e invasión celular por las vías de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2, así como la expresión de MMP2 y MMP9 de manera dependiente del RHA. A su vez, observamos que el tóxico estimula el crecimiento tumoral y metástasis en pulmón e hígado en modelos experimentales de cáncer de mama.

PALABRAS CLAVES: Hexaclorobenceno, RHA, c-Src, HER1, ERK1/2, STAT5b, MMP2, MMP9, MDA-MB-231, migración, invasión, metástasis, cáncer de mama

HEXACHLOROBENZENE ACTION ON MIGRATION, INVASION AND METASTASIS IN BREAST CANCER EXPERIMENTAL MODELS

ABSTRACT

Hexachlorobenzene (HCB) is an organochlorine pesticide considered as a probable human carcinogen. This pollutant was found in puerperal mother milk and in samples of bovine milk for human consumption, at regional level. It is a dioxin-like compound and a weak ligand of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) protein, which is a transcription factor that modulates processes as apoptosis, proliferation and cell migration. AhR interacts with cytosolic complex containing c-Src kinase. Upon dioxin binding, two mechanisms can be triggered: 1) the AhR-toxic complex translocates to the nucleus and modulates gene expression with dioxin-responsive elements (DREs) and 2) c-Src kinase frees from its complex and activates growth factors receptors like Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR/HER1). In previous studies of our laboratory, we found that HCB has a co-carcinogenic effect in N-Nitroso N-methyl urea–induced mammary tumors in rats, enhancing their development and malignancy. We have also demonstrated that HCB activates c-Src/HER1 signaling pathway and decreases estrogen receptor α (ERα) activity of mammary tumors, in the same model. In previous *in vitro* studies, we observed that HCB induces cell proliferation and c-Src activity in ERα (+) MCF-7 breast cancer cell line. Tumorigenesis frequently occurs as a result of the overexpression of proteins that are otherwise involved in normal cell processes, as HER1 family and c-Src tyrosine kinase. These proteins are overexpressed in a high percentage of certain late-stage human breast cancers, and they cooperate in tumor formation and progression, promoting processes like cell proliferation, migration and invasion, metalloprotease activities and metastasis.

The aim of our study was to investigate the effects of HCB on: a) cell migration and invasion, b) c-Src and HER1 expression and activities, c) ERK1/2, Akt2 and STAT5b signaling pathways activation, d) MMP2 and MMP9 expression and activities, and e) AhR and c-Src/HER1 signaling pathways roles in ERα (-) MDA-MB-231 breast cancer cell line, *in vitro*. On the other hand, we studied the action of HCB on tumour growth and metastasis in spontaneous and experimental models, *in vivo*.

Our results demonstrate that HCB stimulates c-Src/HER1/STAT5b and HER1/ERK1/2 signaling pathways, cell migration and invasion, MMP2 and 9 expression, as well as MMP9 secretion and activity in MDA-MB-231, *in vitro*. We observed that c-Src, HER1, and AhR are involved in cell migration and invasion increased by HCB. Moreover, HCB-induced MMP2 expression depends on c-Src, HER1 and AhR; whereas only HER1 and AhR are involved in HCB-induced MMP9 secretion and activity. When MDA-MB-231 were xenotrasplanted in athymic mice, we observed that HCB estimulates tumoral growth (0.3 and 3 mg/kg b.w.), whereas the pesticide also increases c-Src, HER1, ERK1/2 and STAT5b activities, as well as MMP2 and 9 protein levels in mammary tumors at all assayed doses. On the other hand, we found that HCB (0.3 and 3 mg/kg b.w.) enhaces mammary tumor growth, as well as lung and liver micrometastasis levels in spontaneous metastasis models with C4-HI tumors in BALB-c mice. Furthermore, we observed

that the pesticide (3 mg/kg b.w.) enhances the lung metastasis size, in experimental metastasis assay with LM3 cell line in BALB-c mice.

In conclusion, in the present study we demonstrate for the first time, that HCB promotes cell migration and invasion through c-Src/HER1/STAT5b and HER1/ERK1/2 signaling pathways activation, as well as MMP2 and MMP9 expression in an AhR dependent manner. Moreover, we observe that the pesticide estimulates tumor growth and lung and liver metastasis in breast cancer experimental models.

KEYWORDS: Hexachlorobenzene, AhR, c-Src, HER1, ERK1/2, STAT5b, MMP2, MMP9, MDA-MB-231, migration, invasion, metastasis, breast cancer.

A la Dra. Diana Kleiman, por darme la posibilidad y el espacio para realizar esta tesis. Por su apoyo y colaboración.

A la Dra. Andrea Randi, por enseñarme no solo cuestiones de mesada y análisis de experimentos, sino también a lidiar con mis ansiedades y con las frustraciones que la labor científica a veces nos trae. Por su apoyo y paciencia. Y sobre toda las cosas, por su fuerza, su empuje, y por ser una muy buena directora, pero ante todo una ***muy buena persona****.*

A la Dra. Laura Álvarez y a Marcela Sánchez, por su apoyo y colaboración. Por sus consejos y contención que he recibido en momentos críticos. Se los agradezco de corazón.

A Flopi, Delfi, Lauri, Mecha, Ale y Ana Clara, mis grandes compañeras y amigas del laboratorio, con las cuales compartí diferentes etapas del trabajo. Por la paciencia, la contención, las largas charlas de todo tipo y por poder contar siempre con ustedes. Por hacer que en el laboratorio se viva un ambiente de tanto compañerismo.

A la Dra. Paola Rojas y la gente del laboratorio de Claudia Lanari, por su muy buena onda, energía y buena predisposición.

A la Dra. Claudia Lanari, por colaborar con nuestro trabajo y por abrirnos puertas para enriquecer nuestro trabajo.

Al Dr. Lucas Colombo, por su colaboración y buena predisposición.

Al personal no docente, especialmente a Priscila, David, Roberto y Daniel, por su buena onda. Por detenerse a compartir charlas de pasillo.

A la gente del quinto piso de medicina, por la buena onda y por prestarnos cosas de diferente índole, desde equipos a materiales cuando lo requeríamos.

A la Dra. Cristina Ibarra por prestarnos la centrífuga y otras cosas más.

A mi amiga Caro, mi hermana del alma. Por tantas cosas compartidas juntas…por contenerme tanto en esta etapa como en otras. Gracias por siempre estar cuando te necesito…

A mi amiga de toda la vida Juli, por estar siempre presente en todos los momentos importantes de mi vida. Gracias por tu amistad incondicional.

A las amigas que me dio la biología: Marce, Gabi y Romi. Por vivir tantas cosas durantes todos estos años juntas...gracias por siempre estar presentes!!!!

Al amor de mi vida, Mariano. Por la ***paciencia infinita*** *que me tuviste durante esta etapa. Por ser tan compañero, por estar presente en todo sentido. Por brindarme tanta contención…Gracias!!!!*

A Tonino, por acompañarme especialmente durante la escritura de esta tesis.

A mi mamá y mi papá por enseñarme tantas cosas. Por estar siempre presentes en cada paso de mi vida. Por contar con su apoyo. Por escucharme y aconsejarme.

A mi hermano, por prestarme un oído cuando lo necesito y por acompañarme en ésta como en otras etapas de mi vida.

TRABAJOS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL

-"Activation of c-Src/HER1/STAT5b and HER1/ERK1/2 signaling pathways and cell migration by hexachlorobenzene in MDA-MB-231 human breast cancer cell line"

Pontillo Carolina, García María Alejandra, Peña Delfina, Cocca Claudia, Chiappini Florencia, Alvarez Laura, Kleiman de Pisarev Diana y Randi Andrea.

Toxicological Sciences 120 (2): 284-296 (2011). ISSN 1096- 6080.

-"Action of Hexachlorobenzene on MDA-MB-231 human breast cancer cell invasion, MMP2 and MMP9 activities, tumour growth and metastasis in different animal models"

Pontillo Carolina, Rojas Paola, Chiappini Florencia, Ventura Clara, Cocca Claudia, Máximo Crocci, Lucas Colombo, Lanari Claudia, Kleiman de Pisarev Diana, Randi Andrea.

Trabajo en preparación.

INDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS	
INTRODUCCIÓN	1
1- Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs)	1
2- Hexaclorobenceno (HCB)	2
2.1 Características generales	2
2.2 Vías de absorción y eliminación	3
2.3 Efectos sobre la salud humana	4
2.4 Efectos sobre animales de experimentación	4
3- Receptor de Hidrocarburos Aromáticos	6
4- Cáncer de mama	9
4.1 Factores de riesgo	9
4.2 Aspectos generales	9
4.3 Transición epitelio-mesenquimática (TEM)	11
4.4 Migración e invasión celular	12
4.5 Metaloproteasas	15
4.6 Metástasis	19
4.7 Modelos experimentales de metástasis	22
5- Vías de transducción de señales	25
5.1 Quinasa de tirosina c-Src	25
5.2 Receptores de Factores de Crecimiento Epidérmico	27
6- Cáncer de mama y Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs)	31
OBJETIVOS	34
1- Hipótesis general	34
PARTE I: ACCIÓN DEL HEXACLOROBENCENO EN LA MIGRACIÓN CELULAR. IMPLICANCIA DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE c-SRC/HER1/STAT5B Y HER1/ERK1/2, Y ROL DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS	35
2- Objetivo general	35
3- Objetivos específicos	35
PARTE II: ACCIÓN DEL HEXACLOROBENCENO EN LA INVASIÓN CELULAR Y METÁSTASIS. ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*. IMPLICANCIA DE c-SRC, HER1 Y DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS	36
2- Objetivo general	36
3- Objetivos específicos	36

MATERIALES Y MÉTODOS 38

1- Materiales y Reactivos 38

2- Cultivos celulares 39
2.1 MDA-MB-231 39
2.2 LM3 39

3- Tumores 39

4- Ratones 40

5- Exposición de las células MDA-MB-231 al HCB 40

6- Obtención de lisados celulares de MDA-MB-231 40

7- Fraccionamiento subcelular de los tumores de mama 41

8- Determinación de la concentración de proteínas 41

9- Inmunoprecipitación del HER1 41

10- Electroforesis en geles de poliacrilamida 41

11- Ensayo de Inmunoblot 42

12- Ensayo de viabilidad celular 44

13- Ensayo de migración celular 44
13.1 Ensayo de la herida 44
13.2 Ensayo del transwell 44

14- Evaluación de la invasión celular 45

15- Rol de c-Src, HER1 y RHA 45

16- Ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa (RT-PCR) 45
16.1 Reacción de PCR para la metaloproteasa 9 (MMP9) 46
16.2 Reacción de PCR para la metaloproteasa 2 (MMP2) 46
16.3 Reacción de PCR para CYP1A1 46
16.4 Reacción de PCR para L19 46

17- Determinación de los niveles proteicos de MMPs intracelulares y secretados 47

18- Ensayo de Actividad de metaloproteasas 48

19- Evaluación de metástasis 48
19.1 Ensayo de metástasis espontánea en ratones hembra BALB-c atímicos (nu/nu) inoculados en la mama con células MDA-MB-231 48
19.2 Ensayo de metástasis espontánea en ratones hembra BALB-c con tumores C4-HI 49
19.3 Ensayo de metástasis experimental en ratones hembra BALB-c inoculados en la vena de la cola con la línea celular LM3 50

20- Análisis estadísticos 50

RESULTADOS 51

PARTE I:
ACCIÓN DEL HEXACLOROBENCENO EN LA MIGRACIÓN CELULAR. IMPLICANCIA DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE c-SRC/HER1/STAT5B Y HER1/ERK1/2, Y ROL DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS 51

1- El HCB induce la fosforilación de c-Src y del HER1 en función del tiempo de intoxicación 51

2- Efecto del HCB sobre la activación de STAT5b, ERK1/2 y Akt2 en función del tiempo 52

3- Estudio de la viabilidad celular 54

4- El HCB incrementa la activación de c-Src y HER1 en función de la dosis de exposición 55

5- Acción de diferentes dosis de HCB sobre la actividad de ERK1/2, Akt2 y STAT5b 56

6- Rol de c-Src y HER1 en las activaciones de ERK1/2 y STAT5b promovidas por HCB 58

7- Rol del RHA en la activación de las vías de señalización de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2 inducida por HCB 60

8- Efecto del HCB sobre la expresión del ARNm del CYP1A1 64

9- Acción del HCB sobre la migración celular 65
9.1. Ensayo de la herida 65
9.2. Ensayo del transwell 66

10- Rol de c-Src, HER1 y RHA en la migración celular promovida por HCB 67

PARTE II:
ACCIÓN DEL HEXACLOROBENCENO EN LA INVASIÓN CELULAR Y METÁSTASIS. ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO. IMPLICANCIA DE c-SRC, HER1 Y DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS 69

1- Acción del HCB sobre la expresión, secreción y actividad de las metaloproteasas 2 y 9 (MMP2 y 9) 69

2- Rol de c-Src y HER1 en los efectos inducidos por HCB en la expresión, secreción y actividad de MMP2 y 9 71

3- Rol del RHA en los efectos del HCB sobre la expresión, secreción y actividad de MMP2 y 9 73

4- El HCB altera los niveles de ARNm de MMP2 y 9 75

5- El HCB incrementa la invasión celular. Dependencia de c-Src, HER1 y RHA en la invasión celular inducida por el tóxico 77

6- Modelo de xenotrasplante con MDA-MB-231 en ratones hembra BALB-c atímicos 80
6.1. Incremento del crecimiento tumoral inducido por el pesticida 80

6.2. El HCB induce activación de c-Src y HER1 en los tumores de mama de ratones atímicos 82
6.3. El tóxico induce la fosforilación de ERK1/2 y de STAT5b en los tumores de mama de ratones atímicos 84
6.4. Aumento en los niveles de MMP2 y 9 inducido por HCB, en tumores de mama de ratones atímicos 87
6.5. Efecto del HCB sobre la metástasis en ratones BALB-c atímicos 90

7- Modelo de trasplante singenéico con la línea tumoral C4-HI en ratones BALB-c 92
7.1. El HCB induce el crecimiento de los tumores de mama C4-HI 92
7.2. Acción del tóxico sobre los niveles de MMP2 y 9 en los tumores de mama C4-HI en ratones BALB-c 94
7.3. Acción del HCB sobre la generación de micrometástasis a partir de tumores C4HI en ratones BALB-c 95

8- Modelo de metástasis experimental singenéico con células LM3 en ratones hembra BALB-c 99

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 102

BIBLIOGRAFÍA 120

ABREVIATURAS

A	Adenocarcinoma
Ab	Abcam
ADI	Carcinoma Ductal Infiltrante
AG1478	Tyrphostin
Akt	Proteína Quinasa B
α-NF	α-naftoflavona
AP-1	Proteína Activadora 1
ARNT	Proteína Translocadora Nuclear del Receptor RHA
BD	Becton Dickinson
BDT	BD Transduction
BR	Bio-Rad
BSA	Seroalbúmina Bovina
Ca	De Cabra
Cbfa1	Factor de unión al "Core" a-1
CD inf	Carcinoma Ductal Inflamatorio
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CMP	Cáncer de Mama Primario
COPs	Contaminantes Orgánicos Persistentes
CP	Policlonal de Conejo
CS	Cell Signaling
c-Src	Quinasa de tirosina citosólica normal
CYP1A1	Citocromo P450 1A1
DDD	Dicloro Difenil Dicloroetano
DDE	Dicloro Difenil dicloro Etileno
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DRE	Elementos de Respuesta a Dioxinas
EDTA	Ácido Etilen diamino Tetra acético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EGTA	Ácido Etilenglicol amino Tetra acético
EP	Efusión Pleural
ERK1/2	Quinasa Regulada por Señales Extracelulares
FAK	Quinasa de Adhesión Focal
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
GDP	Guanosina Disfosfato
GTP	Guanosina Trisfosfato
GTPasa	Guanosina Trifosfatasa
HCB	Hexaclorobenceno
HER-1	Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico
Hsp	Proteína de shock térmico
IARC	Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer (USA)
IGFs	Factores de Crecimiento Insulina símil
IPCS	International Programme on Chemical Safety
JAK	Quinasa Janus
M	Millipore
MAPK	Quinasa Activada por Mitógenos
ME	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteasa
MMTV	Virus del Tumor Mamario Murino

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NFκB	Factor de Transcripción Nuclear κB
NMC	Nódulo Metastásico Cutáneo
NMU	N-Nitroso N-Metilurea
PAHs	Hidrocarburos Aromáticos Polihalogenados
PCBs	Bifenilos Policlorados
4,7 PHE	4,7-ortofenantrolina
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 Quinasa
PIP	Fosfatidilinositol 3'-Fosfato
PMA	Ésteres de Forbol
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
PP2	4-Amino-5-(4-cloro- 145 fenil)-7-(t-butil) pirazolo [3,4-d] pirimidina
PTK	Quinasa de Tirosina
PVDF	Polivinil Difluoruro
RAFTK	Quinasa de Tirosina Relacionada a la Adhesión Focal
REα	Receptor de Estrógenos α
RHA	Receptor de Hidrocarburos Aromáticos
RM	Monoclonal de Ratón
SC	Santa Cruz
SCID	Ratones con Inmunodeficiencia Severa Adquirida
SFB	Suero Fetal bovino
Src	Sarcoma
STAT	Transductor de Señales y Activador de la Transcripción
TCDD	2,3,7,8, Tetracloro dibenzo-p-dioxina
TEM	Transición Epitelio-Mesenquimática
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante-β
TIMPs	Inhibidores de Metaloproteasas de Tejidos
TME	Transición Mesenquimática-Epitelial
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TNF-α	Factor de Crecimiento Transformante-α
UP	UPSTATE
VEGF	Factor de Crecimiento Epidérmico Vascular
WAP	Proteína Ácida de Suero Lácteo
XRE	Elementos de Respuesta a Xenobióticos

INTRODUCCIÓN

1. Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs)

En el transcurso de los últimos 150 años, el hombre ha fabricado diversos compuestos químicos con el fin de satisfacer las necesidades crecientes del desarrollo tecnológico y mejorar su calidad de vida.

Un numeroso grupo de estas sustancias químicas se denominan contaminantes orgánicos persistentes (COPs). Estos compuestos son muy resistentes a la degradación tanto química como biológica, se magnifican a lo largo de la cadena trófica y suponen un alto riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Dentro de este grupo se encuentran, entre otros, los pesticidas organoclorados, los bifenilos policlorados (PCBs) y los compuestos "tipo dioxina", tales como dibenzodioxinas y dibenzofuranos (Wolff y Toniolo, 1995).

Debido a su estructura, los COPs son altamente lipofílicos, por lo que se acumulan en el tejido adiposo y en los componentes lipídicos del suero, consiguen atravesar la placenta y se encuentran en grandes cantidades en la leche materna. La Convención de Estocolmo (2001) prohibió o limitó el uso de muchos de estos compuestos y a partir de esta reglamentación, se implementaron estrategias para reducir su liberación al medio ambiente. Sin embargo, no solo muchos de estos compuestos aún se utilizan en la actualidad, sino que también los residuos de su antigua producción siguen siendo una fuente de exposición. En un estudio reciente en la Argentina, se encontró que el 91% de las muestras de leche materna proveniente de puérperas, contenían por lo menos un compuesto organoclorado, encontrándose al hexaclorobenceno como el segundo tóxico más frecuente (Der Parsehian, 2008).

Aunque generalmente no tengan gusto ni olor, aunque sean tan invisibles en algunos medios de comunicación, aunque se encuentren en concentraciones tan bajas en el imaginario colectivo, los COPs constituyen un riesgo real para la salud humana y el medio ambiente. Numerosos trabajos han demostrado que los COPs pueden tener diversos efectos adversos sobre la salud humana. Entre los posibles efectos se encuentran malformaciones embrionarias, esterilidad, problemas inmunológicos, hepatotoxicidad y cáncer. Sin embargo, la toxicidad de estas sustancias depende de la especie, el sexo y la edad de los organismos afectados, además de la dosis y el tiempo de exposición. Si bien como referencia en la población humana se han encontrado unos 20 ng de COPs/kg de peso corporal en tejido adiposo, existen casos en que el nivel de estas sustancias ha llegado a superar los 50 ng/kg. Se sabe que en animales de experimentación, dosis de 1 ng/kg por día o menores pueden causar alteraciones reproductivas y hepáticas (IPCS 1992). Es por ello que la regulación por organismos gubernamentales de estas sustancias es sumamente importante para la protección de la salud humana, de la sobrevida de todos los organismos vivientes y del medio ambiente en general.

2. Hexaclorobenceno

2.1 Características generales

El Hexaclorobenceno (HCB) es un hidrocarburo aromático clorado de fórmula molecular C_6Cl_6. En el medio ambiente, no se encuentra en forma natural y suele estar acompañado de otras sustancias como dibenzofuranos policlorados y dioxinas. Es prácticamente insoluble en agua pero es muy soluble en grasas y solventes orgánicos (IARC 2001).

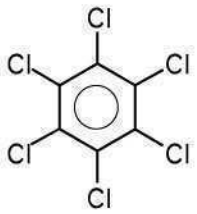
Posee una vida media larga en aire, suelo y sedimentos, por lo que es muy persistente, siendo designado como Contaminante Orgánico Persistente (COP) bajo la convención de Estocolmo (IARC 2001; Barber et al., 2005). Dada su volatilidad y resistencia a la degradación, el HCB puede ser fácilmente distribuido en el ambiente, encontrándose rastros a largas distancias de la fuente de emisión (Michielsen et al., 1999; IARC 2001).

El principal uso del HCB ha sido históricamente el de funguicida para tratar semillas de distintos granos destinadas a la siembra. Se comenzó a utilizar en 1933 pero su producción se hizo masiva recién hacia los años 50s y 60s, llegándose a un pico de producción mundial a fines de los 80s de 10.000 toneladas anuales (Barber et al., 2005). La producción comercial luego comenzó a disminuir debido a restricciones en su uso, aunque esto dependió de cada país. En Argentina, su uso fue restringido en el año 1993 y prohibido en el año 2000 (Resolución 750/00 Sagpa, publicada en el B.O. N°29. 517 del 02/11/2000).

Además, este compuesto ha sido utilizado también como agente preservante de madera, en la industria del aluminio, neumáticos, pirotecnia, producción de tinturas y en muchos otros productos industriales. Aunque su fabricación comercial ha cesado, se sigue generando HCB como subproducto y/o impureza de numerosos procesos de cloración y es también liberado al ambiente por la combustión incompleta y emanaciones de antiguos residuos de funguicidas (Michielsen et al., 1999; Zheng et al., 1999; Bailey, 2001; Barber et al., 2005; Reed et al., 2007).

La estabilidad química y alta persistencia del HCB le permiten acumularse en la cadena trófica, ocurriendo una biomagnificación significativa en ecosistemas acuáticos (Michielsen et al., 1999).

HEXACLOROBENCENO (HCB)



Nombre químico: Hexaclorobenceno

Nombres comerciales (lista parcial): Amaticin, Anticarie, Buncture, Bunt-no-more, Co-op hexa, Granox, No bunt, Sanocide, Smut-go, Sniecotox

CAS: 118-74-1; fórmula molecular: C_6CL_6; peso molecular: 282 g/mol.

Aspecto: Cristales monoclínicos blancos o sólido cristalino.

Propiedades: Punto de fusión: 227-230°C; punto de ebullición: 323-326°C (se sublima); K_H: 7,1 x 10^{-3} atm.m^3/mol a 20°C; log Koc: 2,56-4,54; log Kow: 3,03-6,42; solubilidad en agua: 40 µg/l a 20°C; presión de vapor: 1,089 x 10^{-5} mm Hg a 20°C.

Figura 1. Ficha técnica del HCB.

2.2 Vías de absorción y eliminación

La principal fuente de exposición global sobre la población humana es a través del consumo de alimentos contaminados, como productos lácteos, peces y carnes. La exposición también puede ocurrir a través de la inhalación de aire contaminado, por contacto dérmico, exposición en el útero o a través de la lactancia (Michielsen et al., 1999; Reed et al., 2007). Una vez absorbido, por su característica lipofílica el HCB se distribuye en órganos y tejidos con alto contenido lipídico, aumentando su concentración con el correr de los años por bioacumulación. Por ello, este compuesto puede acumularse en tejidos humanos como glándula mamaria, hígado, tiroides, tejido adiposo y ovario (van Raaij et al., 1993). La agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (US EPA) ha reportado que existen niveles detectables de HCB en tejido adiposo en el 95% de la población de ese país (Barber et al., 2005).

El HCB es degradado en el organismo por el sistema microsomal hepático citocromo P450 (isoformas CYP1A1, CYP1A2, CYP3A1 y CYP1A4) a pentaclorofenol y tetraclorohidroquinona, o declorado reductivamente para formar pentaclorobenceno (den Besten et al., 1993; Michielsen et al., 1999). La excreción del HCB ocurre por vía urinaria mayoritariamente como metabolitos del mismo, siendo los predominantes pentaclorofenol y pentaclorobenceno.

Se calcula que la ingesta diaria de HCB por adultos en la población norteamericana, a partir del aire, alimentos y suelo es de unos 3 ng/kg/día. Sin embargo, la ingesta promedio de HCB por infantes que amamantan es mucho mayor, ya que ha sido demostrada la transferencia del pesticida a través de la leche materna (Nakashima et al., 1997). La absorción del HCB es mayor

cuando es administrado disuelto en aceite que cuando se encuentra suspendido en un medio acuoso (ATSDR, 2002).

2.3 Efectos sobre la salud humana

Los efectos tóxicos del HCB incluyen porfirias, alteraciones tiroideas, daño hepático, daño renal, esplenomegalia, alteraciones neurológicas, teratogénesis y problemas inmunológicos (van Birgelen, 1998). La porfiria es la manifestación tóxica del HCB mejor estudiada. El episodio de intoxicación masiva con HCB más representativo ocurrió en Turquía entre 1954 y 1959, por la ingesta de harina elaborada con semillas de trigo tratadas con el funguicida. El principal efecto observado fue una epidemia de porfiria hepática contraída por aproximadamente 4000 personas (Gocmen et al., 1986; Gocmen et al., 1989; Gorman et al., 2007), observándose también hiperpigmentación, hirsutismo, debilidad, lesiones fotosensibles y pérdida de masa muscular esquelética. Además, los hijos de mujeres que ingirieron harina contaminada fueron expuestos a través de la placenta o por la leche materna, causando una alta mortalidad en niños menores de 2 años (Gocmen et al., 1989; IARC 2001). A su vez se registró un aumento en la frecuencia de nacimientos de niños con fragilidad en la piel, trastornos neurológicos, corta estatura, extremidades pequeñas, y agrandamiento de la glándula tiroidea (Courtney, 1979; ATSDR, 2002).

2.4 Efectos sobre animales de experimentación

En animales de experimentación, se han demostrado numerosos efectos perjudiciales del HCB, como inmunotoxicidad, neurotoxicidad, aumento de la síntesis de enzimas microsomales en hígado, desencadenamiento de porfiria hepática, hipotiroxinemia y adenomas tiroideos (Cabral et al., 1977; Kleiman de Pisarev et al., 1990; ATSDR 2002).

Hay sustancial evidencia de la carcinogenicidad del HCB en animales de experimentación, pero los resultados en humanos son contradictorios. En ratones y ratas, el HCB produjo tumores hepáticos y renales. Además, su administración perinatal en ratas aumentó la incidencia de adenomas paratiroideos en machos y feocromocitomas adrenales en hembras. En hamsters, el tóxico indujo hemangioendoteliomas hepáticos y adenomas tiroideos (IARC 2001). En base a estas evidencias al HCB le fue asignado el papel de "probable carcinógeno humano" por la Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer (IARC) (IARC 2001; ATSDR 2002).

Se demostró, además, que el HCB promueve el desarrollo de cáncer en múltiples órganos y tejidos, tales como hígado (Gustafson et al., 2000; Ou et al., 2001) y tiroides en hamsters, ratas y ratones (Courtney, 1979; Cabral y Shubik, 1986).

El tratamiento de roedores con HCB produjo la disminución en los niveles de corticosterona y cortisol séricos (Foster et al., 1995) y disfunciones inmunológicas (Ezendam et al., 2004; Ezendam et al., 2003). Asimismo se observó que el HCB indujo, en ciertos organismos,

alteraciones a nivel del sistema nervioso central (Sundlof et al., 1981) y del sistema reproductivo (Foster et al., 1992; Alvarez et al., 2000).

En un estudio realizado en nuestro laboratorio, observamos que la administración de HCB (1 g/kg p.c.) a ratas con ciclos estrales espontáneos durante 30 días disminuyó significativamente los niveles de receptor de estrógeno uterino, así como los niveles circulantes de estradiol y prolactina, mientras que se observó a su vez una disminución en el número de óvulos liberados (Alvarez et al., 2000). También se demostró que el HCB presenta una capacidad escasa o nula de unirse al Receptor de Estrógenos α (REα) (Noguerol et al., 2006).

Trabajos previos de nuestro laboratorio en hígado de rata, demostraron que el HCB aumenta la internalización y la actividad de quinasa de tirosina (PTK) del Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (REGF/HER1), así como el contenido de fosfotirosina de numerosas proteínas citosólicas y de membrana (Randi et al., 2003a). Además, se observó que el tóxico estimula la actividad de la ornitina decarboxilasa, induce un aumento en la expresión proteica de los proto-oncogenes c-Myc, c-Fos y c-Jun, e incrementa los niveles de poliaminas libres (Randi et al., 2003b). En un estudio más reciente, encontramos que el HCB incrementa la actividad de c-Src y la fosforilación en Tirosina-845 del HER1 (sitio específico para la c-Src) tanto en hígado de rata como en la línea celular normal de hígado de rata WBF-344, demostrando que el tóxico transactiva al HER1 vía c-Src en dicho modelo. Asismismo observamos que el pesticida induce la translocación del Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (RHA) del citosol al núcleo de manera dependiente de la dosis (Randi et al., 2008).

Por otro lado, en nuestro laboratorio se realizaron estudios sobre el mecanismo de acción del HCB en cáncer de mama. En trabajos *in vivo,* encontramos que el HCB tiene un efecto co-carcinogénico en la formación de tumores mamarios inducidos por N-Nitroso N-Metilurea (NMU) en ratas, incrementando el número de tumores por rata, el volumen tumoral y la malignidad de los mismos. Además, demostramos que el pesticida estimula la vía de señalización de los Factores de Crecimiento Insulina símil (IGFs) aumentando la fosforilación del IRS-1 en glándula mamaria, mientras que disminuye en tumores mamarios (Randi et al., 2006). En el mismo modelo, demostramos que el HCB estimula la actividad del Receptor de Estrógenos α (REα) por fosforilación en la Tirosina-537 a través de la c-Src, y la vía de señalización c-Src/HER1 en glándula mamaria normal. A su vez se observó que el tóxico activa dicha vía, mientras que disminuye la actividad del REα en los tumores mamarios. Estas alteraciones moleculares se correlacionan con cambios histopatológicos de inducción de lesiones preneoplásicas y efecto estrogénico en glándula mamaria, mientras que en tumores observamos que el pesticida promueve un fenotipo de mayor malignidad (Peña et al., 2012).

En estudios en cáncer de mama *in vitro*, observamos que el HCB induce proliferación celular y estimula la vía de señalización de los IGFs de una manera dependiente del REα en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 (+REα). Además, encontramos que el pesticida a dosis bajas de exposición, aumenta la actividad de c-Src quinasa y la fosforilación del REα en Tirosina-537 a las mismas dosis que estimula la proliferación celular, mientras que a dosis

altas induce apoptosis (García et al., 2010). Por otro lado en otra línea celular derivada de carcinoma mamario humano con fenotipo de mayor malignidad, que no expresa REα*,* MDA-MB-231, el tóxico no altera la proliferación celular a pesar de estimular la vía de los IGFs (García 2008).

3. Receptor de Hidrocarburos Aromáticos

El Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (RHA) fue descubierto estudiando el mecanismo de acción del tóxico ambiental 2,3,7,8, tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), ya que mediaba la mayoría de los efectos de dicho compuesto (Safe et al., 2000). Es una proteína receptora que se activa por unión al ligando formando un complejo que funciona como factor de transcripción. Pertenece a la familia de los factores de transcripción bHLH/PAS (Bock y Kohle, 2005).

El RHA en ausencia de ligando se encuentra en el citosol de la mayoría de las células formando un complejo con la chaperonas Hsp90, 70 y 50 y co-chaperonas como ARA9 y p23, estando además presente la proteína quinasa de tirosina c-Src (Enan y Matsumura, 1996). Estudios más recientes demuestran que la c-Src está formando parte de un complejo citosólico diferente al del RHA (Park et al., 2007). La unión del RHA al ligando desencadenaría dos tipos de mecanismos: 1) a nivel nuclear, donde el receptor unido al ligando se disocia de las chaperonas, se transloca al núcleo y forma un heterodímero con la proteína translocadora nuclear del receptor RHA (ARNT), modulando la transcripción de genes blanco; y 2) a nivel de membrana plasmática, donde el complejo de la c-Src quinasa interactúa con el complejo del RHA, liberándose la c-Src que activa a Receptores de Factores de Crecimiento, estimulando su fosforilación y las vías de señalización correspondientes. El complejo resultante ha sido denominado CRHA (RHAC en inglés) (Matsumura, 1994). De esta manera, el RHA posee efectos no genómicos asociados a la activación de vías de señalización intracelulares y efectos genómicos al actuar como factor de transcripción modulando la expresión de genes blanco (**Figura 2**).

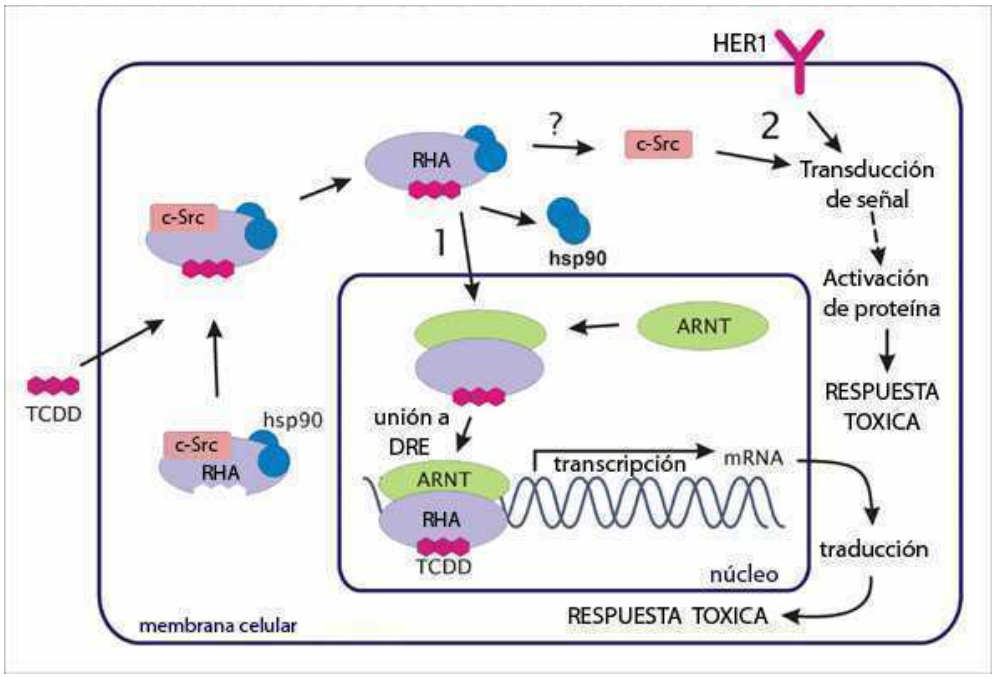


Figura 2. Vía de señalización del RHA. Se muestran dos vías posibles: 1) camino de señalización nuclear (efectos genómicos), donde el RHA heterodimeriza con ARNT para inducir la transcripción de genes blanco; y 2) camino de señalización de membrana celular (efectos no genómicos), donde la c-Src interactúa con Receptores de Factores de Crecimiento.

El complejo CRHA (tóxico-RHA-ARNT) ejerce su función de factor de transcripción mediante la unión a elementos de respuesta a dioxinas (DRE) o elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) que se encuentran en los promotores de los genes blanco. Ejemplo de ellos son las enzimas que metabolizan xenobióticos de fase I y de fase II como citocromo P4501A1 y la glutation-S-transferasa respectivamente. Luego de cumplir su función, el complejo se transloca al citosol y es degradado por acción del proteosoma (Barouki et al., 2007).

Se ha encontrado que además de unir TCDD, el RHA es capaz de interactuar con diversos "compuestos tipo dioxina" con diferente afinidad, como los Hidrocarburos Aromáticos Polihalogenados (PAHs). Se observó que la intensidad de las respuestas bioquímicas y tóxicas a estos compuestos correlaciona con la afinidad de unión al receptor (Safe et al., 2000).

El HCB ha sido clasificado como "compuesto tipo dioxina" ya que cumple los tres requisitos para dicha consideración: 1) se une al Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (RHA) induciendo así la expresión de enzimas que metabolizan xenobióticos como el citocromo P4501A1 (CYP1A1) (Smith et al., 1993); 2) presenta efectos similares a los producidos por la TCDD, considerada la dioxina más tóxica; y 3) se bioacumula en suelo y en los tejidos grasos. El HCB tiene una afinidad por el RHA 10000 veces menor que la TCDD, el agonista más fuerte conocido (Hahn et al., 1989; van Birgelen, 1998). Sin embargo la evidencia acerca de que la toxicidad del HCB está mediada por la interacción con dicho receptor, no es concluyente. El HCB por ser un agonista débil del RHA (Hahn et al., 1989), es un modelo toxicológico diferente y novedoso que

incluye a varios compuestos organoclorados, que nos permite estudia efectos dependientes e independientes de este receptor, según el tiempo y la dosis de exposición.

El RHA posee un rol fundamental en la detoxificación de xenobióticos y endobióticos, ya que al unirse a su ligando induce en forma coordinada la expresión de enzimas de fase I y fase II que metabolizan estos compuestos (Bock y Kohle, 2006). En muchos casos las enzimas de fase I son responsables de la bioactivación del xenobiótico a su forma genotóxica activa como ocurre con el benzopireno, el cual luego se une covalentemente al ADN y proteínas, formando aductos. La formación de aductos está correlacionada con un aumento del riesgo de carcinogénesis (Bock y Kohle, 2006; Beischlag et al., 2008), siendo éste entonces un posible camino por el que la exposición a un compuesto xenobiótico lleve al desarrollo de cáncer. Esto le confiere al RHA un rol clave en la iniciación tumoral, directamente ligado a esta ruta clásica de detoxificación.

Por otro lado, se sabe que el RHA está involucrado en la promoción tumoral y evidencias recientes sugieren que este receptor juega además un rol importante en la progresión tumoral. El RHA participa en vías de señalización que regulan la adhesión célula-célula y célula-sustrato teniendo por lo tanto una función importante en la proliferación, diferenciación y motilidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Dietrich y Kaina, 2010). Alteraciones en los niveles o actividad del RHA pueden conducir a una migración celular anormal que contribuya al potencial tumorigénico de la célula blanco. Se observó que el tratamiento de la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 con TCDD, incrementa la motilidad (Barouki et al., 2007).

A su vez, el RHA tiene la capacidad de promover o inhibir la proliferación dependiendo del fenotipo celular, lo cual tiene importantes implicancias en el cáncer. Entre sus genes blanco se encuentran c-jun, jun-D, BAX, NFκB y p27 (Bock y Kohle, 2006; Barouki et al., 2007). Dada la habilidad del RHA para regular la proliferación celular en forma tejido específica, su actividad puede desencadenar el proceso carcinogénico en distintos grados. Se observó que ratones knock out para el RHA eran resistentes a tumores inducidos por benzopireno, un tóxico tipo dioxina presente en el humo del cigarrillo, lo que implicaría un rol clave del RHA en el desarrollo de ese tipo de carcinogénesis ambiental. Sin embargo, no está bien definido el papel del RHA en el desarrollo de tumores que ocurren por otros factores, habiendo también evidencias de una función como supresor tumoral del RHA en la carcinogénesis colorectal (Kawajiri y Fujii-Kuriyama, 2007).

Estudios de diferentes grupos de investigadores, demostraron que el RHA podría tener un rol fisiológico en la homeostasis hepática y del sistema inmune, así como en el desarrollo celular. Ratones knock out para el RHA mostraron, entre otras alteraciones, hipertrofia cardíaca, alteraciones cutáneas y del sistema inmune y también alteraciones en el desarrollo del ovario que afectaron la función reproductiva (Barouki et al., 2007).

Existen varios mecanismos de crosstalk entre el RHA y otras vías de señalización, entre las cuales se incluyen: la vía de TGFβ, la vía neuronal GABAérgica, la vía del RE (Puga et al., 2005) y la vía del HER1 (Marlowe y Puga, 2005; Haarmann-Stemmann et al., 2009; Puga et al., 2009).

4. Cáncer de mama

4.1 Factores de riesgo

El cáncer de mama es la enfermedad neoplásica más común en mujeres y comprende más de una tercera parte de todos los nuevos casos de cáncer en mujeres de sociedades occidentales (Landis et al., 1999; Kamangar et al., 2006). La falla en la erradicación de esta enfermedad se debe a la falta de identificación de un agente etiológico específico, el tiempo preciso de iniciación y los mecanismos moleculares responsables de la iniciación y progresión del cáncer. Luego de numerosas incertidumbres alrededor del origen de esta enfermedad, existen sustanciales evidencias de que el riesgo de padecer cáncer de mama se relaciona significativamente con factores reproductivos y endocrinos (Russo et al., 2000).

La tasa de incidencia de cáncer de mama ha incrementado desde los años cuarenta en muchos países industrializados. Europa occidental, Estados Unidos y Canadá tienen la mayor incidencia de cáncer de mama, mientras que las menores tasas se encuentran en Asia (Parkin 2001). Se observó que cuando las mujeres migran de Asia y otros países con bajas tasas de incidencia a países industrializados con altas tasas de incidencia en cáncer de mama, las tasas entre los inmigrantes de primera y segunda generación aumentan gradualmente, acercándose a aquellas del país en que viven. Estos hallazgos son consistentes con el rol importante que cumplen factores ambientales o de estilo de vida en la etiología del cáncer de mama (Stanford et al., 1995).

Los factores de riesgo conocidos para el cáncer de mama, solo explican aproximadamente el 40% de los casos (Madigan et al., 1995). Dichos factores de riesgo son clasificados en cuatro amplias categorías: 1) factores genéticos, 2) factores reproductivos/hormonales, 3) factores relacionados al estilo de vida, y 4) factores ambientales, conteniendo la última categoría a los compuestos organoclorados (Salehi et al., 2008).

4.2 Aspectos generales

Más del 95% de los cánceres de mama son de origen epitelial. La evolución natural del cáncer de mama involucra la progresión del mismo a través de distintos estadíos patológicos y clínicos bien definidos, comenzando con una hiperproliferación ductal, seguida de un carcinoma in situ, un carcinoma invasivo, llegando finalmente al desarrrollo de una enfermedad metastásica (Allred et al., 2001; Burstein et al., 2004) (**Figura 3**). Un ducto mamario normal está compuesto, de afuera hacia dentro, por el estroma ductal, la membrana basal, una monocapa de células mioepiteliales y otra de epiteliales luminales (en contacto con la luz del ducto mamario) (**Figura 3**). El estroma ductal normal está compuesto de leucocitos, fibroblastos, miofibroblastos y células endoteliales. En el **carcinoma *in situ***, las células mioepiteliales del ducto además de reducirse en número, sufren alteraciones epigenéticas y fenotípicas, probablemente debido a la degradación de la membrana basal; por otro lado incrementa el número de fibroblastos, miofibroblastos y linfocitos del estroma ductal. El **carcinoma invasivo** se da como resultado de la pérdida de la membrana basal y de la monocapa de células mioepiteliales, que permite que las células tumorales de origen

epitelial invadan el estroma adyacente. Potencialmente estas células podrán migrar a órganos distantes, generando eventualmente metástasis.

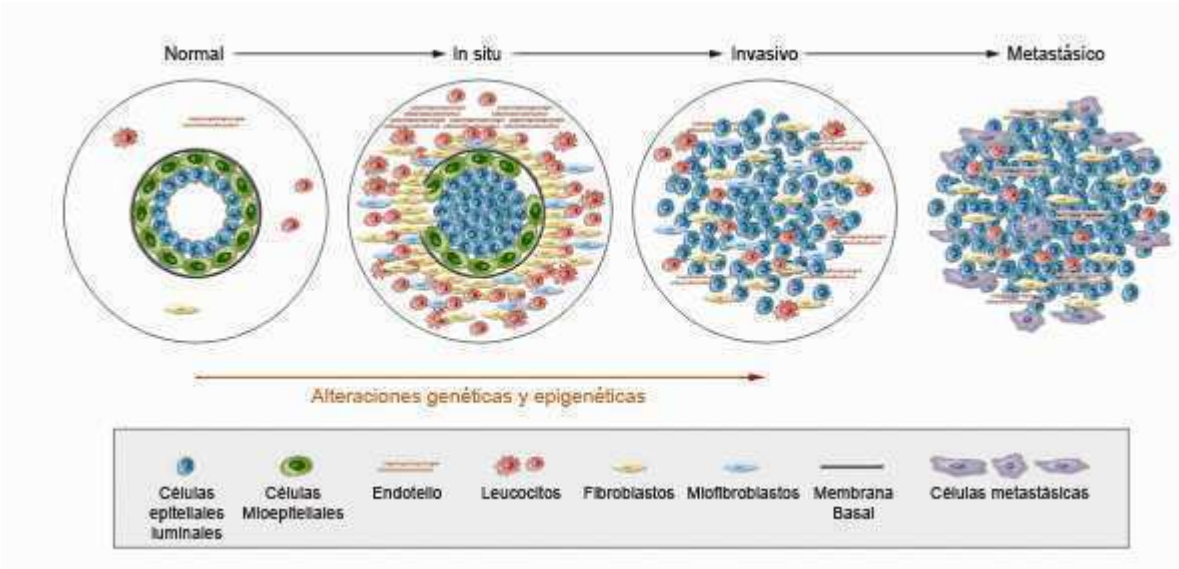


Figura 3. Modelo hipotético de la progresión tumoral en cáncer de mama (Polyak, 2007).

Los carcinomas de mama se caracterizan por presentar una histología heterogénea. La plasticidad celular epitelial puede generar diferentes subpoblaciones celulares que contribuyan a la heterogeneidad intratumoral. Sin embargo, la mayoría de los tumores presentan un fenotipo dominante, permitiendo su clasificación. Los métodos utilizados para clasificar los tumores de mama se basan en análisis diversos que incluyen estudios histopatológicos, moleculares, genéticos, de patología clínica y perfiles de expresión génica. En la clasificación histológica y molecular del cáncer de mama se han descripto al menos cuatro fenotipos diferentes: 1) el **normal**, que tiene un perfil de expresión similar al del tejido de mama no canceroso; 2) el **luminal**, que generalmente incluye tumores que son positivos para el REα+ y el receptor de progesterona (RP+), pero negativos para el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2-); 3) el **fenotipo REα-**, que sobreexpresa HER2 o HER1; y 4) el **fenotipo basal**, que incluye tumores REα-, RP-, HER2- (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001; Sørlie et al., 2003). El fenotipo luminal está a su vez dividido en dos grupos distintos: el "**luminal A**", que expresa altos niveles de las citoqueratinas 8 y 18; y el "**luminal B**", que expresa niveles muy bajos de estos genes. Las diferencias moleculares entre estos 4 fenotipos de cáncer de mama desencadenan en respuestas clínicas distintas frente a los tratamientos, en general los tumores del tipo basal tienen la peor prognosis tumoral, mientras que los de tipo luninal A poseen la mejor prognosis (Sørlie et al., 2001).

4.3 Transición Epitelio-Mesenquimática (TEM)

Las células de origen epitelial y mesenquimático forman parte de la estructura y función de los órganos en desarrollo del embrión ya en sus estadíos tempranos. De ésta manera, las células con fenotipo mesenquimático proveen soporte y estructura a las células epiteliales a través de la producción de la matriz extracelular (ME) y a diferencia de las células epiteliales, tienen una gran motilidad y capacidad invasiva (Hay 2005). Sin embargo, estos fenotipos celulares no son siempre permanentes. Bajo determinadas condiciones las células epiteliales y las mesenquimáticas son capaces de convertirse de un fenotipo al otro. Este proceso, llamado transición epitelio-mesenquimática (TEM), o la inversa, transición mesenquimática-epitelial (TME), es necesario para dar lugar a organismos complejos y para la morfogénesis. Por ejemplo, la plasticidad epitelial y la adquisición de propiedades invasivas, sin llegar a obtener un fenotipo mesenquimático completo es crítica en el desarrollo, particularmente en la morfogénesis de los ductos mamarios.

Trabajos recientes en cáncer han identificado una plasticidad celular similar, en donde células tumorales epiteliales adquieren cualidades mesenquimáticas que le permiten escapar del tumor primario (Lopez-Novoa y Nieto, 2009). Debido a que la invasión local se cree que es necesaria para los primeros pasos de la diseminación metastásica, existe la hipótesis de que la TEM y la plasticidad epitelial contribuyen a la progresión tumoral (Micalizzi et al., 2010). Durante la embriogénesis, los pasos de la TEM son bien definidos, mientras que la TEM asociada a cáncer y fibrosis está poco definida. A pesar de que las características generales de este proceso son similares en la mayoría de los casos, algunos trabajos recientes han propuesto su clasificación en tres subtipos diferentes: **TEM de desarrollo** (tipo I); **TEM de fibrosis y sanado de herida** (Tipo II) y **TEM asociada al cáncer** (tipo III) (Kalluri y Weinberg, 2009).

La regulación de la plasticidad celular epitelial durante la TEM está implicada en la progresión tumoral. Las células epiteliales que sufren la TEM pierden sus características como tales para adquirir un fenotipo mesenquimático, convirtiéndose en células con alta motilidad y capacidad invasiva. En resumen, en este proceso se producen los siguientes cambios celulares y moleculares: 1) pérdida de la adhesión célula-célula y de la polaridad apical-basal, disminuyendo la expresión de moléculas de adhesión como la caderina E; 2) disminución de la expresión de las citoqueratinas epiteliales; 3) aumento de la expresión de proteínas mesenquimáticas como la vimentina; 4) reorganización del citoesqueleto adquiriendo una morfología ahusada característica de un fenotipo más móvil; 5) incremento de la capacidad de migrar e invadir; 6) resistencia aumentada a la apoptosis. Durante la progresión tumoral, las células epiteliales se desprenden del tumor primario, se adhieren e invaden el estroma adyacente, trasvasan a los vasos sanguíneos para luego eventualmente formar tumores secundarios. Este proceso metastático es similar a la TEM seguida por una transición mesenquimática-epitelial en el sitio de arresto (Chaffer et al., 2007; Thiery 2002; Thiery 2003). En cáncer, se han observado pruebas de la existencia de la TEM en mama (Trimboli et al., 2008), ovario (Vergara et al., 2010), colon (Brabletz et al., 2005), y esófago (Usami et al., 2008). Guarino et al., (2007) postulan que en cáncer de mama la TEM es un mecanismo potencial por el cual las células tumorales pueden adquirir una mayor motilidad y un fenotipo invasivo para escapar del tumor primario. A su vez, existen evidencias de que éste

proceso puede ocurrir también de una forma más local en el borde invasor del tumor (Brabletz et al., 2001).

La TEM requiere de la coordinación de una compleja red de señalización intracelular y extracelular, que involucra factores de iniciación y mecanismos de retroalimentación para dar lugar a los cambios intracelulares que conducen a la transformación epitelio-mesenquimática. Se ha demostrado que muchas vías de transducción de señales inducen la TEM *in vitro* (Thiery 2002). Esto incluye factores de crecimiento como EGF (Hardy et al., 2010), VEGF, las metaloproteasas (MMPs) (Radisky E y Radisky D, 2010), quinasas de tirosina no receptoras como la c-Src (Frame 2002; Boyer et al., 1997) y la activación oncogénica de receptores con actividad de quinasa de tirosina (RTK) como el HER1 (Thiery 2002; Barr et al., 2008). Particularmente se ha reportado que RTKs como el HER1 y el RIGF-1 y por otro lado la c-Src, inducen la fosforilación de la caderina E y cateninas asociadas, conduciéndolas a su degradación (Fujita et al., 2002). El HER1 parece estar involucrado en los estadíos de tumores de mama humanos más avanzados y podría tener un rol importante en la TEM y metástasis tumoral (Lichtner et al., 1995).

4.4 Migración e invasión celular

La motilidad de las células es un marcador de invasión en cáncer y es el primer paso involucrado en la metástasis. El citoesqueleto provee la infraestructura básica para mantener la motilidad celular. Está conformado por tres tipos de proteínas diferentes: microtúbulos, filamentos intermedios y filamentos de actina. La dinámica de la motilidad celular en cáncer de mama está regulada por el citoesqueleto de actina (Pollard y Borisy, 2003). En las células tumorales los filamentos de actina están organizados en una red tridimensional que forman 3 estructuras diferentes: **lamelipodios**, **filopodios** e **invadopodios**. Los **lamelipodios** son protrusiones de la membrana que se forman en el borde frontal de la célula en movimiento. Los **filopodios** comprenden proyecciones finas de la membrana sostenidas por filamentos de actina. Los **invadopodios** son extensiones de grosor moderado compuestos por filamentos de actina que se forman durante la invasión celular. Las células tumorales se adhieren a la ME a través de la unión de proteínas de transmembrana denominadas integrinas. Estos sitios de adhesión son regiones discretas (complejos focales) que también sirven como regiones de adhesión para los largos filamentos de actina llamados fibras de estrés (Chhabra y Higgs, 2007). El citoesqueleto de actina y las proteínas unidas a actina juegan un rol esencial en la motilidad celular. La **Figura 4** resume el modelo de motilidad comunmente aceptado (Friedl y Wolf, 2003): 1) Se forma una protrusión (lamelipodio) en el borde de la célula que está en la dirección del movimiento; 2) anclaje de la membrana al sustrato en el borde frontal a través de la adhesión focal (estructuras de adhesión con integrinas); 3) se contrae la red de fibras de estrés de actina, que genera la tensión suficiente para tirar a la células hacia adelante; 4) desarmado de las adhesiones focales, permitiendo a la célula retraerse y ser arrastrada en la dirección del movimiento (Broussard et al., 2008).

La familia de GTPasas de pequeño tamaño Rho, es un subgrupo dentro de la superfamilia de GTPasas Ras. Esta familia incluye a Rac, Rho y Cdc42, que son reguladores de la motilidad

celular. Rac induce el ensamblado de los complejos de adhesión focal y la polimerización de actina durante la formación de lamelipodios. Rho estimula la formación de fibras de estrés, mientras que Cdc42 induce la polimerización de actina para la formación de filopodios (Etienne-Manneville y Hall, 2002; Hall 1998). Las GTPasas actúan como intercambiadores de GTP (guanosina trifosfato)-GDP (guanosina difosfato). Cuando las células son estimuladas con factores de crecimiento como EGF, la molécula de GDP unida a la GTPasa inactiva es intercambiada por GTP, llevándola a su activación. La GTPasa activa estimula a los efectores que llevan a la reorganización del citoesqueleto de actina y a la motilidad en la célula de cáncer de mama (Ostrander et al., 2007; Heasman y Ridley, 2008) (**Figura 4**).

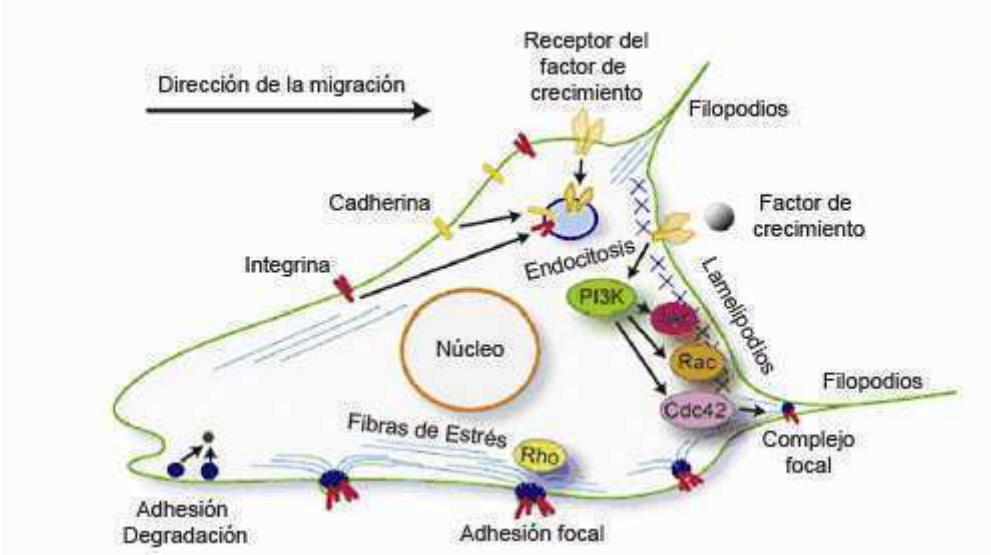


Figura 4: Migración celular (Jiang et al., 2009).

Dependiendo del tipo tumoral y del tejido adyacente, la migración celular se puede dar a través de diferentes tipos de estrategias, con el fin de vencer la resistencia física establecida por la red tridimensional de los tejidos. En los cortes histológicos se pueden distinguir principalmente dos patrones de invasión diferentes: 1) **la invasión celular individual**, y 2) la **invasión celular colectiva** (**Figura 5**).

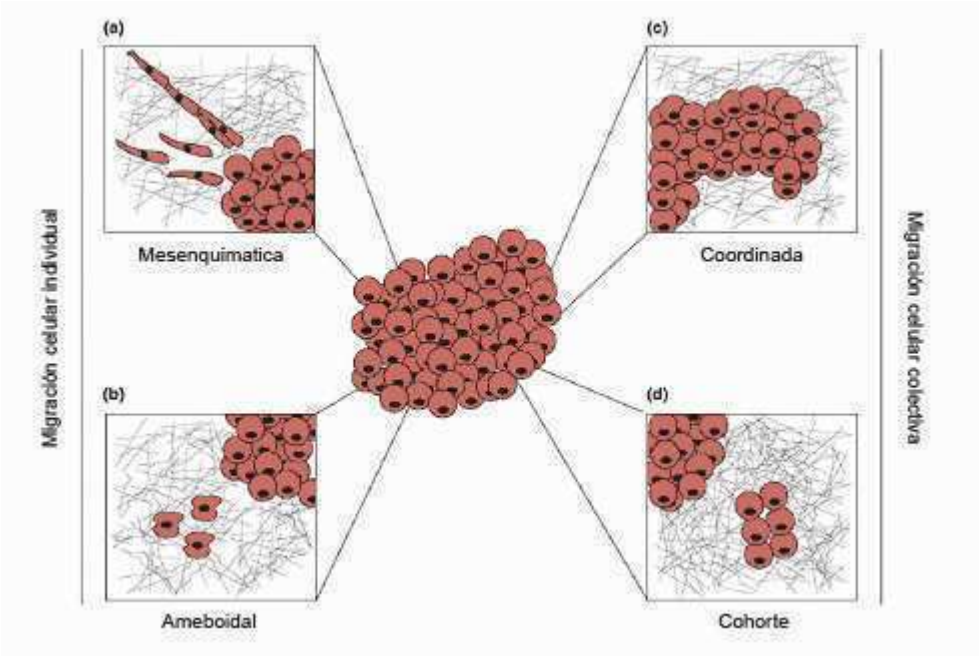


Figura 5. Estrategias de invasión y migración celular (Yilmaz et al., 2007).

1) Migración o invasión celular individual

Las células tumorales que migran o invaden en forma individual pueden emplear una estrategia de tipo A) **fibroblasto** o B) **leucocito** para atravesar la ME.

A) **Estrategia de invasión tipo fibroblasto: migración mesenquimática**

La invasión mesenquimática es iniciada por la transición epitelial-mesenquimática (TEM) de las células tumorales individuales en el frente invasor del tumor primario (**Figura 5a**). Este tipo de invasión se caracteriza por la morfología ahusada de las células tumorales y por la expresión de metaloproteasas y cierto tipo de integrinas.

B) **Estrategia de invasión tipo leucocito: migración ameboidal**

Al igual que los leucocitos, las células de cáncer de mama pueden realizar en forma eficiente la migración de tipo ameboidal, que se caracteriza por la interacción débil con el estroma. En este tipo de motilidad no se requiere de metaloproteasas, ya que las células logran escurrirse a través de los "poros" que se forman dentro de la ME (**Figura 5b**).

Dependiendo de la composición del microambiente, se cree que las células de cáncer de mama pueden alternar libremente entre estos dos tipos de estrategias de migración.

2) Migración o invasión celular colectiva

Otro mecanismo por el cual las células tumorales pueden diseminarse a partir del tumor primario es la invasión colectiva (Friedl y Gilmour, 2009; Giampieri et al., 2009; Nabeshima et al., 1999; Friedl P et al., 1995). El marcador de invasión colectiva es la presencia de uniones entre las células invasoras debido a la continua expresión de moléculas de adhesión en las mismas. Existen dos estrategias diferentes: A) **invasión coordinada** e B) **invasión de cohorte.**

A) **Invasión colectiva coordinada:**

Durante la invasión colectiva coordinada, las células de cáncer de mama invaden el tejido adyacente sin perder el contacto con las células vecinas y el tumor primario. Este tipo de invasión es dependiente de metaloproteasas (**Figura 5c**).

B) **Invasión colectiva de cohorte:**

La invasión colectiva de cohorte (grupo de 6 a 10 células tumorales) se caracteriza por la interacción entre las células migrantes pero la pérdida de contacto con el tumor primario. Este tipo de invasión es también dependiente de metaloproteasas (**Figura 5d**).

Es de interés remarcar que la estrategia de invasión de un tumor puede determinar la preferencia del mismo por una determinada vía de diseminación para dar eventualmente mestástasis. De esta manera, la invasión individual de células tumorales *in vivo*, particularmente en cooperación con macrófagos, dirige a las células a los vasos sanguíneos resultando en la diseminación por esta vía (Condeelis y Segall, 2003; Wyckoff et al., 2004). Por otro lado, la invasión colectiva dirige a las células tumorales a los vasos linfáticos (Giampieri et al., 2009).

4.5 Metaloproteasas

La degradación proteolítica de la ME es crucial para la invasión celular (exceptuando la invasión ameboidal). Las metaloproteasas (MMPs), son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que están involucradas en las degradación de la ME. En los procesos normales fisiológicos, estas enzimas juegan un rol en los eventos asociados al remodelado del tejido normal como en el desarrollo embrionario, angiogénesis, involución mamaria, etc. Se cree que la expresión anormal de MMPs contribuye a varios procesos patológicos, entre ellos el crecimiento tumoral, invasión y metástasis (Chambers y Matrisian, 1997). La familia de MMPs consiste en 23 miembros diferentes. Las MMPs han sido clasificadas de acuerdo a la especificidad de sustrato y a su estructura en cuatro grupos principales: 1) **colagenasas**, 2) **gelatinasas**, 3) **estromelisinas**, y 4) **MMPs de membrana** (MT-MMPs) (Chambers y Matrisian, 1997; Duffy y McCarthy, 1998).

Las **colagenasas** catalizan la degradación del colágeno en su forma fibrilar (ej: tipo I, II y III); ejemplos de ellas son la MMP1, MMP8 y MMP13.

Las **gelatinasas**, que son también denominadas colagensasas de tipo IV, degradan gelatina (colágeno desnaturalizado), y colágeno de tipo IV, V, VII, IX y X. El colágeno de tipo IV es particularmente abundante en la ME y en la membrana basal, que es la membrana que separa el parénquima del estroma. Este subgrupo de MMPs posee dos miembros, la gelatinasa A (MMP2) y la gelatinasa B (MMP9).

Las **estromelisinas** catalizan la degradación de proteoglicanos, y proteínas no colágenas como la laminina, fibronectina y las regiones no helicales del colágeno IV.

El cuarto grupo consiste en el grupo de **MMPs de membrana**, que poseen un dominio de unión a membrana. El miembro mejor caracterizado es MT1-MMP.

1) Estructura

A pesar de que cada MMP en particular posee una determinada estructura, la gran mayoría poseen una secuencia de dominio que incluye: 1) una secuencia peptídica (pre), 2) un dominio pro-péptido (pro), 3) un dominio catalítico, que contiene un sitio activo Zn^{2+} y 4) un dominio C-terminal tipo hemopexina (**Figura 6**) (Nagase y Woessner, 1999). Sin embargo, muchas MMPs tienen dominios adicionales como dominios de trans-membrana o dominios citoplasmáticos (Stamenkovic 2003).

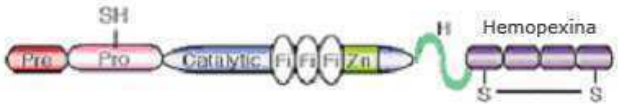


Figura 6: Estructura proteíca de MMP2 y MMP9. pre: secuencia peptídica, pro: pro-péptido, catalítico: dominio catalítico, hemopexina: dominio hemopexina, SH: residuo cisteína, Zn: sitio activo Zn^{2+}(Yoon et al., 2003).

2) Regulación

La actividad de las MMPs está regulada en múltiples niveles. A pesar de la complejidad de la regulación de estas enzimas, se pueden reconocer tres niveles principales de control endógeno: transcripción del gen, activación de la pro-enzima e inhibición de la actividad enzimática. De esta manera, se regula finamente la actividad de las MMPs en la fisiología normal. La alteración de cualquiera de estos tres niveles de control en la actividad de las MMPs ha sido asociada a la progresión tumoral (Celentano y Frishman, 1997).

A) **Regulación transcripcional**

El análisis estructural y funcional de la región promotora de los genes que codifican para las MMPs proporcionó un mayor entendimiento de los mecanismos que regulan su expresión. Existen estudios que revelaron la presencia de sitios de unión a AP-1 en la mayoría de los promotores de los genes de MMPs (Pendas et al., 1997). Este elemento "enhancer" une homodímeros o heterodímeros de la familia de oncoproteínas Fos y Jun., siendo esto una interesante conexión entre los factores de transcripción relacionados a la transformación maligna y la expresión de MMPs. A su vez, sitios de unión para los factores de transcripción NFκB y Cbfa1 son también necesarios para regular en forma precisa la expresión de genes de MMPs y su especificidad tisular (Bond et al., 1998; Jiménez et al., 2001). De esta manera, las MMPs están reguladas por una gran variedad de estímulos que desencadenan vías de señalización intracelulares que activan a dichos factores transcripcionales. Algunos de esos estímulos son: citoquinas, factores de crecimiento (ej: FGF, EGF, VEGF) (Miyake et al., 1997; Kim et al, 2009; Lamoreaux et al., 1998); hormonas esteroideas y ésteres de forbol (PMA), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Parsons et al., 1997).

B) **Activación de las pro-metaloproteasas**

Las MMPs, como la mayoría de las enzimas proteolíticas, son sintetizadas como zimógenos inactivos. Es por ello, que la activación de las pro-MMPs es otro paso fundamental en la regulación de la actividad de estas enzimas. Todas las MMPs son secretadas al exterior de la célula como zimógenos, con excepción de las MT-MMPs. En el dominio pro-péptido de las MMPs, existe un residuo de cisteína que estabiliza a la pro-enzima inactiva (van Wart et al., 1990). Por otro lado en el dominio catalítico hay un sitio Zn^{2+} activo presente que se une al residuo de cisteína nombrado previamente (**Figura 6**). Cuando esto último ocurre, la metaloproteasa se encuentra inactiva. Al romperse la unión cisteína-Zn^{2+}, el zinc no catalítico de la MMP pasa a ser catalítico, resultando en una enzima con actividad intermedia (van Wart et al., 1990; Springman et al., 1990). Para que la MMP adquiera una capacidad catalítica completa, el pro-dominio debe ser clivado (Springman, et al., 1990), llevando a la reducción del peso molecular de la ezima completamente activa. *In vivo*, las MMPs pueden activarse por autoclivaje, aunque generalmente son activadas por otras proteinasas (ej: tripsina, plasmina). Una vez activas, éstas son capaces de activarse entre ellas, por ejemplo las gelatinasas MMP2 y 9, pueden activarse entre sí.

C) **Inhibidores endógenos**

La actividad de las MMPs está regulada por varios tipos de inhibidores endógenos, de los cuales los inhibidores de metaloproteasas de tejidos (TIMPs) son los más importantes (Brew et al., 2000). Los TIMPs son, también, proteínas secretadas pero podrían encontrarse en la superficie celular asociadas con las MT-MMPs. Está descripto que los TIMPs inhiben a las MMPs de forma

reversible al unirse a la región catalítica de estas enzimas. Esta unión TIMP-MMP se da en una relación estequiométrica (1:1) (Gomis-Ruth et al., 1997).

3) Metaloproteasas en cáncer de mama

Actualmente se conoce que las MMPs juegan un rol muy importante en cáncer de mama, participando tanto en la iniciación y crecimiento tumoral, como en la progresión.

A) **Rol de las MMPs en la iniciación y crecimiento tumoral**

Existen numerosas evidencias que demuestran que algunos de los genes clave involucrados en la carcinogénesis mamaria (oncogenes c) pueden contribuir a la tumorigénesis al regular la expresión de las MMPs. La transfección de células de cáncer de mama MCF-10A con c-ErbB-2 o c-Ras resulta en la expresión incrementada de MMP2 (Giunciuglio et al., 1995). Los posibles mecanismos por los cuales las MMPs pueden contribuir a la iniciación o crecimiento tumoral incluyen: la promoción de la angiogénesis, la activación de factores de crecimiento o de sus receptores (por liberación de factores de crecimiento secuestrados en la ME) (Manes et al., 1997; Levi et al., 1996; Masson et al., 1998; Codony-Servat et al., 1999); y la inactivación de inhibidores de factores de crecimiento. Las MMPs pueden promover la angiogénesis por, al menos, dos mecanismos diferentes: al degradar barreras permitiendo la invasión de las células endoteliales, y al liberar factores que promueven y mantienen la angiogénesis (Stetler-Stevenson 1999).

B) **Rol de las MMPs en la progresión tumoral**

Las MMPs juegan un rol esencial en la invasión celular y metástasis favoreciendo por lo tanto la progresión tumoral (Chambers y Matrisian, 1997; Duffy y McCarthy, 1998). Para que las células tumorales puedan intravasar y extravasar los vasos sanguíneos, la ME y la membrana basal ricas en colágeno de tipo IV deben ser degradadas. Dado que las MMP2 y MMP9 son las únicas capaces de degradar el colágeno de tipo IV, se le ha dado una especial importancia al rol que cumplen estas MMPs en la metástasis (Chambers y Matrisian, 1997). Existen numerosos trabajos que han observado altos niveles de MMP2 y 9 asociados con un incremento en la metástasis. Hasta el momento, la conclusión a la cual se puede llegar, es que el número y cantidad relativa de MMPs se ve incrementado con la progresión tumoral en cánceres de diferentes tipos (MacDougall et al., 1995; Ueda et al., 1996). Particularmente, en cáncer de mama las MMP2 y 9 están sobre-expresadas, y se cree que son muy importantes para la invasión celular, metástasis y angiogénesis (Jones et al., 1999; Pellikainen et al., 2004; Hanemaaijer et al., 2000; Weigelt et al., 2005).

4.6 Metástasis

En cáncer de mama, el 90% de las muertes se deben a las metástasis originadas a partir del tumor primario. Se estima que el 6% de los pacientes tienen metástasis al momento del diagnóstico de la enfermedad, mientras que se cree que del 20 al 50% de los pacientes diagnosticados por primera vez con cáncer de mama desarrollarán eventualmente enfermedades metastásicas (Lu et al., 2009).

A pesar de que han sido identificados una gran variedad de subtipos histológicos de cánceres de mama invasivos, el carcinoma ductal invasivo es el subtipo predominante, representando entre el 50 al 80% del total de los cánceres invasivos (Tavassoli y Devilee, 2003). En cáncer de mama, los sitios más frecuentes de metástasis son los pulmones, huesos e hígado (Lee 1983). Está aceptado que el riesgo de desarrollar metástasis incrementa con la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos axilares, el incremento del tamaño del tumor primario y la pérdida de diferenciación histopatológica (el grado) del mismo, siendo éstos marcadores de prognosis tumoral en cáncer de mama (Page 1991). En pacientes sin metástasis en ganglios linfáticos axilares, un marcador predictivo de metástasis a larga distancia es la invasión de los vasos sanguíneos (Mascarel et al., 1998). A pesar de los esfuerzos realizados para poder establecer una prognosis tumoral, existe un porcentaje de pacientes que se escapan a dichos estudios predictivos. Es así que, aproximadamente un tercio de las mujeres que tienen cáncer de mama que no se diseminaron a nódulos linfáticos desarrollan metástasis distantes; mientras que un tercio de las pacientes que poseen los nódulos linfáticos comprometidos permanecen libres de metástasis en órganos distantes 10 años después de su terapia local (Hellman 1994).

Los tumores secundarios se forman a partir de células cancerosas que dejan el tumor primario y viajan, principalmente, por los vasos sanguíneos y linfáticos para alcanzar el nuevo sitio del cuerpo donde formarán una nueva colonia (Yilmaz et al., 2007). Para dejar el tumor primario y diseminarse a órganos distantes, las células tumorales deben seguir una serie de eventos biológicos complejos conocidos como "cascada metastásica". Primero, las células cancerosas pierden capacidad de adherirse a las células vecinas y ganan habilidad de migrar e invadir como se describió previamente (ver sección 4.3 y 4.4). Entonces, las células atraviesan la membrana basal e invaden el tejido adyacente alcanzando los vasos linfáticos y sanguíneos. Luego de una intravasación exitosa, las células deberán sobrevivir en la circulación, diseminarse por todo el cuerpo, reconocer órganos específicos blanco y extravasarse al nuevo ambiente. En este nuevo sitio deberán iniciar el programa de sobrevida para poder formar micrometástasis y luego deberán reiniciar los programas proliferativos, generando entonces neoplasias macroscópicas detectables clínicamente (Fidler 2003) (**Figura 7**). Esta serie de eventos de alta complejidad que se suceden durante la "cascada metastásica" está orquestada por vías de transducción de señales que se disparan dentro de las células tumorales. Sin embargo, las interacciones entre las células tumorales y las células estromales no cancerosas juegan un rol esencial a lo largo de todo este proceso (Valastyan y Weinberg, 2011).

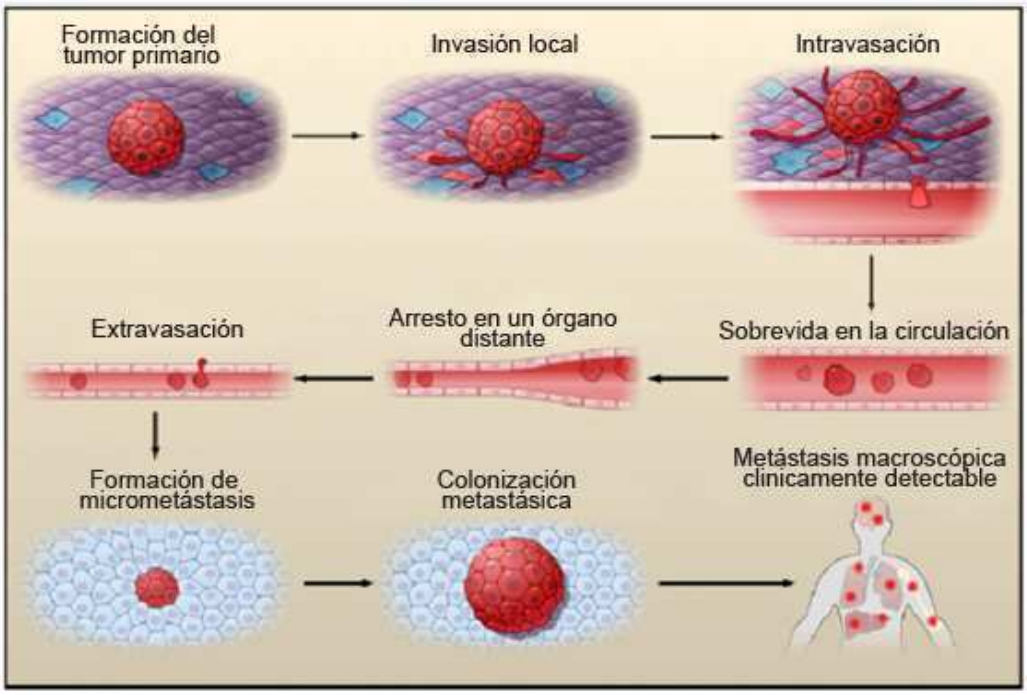


Figura 7. Cascada metastásica (Valastyan y Weinberg, 2011).

Existen diferentes modelos que explican cómo las células del tumor primario son capaces de dar metástasis en órganos distantes durante la "cascada metastásica". El modelo tradicional de metástasis sugiere que la mayoría de las células del tumor primario tienen un bajo potencial metastático, pero lo adquieren por mutaciones somáticas que se dan en estadíos tardíos de la tumorigénesis (Fidler y Kripke, 1977) (**Figura 8a**). A su vez, el modelo de metástasis espontánea describe que todas las células del tumor primario tienen la capacidad de desarrollar tumores secundarios, y que la metástasis es producto de la diseminación azarosa de las mismas (Milas et al., 1983) (**Figura 8b**). El modelo de "heterogeneidad dinámica" propone que en el tumor primario se generan constantemente subpoblaciones de células metastásicas pero al ser inestables, se da un equilibrio dinámico entre la generación y la pérdida de dichas células (Hill et al., 1984) (**Figura 8c**). Por otro lado, la teoría de la "dominancia clonal" explica que una vez que se origina un subclon metastásico dentro del tumor primario, éste prolifera dominando el resto de la masa tumoral (Kerbel et al., 1988) (**Figura 8d**). Por último, García-Olmo et al. (1999) proponen un modelo controvertido: el de la "hipótesis de genometástasis", basada en estudios *in vitro,* que sugiere que la metástasis se da como producto de la transfección de células susceptibles de órganos distantes con oncogenes circulantes en plasma que derivan del tumor primario (**Figura 8e**).

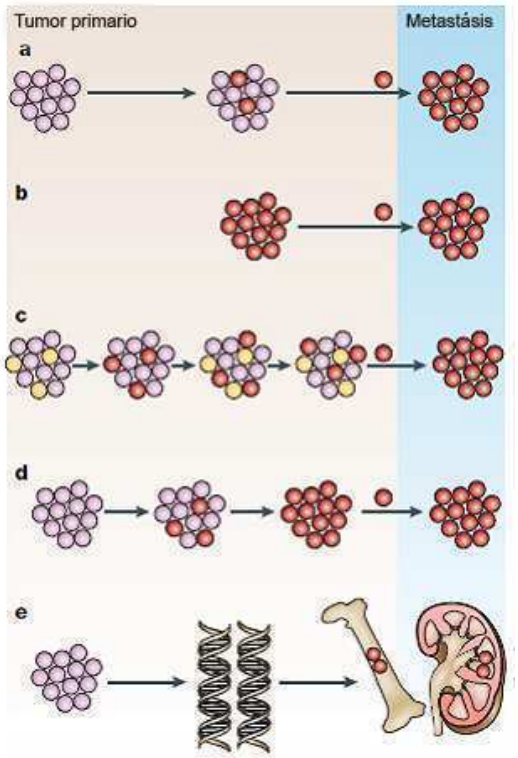


Figura 8. Modelos de metástasis. a: Modelo tradicional; b. Modelo de metástasis espontánea; c: Modelo de heterogeneidad dinámica; d: Modelo de dominancia clonal; e: Hipótesis de genometástasis. Células rojas: tumorales metastásicas; Células lilas: tumorales no metastásicas (Weigelt et al., 2005).

En estos últimos tiempos, descubrimientos obtenidos con estudios de "microarray" de ADN han restablecido la discusión del proceso metastásico incorporándose nuevos modelos. Los perfiles de expresión génica de los tumores primarios permiten discriminar entre un tumor con riesgo metastásico y pobre-prognosis (**células rojas, Figura 9a**) y un tumor de buena-prognosis (**células lilas, Figura 9a**), indicando ésto que la capacidad metastásica se adquiere tempranamente en la tumorigénesis (van 't Veer et al., 2002). Una variación a este modelo fue propuesta por Kang et al. (2003), donde los tumores primarios con alta capacidad metastásica poseen el perfil de expresión génica de pobre-prognosis y que existe un perfil de expresión específico adicional que predice el sitio de metástasis (verde: hueso; azul: hígado; violeta: pulmón; **Figura 9b**). El modelo de evolución paralela explica que la diseminación de las células metastásicas tumorales ocurre tempranamente en la oncogénesis y en forma independiente de las células del tumor primario (Schmidt-Kittler et al., 2003) (**Figura 9c**). Un modelo alternativo de metástasis atractivo se basa en el descubrimiento de que los tumores contienen células madre cancerosas. Este modelo propone que solo estas células, y no el resto del tumor, tienen la capacidad de generar tumores secundarios (Al-Hajj et al., 2003) (**Figura 9d**).

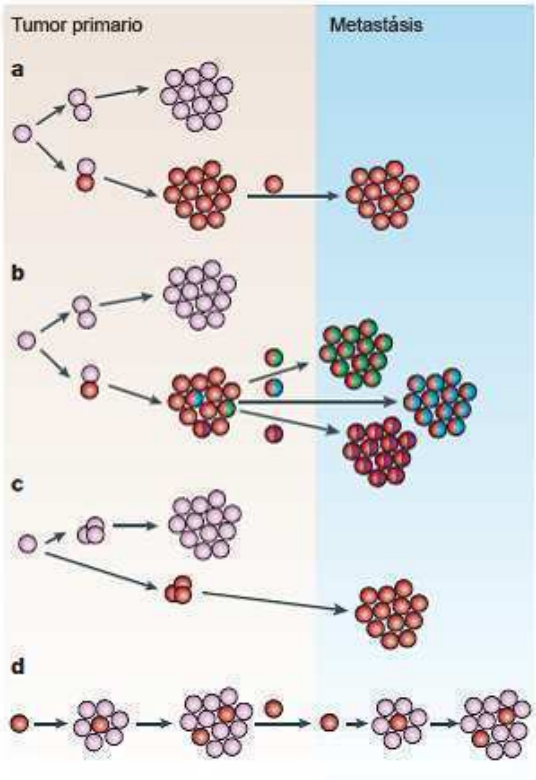


Figura 9: Modelos de metástasis basados en estudios de perfil de expresión génica (Weigelt et al., 2005).

Estudios con marcadores prognósticos han demostrado que el microambiente tumoral contribuye significativamente en la tumorigénesis. Este concepto está avalado por numerosos trabajos *in vivo* e *in vitro* recientes (Bhowmick et al., 2004; Bissell y Labarge, 2005). La integración entre este concepto y los modelos metastáticos propuestos hasta el momento, permitiéron a Weigelt et al. (2005) proponer un nuevo modelo. El mismo explica que las **células madre** de la mama sufren mutaciones oncogénicas que llevan a la transformación de las mismas, generándose tumores de prognosis tumoral pobre y con alta capacidad metastásica. En cambio, cuando las mutaciones ocurren en **células progenitoras** diferenciadas, se genera un tumor no metastásico con una buena prognosis tumoral. En los tumores metastásicos de pobre prognosis, bajo la influencia de los fibroblastos tumorales, sólo la población de células madre tumorales tiene habilidad de dar metástasis. Se cree que en estos tumores, existen variantes de células madre cancerosas con perfiles de expresión génica diferentes que definen la especificidad de tejido para la metástasis.

4.7 Modelos experimentales de metástasis

En cáncer de mama, los conocimientos en la progresión tumoral y metástasis adquiridos en los últimos tiempos, se obtuvieron como producto del uso de dos modelos *in vivo* diferentes: A)

Modelos con técnicas de trasplante; y B) **Modelos con ratones modificados genéticamente**.

A) **Modelos con técnicas de trasplante**

Teniendo en cuenta la especie y el "background" genético del huésped y del donante, se puede distinguir entre dos tipos de trasplantes: **singenéico** y **xenotrasplante**. El trasplante de células de cáncer de mama de un ratón a otro ratón con "background" genético idéntico (trasplante singenéico) evita la respuesta inmune del huésped frente a la células tumorales del donante. Estos modelos permiten al investigador estudiar la contribución del sistema inmune, que se encuentra intacto en la progresión tumoral (Gravekamp et al., 2004). Para estudiar el crecimiento y capacidad metastásica de diferentes líneas celulares de cáncer de mama humano *in vivo* se realizan experimentos de xenotrasplante utilizando ratones inmunosuprimidos, como los ratones atímicos y los ratones con inmunodeficiencia severa adquirida (SCID) (Hurst et al., 1993). La implantación de líneas celulares de cáncer de mama humano es relativamente simple y permite la manipulación genética o farmacológica de las células implantadas. Sin embargo, existen limitaciones claras en los modelos de xenotrasplante. Primero, la respuesta inmune, que juega un rol fundamental en el desarrollo tumoral, está disminuida en ratones inmunosuprimidos. Segundo, el componente estromal no es del mismo origen que el tumoral. Existe un gran número de modelos de xenotrasplante que se usan de rutina en investigación en cáncer de mama, y la mayoría derivan de líneas celulares establecidas (**Tabla 1**). Entre los más usados se encuentra el modelo de la línea celular MDA-MB-231 en ratones atímicos. La MDA-MB-231 es una línea celular de cáncer de mama humano independiente de estrógenos que deriva de la efusión pleural de un paciente con cáncer de mama.

El uso de modelos de trasplantes, ya sean singenéicos o xenogenéicos, pueden tener dos tipos diferentes de abordajes experimentales: 1) **ensayos de metástasis experimental** y 2) **ensayos de metástasis espontánea.**

En los **ensayos de metástasis experimental** las células tumorales son dirigidas directamente a la circulación sistémica. Dependiendo del sitio de inyección y del tropismo de las células, se pueden generar metástasis en diferentes órganos. En cáncer de mama las células tumorales son usualmente inyectadas en: a) la vena de la cola, resultando en metástasis en pulmón; b) la vena portal, que lleva a la colonización del hígado; y c) el corazón (por punción intracardíaca), que puede generar metástasis en un espectro más amplio de órganos incluyendo el hueso. Los modelos experimentales de metástasis se caracterizan por una serie de ventajas. La corta duración del ensayo, la reproducibilidad, y el hecho de que el investigador tiene el control del número y tipo de células que entran en circulación. Sin embargo, en este modelo solo se analizan los últimos pasos de la metástasis, y no el proceso completo. A su vez, es importante tener en cuenta que en este modelo las células metastásicas no se arrestarán e interactuarán con el tejido blanco como ocurre naturalmente, ya que al

haber un gran número de éstas, circularán en forma independiente y no como émbolos (célula tumoral asociadas a plaquetas).

En los **ensayos de metástasis espontánea**, las células tumorales pueden ser implatadas en la mama (implantación ortotópica) o en la piel (implantación ectotípica). En estos modelos la formación del tumor primario y de las subsecuentes metástasis en parte, son similares a los múltiples pasos implicados en el desarrollo del cáncer de mama maligno en pacientes (Khanna y Hunter, 2005). Muchas líneas celulares de cáncer pueden generar metástasis espontáneas al ser inoculadas en la mama del ratón (implante ortotópico) (**Tabla1**), permitiendo el estudio del proceso metastásico completo. La línea celular MDA-MB-231 al ser inoculada en el cordón mamario de ratones atímicos puede generar metástasis en pulmón, hígado, cerebro y nódulos linfáticos mamarios (Minn et al., 2005).

								Metástasis	
Línea celular	Tipo tumoral	Fuente	Fenotipo molecular	RE	RP	HER2	Sitio de inoculación	N° de células	Localización
MDA-MB-231	A	EP	Basal B	-	-		Vena de la cola	2×10^5	pulmón
							mama	5×10^5-1×10^6	pulmón, hígado, cerebro, gánglios linfáticos
							intracardíaca	1×10^4 - 1×10^5	cerebro, hueso
MDA-MB-435	CDI	EP	Basal B	-	-		mama	2×10^6	pulmón
MDA-MB-453	A	EP	Luminal	-	-	+	intracardíaca	1×10^5	hueso
SUM1315	ADI	NMC	Basal B	-	-		mama	1×10^6	pulmón, hueso
SUM149	CD inf	CMP	Basal B	-	-		Vena de la cola	2×10^6	pulmón
BT-474	CDI	CMP	Luminal	+	+	+	intracardíaca	1×10^6	hueso
MCF7	ADI	EP	Luminal	+	+		mama	1×10^6	gánglios linfáticos
T47D	ADI	EP	Luminal	+	+		mama	1×10^6	gánglios linfáticos

Tabla 1: Modelos de xenotrasplantes más comúnmente usados en cáncer de mama (Kim y Baek, 2010). A: adenocarcinoma; CDI: carcinoma ductal invasivo; ADI: carcinoma ductal infiltrante; CD inf: carcinoma ductal inflamatorio; EP: efusión pleural; NMC: nódulo metastático cutáneo; CMP: cáncer de mama primario.

B) **Modelos con ratones modificados genéticamente**

Con el fin de generar ratones modificados genéticamente para estudios de cáncer de mama, hoy en día, se utilizan técnicas moleculares para obtener ratones con deleciones de genes que codifican para supresores tumorales o ratones transgénicos que expresan determinados oncogenes (Kim y Baek, 2010). Particularmente, para los estudios en cáncer de mama se utilizan promotores específicos de mama con el fin de restringir la expresión del oncogen en la glándula mamaria. De ésta manera se han generado ratones transgénicos que expresan el oncogen (HER1, Wnt1, Ras, etc) bajo el control de los promotores MMTV ("mouse mammary tumor virus") o WAP ("whey acid protein") que generan tumores espontáneos en la glándula mamaria, y que luego podrían desarrollar metástasis (Bouchard et al., 1989).

5. Vías de transducción de señales

5.1 Quinasa de tirosina c-Src

La familia de quinasas Src (SFKs) comprende una clase de quinasas de tirosina no receptoras asociadas a membrana, involucradas en una variedad de caminos de transducción de señales. Existen 9 miembros en la familia, incluyendo a c-Src, c-Yes, Fyn, Lyn, Lck, Hck, Blk, Fgr y Yrk. Su participación en caminos de señalización celulares normales, acoplada a la capacidad de estar activas constitutivamente para inducir transformación celular, ha conseguido un fuerte interés en el estudio del rol de estas quinasas en la progresión de los cánceres humanos (Summy y Gallick, 2003).

La c-Src funciona como un co-transductor de señales de membrana activando una gran variedad de receptores de factores de crecimiento, incluyendo el HER1 (Biscardi et al., 1998).

A) **Estructura y mecanismos de regulación**

La miristilación amino-terminal de c-Src es requerida para la asociación con la membrana celular y es esencial para su función transformante. La c-Src se autofosforila en la Tirosina-416 y esta fosforilación es requerida para su completa actividad (Roskoski 2005). Los estudios de función y estructura elucidaron que su actividad es regulada tanto por fosforilación como por interacciones proteína-proteína involucrando los dominios SH2 y SH3 (Gonfloni et al., 1999). La fosforilación de la Tirosina-527 del carboxilo terminal promovida por Csk conduce a la unión de esta región con el dominio SH2 de la misma proteína que se transforma en una conformación "cerrada" o inactiva (Okada y Nakagawa, 1989). Las interacciones entre el dominio SH3 y el dominio quinasa también contribuyen a la regulación negativa.

Existen varios caminos por los cuales la c-Src puede activarse: a) defosforilación de la Tirosina-527 por una fosfatasa, b) deleción o mutación de la Tirosina-527, c) desplazamiento por ligandos de alta afinidad, de las interacciones intramoleculares mediadas por SH2 y SH3 y d) fosforilación de la Tirosina-416 (Frame 2002; Roskoski 2005). Alguno o varios de estos caminos propuestos podrían ser los responsables de la activación de c-Src en células de cáncer (**Figura 10**).

Figura 10. Estructura de la c-Src quinasa. La molécula está compuesta por una secuencia amino terminal de miristilación (M), una región única (U), los dominios de interacción con proteínas SH2 y SH3, un dominio quinasa de tirosina que contiene la Tirosina-416 y un dominio regulatorio carboxi-terminal (R) que contiene a la Tirosina-527 (Frame 2002).

Se propuso un mecanismo regulatorio bidireccional, en el cual la modulación enzimática de c-Src podría primariamente regular la disponibilidad de los dominios de interacción proteína-proteína. Es decir, por un lado los dominios regulatorios inhiben la actividad de c-Src y, por el otro, la actividad de c-Src controla la disponibilidad de los dominios regulatorios (Gonfloni et al., 2000). Estos hallazgos han provisto una explicación para la oncogenicidad de v-Src en la cual la región regulatoria del carboxilo terminal ha sido sustituida por otros aminoácidos. Se observó que la pérdida de la región que contiene la Tirosina-527 es la primera razón para que se convierta en una proteína transformante. En cáncer de colon se reporta la expresión de una c-Src truncada en el carboxilo terminal (Irby et al., 1999) (**Figura 11**).

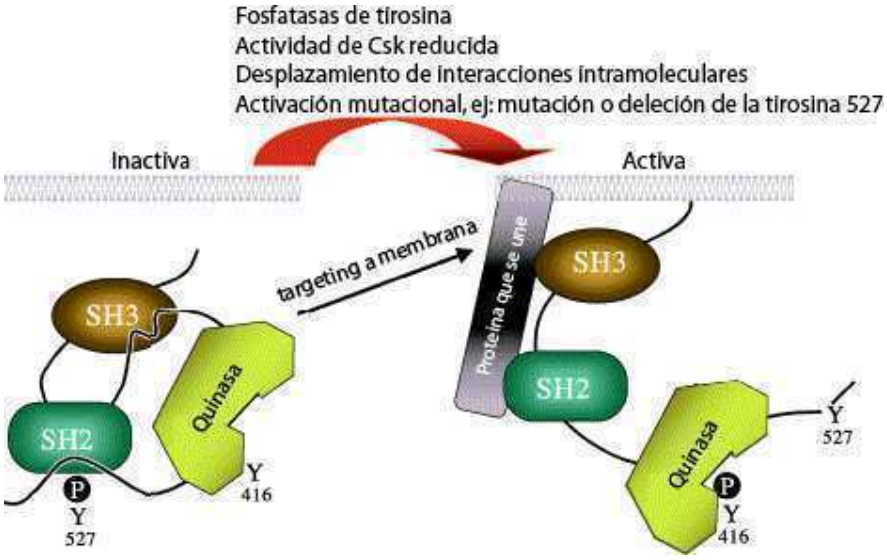


Figura 11. Tipos de regulación de la c-Src quinasa. Según el tipo de regulación involucrada, se puede llevar a una "apertura" conformacional de la c-Src y la activación catalítica que puede ocurrir en células tumorales (Frame 2002).

B) **c-Src en cáncer de mama**

La c-Src se encuentra sobreexpresada en más del 70% de los cánceres mamarios, y frecuentemente se acompaña de una sobreexpresión de HER1 (Ottenhoff-Kalff et al., 1992; Luttrell et al., 1994; Muthuswamy et al., 1994). La c-Src está involucrada no sólo en procesos normales de mitogénesis inducidas por EGF (Luttrell et al., 1988; Wilson et al., 1989), sino que también potencia la acción de los miembros de la familia del HER1 durante la tumorigénesis (Biscardi et al., 1999a; Biscardi et al., 2000; Maa et al., 1995, Dimri et al., 2007). Se demostró que el dominio SH2 de c-Src se asocia con el HER1 y HER2/Neu activados de líneas celulares de cáncer de mama (Luttrell et al., 1994). También se observó que la actividad de c-Src aumenta en forma dependiente de EGF en células que sobreexpresan HER1 (Oude-Weernink et al., 1994). Biscardi et al. (1998) reportaron que c-Src y HER1 se co-asocian en forma dependiente de EGF en líneas celulares de cáncer de mama y en tumores que sobreexpresan ambas proteínas.

5.2 Receptores de Factores de Crecimiento Epidérmico

Las proteínas ErbBs o Receptores de Factores de Crecimiento Epidérmico pertenecen a la subclase I de la superfamilia de Receptores con actividad quinasa de tirosina (RTKs). Existen 4 miembros en la familia de ErbB: el receptor de EGF o Erb1 o HER1, el Erb2/Neu/HER2, el Erb3/HER3 y el Erb4/HER4. Todos tienen en común un dominio de unión al ligando extracelular, una región transmembrana y un dominio citoplasmático con función quinasa de tirosina (Olayioye et al., 2000).

Una familia de ligandos, los factores de crecimiento relacionados con el EGF, se unen al dominio extracelular de los ErbBs llevando a la formación de homo y heterodímeros. La dimerización consecuentemente estimula la actividad intrínseca de tirosina quinasa de los receptores y desencadena la autofosforilación de residuos de tirosina específicos dentro del dominio citoplasmático. Estos residuos fosforilados sirven como sitios de anclaje para moléculas involucradas en la regulación de cascadas de señalización intracelulares. Por último, los efectos río abajo sobre la expresión genética determinan la respuesta biológica a la activación del receptor (Olayioye et al., 2000).

Existen principalmente tres vías de señalización que pueden desencadenarse por la activación del HER1 y los otros miembros de la familia: la de Ras/ERK1/2, la de PI3K/Akt y la de JAK/STAT (Henson y Gibson, 2006) (**Figura 12**).

A) **Vías de señalización del HER1**

-Vía Ras/ERK 1/2

Las MAPK constituyen una superfamilia de quinasas de serina/treonina que son activadas por diversos estímulos, incluyendo el EGF. Luego de la activación y autofosforilación del HER1, el dominio SH2 de Grb2 puede unirse a este receptor en forma directa o indirectamente vía la unión de Shc (Sasaoka et al., 1994). Seguidamente, se recluta la proteína SOS a la membrana, quién vía su actividad provoca el intercambio de GDP por GTP en la proteína Ras, activándola. Ras a su vez activa a Raf-1 por medio de su fosforilación. Esto lleva a la fosforilación y activación de la quinasa MEK1/2 quien luego a su vez fosforila y activa a las MAP quinasas ERK1/2, quienes posteriormente fosforilan distintos sustratos citosólicos o nucleares (Olayioye et al., 2000).

-Vía PI3K/Akt

La fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) es una enzima que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP al fosfatidil inositol, generando un fosfatidilinositol 3'-fosfato (PIP) y de esa forma desencadena una vía de transducción de señales. Los PIP sirven de sitio de anclaje de proteínas que poseen un dominio de homología a plecstrina (PH).

Luego de la autofosforilación del HER1 se recluta la PI3K a la membrana, que se estimula mediante la unión de su dominio SH2 a las tirosinas fosforiladas del HER1. La activación de la quinasa lleva a la formación de PIP, que luego sirve de sitio de anclaje de la quinasa de serina/treonina Akt, translocándola a la membrana donde se fosforila y activa. Esta quinasa puede luego fosforilar numerosos sustratos (Song et al., 2005).

-Vía JAK/STAT

La quinasa Janus (JAK) es una familia de quinasas de tirosina que fosforilan a las proteínas Transductoras de Señales y Activadoras de la Transcripción (STATs). Tanto JAK como STAT se asocian con el HER1 fosforilado, permitiendo que JAK fosforile a STAT. Una vez fosforiladas, las proteínas STAT se translocan al núcleo, donde inducen la transcripción de numerosos genes (Rawlings et al., 2004).

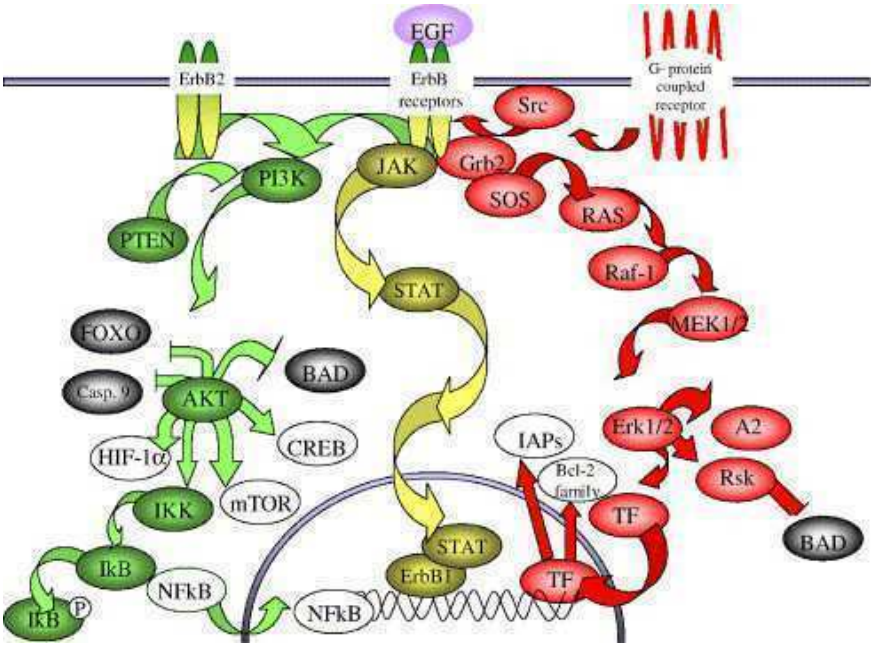


Figura 12. Vías de señalización del receptor HER1. El EGF se une a receptores ErbBs desencadenando la activación de una red de vías de señalización, como la vía PI3K/AKT (verde), la vía RAS/ERK (rojo) y la vía JAK/STAT (amarillo). Estas vías llevan a la activación de proteínas anti apoptóticas (blanco) y la inactivación de proteínas proapoptóticas (negro). Los homodímeros de HER2 activan las mismas vías pero no requieren del EGF para su activación y los receptores acoplados a proteína G activan a los receptores ErbBs vía la fosforilación en tirosina de los ErbBs mediada por la quinasa c-Src (Henson y Gibson, 2006).

De acuerdo al contexto celular estas tres vías de señalización pueden desencadenar respuestas biológicas diversas, como proliferación, apoptosis, sobrevida, migración e invasión celular (Henson y Gibson, 2006; Wang et al., 2007).

Los ligandos que se unen a los ErbBs son numerosos y se reconocen como factores de crecimiento relacionados con EGF (Peles y Yarden, 1993). Son producidos como precursores transmembrana y son procesados y liberados por proteólisis (Massagué y Pandiella, 1993). Hay numerosos ligandos que incluyen EGF, anfiregulina y TGFα, los cuales se unen específicamente al HER1 y betacelulina, EGF unido a heparina (HB-EGF) y epiregulina que exhiben una especificidad dual uniéndose tanto al HER1 como al HER4.

B) **HER1 en cáncer de mama**

El HER1 tiene varias funciones en el desarrollo normal de la glándula mamaria, y se ha encontrado en células epiteliales ductales de tejido mamario normal (Biscardi et al., 1999b). De todos los tumores mamarios humanos, aproximadamente el 30% sobreexpresan HER1, y esta sobreexpresión se correlaciona con una pérdida de la respuesta a estrógenos y con una pobre prognosis tumoral (Toi et al., 1991, Radinsky et al., 1995). Una enorme cantidad de evidencias sugieren que el HER1 está involucrado en los estadíos tardíos de cáncer de mama, predominantemente en sitios metastásicos, más que en tumores primarios (Sainsbury et al., 1987; Toi et al., 1991; Battaglia et al., 1988; Khazaie et al., 1993). Está reportado que la sobreexpresión del HER1 en cáncer de mama resulta en un incremento de la capacidad metastásica tumoral (Xue et al., 2006). De hecho, se observó que HER1 participa en el proceso metastásico (Lichtner et al., 1995). Además, se ha demostrado que el EGF estimula la migración de ambos tipos celulares, normales y tumorales, incluyendo células epiteliales de mama normales, fibroblastos, y células de carcinoma de próstata y de riñón (Turner et al., 1996; Xie et al., 1998).

C) **Interacción entre HER1 y c-Src en cáncer de mama**

La gran mayoría de los tumores de mama (95%) es inicialmente hormono-dependiente. Esto implica que los estrógenos juegan un rol crucial en su desarrollo y evolución inicial (Russo et al., 2003). Sin embargo, se sabe que con la progresión tumoral se da usualmente la activación de otras vías, normalmente asociadas a receptores de factores de crecimiento y junto con ello, se pierde la dependencia hormonal. El HER1 y el HER2 están implicados en la generación de la resistencia a la terapia hormonal en cáncer de mama. En estudios clínicos, se ha observado que la sobreexpresión del HER1 y HER2 está asociada a una falta de respuesta a la terapia hormonal y a la pobre prognosis tumoral (Nicholson et al., 1994; Wright et al., 1992).

Los miembros de la familia HER y la quinasa de tirosina no receptora c-Src están sobreexpresados con alta frecuencia en cánceres de mama humanos y están implicados en la generación y progresión de la enfermedad (Biscardi et al., 1998; Belsches-Jablonski et al., 2001; Ottenhoff-Kalff et al., 1992). A diferencia del HER1, la sola sobreexpresión de c-Src es insuficiente para transformar fibroblastos murinos en cultivo o para sostener un crecimiento tumoral en animales (Maa et al., 1995). Así, la expresión de formas activas constitutivamente de c-Src en fibroblastos murinos en cultivo han demostrado que c-Src es requerida para la mitogénesis

inducida por EGF (Roche et al., 1995). Estos hallazgos sugieren que c-Src podría funcionar promoviendo el crecimiento de células tumorales por participar de o aumentar la señal mitogénica que se inicia por factores de crecimiento extracelulares u oncogenes intracelulares. Aquí aparecen las dos funciones importantes para la c-Src: 1) modular la función del receptor porque aumenta la señal inmediatamente río abajo de los receptores, regulando la endocitosis (Wilde et al., 1999) y 2) afectar el remodelado morfogenético celular porque fosforila proteínas que se asocian con el citoesqueleto de actina (Maa et al., 1995; Biscardi et al., 1998; Tice et al., 1999).

La expresión aumentada de c-Src en células que presentan elevados niveles de HER1 resultaron en un aumento de la síntesis de ADN, crecimiento en agar blando y formación de tumores en ratones atímicos. La coexpresión de c-Src y HER1 en líneas celulares de cáncer de mama, resulta en una asociación física inducida por EGF, entre el HER1 y la c-Src y la fosforilación en Tirosina-845 (Y845) dentro del dominio catalítico del HER1. Al comienzo de las investigaciones, se pensaba que esta modificación covalente no se requería para la actividad catalítica del HER1, pero se observó que aumentaba enormemente la proliferación, transformación y formación tumoral *in vivo* (Biscardi et al., 1999a). Se ha demostrado que la fosforilación de Y845 del HER1 es dependiente de la actividad catalítica de c-Src, sugiriendo que c-Src directamente fosforila este sitio (Tice et al., 1999). Al sustituir este residuo por fenilalanina, observaron que no se afectó la fosforilación de varias proteínas estimuladas por EGF como la fosfolipasa C, MAPK o STAT3. En cambio, se suprimió completamente la fosforilación del factor de transcripción STAT5b en la Tirosina-699 (Y699) activante, sugiriendo que la activación de la Y845-HER1 puede ser crítica para la actividad del STAT5b (Kloth et al., 2003; Silva y Shupnik, 2007).

Por otro lado existen numerosas evidencias que demuestran que el HER1 coopera con la quinasa c-Src promoviendo la migración celular. Existen estudios, en los que se ha observado una conexión bioquímica entre el HER1 situado en la membrana de células de carcinoma y la c-Src intracelular que lleva a alteraciones del citoesqueleto de actina y a la motilidad celular (Tice et al., 1999; Mao et al 1997). La estimulación con EGF de células de carcinoma que sobre-expresan HER1 resulta en la unión de c-Src a dicho receptor activo y la estimulación de la actividad de quinasa de tirosina de c-Src (Oude-Weernink et al., 1994; Biscardi et al., 1998). La activación de c-Src vía EGF en fibroblastos promueve la fosforilación de la molécula reguladora de actina rhoGAP produciendo el desensamblado de los filamentos de actina (Chang et al., 1995). Por otro lado la vía de señalización intracelular desencadenada por la activación de c-Src por EGF también involucra a dos proteínas relacionadas con la motilidad celular: la quinasa de adhesión focal (FAK) y la quinasa de tirosina relacionada a la adhesión focal (RAFTK). Estos eventos de señalización resultan en el incremento de la invasividad *in vitro* (Brunton et al., 1997; Hauck et al., 2001). Lotz et al. (2003) demostraron que en cáncer de mama, el HER1 sinergiza con la proteína c-Src en la promoción de la invasión.

Todos estos hallazgos indican que c-Src y HER1 cooperan en los procesos de mitogénesis y transformación celular en cáncer.

6. Cáncer de mama y Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs)

La exposición humana a COPs ubicuos tales como PCBs, TCDD, dicloro difenildicloroetileno (DDE) y HCB, ha atraído la atención con respecto al rol de estos pesticidas en la etiología del cáncer de mama a nivel mundial. Al ser liposolubles y poseer una larga vida media, cantidades medibles de estos compuestos están presentes en diferentes tejidos humanos con alto contenido graso como la glándula mamaria, así como también en suero y leche materna.

Aunque el mecanismo de acción de estos químicos en la carcinogénesis no se conoce aún, existen estudios que demuestran que algunos COPs tienen el potencial de promover el desarrollo de cáncer en varios modelos experimentales, tales como roedores y líneas celulares humanas. Estudios *in vitro* demostraron que diversos PCBs promovían la proliferación en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 (Andersson et al., 1999; Zou et al., 2002; Soto et al. 1994). Por otro lado, se observó que la TCDD inhibía la apoptosis al estimular la vía del HER1 en la línea celular epitelial de mama humano MCF-10 (Davis et al. 2001). Calaf y Russo (1993) demostraron que el tratamiento con dimetilbenzantraceno y benzopireno de esta misma línea celular produce una serie de cambios asociados a la transformación celular. A su vez, se observó que el tratamiento prolongado con β-hexaclorociclohexano induce la expresión del proto-oncogen c-Neu, ciclina D1 y p27 en la línea epitelial normal de mama MCF10AT1, *in vitr*o e incrementa el número de tumores de mama y acelera el tiempo de aparición de los mismos en ratones MMTV-Neu, *in vivo* (Wong y Matsumura, 2007). Otros estudios más recientes reportan que al tratar la línea celular normal epitelial de mama HMEC con una mezcla de pesticidas organoclorados (DDT, DDE, DDD, aldrina y dieldrina) se inducía la proliferación celular y la expresión de numerosos genes involucrados en la transformación celular (ACVRL1, ALK-1, KIT, ERBB3 y ALK-1) (Valerón et al., 2009). Previamente, en nuestro laboratorio observamos que el HCB a dosis bajas, induce proliferación celular y la vía de señalización de IGFs de una manera dependiente del REα en MCF-7. Además encontramos que a esas mismas dosis, el pesticida estimula la actividad de la c-Src y la fosforilación del REα (García et al., 2010). En ensayos *in vivo* se observó que la exposición a hidrocarburos aromáticos polihalogenados como la TCDD, produce una variedad de lesiones patológicas involucrando la deposición de la ME y el remodelado del tejido, incluyendo morfogénesis de los túbulos mamarios y prostáticos y promoción tumoral (Brown yLamartiniere, 1995; Roman et al., 1998; Takagi et al., 2000).

Por otro lado, se han reportado algunos estudios que demuestran que compuestos organoclorados promueven la progresión tumoral en cáncer de mama. En ensayos *in vitro*, se observó que el tratamiento de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 con benzopireno (un ligando del RHA presente en el humo del cigarrillo), aumenta los niveles de COX-2 y prostaglandinas, así como la capacidad de invadir de las células, y estos efectos están mediados por el receptor RHA (Miller et al., 2005). A su vez, se encontró que la TCDD induce migración en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 por la vía de señalización de NFATc1/ATX (Seifert et al., 2009). Otros estudios demostraron que el tratamiento con TCDD de esta misma línea celular producía alteraciones morfológicas como la aparición de lamelipodios y mayor motilidad asociadas a una reorganización del citoesqueleto de actina y a una disminución

en la expresión de caderina E (Barouki et al., 2007). Zou y Matsumura (2003) han reportado que al tratar las células MCF7 con β-hexaclorociclohexano por tiempos prolongados se promueve la invasión celular e induce la expresión de HER2 y MMP9 disminuyendo los niveles de RE. En un estudio más reciente Liu et al, (2010) demuestran que el tratamiento con PCBs de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 induce la migración *in vitro*, e incrementa la capacidad de generar metástasis de las MDA-MB-231 en hígado y pulmón*, in vivo*, al activar la quinasa asociada a Rho (ROC). Eum et al. (2004) sugieren que el PCB 104 podría contribuir al desarrollo de metástasis en cáncer de mama, ya que en estudios *in vitro* observaron que este compuesto induce la expresión de VEGF, la hiperpermeabilidad de la línea endotelial HMEC-1, y la migración transendotelial de las MDA-MB-231. Por otro lado, Gakhar et al., (2009) observaron que la TCDD inhibe las uniones intercelulares GAP en las células de cáncer de mama MCF7 y las células epiteliales normales HMEC. Estudios *in vivo* de nuestro laboratorio demostraron que el HCB tiene un efecto co-carcinogénico en tumores mamarios inducidos por NMU en rata, aumentando el número de tumores por rata, el volumen tumoral y la malignidad de los mismos (Randi et al., 2006). En un estudio más reciente, demostramos que el HCB activa la vía de señalización c-Src/HER1 y disminuye la actividad del REα en dichos tumores mamarios, contribuyendo estos cambios moleculares a un fenotipo de mayor malignidad (Peña et al., 2012).

A su vez existen numerosos estudios que demuestran que los COPs favorecen la progresión tumoral en otros tipos de cánceres. Ueng et al., (2010) encontraron que el benzopireno induce la invasión *in vitro* y la metástasis *in vivo* de células CL5 de adenocarcinoma de pulmón. Otros estudios demostraron que la TCDD y el benzopireno estimulan la expresión y secreción de MMP9 en líneas celulares de cáncer de próstata (Haque et al., 2005).

A pesar de la evidencia experimental, existe aún controversia respecto a las propiedades carcinogénicas de los COPs en humanos. Un primer estudio epidemiológico sugirió que el contenido de DDE en sangre podría ser un importante factor etiológico en cáncer de mama (Wolff et al., 1993). Este descubrimiento, advirtió a los epidemiólogos sobre la relevancia de seguir estudiando la relación entre la exposición a los COPs y su potencial implicancia en cáncer de mama. En los siguientes años, numerosos estudios epidemiológicos en el tema con hallazgos variables fueron publicados (Dewailly et al., 1994; Krieger et al., 1994; Guttes et al., 1998). Existen trabajos que concluyen la falta de evidencia que corrobore la hipótesis de que la exposición a los COPs esté asociada a un incremento del riesgo de contraer cáncer de mama (Calle et al., 2002; Laden et al., 2001; Lopez-Cervantes, et al. 2004). Contrariamente, otros estudios muestran una correlación positiva entre los niveles de COPs y la incidencia de cáncer de mama (Aronson et al., 2000; Charlier et al., 2003; Demers et al., 2002; Hoyer et al. 2000; Romieu et al. 2000; Woolcott et al., 2001). La variabilidad en las conclusiones de los diferentes estudios epidemiológicos podría deberse a problemas metodológicos. A pesar de la controversia respecto al tema, reducciones en la exposición a organoclorados, proveerán una oportunidad para la prevención primaria de esta enfermedad.

Con respecto al efecto del HCB en la incidencia del cáncer de mama en humanos, también existen datos contradictorios. En algunos casos, se encontró una correlación positiva entre los

niveles de HCB en suero y tejido adiposo, y la incidencia de cáncer de mama, y en otros no existió una asociación específica. Por otra parte, Dewailly et al., (1994) observaron que mujeres con adenocarcinomas mamarios presentaban niveles de HCB en suero y en tejido mamario significativamente mayores, que aquéllas con tumores benignos. Dado que las evidencias del efecto carcinogénico en humanos aún están en discusión, es que el HCB se encuentra bajo la categoría de "probable carcinógeno humano" (Grupo 2B) en la IARC (2001).

OBJETIVOS

1. Hipótesis general

En estudios previos de nuestro laboratorio, observamos que el HCB tiene un efecto co-carcinogénico en la formación de tumores mamarios inducidos por NMU en rata, aumentando el número de tumores por rata, el volumen tumoral y la malignidad de los mismos. A su vez, demostramos que estos efectos se asociaban a la activación de la vía de señalización c-Src/HER1 en dichos tumores mamarios. Además, en estudios *in vitro* en líneas celulares derivadas de carcinoma mamario humano, observamos que el HCB a bajas dosis estimula la vía de señalización de los IGFs y la proliferación celular, de manera dependiente del REα en MCF7 (REα+). En cambio, en MDA-MB-231 (REα-) no altera la proliferación, mientras que estimula la vía de los IGFs. Se ha reportado que en líneas celulares de cáncer de mama que derivan de tumores más malignos, la activación de la vía de señalización de IGFs podría estimular procesos no relacionados con la proliferación, tales como migración e invasión.

Todos estos hallazgos obtenidos demuestran que el tóxico favorece la promoción tumoral en etapas iniciales hormonodependientes estimulando por ejemplo, la proliferación celular al activar la vía del REα, como observamos previamente en ensayos *in vitro*. La hipótesis de nuestro trabajo es que el tóxico podría estimular otros procesos biológicos asociados a la progresión tumoral, como la migración e invasión celular y metástasis en estadíos tumorales más avanzados. Particularmente, pensamos que el tóxico podría estar promoviendo estos procesos en la línea celular MDA-MB-231 que al sobreexpresar HER1 y c-Src y no expresar REα, posee un fenotipo celular representativo de un tumor más avanzado. Dado que previamente observamos en estudios *in vivo* que el efecto co-carcinogénico del pesticida está asociado a la activación de c-Src y HER1, y debido al rol esencial que cumplen estas dos proteínas en la progresión tumoral en cáncer de mama, es que nos resultó de especial interés estudiar si estas moléculas están involucradas en los procesos biológicos propuestos.

PARTE I:

ACCIÓN DEL HEXACLOROBENCENO EN LA MIGRACIÓN CELULAR. IMPLICANCIA DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE c-SRC/HER1/STAT5B Y HER1/ERK1/2, Y ROL DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS

2. Objetivo General

El objetivo general de la primer parte de éste trabajo fue estudiar los efectos del HCB en la línea MDA-MB-231 sobre la migración celular. Además, nos planteamos analizar su acción sobre la activación del HER1 y c-Src, así como de las vías de señalización "downstream"; y el rol que cumplen la c-Src, HER1 y el RHA en la migración celular.

3. Objetivos específicos

En ensayos *In Vitro* con la línea celular MDA-MB-231 tratada con HCB nos propusimos:

- Estudiar los niveles de expresión y activación de c-Src.
- Analizar los niveles proteicos del HER1 y su fosforilación en Tirosina total, así como en la Tirosina-845.
- Evaluar los niveles de expresión y activación de ERK 1/2.
- Analizar los niveles de expresión y activación de Akt2.
- Estudiar los niveles de expresión y activación de STAT5b.
- Establecer las vías de señalización que involucran las proteínas antes mencionadas estimuladas por el tóxico, realizando ensayos con inhibidores.
- Estudiar si el RHA está involucrado en la activación de dichas vías de señalización inducidas por el HCB.
- Evaluar migración celular.
- Analizar el rol de c-Src, HER1 y RHA en la migración celular inducida por el tóxico.

PARTE II:

ACCIÓN DEL HEXACLOROBENCENO EN LA INVASIÓN CELULAR Y METÁSTASIS. ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO.* IMPLICANCIA DE c-SRC, HER1 Y DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS

2. Objetivo General

En la segunda parte del trabajo nos planteamos estudiar los efectos del HCB en la línea celular MDA-MB-231 *in vitro*, sobre: a) la expresión, secreción y actividad de las MMP2 y 9; b) la invasión celular; y c) el rol de c-Src, HER1 y RHA en dichos efectos. A su vez, nos interesó evaluar la acción del tóxico en la metástasis *in vivo*, utilizando para ello distintos abordajes experimentales.

3. Objetivos específicos

a) En ensayos *In Vitro* con la línea celular MDA-MB-231 tratada con HCB nos propusimos:

- Evaluar los niveles intracelulares de proteínas de MMP2 y 9; y los niveles y actividad de estas enzimas secretadas al medio extracelular.
- Analizar los niveles de ARNm de MMP2 y MMP9.
- Evaluar la invasión celular.
- Establecer el rol de c-Src, HER1 y del RHA en los efectos del tóxico antes descriptos.

b) En ensayos de xenotrasplante ortotópico utilizando la línea celular MDA-MB-231 en ratones hembra BALB-c atímicos, nos propusimos estudiar el efecto del HCB en:

- El Crecimiento tumoral mamario.
- La metástasis espontánea en pulmones, hígado y ganglios linfáticos axilares.
- Los niveles de expresión y activación de c-Src en tumores.
- Los niveles proteicos del HER1 y su fosforilación en la Tirosina-845 en tumores.
- Los niveles de expresión y activación de ERK1/2 en tumores.
- Los niveles de expresión y activación de STAT5b en tumores.
- Los niveles de proteínas de MMP2 y 9 en tumores.

c) En un modelo de metástasis espontánea singenéico con tumores C4-HI en ratones hembra BALB-c, evaluamos el efecto del tóxico en:

- El Crecimiento del tumor primario.
- La metástasis espontánea en pulmones, hígado y ganglios linfáticos axilares.
- Los niveles protéicos de MMP2 y 9 en los tumores.

d) En un modelo de metástasis experimental singenéico con células LM3 inoculadas en la vena de la cola de ratones hembra BALB-c, estudiamos el efecto del HCB en:

- El número y tamaño de focos metastásicos macroscópicos en pulmones.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales y reactivos

El Hexaclorobenceno (HCB) fue obtenido en Sigma-Aldrich Co Ltd., Gillingham-Dorset (UK). Los reactivos de electroforesis en geles de poliacrilamida fueron adquiridos en la empresa Bio-Rad Laboratories. Los anticuerpos policlonales contra c-Src total, c-Src fosforilada en Y416, HER1 total, HER1 fosforilado en Y845, ERK1/2 total, ERK1/2 fosforilado en T202/Y204, Akt fosforilada en T308 y el anticuerpo monoclonal contra MMP2 fueron comprados en Cell Signalling Technology Inc. (MA). Los anticuerpos policlonales contra STAT5b total, STAT5b fosforilado en Y699 y MMP9 fueron obtenidos en Upstate (Millipore). El anticuerpo policlonal contra Akt2 total y el anticuerpo monoclonal contra el RHA fueron comprados en Abcam Ltd (Cambridge, UK). El anticuerpo monoclonal anti-MMP2 fue obtenido en Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). El anticuerpo policlonal anti-MMP9 fue comprado en Millipore. El anticuerpo monoclonal anti- β Actina fue obtenido en Sigma (St. Louis, MO, USA), mientras que el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina total fue comprado en Becton Dickinson (BD). Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa dirigidos contra anti-inmunoglobulina de conejo y anti-inmunoglobulina de ratón fueron obtenidos en Bio-Rad Laboratories (CA, USA). El kit para el ensayo de quimioluminiscencia (ECL) y los marcadores de peso molecular de rango amplio (10 a 250 kDa) fueron obtenidos en GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, UK). Las membranas de polivinil difluoruro (PVDF) de 0.2 μm de espesor para inmunoblot fueron compradas en Bio-Rad Laboratories. La gelatina utilizada en los ensayos de zimografía fue obtenida en Sigma. Los inhibidores de c-Src (PP2) y de HER1 (AG1478) fueron obtenidos en Calbiochem (La Jolla, CA); y los inhibidores del RHA (4,7-ortofenantrolina y α-naftoflavona) fueron comprados en Invitrogen Life Technology (Carlsbad, CA). El 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) fue comprado en Promega (Southampton, UK). Para los estudios en cultivos celulares, los materiales plásticos estériles fueron obtenidos en Greiner Bio-One (GBO-Argentina SA). Los transwells y el matrigel fueron comprados en Becton Dickinson (BD). El medio de cultivo celular RPMI-1640 fue obtenido en Biodynamics SRL. La tripsina, el antibiótico-antimicótico y la glutamina fueron comprados en PAA (Austria), mientras que el suero fetal bovino fue obtenido en Natocor SA (Argentina).

Los random primers, enzimas y cofactores para la Transcripción Reversa (TR) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fueron comprados en Promega Corporation (Madison, WI). Los primers de MMP2, MMP9, L19 y CYP1A1 para la RT-PCR fueron obtenidos en Invitrogen Life Technology (Carlsbad, CA).

El resto de los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico.

2. Cultivos celulares

2.1. MDA-MB-231

La línea celular epitelial de cáncer de mama humano MDA-MB-231 fue obtenida en American Type Culture Collection (ATCC, USA). Esta línea celular deriva de la efusión pleural de un adenocarcinoma mamario humano. La misma se caracteriza por no expresar REα, sobreexpresar el receptor HER1 y expresar la oncoproteína c-Src (Belches-Jablonski et al., 2001). Las células fueron cultivadas en una estufa a 37°C con 5% CO_2 en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de mezcla de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 Unidades/ml, estreptomicina sulfato 10 mg/ml y anfotericina B 25 μg/ml).

2.2. LM3

La línea celular de adenocarcinoma mamario murino LM3 fue donada gentilmente por el Instituto de Oncología Angel Roffo (Buenos Aires, Argentina). Esta línea celular fue establecida en dicho Instituto (Urtreger et al., 1997). Resumidamente, se obtuvo del cultivo primario de un adenocarcinoma mamario transplantable de ratón BALB-c con capacidad metastásica en pulmón, denominado M3 (Bal de Kier Joffé et al., 1986). Luego de la inoculación subcutánea, las células LM3 producen localmente adenocarcinomas muy pocos diferenciados y altamente metastásicos en pulmón (Urtreger et al., 1997). A su vez, cuando estas células son inoculadas en la vena de la cola de ratones BALB-c, originan múltiples metástasis en pulmón (Carnevale et al., 2007). Las células fueron cultivadas en una estufa a 37°C con 5% CO_2 en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB, 1% de mezcla de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 Unidades/ml, estreptomicina sulfato 10 mg/ml y anfotericina B 25 μg/ml) y 2 mM de L-glutamina.

3. Tumores

Los tumores C4-HI (Hormono Independientes) son carcinomas mamarios murinos de tipo ductal que expresan altos niveles de RE y RP, poseen capacidad metastásica en ganglio linfático axilar y pulmón y responden al tratamiento con antiprogestágenos, tamoxifeno y estrógenos (Lanari et al., 2009). Estos tumores se originaron a partir de los tumores C4-HD (Hormono Dependientes) que fueron inducidos por la administración continua del progestágeno medroxiprogesterona (MPA) en ratones hembra BALB-c (Lanari et al., 1986; Lanari et al., 1989), y mantenidos por trasplantes seriados subcutáneos en ratones hembra tratados con MPA. Los tumores que continuaron creciendo, aún en ausencia de MPA dieron origen a la variante C4-HI.

4. Ratones

Los ratones hembra BALB-c atímicos (nu/nu) o normales de 6 semanas de edad fueron obtenidos en el Bioterio de la Universidad Nacional de la Plata (Buenos Aires, Argentina). Los ratones fueron mantenidos en grupos de 4-10 animales por caja en un sistema de recirculación de aire individual por caja, y en un ambiente con aire acondicionado a 20 ± 2°C bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, con libre acceso a la comida y al agua. El cuidado de los animales fue acorde con la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources, 1996). Los ratones atímicos fueron mantenidos en las mismas condiciones antes descriptas pero en un ambiente libre de gérmenes. Para el tratamiento de los animales el HCB (0.3, 3 y 30 mg/kg peso corporal, p.c.) fue disuelto en aceite de maíz y administrado por inyecciones intraperitoneales (0.1 ml) tres veces por semana. El grupo de animales control fue inyectado con aceite de maíz (0.1 ml) como vehículo. Las dosis del pesticida utilizadas son similares a las previamente ensayadas en otros estudios (Ralph et al., 2003).

5. Exposición de las células MDA-MB-231 al HCB

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en medio completo RPMI. Al día siguiente, el medio de cultivo fue cambiado a RPMI sin SFB y 24 horas más tarde, las células fueron expuestas al HCB ó vehículo en RPMI SFB 5% de acuerdo al ensayo. Las concentraciones de HCB utilizadas en este trabajo (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) fueron seleccionadas de acuerdo a previos estudios de nuestro laboratorio (García et al., 2010), y considerando que la dosis de 5 μM está dentro del rango de orden de aquéllas encontradas en sueros humanos de poblaciones altamente contaminadas (To-Figueras et al., 1997). Para el tratamiento de las células el HCB fue disuelto en etanol absoluto. La concentración final de etanol en cada tratamiento fue de 0.5% (V/V). Ensayos previos de nuestro laboratorio mostraron que esta concentración de vehículo no tuvo influencia sobre los parámetros analizados.

6. Obtención de lisados celulares de MDA-MB-231

Una vez finalizado el experimento, se lavó dos veces con buffer fosfato salino (PBS) y se agregó buffer de lisis [Tris-HCl 0.1 M, Tritón X-100 1%, ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) 1 mM, fluoruro de sodio (NaF) 0.1 mM, leupeptina 0.02 mg/ml, ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) 1 mM, PMSF 1 mM]. Luego de 10 minutos, se retiraron los lisados utilizando un raspador y se centrifugaron a 16.000 xg durante 10 minutos a 4 °C de manera de descartar el precipitado de ADN. Los sobrenadantes fueron guardados a -80 °C para ser utilizados en los ensayos de inmunoblot.

7. Fraccionamiento subcelular de los tumores de mama

Los tumores de mama de los ratones fueron homogeneizados en un buffer que contenía sacarosa 0.2 M, Hepes 10 mM, KCl 15 mM, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 2 mM y ditiotreitol 0.5 mM (pH 7.6) en presencia de inhibidores de proteasas [benzamidina 2.5 mM, aprotinina 10 μg/ml, pepstatina A 1 μg/ml, leupeptina 1 μg/ml, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.5 mM] y de inhibidores de fosfatasas (Na_3VO_4 2 mM y NaF 50 mM) utilizando un homogeneizador de vidrio/teflón del tipo Elvejhem. El homogenato crudo fue centrifugado a 1.500 xg durante 10 minutos para extraer la fracción nuclear. Luego, se centrifugó el sobrenadante a 12.000 xg durante 20 minutos para remover las mitocondrias, y el sobrenadante resultante fue centrifugado a 100.000 xg durante 60 minutos para obtener las fracciones microsomal y citosólica. La fracción nuclear fue resuspendida en un buffer de lisis conteniendo NaCl 0.4 M y glicerol 5%, con el objetivo de preparar los extractos nucleares. Todos los pasos se realizaron a 4°C.

8. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas fue analizada por el método de Bradford (Bradford 1976) utilizando seroalbúmina bovina (BSA) (1 mg/ml) como proteína patrón para realizar la curva de calibración.

9. Inmunoprecipitación de HER1

Las proteínas provenientes de los lisados celulares (300-500 μg) resuspendidas en buffer de inmunoprecipitación (Tris 200 mM, pH 7.4, NaCl 1 M, EDTA 100 mM, IGEPAL CA-630 1%, Tritón X-100 2%) en presencia de inhibidores de proteasas (leupeptina 1 mM, PMSF 200 mM y aprotinina 1 mg/ml) y de inhibidores de fosfatasas (Na_3VO_4 2 mM y NaF 0.05 M) fueron incubados con 5 μg de anticuerpo anti- HER1 y 25 μl de A/G plus agarosa, en un volumen final de 0.5 ml durante 16-24 horas a 4 ◦C bajo agitación constante. Al día siguiente, los lisados se centrifugaron a 12.000 xg durante 5 minutos y los inmunoprecipitados se lavaron cuatro veces con buffer de inmunoprecipitación. Luego, se centrifugaron y se desnaturalizaron en buffer Laemmli a 95 ◦C durante 5 minutos para luego separarlos por electroforesis en geles de poliacrilamida.

10. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los lisados celulares ó fracciones subcelulares provenientes de tumores (30-150 μg) se resuspendieron en buffer Laemmli (Tris 0.25 M pH 6.8, SDS 8%, azul de bromofenol 0.03%, glicerol 40%, β-mercaptoetanol 20%) y se calentaron durante 5 minutos a 95 ◦C. Se sembraron

cantidades equivalentes de proteínas de cada muestra o de los inmunoprecipitados en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 6, 7.5 ó 10%, y se realizó la electroforesis en buffer de corrida Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS 0.1% (pH 8.3) a voltaje constante de 80-120 V durante 45-60 minutos a temperatura ambiente. Se corrieron paralelamente proteínas marcadoras de peso molecular de rango amplio (10-250 kDa).

11. Ensayo de Inmunoblot

Las muestras de proteínas de los geles fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando una cámara de transferencia semiseca (Mini Protean Transblot, Bio-Rad). Los geles y las membranas fueron equilibrados previamente en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 200 mM, SDS 0.1%, metanol 20%, pH 8.5) durante 15 minutos y la electrotransferencia se realizó durante 2 horas con voltaje constante de 17 V. Luego de finalizada la transferencia, se utilizó la tinción de proteínas con rojo Ponceau S al 0.5% como control de transferencia y sembrado. Seguidamente, las membranas se bloquearon mediante la incubación con una solución de leche descremada 5% en TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%, pH 8) durante toda la noche. Para los ensayos donde se utilizó anticuerpo anti-fosfotirosina total, se bloqueó con BSA 3 % en TBS-T, debido a que la caseína de la leche contiene fosfotirosinas que pueden interferir en nuestro resultado. Luego, las membranas se incubaron con diferentes anticuerpos primarios (**Tabla A**) durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 ◦C, con agitación constante. Después de la incubación, las membranas fueron lavadas 5 veces con TBS-T a temperatura ambiente durante 10 minutos e incubadas con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa dirigido contra IgG de conejo o de ratón (1:1000 en BSA 3% en TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 5 lavados con TBS-T y un lavado con TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8).

Las membranas fueron incubadas en primer lugar con anticuerpos contra las formas fosforiladas, luego se estripearon con dos lavados de 15 minutos en baño calefactor con agitación a 60 ◦C, en buffer de stripping (Tris 0.063 M, β-mercaptoetanol 0.1 M, SDS 2%, pH 6.7). Seguidamente se bloquearon y se reincubaron con anticuerpos contra las formas totales de las diferentes proteínas analizadas.

Los complejos inmunes fueron visualizados empleando un kit de quimioluminiscencia (ECL). Luego se expusieron las placas radiográficas (High performance chemiluminiscence film, Amersham Hyperfilm, ECL), a diferentes tiempos, que seguidamente se revelaron para cuantificar los resultados. Las bandas obtenidas fueron cuantificadas mediante densitometría óptica, utilizando el programa Gel-Pro Analyzer 3.1. Como control de carga de los ensayos de inmunoblot, se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-β Actina (1:2000), incubando las membranas durante 2 horas a temperatura ambiente. Los valores obtenidos de todas las bandas de proteínas analizadas, fueron normalizados en relación a la señal de la β Actina y relativizados al control.

Anticuerpo	**Fabricante**	**Código**	**Origen**	**Dilución usada**
p-Akt (T308)	CS	9275	CP	1/500
p-ERK1/2 (T202/204)	CS	9101	CP	1/1000
p-STAT5a/b (T694/699)	UP	05-495	RM	1/500
p-c-Src (T416)	CS	2101	CP	1/250
p-HER1 (Y845)	Ab	ab 5636	CP	1/500
p-Tyr total	BDT	610000	RM	1/1000
Akt2	Ab	ab 66129	CP	1/500
ERK1/2	CS	9102	CP	1/1000
STAT5b	UP	06-969	CP	1/500
c-Src	CS	2108	CP	1/500
HER1	CS	2232	CP	1/500
MMP2	SC	sc-13595	RM	1/500
MMP9	M	AB 19016	CP	1/500
RHA	Ab	ab-2770	RM	1/500
β Actina	Sigma	ab 5636	CP	1/500
anti-conejo	BR	170-6515	Ca	1/1000
anti-ratón	BR	170-6516	Ca	1/1000

TABLA A. Anticuerpos utilizados para immunoblot. CP (policlonal, de conejo), RM (monoclonal, de ratón), Ca (de cabra). Santa Cruz (SC), UPSTATE (UP), Abcam (Ab), Cell Signaling (CS), BD Transduction (BDT), Millipore (M), Bio-Rad (BR).

12. Ensayo de viabilidad celular

Las células MDA-MB-231 fueron tratadas según lo descrito previamente. Una vez finalizado dicho tratamiento, se cambió el medio por una solución de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) en PBS 1X. Luego de 1 hora, el precipitado de formazán se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) y se midió la concentración de formazán en espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. El número de células viables se calculó teniendo en cuenta que es proporcional a la producción de formazán. Los valores graficados fueron expresados como el porcentaje de viabilidad celular respecto al control.

13. Evaluación de la migración celular

13.1. Ensayo de la herida

Se realizó una herida con la punta de un tip en la monocapa de células MDA-MB-231 confluente tratadas previamente con HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo por 24 hrs. Luego los pocillos se lavaron con PBS dos veces para remover las células levantadas en el anterior procedimiento, y se volvió a colocar el mismo tratamiento. Se tomaron las primeras fotografías al tiempo de 0 horas. Seguidamente, a las 10 y 20 horas de realizada la herida, se volvieron a fotografiar los mismos campos. Por cada réplica (n=3), se contaron el número de células que migraron dentro del área de la herida, seleccionando 5 campos al azar, y en el gráfico se expresó el valor promedio de células migrantes en cada tiempo y para las diferentes dosis de HCB. Se asignó un valor arbitrario de 100 a la muestra control del tiempo de 20 hrs.

13.2. Ensayo del transwell

Para los ensayos de migración se utilizaron transwells de 8 μm de poro, en multiwells de 24 pocillos (BD Biosciences, Buenos Aires, Argentina). Luego de exponer las células MDA-MB-231 a diferentes dosis de HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo por 24 horas, fueron resuspendidas en medio de cultivo RPMI libre de suero con el mismo tratamiento y se colocó un volumen de 200 μl de dicha suspensión con $3x10^4$ células en la parte superior del transwell. En la parte inferior del mismo, se colocó medio de cultivo con 2% de SFB como quimioatractante. Después de una incubación de 20 horas, las células de la parte superior del transwell fueron removidas con un hisopo de algodón. Las células que migraron hacia la parte inferior del filtro, fueron fijadas durante 10 minutos con metanol, teñidas con azul de toluidina y seguidamente fotografiadas bajo microscopio para luego ser cuantificadas. Los resultados graficados fueron expresados como el porcentaje de células tratadas con HCB que migraron, respecto de las células tratadas con vehículo (control). Se asignó un valor arbitrario de 100 a la muestra control.

14. Evaluación de la invasión celular

Los transwells de 8 μm de poro colocados en multiwells de 24 pocillos fueron recubiertos con 50 μl de matrigel al 13% (BD Biosciences, Buenos Aires, Argentina) en RPMI, y luego incubados en la estufa de cultivo a 37 °C durante 2 hrs para permitir su posterior gelificación. Las células MDA-MB-231 ($2.5x10^4$) en RPMI libre de SFB con HCB (5 μM) ó vehículo, fueron sembradas en la parte superior del transwell. Se utilizó RPMI con 10% de SFB como quimioatractante en la parte inferior del mismo. Luego de transcurridas 48 horas para permitir la invasión celular, se procedió como lo descripto previamente para el ensayo de migración. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células tratadas con HCB que invadieron respecto a la cantidad de células tratadas con el vehículo (control). Se asignó un valor arbitrario de 100 a la muestra control.

15. Rol de c-Src, HER1 y RHA

Para estudiar si los efectos inducidos por el tóxico en la línea celular MDA-MB-231 estaban mediados por el RHA, HER1, y/o c-Src, nos propusimos hacer ensayos en presencia de inhibidores específicos de éstas proteínas. Para estudiar el rol del RHA en las vías de señalización estudiadas, utilizamos dos antagonistas del RAH estructuralmente no relacionados, la 4,7-ortofenantrolina (4,7 PHE) y la α-naftoflavona (α-NF). A su vez, con el objetivo de evaluar si los efectos observados dependían de la c-Src, usamos un inhibidor específico de c-Src, el 4-Amino-5-(4-cloro-fenil)-7-(t-butil) pirazolo [3,4-d] pirimidina (PP2). Finalmente para analizar el rol del HER1 en los cambios inducidos por el pesticida, utilizamos el inhibidor del HER1, Tirfostina AG1478. Las células MDA-MB-231 fueron pretratadas durante 3 horas con los diferentes inhibidores a distintas concentraciones puestas a punto para cada tipo de ensayo, y luego tratadas con HCB en presencia de los mismos. A manera de control, en todos los ensayos se realizaron incubaciones de las células con los inhibidores en ausencia del HCB, para evaluar específicamente si el tratamiento con estas moléculas tenía algún efecto sobre los parámetros analizados. Los compuestos usados como inhibidores en estos ensayos, se han probado ampliamente en diferentes estudios, con buenos resultados (Galvagni et al., 2010; Krishnaswamy et al., 2010; Mahon y Gasiewicz, 1992).

16. Ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa (RT-PCR)

Una vez tratadas con HCB ó vehículo, durante los tiempos de 6, 16 ó 24 horas según el ensayo, las células MDA-MB-231 fueron lavadas con PBS, luego resuspendidas en Trizol y guardadas en freezer de - 80°C hasta el momento en que se realizó la extracción del ARNm. Posteriormente se realizaron la extracción y seguidamente la cuantificación del ARNm y se sintetizó el ADN-c a partir de 1 μg de ARNm de cada muestra en presencia de los cuatro deoxinucleótidos trifosfato y la enzima transcriptasa reversa. A continuación, se llevaron a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El número de ciclos de amplificación adecuado para cada caso, fue

predeterminado en curvas de ciclos. Para ello, utilizando una muestra se realizaron curvas de ciclos (15, 20, 25, 30, 35 y 40), luego se realizaron las densitrometrías correspondientes y se graficó el logaritmo de las densitometrías en función del número de ciclos. Se determinó como número de ciclos óptimo aquel que formara parte de la pendiente recta. La secuencia de los primers sentido y antisentido utilizados en la PCR para amplificar cada gen, se muestran en la **Tabla B**.

16.1. Reacción de PCR para la metaloproteasa 9 (MMP9)

Para amplificar MMP9 se utilizó 1 µl de reacción de RT (ADN-c), en un volumen total de reacción de PCR de 25 µl conteniendo 1.25 unidades de la enzima ADN polimerasa Go Taq, $MgCl_2$ 1.5 mM, mix de DNTp 0.2 mM y 0.5 µM de ambos primers. La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera: la mezcla de reacción fue incubada a 94°C durante 5 minutos, luego amplificada a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, y 72 °C durante otros 30 segundos. Se realizaron 33 ciclos de amplificación, seguidos de la incubación a 72°C durante 5 minutos.

16.2. Reacción de PCR para la metaloproteasa 2 (MMP2)

Para amplificar MMP2 se realizó la reacción de PCR a partir de 2 µl de ADN-c en un volumen total de 25 µl conteniendo lo antes descripto. La reacción consistió en: una primera incubación a 94 °C durante 5 minutos, seguido de la amplificación a 94 °C durante 30 segundos, 57 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante otros 30 segundos. Luego de 37 ciclos de amplificación se incubó 7 minutos a 72 °C.

16.3. Reacción de PCR para CYP1A1

Para amplificar el CYP1A1 se realizó la PCR a partir de 2 µl de ADN-c en un volumen total de 25 µl conteniendo lo antes descripto. La reacción consistió en: una primera incubación a 95 °C durante 4 minutos, seguido de la amplificación a 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante otros 30 segundos. Luego de 38 ciclos de amplificación se incubó 7 minutos a 72 °C.

16.4. Reacción de PCR para L19

Se amplificó L19 a partir del ADN-c de cada muestra con el fin de utilizarlo como un control de carga. Para ello se realizó la PCR a partir de 0.5 µl de ADN-c en un volumen total de 25 µl conteniendo lo descripto previamente. La reacción se realizó de la misma manera que la ensayada para amplificar MMP9.

En todos los casos el producto de reacción de la PCR fue corrido en un gel de agarosa al 2%, conteniendo 0.05% (V/V) de bromuro de etidio. Las bandas fueron detectadas usando el Image Quant RT PCR (GE Healthcare), y la intensidad de las mismas fue cuantificada utilizando el programa Gel-Pro Analyzer 3.1.

	Primer	**Secuencia**
L19	Sentido	AGTATGCTCAGGCTTCAGAA
	Antisentido	TTCCTTGGTCTTAGACCTGC
MMP9	Sentido	GATGCGTGGAGAGTCGAAAT
	Antisentido	CACCAAACTGGATGACGATG
MMP2	Sentido	ACCCATTTACACCTACACCAAG
	Antisentido	GTATACCGCATCAATGTTTTCCG
CYP1A1	Sentido	TAGACACTGATCTGGCTGCAG
	Antisentido	GGGAAGGCTCCATCAGCATC

TABLA B. Secuencias de primers utilizadas en los ensayos de RT-PCR.

17. Determinación de los niveles proteicos de MMPs intracelulares y secretados

Las células MDA-MB-231 se expusieron a diferentes dosis de HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo, durante 24 horas. Luego, previo lavado con PBS, se adicionó RPMI libre de SFB. Una vez transcurridas 24 horas, se colectó el medio y se guardó a -20 °C hasta el momento de su uso. Estas muestras fueron utilizadas para medir los niveles de proteínas de MMP2 y 9 secretadas al medio por las células en ensayos de inmunoblot. A su vez, estas mismas muestras fueron utilizadas para medir la actividad de dichas gelatinasas con la técnica de zimografía en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y 1% de gelatina. Por otro lado, la monocapa celular fue lavada con PBS y se obtuvieron los lisados celulares totales como se describió previamente. Las muestras fueron guardadas a -20 °C para ser usados para detectar los niveles intracelulares de MMP2 y 9 por inmunoblot, así como los niveles de β Actina.

18. Ensayo de Actividad de metaloproteasas

Con el fin de medir la actividad de las gelatinasas secretadas por la línea celular MDA-MB-231, se realizó la técnica de zimografía en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y 1% de gelatina (sustrato de MMP2 y 9). Esta técnica permite separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular y luego al incubar el gel en las condiciones adecuadas para que las gelatinasas degraden el sustrato (gelatina) presente dentro del gel, evaluamos la actividad de las mismas midiendo la intensidad de bandas claras al teñir el gel con un colorante para proteínas.

Los medios de cultivo colectados previamente (25-50 μl) se resuspendieron en un buffer de Laemmli modificado (Tris-HCl 10 mM pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.03% y glicerol 10%), se calentaron durante 5 minutos a 95 ◦C, y luego se sembraron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 6 ó 7.5%, realizando la electroforesis como se describió previamente. Luego los geles fueron lavados 2 veces durante 30 minutos con Rinsing Buffer 1 (Tris-HCl 50 mM, Tritón X-100 2.5% V/V), 3 veces durante 5 minutos con Rinsing Buffer 2 (Tris-HCl 50 mM), y seguidamente incubados durante 24, 48 ó 72 horas a 37 °C en un buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.15 M, $CaCl_2$ 10 mM. Finalmente los geles se tiñeron con una solución colorante de proteínas (Coomassie Brilliant Blue R 250 0.1% V/V) durante 2 horas y luego se destiñeron con una solución conteniendo ácido acético 10% y metanol 10%. De esta manera las regiones de degradación enzimática se observaron como bandas claras sobre el fondo azul. Los geles fueron escaneados y las bandas obtenidas fueron cuantificadas mediante densitometría óptica utilizando el programa Gel-Pro Analyzer 3.1. Los valores obtenidos fueron normalizados en relación a la señal de la β Actina encontrada en el ensayo de inmunoblot del lisado total de las muestras correspondientes a dicho experimento. Los valores fueron expresados como el porcentaje de actividad de la enzima de las muestras de células tratadas con HCB, respecto a las muestras tratadas con vehículo (control), asignándole un valor arbitrario de 100 a la muestra control.

19. Evaluación de metástasis

Con el objetivo de estudiar los efectos del tóxico sobre las metástasis *in vivo* se utilizaron tres modelos distintos, siendo los dos primeros modelos de **metástasis espontánea** y el último un **modelo de metástasis experimental**.

19. 1. Ensayo de metástasis espontánea en ratones hembra BALB-c atímicos (nu/nu) inoculados en la mama con células MDA-MB-231

Se inocularon subcutánemente (sc) las células MDA-MB-231 en matrigel ($9x10^6$) en los cordones mamarios de ratones hembra BALB-c atímicos de 6 semanas de edad. La mayoría de los ratones desarrollaron un tumor de mama en un período de aproximadamente un mes. Los tumores desarrollados fueron trasplantados bajo condiciones de esterilidad en tres ratones BALB-c atímicos. Una vez que los tumores alcanzaron un tamaño adecuado, se procedió a comenzar el

experimento propiamente dicho a partir del material tumoral proveniente de estos tres ratones. Para ello, los ratones se sacrificaron y los tumores fueron extirpados en condiciones de esterilidad, luego diseccionados en trozos pequeños de tamaño similar y finalmente cada trocito fue inoculado sc en los cordones mamarios de ratones hembra BALB-c atímicos. Una vez que los tumores de mama prendieron, comenzaron a crecer y alcanzaron un tamaño de aproximadamente 0.25 x 0.25 cm, se separaron los ratones en cuatro grupos diferentes (10 ratones por grupo) y se comenzó con el protocolo de intoxicación. Los ratones fueron inoculados intraperitonealmente (i.p.) con 0.1 ml de una solución de HCB en aceite de maíz (0.3, 3, 30 mg/kg p.c.) ó vehículo (aceite de maíz) tres veces por semana. A su vez, el diámetro mayor (D) de los tumores y el diámetro perpendicular a éste (P) se midieron tres veces por semana, utilizando un calibre. Al mes y medio de iniciado el experimento, se realizó la necropsia de los animales, y los tumores primarios fueron fotografiados, medidos y pesados. Se guardaron muestras del tumor primario en nitrógeno líquido y otra muestra del mismo fue fijada en paraformaldehído (PFA) e incluida en parafina, cortado y teñido con Hematoxilina-Eosina para su posterior análisis histopatológico. Los pulmones, el hígado y los ganglios linfáticos axilares de cada ratón fueron fijados en PFA e incluidos en parafina. Se realizaron cortes semi-seriados de dicho material incluido y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina para evaluar la aparición de focos metastáticos o micrometástasis en estos órganos. Los volúmenes tumorales fueron calculados con la fórmula $\pi DP^2/6$ donde D es el diámetro mayor medido y P es el diámetro perpendicular al mismo. Las muestras del tumor primario guardadas en nitrógeno líquido se utilizaron posteriormente para obtener fracciones subcelulares con el objetivo de analizar los niveles de diferentes proteínas por inmunoblot.

En los estudios de metástasis en pulmón, ganglio linfático axilar ó hígado, los resultados fueron expresados como el porcentaje de animales que presentaron micrometástasis en dicho órgano del total de los animales para cada grupo.

19.2. Ensayo de metástasis espontánea en ratones hembra BALB-c con tumores C4-HI

Ratones hembra BALB-c con tumores de mama C4-HI fueron sacrificados, los tumores C4-HI fueron extirpados en condiciones de esterilidad y colocados en solución fisiológica para luego ser diseccionados en trozos de similar tamaño. Seguidamente, un trozo de tumor fue inoculado sc en uno de los cordones mamarios de cada uno de los ratones hembra BALB-c de 6 semanas de edad. Una vez que los tumores prendieron, crecieron y alcanzaron un tamaño aproximado de 0.25 x 0.25 cm, se separaron los ratones en cuatro grupos diferentes (7 ratones por grupo) y se comenzó con la exposición al HCB en aceite de maíz (0.3, 3, 30 mg/kg p.c.) ó vehículo, como se describió previamente para el ensayo anterior. Los tumores fueron medidos tres veces por semana con calibre. Aproximadamente a los dos meses de iniciado el experimento se realizó la necropsia de los animales y se procedió como lo descripto previamente para ratones BALB-c inoculados con MDA-MB-231.

Para estudiar los niveles de metástasis en pulmón, ganglios linfáticos axilares e hígado los resultados fueron sujetos a dos tipos de análisis. En una primera etapa, los datos se expresaron como el porcentaje de animales que presentaban metástasis en el órgano en cuestión del total de ratones para cada grupo. En una segunda etapa, los resultados fueron graficados como el número de focos metastásicos en el órgano analizado para cada grupo.

19.3 Ensayo de metástasis experimental en ratones hembra BALB-c inoculados en la vena de la cola con la línea celular LM3

Ratones hembra BALB-c de 8 semanas de edad se expusieron a diferentes dosis de HCB disuelto en aceite de maíz (0.3, 3, 30 mg/kg p.c.) ó vehículo, por inyección i.p. tres veces por semana. Luego de una semana de tratamiento, los ratones fueron inoculados en la vena de la cola con las células LM3 ($5x10^4$). Se continuó con la intoxicación de los ratones durante 3 semanas más. A continuación los animales fueron sacrificados y los pulmones se extrajeron y se guardaron en solución de Bovin. Posteriormente se realizó un análisis bajo lupa estereoscópica de cada pulmón en el cual se contó el número total de macrometástasis. A su vez, utilizando un papel milimetrado se midió el tamaño de cada macrometástasis, teniendo en cuenta para ello la longitud del díametro mayor de las mismas. De esta manera, se contaron el número de macrometástasis con tamaños mayores y menores de 1.5 mm de diámetro.

En un primer análisis, los resultados fueron expresados como el número de macrometástasis totales observadas en pulmón para cada grupo. Luego se graficó el número de focos metastásicos con diámetros mayores o menores a 1.5 mm en dicho órgano.

20. Análisis estadísticos

Los datos del ensayo de la herida y los datos de los tamaños tumorales en los experimentos *in vivo* fueron analizados por análisis de varianzas del tipo ANOVA de dos factores. Se utilizó el test de Bonferroni para comparar entre grupos experimentales. Se consideraron diferencias significativas cuando los valores de p fueron menores a 0.05. Los resultados representan las medias ± SD de al menos tres experimentos independientes.

Los datos de los restantes ensayos fueron analizados por análisis de varianzas del tipo ANOVA de un factor. Cuando el análisis de varianzas resultó significativo (valor de p menor a 0.05), se utilizó el test de Tukey para comparar entre grupos experimentales. Se consideraron diferencias significativas cuando los valores de p fueron menores a 0.05. Los resultados representan las medias ± SD de al menos tres experimentos independientes.

RESULTADOS

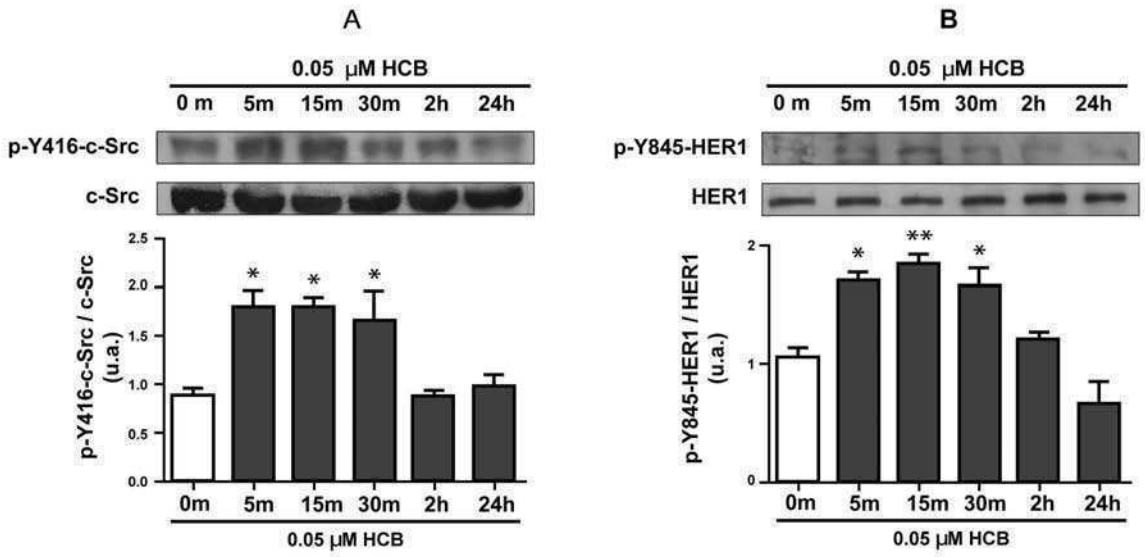
PARTE I:

ACCIÓN DEL HEXACLOROBENCENO EN LA MIGRACIÓN CELULAR. IMPLICANCIA DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE c-SRC/HER1/STAT5B Y HER1/ERK1/2, Y ROL DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS

1. El HCB induce la fosforilación de c-Src y del HER1 en función del tiempo de intoxicación

En estudios previos de nuestro laboratorio, observamos que el HCB estimula la actividad de la c-Src quinasa y la fosforilación del HER1 en Tirosina-845 (Y845) tanto en hígado de rata como en la línea celular de hígado normal de rata WBF-344 (Randi et al., 2008). Por otro lado, demostramos que el pesticida aumenta la fosforilación de c-Src en Tirosina-416 (Y416) en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 (García et al., 2010). En otros estudios, encontramos que el HCB estimula la fosforilación de Y416-c-Src y de Y845-HER1 en tumores de mama inducidos por NMU en ratas (Peña et al., 2012). Teniendo en cuenta estos antecedentes, y la importancia de c-Src y HER1 en la progresión tumoral mamaria, en este trabajo nos propusimos analizar el efecto del HCB sobre la activación de estas moléculas en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Dicha línea celular no posee REα, mientras que sobreexpresa HER1 y expresa c-Src, siendo por ende un buen modelo para este estudio.

Las células fueron expuestas al tóxico (0.05 μM) durante diferentes tiempos (0, 5, 15, 30 minutos, 2 y 24 horas) y los lisados celulares fueron usados para analizar por inmunoblot los cambios en la fosforilación de las proteínas en estudio. Observamos que el HCB aumenta significativamente la fosforilación de c-Src en Y416 a los 5, 15 y 30 minutos de exposición, mientras que los niveles de c-Src totales no se modifican (**Figura 13A**). Luego, evaluamos si el tóxico podía estimular la fosforilación en la Y845 del HER1, un sitio específico para la transactivación del HER1 por c-Src. Como se muestra en la **Figura 13B**, el HCB induce un aumento en la fosforilación en Y845-HER1 a los 5, 15 y 30 minutos de exposición, coincidiendo con los tiempos de activación de la c-Src. Los niveles de HER1 totales permanecieron constantes.

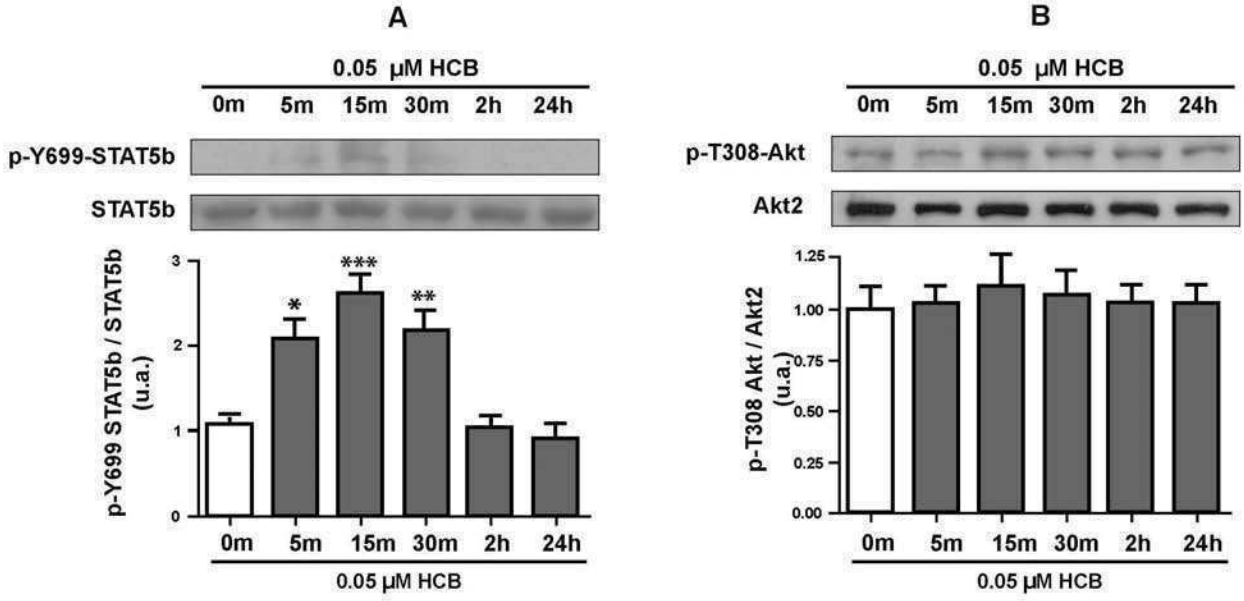


-Fig.13. El HCB induce la fosforilación de c-Src y de HER1 en función del tiempo de intoxicación en MDA-MB-231. (A) Niveles de fosforilación de Y416-c-Src y (B) de Y845-HER1. Las células fueron expuestas al HCB (0.05 µM) o vehículo durante 5, 15, 30 minutos, 2 y 24 horas y los lisados celulares fueron resueltos por SDS-PAGE. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-fosfo-Y416-c-Src en (A) ó anti-fosfo-Y845-HER1 en (B), estripeadas y reincubadas con las formas totales de los anticuerpos, como se describe en Materiales y Métodos. Un experimento de inmunoblot representativo se muestra en los paneles superiores. La relación entre la cuantificación de los niveles de fosfo-Y416-c-Src y c-Src total, así como entre fosfo-Y845-HER1 y HER1 total, por densitometría óptica de 3 experimentos independientes, se muestra en los paneles inferiores. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*$p< 0.05$, **$p< 0.01$).

2. Efecto del HCB sobre la activación de STAT5b, ERK1/2 y Akt2 en función del tiempo

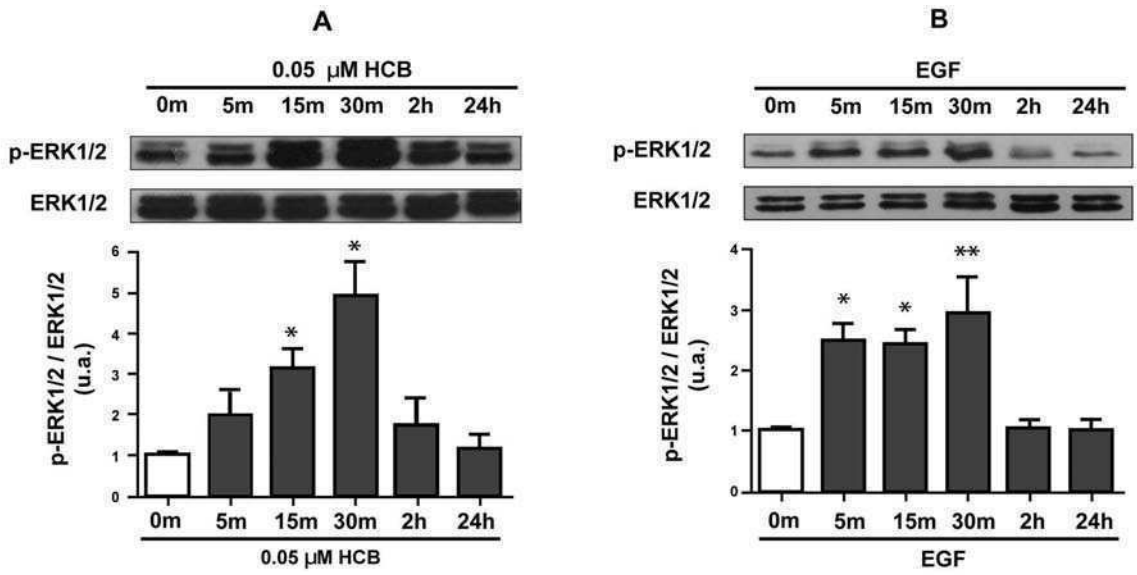
Se ha reportado que STAT5b se fosforila en Tirosina-699 (Y699) tanto por la c-Src activa, como por HER1 cuando está fosforilado en la Y845 (Kloth et al., 2003; Silva y Shupnik, 2007). Teniendo en cuenta que el HCB activa a la c-Src e induce la fosforilación en Y845-HER1, nos resultó de especial interés estudiar los efectos del tóxico sobre la STAT5b en nuestro trabajo, dado que se reportó que dicha proteína está involucrada en procesos asociados a oncogénesis como proliferación, migración y metástasis (Kloth et al., 2003). De ésta manera, observamos que STAT5b aumenta su fosforilación a los 5, 15 y 30 minutos de exposición, coincidiendo con lo observado para la Y416-c-Src y Y845-HER1. Los niveles de STAT5b total se mantuvieron constantes durante todo el ensayo (**Figura 14A**).

Por otro lado, estudiamos los efectos del pesticida sobre Akt2 y ERK1/2, dos vías de señalización activadas por el receptor HER1. Particularmente evaluamos si el HCB estimulaba la fosforilación en la Treonina-308 (T308) de Akt2, debido a que se ha encontrado que dicha isoforma de Akt está involucrada en la migración celular en MDA-MB-231 (Wang et al., 2008). Nuestros resultados mostraron que el pesticida no produce cambios en la fosforilación en T308-Akt ni en los niveles de proteína total (**Figura 14B**).



-Fig. 14. Efectos sobre la fosforilación de STAT5b y Akt2 en función del tiempo de exposición al HCB en MDA-MB-231. (A) Niveles de fosforilación de STAT5b y (B) de Akt2. Las células fueron expuestas al HCB (0.05 µM), ó vehículo durante 5, 15, 30 minutos, 2 y 24 horas. Se prepararon los lisados celulares totales y las proteínas se corrieron en geles PAGE-SDS y las membranas se incubaron con anticuerpos anti-fosfo-Y699-STAT5b en (A) ó anti-fosfo-T308-Akt2 en (B). Luego las membranas se estripearon y se incubaron con los anticuerpos de las formas totales, como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra el inmunoblot de un experimento representativo en cada caso, en los paneles superiores. La relación entre la cuantificación de los niveles de fosfo-Y699-STAT5b y STAT5b total, así como entre fosfo-T308-Akt y Akt2 total, por densitometría óptica de 3 experimentos independientes, se muestra en los paneles inferiores. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001).

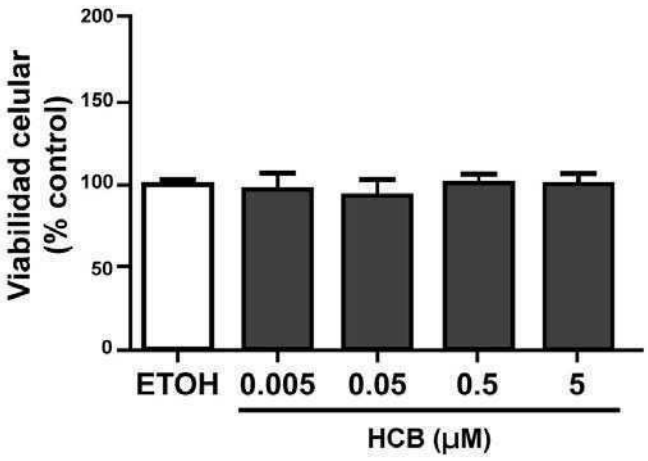
A continuación evaluamos la acción del HCB sobre la fosforilación de ERK1/2, y observamos que el pesticida incrementa significativamente la actividad de de esta proteína a los 15 y 30 minutos, no encontrándose cambios en los niveles de proteínas totales (**Figura 15A**). Otros autores demostraron previamente que los compuestos tipo dioxina pueden actuar como factores de crecimiento, al estimular a sus receptores (Matsumura, 1994). Para estudiar si la inducción en el tiempo del ERK1/2 por HCB podría ser similar a la ejercida por EGF, el ligando del HER1, estimulamos las células con EGF (10 ng/ml) durante los mismos tiempos utilizados en el ensayo con HCB. Encontramos que ERK1/2 aumentaba su fosforilación a 5, 15 y 30 minutos, con un patrón de activación en el tiempo similar al obtenido con el tóxico (**Figura 15B**). Estos resultados sugieren que el aumento en la fosforilación del ERK1/2 inducida por HCB, podría estar mediada por la activación del HER1.



-Fig. 15. Efectos sobre la fosforilación de ERK1/2 en función del tiempo de exposición al HCB o al estímulo con EGF en MDA-MB-231. (A) Niveles de fosforilación de ERK1/2 al tratar con HCB y (B) al estimular con EGF. Las células fueron expuestas al HCB (0.05 µM), vehículo ó EGF (10 ng/ml) durante 5, 15, 30 minutos, 2 y 24 horas. Se prepararon los lisados celulares totales y las proteínas se corrieron en geles PAGE-SDS y las membranas se incubaron con anticuerpo anti-fosfo-ERK1/2, luego las membranas se estripearon y se incubaron con el anticuerpo de la forma total, como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra el inmunoblot de un experimento representativo en cada caso, en los paneles superiores. La relación entre la cuantificación de los niveles de fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 total, por densitometría óptica de 3 experimentos independientes, se muestra en los paneles inferiores. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*p< 0.05, **p< 0.01).

3. Estudio de la viabilidad celular

Previo a la realización de los ensayos dosis-respuesta, consideramos adecuado llevar a cabo un estudio de viabilidad celular con el objetivo de descartar que las dosis ensayadas en nuestro trabajo tengan un efecto tóxico sobre la línea celular en estudio. Para ello, expusimos las células a las diferentes concentraciones de HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 µM) o vehículo durante 48 horas, luego adicionamos el reactivo de MTT para medir la viabilidad celular y seguidamente medimos las muestras en espectrofotómetro. Utilizamos 48 horas de exposición al tóxico ya que este es el tiempo máximo de exposición al pesticida ensayado en este trabajo. Nuestros resultados muestran que el pesticida no afecta la viabilidad celular a ninguna de las dosis ensayadas (**Figura 16**).

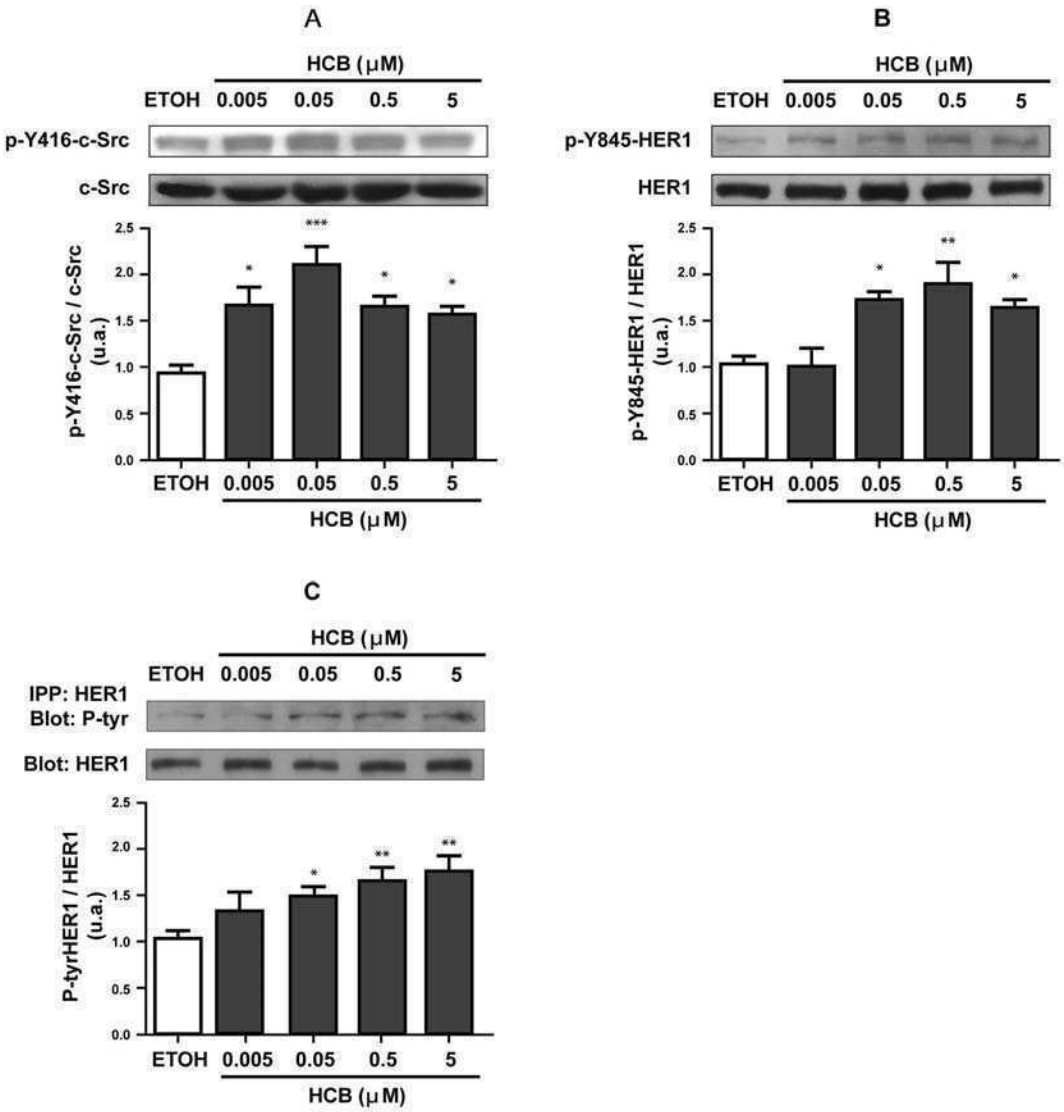


-Fig. 16. Efecto del HCB en la viabilidad celular. Las células se expusieron a diferentes dosis de HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo durante 48 horas, y luego se adicionó una solución de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) por una hora. El precipitado de formazán se disolvió en DMSO y se midió en espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. El número de células viables se calculó teniendo en cuenta que es proporcional a la producción de formazán. Los valores graficados fueron expresados como el porcentaje de viabilidad celular respecto al control. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey.

4. El HCB incrementa la activación de c-Src y HER1 en función de la dosis de exposición

Debido a que previamente demostramos que el HCB (0.05 μM) produce un aumento en la fosforilación de c-Src y Y845-HER1 a los 5, 15 y 30 minutos de exposición, nos propusimos estudiar el efecto del tóxico en diferentes dosis (0.005, 0.05, 0.5 and 5 μM) a los 15 minutos de tratamiento. La **Figura 17A** muestra que el HCB induce la fosforilación de c-Src en Y416 a todas las dosis ensayadas. Incrementos significativos en la fosforilación de Y845-HER1 fueron encontrados a las dosis de 0.05, 0.5 y 5 μM de HCB (**Figura 17B**).

Por otro lado, estudiamos si el tóxico alteraba los niveles de fosforilación del HER1 en todos sus sitios tirosinas, ya que se conoce que la fosforilación en Y845-HER1 ejerce una contribución débil a la activación del ERK1/2 en cáncer de mama (Kloth et al, 2003). Para ello, inmunoprecipitamos el HER1 a partir de lisados celulares expuestos a diferentes dosis de HCB, con anticuerpo anti-HER1 total. Luego realizamos la electroforesis en geles de poliacrilamida de los inmunoprecipitados de HER1, y las membranas correspondientes fueron incubadas con anticuerpo anti-fosfotirosina, estripeadas y vueltas a incubar con anti-HER1 total. Observamos un incremento dosis dependiente de la fosforilación en tirosina total del HER1 en todas las dosis ensayadas, excepto la menor dosis (**Figura 17C**).



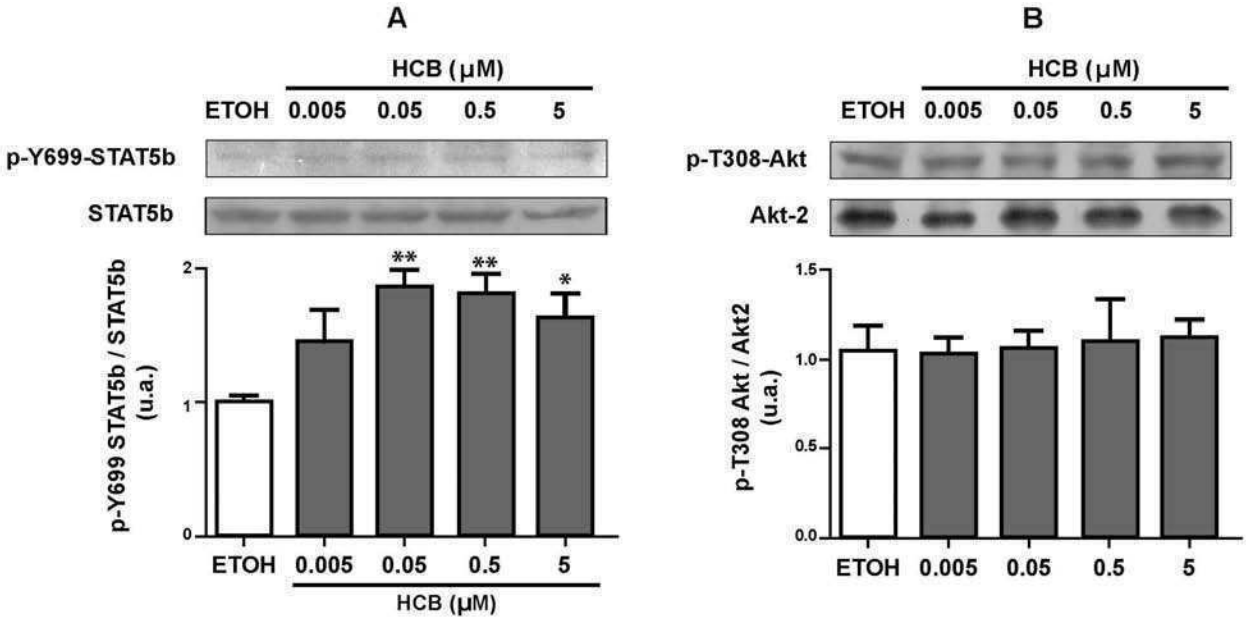
-Fig.17. Curvas dosis-respuesta de la activación de c-Src y HER1 al tratamiento con HCB en MDA-MB-231. Las células fueron expuestas a diferentes dosis con HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5μM) ó vehículo durante 15 minutos. (A) Niveles de fosforilación de c-Src, (B) de Y845-HER1 y (C) de Ytotal-HER1. Los lisados celulares totales en (A) y (B) ó el inmunoprecipitado del HER1 en (C) fueron corridos en geles PAGE-SDS. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-fosfo-Y416-c-Src en (A), anti-fosfo-Y845-HER1 en (B) ó anti-fosfo-Ytotal-HER1 en (C), luego estripeadas y reincubadas con los anticuerpos de las formas totales, como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra el inmunoblot de un experimento representativo en cada caso, en los paneles superiores. La relación entre la cuantificación de los niveles de fosfo-Y416-c-Src y c-Src total, así como fosfo-Y845-HER1 ó fosfotirosina-HER1 y HER1 total, por densitometría óptica de 3 experimentos independientes, se muestra en los paneles inferiores. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001).

5. Acción de diferentes dosis de HCB sobre la actividad de ERK1/2, Akt2 y STAT5b

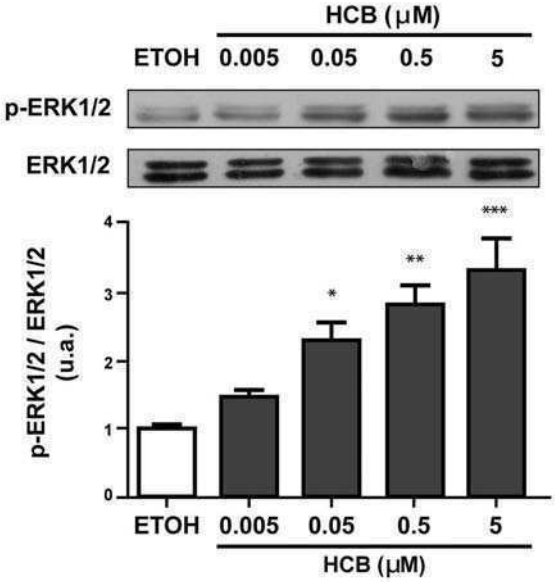
Luego de observar que el tratamiento de las células MDA-MB-231 con diferentes concentraciones de HCB por 15 minutos, estimula tanto los niveles de fosforilación de c-Src como los de HER1 en Y845 y en tirosina total, nos propusimos examinar si el tóxico incrementa también la activación de ERK1/2, Akt2 y STAT5b. Al estudiar el efecto del pesticida sobre la

fosforilación de Y699-STAT5b, encontramos un aumento significativo en las dosis de HCB 0.05, 0.5 y 5 μM (**Figura 18A**) que correlaciona con la fosforilación en Y845-HER1 inducida por el tóxico (**Figura 17B**). Sin embargo, no observamos que el HCB altere la fosforilación de T308-Akt2 a ninguna de las dosis ensayadas (**Figura 18B**).

Luego, al analizar la acción del HCB sobre el ERK1/2, encontramos claramente un incremento de la fosforilación de esta proteína en función del aumento de la dosis del tóxico (**Figura 19**). Este comportamiento es similar al observado previamente para la fosforilación en tirosina total del HER1 (**Figura 17C**).



-Fig.18. Fosforilación de STAT5b y Akt2 en respuesta a la exposición con diferentes dosis de HCB en MDA-MB-231. (A) Niveles de fosforilación de STAT5b y (B) de Akt2. Las células fueron expuestas al HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo durante 15 minutos. Los lisados celulares totales fueron preparados y las proteínas se separaron en geles PAGE-SDS. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-fosfo-Y699-STAT5b en (A) ó anti-fosfo-T308-Akt en (B), y luego estripeadas y reincubadas con los anticuerpos contra las formas totales, como se indica en Materiales y Métodos. Se muestra el inmunoblot de un experimento representativo en cada caso, en los paneles superiores. La relación entre la cuantificación de los niveles de fosfo-Y699-STAT5b y STAT5b total, así como fosfo-T308-Akt y Akt2 total, por densitometría óptica de 3 experimentos independientes, se muestra en los paneles inferiores. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*$p< 0.05$, **$p< 0.01$).

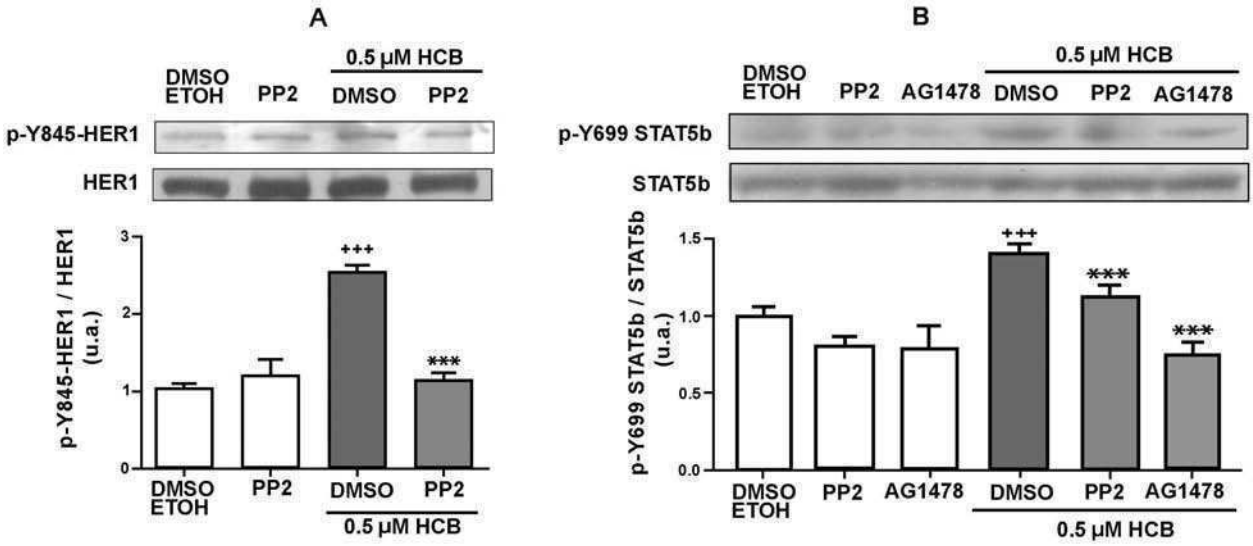


-Fig.19. Cambios en los niveles de fosforilación de ERK1/2 en respuesta a la exposición con diferentes dosis de HCB en MDA-MB-231. Las células fueron expuestas al HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo durante 15 minutos. Los lisados celulares totales fueron preparados y las proteínas se separaron en geles PAGE-SDS. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-fosfo-ERK1/2, luego estripeadas y reincubadas con el anticuerpo contra la forma total, como se indica en Materiales y Métodos. Se muestra el inmunoblot de un experimento representativo, en el panel superior. La relación entre la cuantificación de los niveles de fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 total, por densitometría óptica de 3 experimentos independientes, se muestra en el panel inferior. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001).

6. Rol de c-Src y HER1 en las activaciones de ERK1/2 y STAT5b promovidas por HCB

Con el objetivo de determinar las contribuciones de c-Src y HER1 en el incremento de la actividad de ERK1/2 y STAT5b inducido por el pesticida, realizamos ensayos usando inhibidores específicos, PP2 para c-Src y AG1478 para HER1. En primer lugar, examinamos si el pretratamiento de las células con PP2 bloqueaba el estímulo que producía el HCB sobre la fosforilación en Y845-HER1, ya que se conoce que este sitio es específico para la activación de HER1 por la quinasa c-Src. Para ello, pretratamos las células con PP2 0.2 nM durante 3 horas, y luego las expusimos al HCB 0.5 μM durante 15 minutos en presencia del inhibidor. Observamos que el PP2 bloquea completamente la activación de Y845-HER1 inducida por HCB (**Figura 20A**).

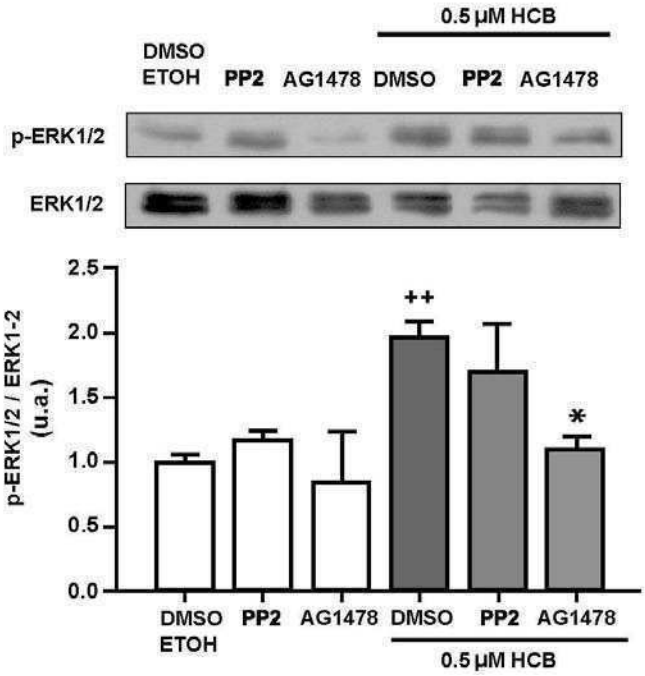
Luego, al evaluar el efecto de los inhibidores sobre los niveles de fosforilación de Y699-STAT5b, encontramos que tanto el PP2 como el AG1478 revierten parcial o totalmente la fosforilación inducida por el tóxico. Estos resultados demuestran que tanto c-Src como HER1 están involucrados en la activación de STAT5b estimulada por HCB (**Figura 20B**).



-Fig. 20. Rol de c-Src y HER1 en las activaciones de HER1 y STAT5b inducidas por HCB en MDA-MB-231. (A) Niveles de fosforilación de Y845-HER1 y (B) de STAT5b. Las células fueron pretratadas con PP2 0.2 nM ó AG1478 0.5 µM durante 3 horas y luego expuestas al HCB (0.5 µM) ó vehículo durante 15 minutos. Los lisados celulares totales fueron preparados y luego las proteínas fueron corridas en geles PAGE-SDS. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-fosfo-Y845-HER1 en (A) ó anti-fosfo-Y699-STAT5b en (B), y luego estripeadas y reincubadas con los anticuerpos contra las formas totales, como se indica en Materiales y Métodos. Se muestra el inmunoblot de un experimento representativo en cada caso, en los paneles superiores. La relación entre la cuantificación de los niveles de fosfo-Y845-HER1 y HER1 total, así como de fosfo-Y699-STAT5b y STAT5b total, por densitometría óptica de 3 experimentos independientes, se muestra en los paneles inferiores. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Las cruces indican diferencias significativas respecto al control ($^{+++}p< 0.001$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al HCB ($^{***}p< 0.001$).

Seguidamente, nos propusimos estudiar las contribuciones de c-Src y HER1 en la fosforilación del ERK1/2 inducida por HCB, y encontramos que el PP2 (0.2 nM) no tiene efecto significativo sobre la activación del ERK1/2, mientras que el AG1478 (0.5 µM) lo inhibe totalmente. Estos resultados demuestran que solo HER1 media la activación de ERK1/2 inducida por el tóxico (**Figura 21**). Dichas observaciones coinciden con estudios previos de otros investigadores que encontraron que la fosforilación en la Y845-HER1 producida por c-Src no contribuye a la fosforilación del ERK1/2 en cáncer de mama (Kloth et al., 2003; Silva y Shupnik, 2007).

De esta manera, hasta aquí nuestro trabajo demuestra que el tóxico estimula dos vías de transducción de señales diferentes: la de c-Src/HER1/STAT5b y la de HER1/ERK1/2 en la línea celular MDA-MB-231.



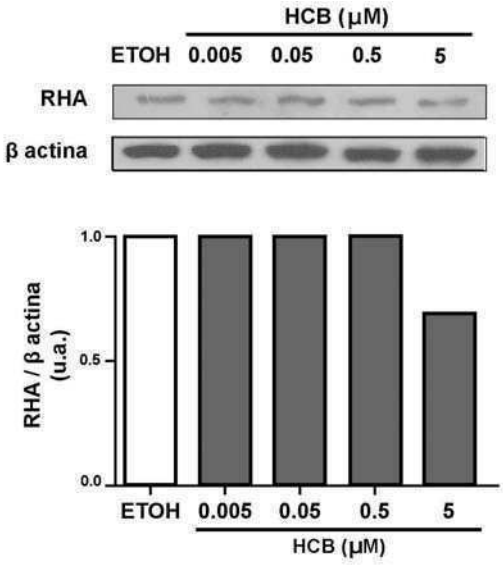
-Fig. 21. Rol de c-Src y HER1 en la fosforilación de ERK1/2 inducida por HCB en MDA-MB-231. Las células fueron pretratadas con PP2 0.2 nM ó AG1478 0.5 µM durante 3 horas y luego expuestas al HCB (0.5 µM) ó vehículo durante 15 minutos. Los lisados celulares totales fueron preparados y luego las proteínas fueron corridas en geles PAGE-SDS. Las membranas fueron incubadas con anticuerpo anti-fosfo-ERK1/2 y luego estripeadas y reincubadas con el anticuerpo contra la forma total, como se indica en Materiales y Métodos. Se muestra el inmunoblot de un experimento representativo en cada caso, en el panel superior. La relación entre la cuantificación de los niveles de fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 total, por densitometría óptica de 3 experimentos independientes, se muestra en el panel inferior. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Las cruces indican diferencias significativas respecto al control ($^{++}p< 0.01$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al HCB ($^{*}p< 0.05$).

7. Rol del RHA en la activación de las vías de señalización de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2 inducida por HCB

El HCB es un ligando débil del RHA, por lo tanto puede desencadenar tanto efectos dependientes de la unión a dicho receptor (dosis altas), como independientes (dosis bajas) (Hahn et al., 1989). En nuestro laboratorio, observamos previamente, que en hígado de ratas tratadas con HCB, aumenta la actividad del HER1, a la vez que se induce la translocación del RHA desde el citosol al núcleo (Randi et al., 2008).

Previo a estudiar si el tóxico activa las vías de señalización c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2 a través de su unión al RHA, nos propusimos verificar la presencia de dicho receptor en la línea celular en estudio. Para ello tratamos las MDA-MB-231 con las diferentes dosis del tóxico ensayadas en este trabajo (0.005, 0.05, 0.5 y 5 µM) ó vehículo por 24 horas, y los lisados celulares fueron usados para analizar por inmunoblot los niveles de proteína del RHA. Como se observa en la **Figura 22**, la línea celular expresa buenos niveles del RHA, como ha sido reportado previamente por otros investigadores (Angus et al., 1999; Döhr et al.,

1995; Spink et al., 1998). Si bien no se han realizado análisis estadísticos para confirmarlo, puede observarse una ligera disminución en los niveles de RHA con la dosis de 5 μM de HCB. Esto puede explicarse con reportes previos que demuestran que la TCDD induce la translocación del RHA al núcleo y su posterior down-regulación en las MDA-MB-231 (Pollenz 1996; Angus et al., 1999) (**Figura 22**).

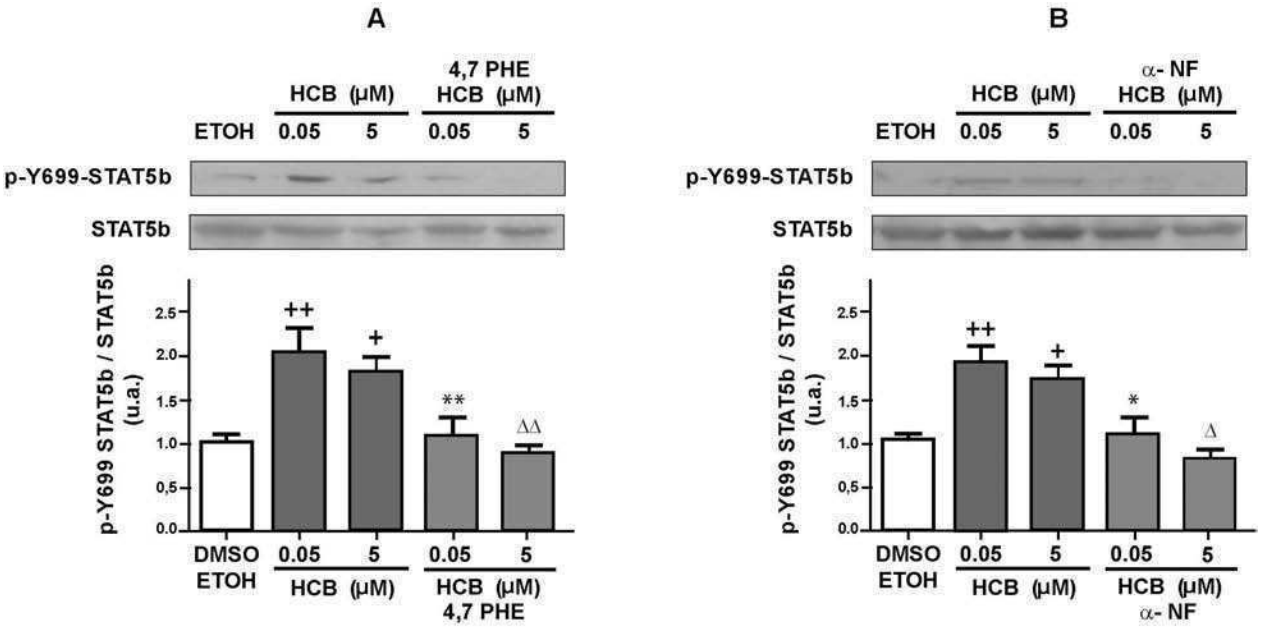


-Fig. 22. Niveles del RHA en la línea celular MDA-MB-231. Las células fueron expuestas al HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo durante 24 horas. Los lisados celulares totales fueron preparados y las proteínas se separaron en geles PAGE-SDS. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-RHA, y luego reincubadas con el anticuerpo anti-β Actina. Se muestra el inmunoblot de un experimento representativo, en el panel superior. La relación entre la cuantificación de los niveles de RHA y β Actina, por densitometría óptica se muestra en el panel inferior.

Con el objetivo de determinar si el HCB activa las vías de señalización c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2 al unirse al RHA, preincubamos las células en presencia o ausencia de un antagonista de dicho receptor, la 4,7-ortofenantrolina (4,7 PHE). Está descripto, en estudios *in vitro,* que la 4,7-PHE inhibe la unión de la dioxina TCDD al RHA, porque compite por el mismo sitio de unión al receptor (Mahon y Gasiewicz, 1992). Las MDA-MB-231 se pretrataron durante 3 horas con 4,7-PHE (5 ó 10 μM) y luego se expusieron al HCB durante 15 minutos en presencia de dicho inhibidor. Para estos ensayos, se usaron la dosis más baja (0.05 μM) y la más alta (5 μM) de HCB utilizadas en este trabajo, que inducen ambas vías de señalización. De esta manera la dosis de 0.05 μM sería representativa de los efectos del tóxico a bajas dosis y la de 5 μM sería representativa de los efectos mediados por el tóxico a altas dosis.

Como se observa en la **Figura 23A**, el pretratamiento con 4,7-PHE, previno completamente la fosforilación de STAT5b inducida por el tóxico en ambas dosis. Con el fin de corroborar que la fosforilación de STAT5b estimulada por el HCB en dosis de 0.05 μM está mediada por el RHA, utilizamos la α-naftoflavona (α-NF), otro antagonista del receptor no relacionado

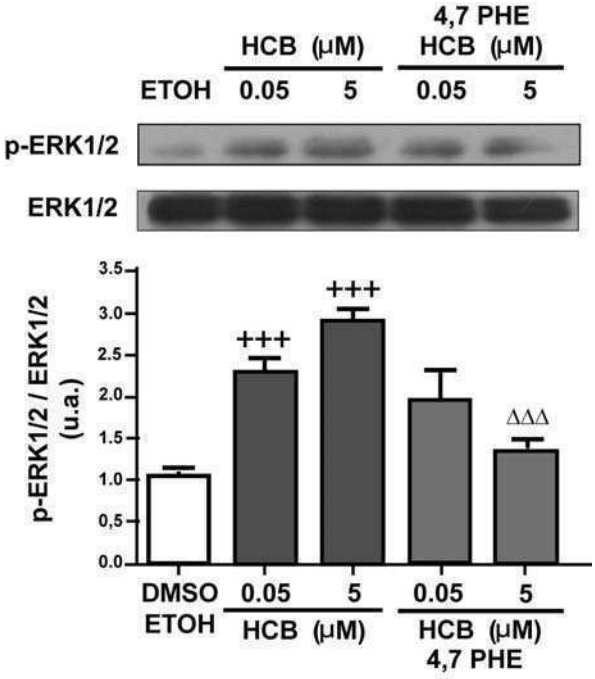
estructuralmente con la 4,7-PHE (Merchant et al., 1990). Nuestros resultados mostraron que la α-NF (1 μM) previene también el incremento en la fosforilación de STAT5b estimulado por el tóxico en ambas concentraciones (**Figura 23B**). De esta manera, demostramos que el aumento en la fosforilación de STAT5b causada por HCB es dependiente del RHA, tanto a dosis bajas como altas.



-Fig. 23. Rol del RHA en la activación de la vía de c-Src/HER1/STAT5b inducida por HCB en MDA-MB-231. (A) Niveles de fosforilación de Y699-STAT5b en presencia ó ausencia de 4,7-ortofenantrolina (4,7 PHE) y (B) en presencia ó ausencia de α-naftoflavona (α-NF). Las células fueron pretratadas con 4,7-PHE (5 μM) ó α-NF (1 μM) durante 3 horas y luego expuestas al HCB (0.05 y 5 μM) ó vehículo durante 15 minutos. Los lisados celulares totales fueron preparados y luego las proteínas corridas en geles PAGE-SDS. Las membranas fueron incubadas con anticuerpo anti-fosfo-Y699-STAT5b y luego estripeadas y reincubadas con el anticuerpo contra la forma total, como se indica en Materiales y Métodos. Se muestra el inmunoblot de un experimento representativo, en los paneles superiores. La relación entre la cuantificación de los niveles de fosfo-Y699-STAT5b y STAT5b total, por densitometría óptica de 3 experimentos independientes, se muestra en los paneles inferiores. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Las cruces indican diferencias significativas respecto al control (+$p<0.05$, ++$p<0.01$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al HCB (0.05 μM), (*$p<0.05$, **$p< 0.01$). Los triángulos indican diferencias significativas respecto al HCB (5 μM) (Δ$p<0.05$, ΔΔ$p< 0.01$).

A continuación, evaluamos si la estimulación de la actividad de ERK1/2 por HCB es dependiente del RHA. Para ello, pretratamos las células con 4,7-PHE y luego las expusimos al HCB. Encontramos que solo para la dosis de 5 μM de HCB el pretratamiento inhibe la fosforilación del ERK1/2 (**Figura 24**).

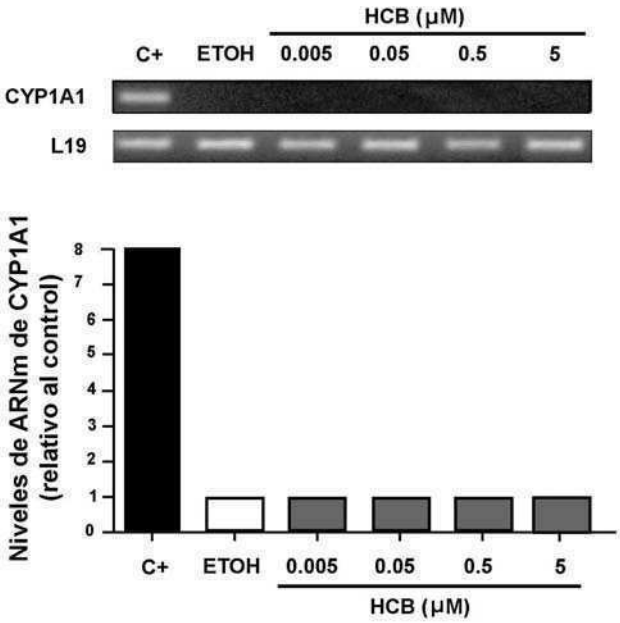
Todos estos resultados, demuestran que el HCB activa la vía de señalización de c-Src/HER1/STAT5b solamente a través de mecanismos dependientes del RHA. Por otro lado, observamos que el tóxico estimula la vía de HER1/ERK1/2 a través de mecanismos dependientes e independientes del RHA, según su concentración.



-Fig.24. Rol del RHA en la activación de la vía de HER1/ERK1/2 inducida por HCB en MDA-MB-231. Las células fueron pretratadas con 4,7-ortofenantrolina (4,7 PHE, 10 μM) durante 3 horas y luego expuestas al HCB (0.05 y 5 μM) ó vehículo durante 15 minutos. Los lisados celulares totales fueron preparados y luego las proteínas fueron corridas en geles PAGE-SDS. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-fosfo-ERK1/2, y luego estripeadas y reincubadas con el anticuerpo contra la forma total, como se indica en Materiales y Métodos. Se muestra el inmunoblot de un experimento representativo, en el panel superior. La relación entre la cuantificación de los niveles de fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 total, por densitometría óptica de 3 experimentos independientes, se muestra en el panel inferior. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Las cruces indican diferencias significativas respecto al control (+++$p < 0.001$). Los triángulos indican diferencias significativas respecto al HCB (5 μM) (ΔΔΔ$p<0.001$).

8. Efecto del HCB sobre la expresión del ARNm del CYP1A1

Dado que los estudios previos están realizados a tiempos cortos (15 minutos), a los cuales no puede producirse síntesis de novo, podríamos especular que el RHA estaría mediando los efectos del HCB por mecanismos no genómicos (que no implican su actividad como factor de transcripción). Sin embargo, para reafirmar esto, nos dispusimos analizar la expresión de CYP1A1, un gen cuya expresión es inducida por ligandos del RHA en la línea celular MDA-MB-231 (Döhr et al., 1995). Las células fueron tratadas por 6 horas con las diferentes dosis del tóxico ó vehículo y luego medimos los niveles de ARNm de CYP1A1 por RT-PCR. Se eligió este tiempo de exposición al pesticida ya que está reportado que a dichos tiempos se induce la expresión de este gen cuando se trata a las MDA-MB-231 con TCDD (Döhr et al., 1995). Se utilizó como control positivo de la expresión de dicho gen, muestras de hígado de ratas tratadas con HCB, debido a que previamente se demostró que el tóxico induce la expresión del CYP1A1 en este tejido (Guliaeva et al., 1994). Observamos que ninguna de las dosis del tóxico induce la expresión del CYP1A1 (**Figura 25**). Se han realizado ensayos similares a diferentes tiempos (2, 10 ó 24 horas), observándose los mismos resultados (datos no mostrados). Todos esto sugiere que la activación de las vías de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2 estimuladas por HCB involucraría mecanismos no genómicos del RHA.



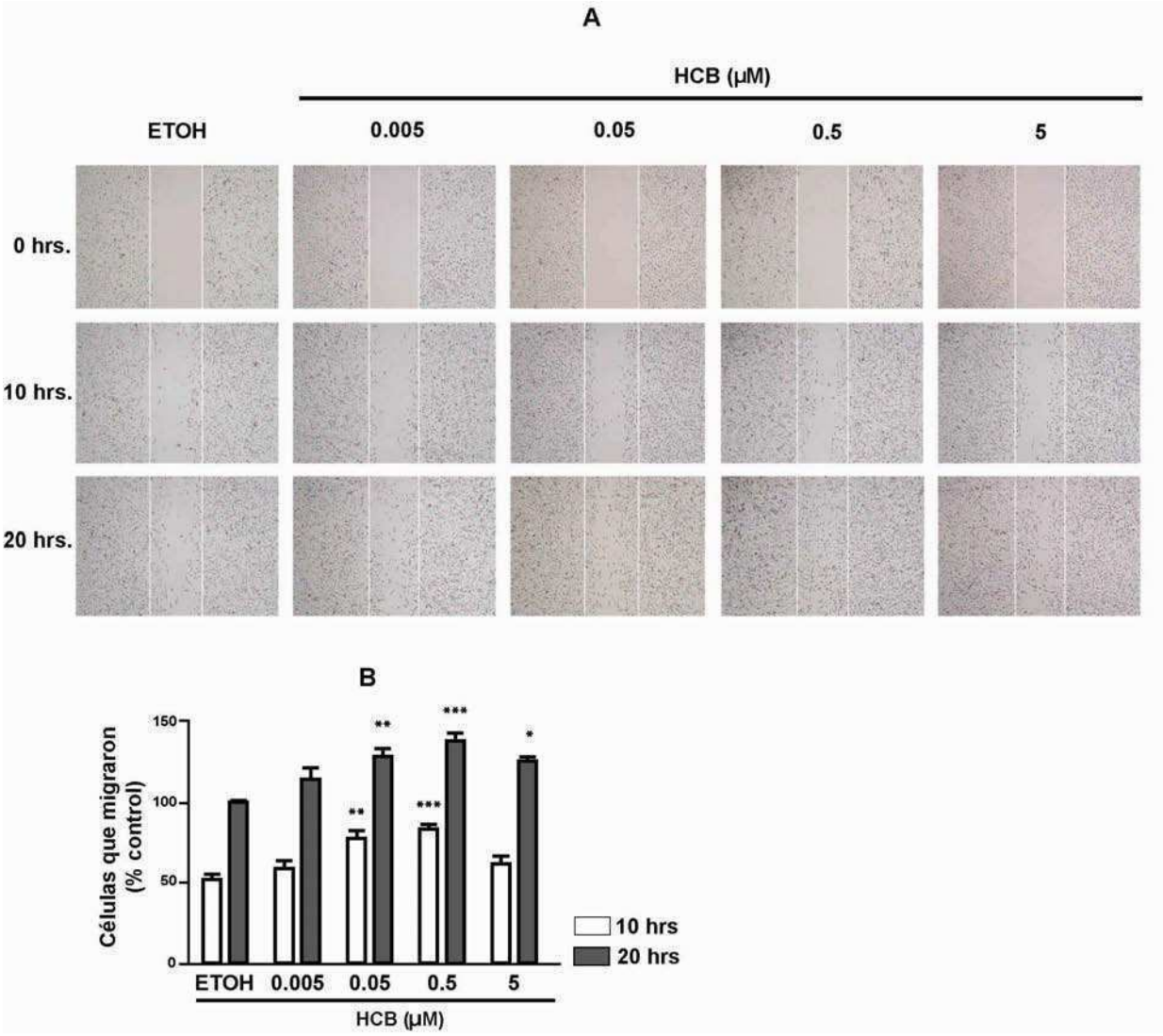
-Fig. 25. Efecto del HCB sobre la expresión del CYP1A1. Niveles de ARNm de CYP1A1 analizados por RT-PCR. Las células MDA-MB-231 fueron tratadas con HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 µM) ó vehículo por 6 horas. Luego se midieron los niveles de ARNm por la técnica de RT-PCR según lo descripto en Materiales y Métodos. Se utiliza como control de carga la expresión de L19. El control positivo utilizado proviene de hígados de ratas intoxicada con HCB. Un experimento representativo se muestra en el panel superior. La densitometría óptica de los niveles de ARNm de CYP1A1 relativizado a los niveles de L19 de un experimento se muestra en el panel inferior.

9. Acción del HCB sobre la migración celular

Previamente, en estudios *in vivo* de nuestro laboratorio se ha demostrado que el HCB incrementa el número, el volumen y la malignidad de los tumores mamarios inducidos por NMU en rata (Randi et al., 2006). A su vez, en un trabajo *in vitro* reciente, observamos que el tóxico aumenta la proliferación en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, pero no afecta este parámetro en MDA-MB-231 (García et al., 2010). Este comportamiento podría deberse a que la línea celular MDA-MB-231 tiene un fenotipo más agresivo, y muestra una tasa de proliferación basal muy alta. Teniendo en cuenta esto último, nuestra hipótesis es que el HCB podría estar alterando otros parámetros celulares, como la migración. Con el fin de estudiar si el HCB afecta la migración celular, realizamos dos métodos diferentes: el ensayo de la herida y el ensayo del transwell (Valster et al., 2005).

9.1. Ensayo de la herida

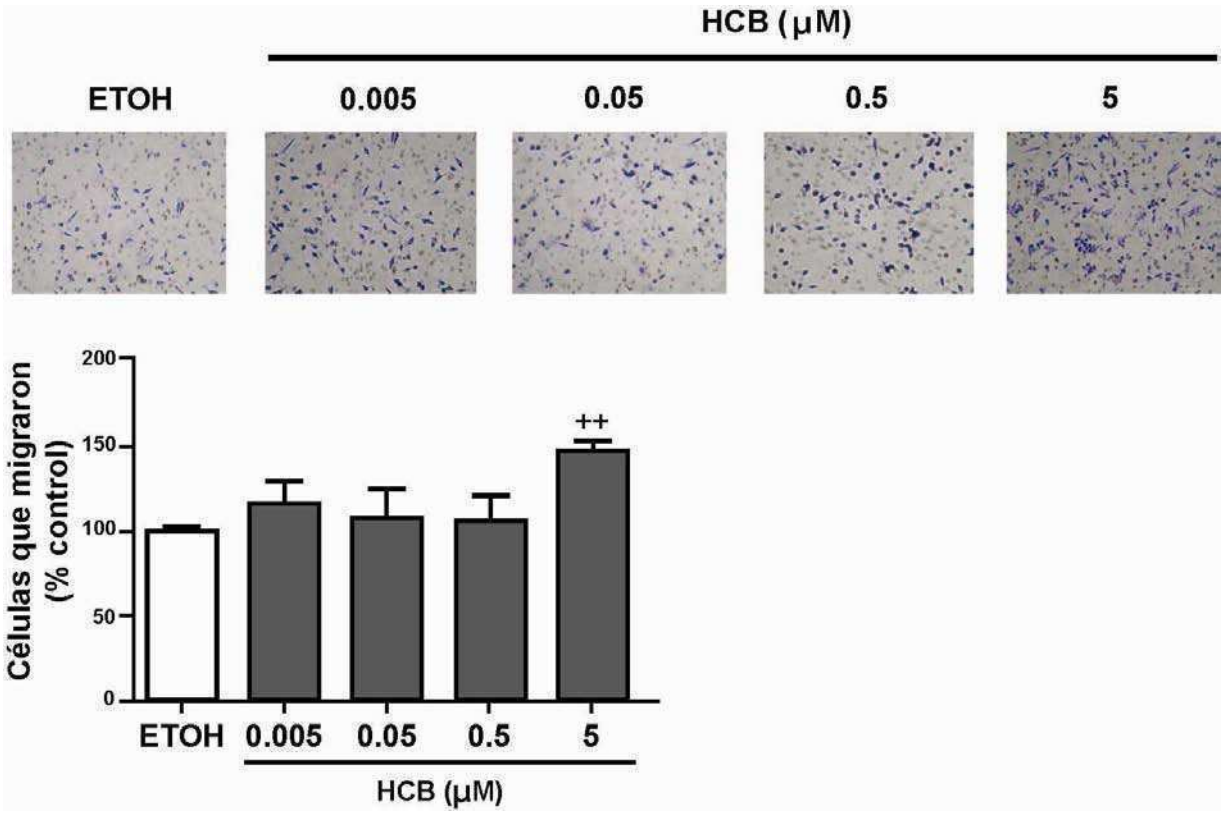
Previamente, observamos que las diferentes dosis del tóxico ensayadas en nuestro trabajo no alteran la viabilidad celular de las MDA-MB-231 (**Figura 16**). En una primera etapa, nos propusimos realizar el ensayo de la herida. Para ello, se dejaron crecer las células a confluencia, se realizó una herida en la monocapa celular con un tip plástico y se analizó el cerrado de la herida en función del tiempo en presencia de diferentes dosis de HCB ó vehículo (etanol) según lo detallado en Materiales y Métodos. Nuestros resultados muestran que si bien las células no tratadas migraron, las células expuestas al HCB, tienen una mayor capacidad de cerrar la herida respecto a las células control tanto a las 10 como a las 20 horas (**Figura 26A**). El análisis estadístico, demostró que el HCB produjo un incremento significativo de la capacidad de las células de cerrar la herida, a las 10 horas a dosis de 0.05 y 0.5 μM. Sin embargo, a las 20 horas el aumento en la migración celular ocurrió no sólo con HCB 0.05 y 0.5 μM, sinó también a la dosis máxima de exposición (5 μM) (**Figura 26B**).



-Fig. 26. Acción del HCB sobre la migración celular evaluada por el ensayo de la herida en MDA-MB-231. (A) Fotos representativas de las heridas realizadas en los pocillos con los diferentes tratamientos [HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo], y en los diferentes tiempos (0, 10 y 20 horas); y (B) cuantificación del número de células que migraron hacia la herida. Las células fueron crecidas hasta confluencia en un medio con SFB 10%, hambreadas, tratadas por 24 horas con HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo en medio con SFB 5%, y luego se realizó una herida con la punta de un tip y se volvió a colocar el tratamiento correspondiente. Se sacaron fotos en cinco campos elegidos al azar, a diferentes tiempos (0, 10 y 20 horas). Luego se contó el número de células que migraron hacia la herida. Se asignó un valor arbitrario de 100 a la muestra control del tiempo 20 hrs. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*$p< 0.05$; **$p< 0.01$, ***$p< 0.001$).

9.2. Ensayo del transwell

Luego nos propusimos estudiar la capacidad de las células MDA-MB-231 de migrar hacia un quimioatractante (2% SFB) en respuesta al tratamiento con HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo en el ensayo del transwell. Observamos que sólo las células tratadas con la mayor dosis de HCB (5 μM) muestran un aumento significativo en su capacidad de migrar hacia el suero respecto al control (52%) (**Figura 27**).



-Fig. 27. Acción del HCB en la migración celular en MDA-MB-231 evaluada por el ensayo del transwell. Las células fueron expuestas a diferentes dosis de HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo durante 24 horas, luego se sembraron en los transwells en presencia del mismo tratamiento. Después de 20 horas las células que migraron hacia el suero fueron fijadas y teñidas. En el panel de arriba se observan fotografías representativas de cada tratamiento, del filtro poroso por donde migran las células. En el panel de abajo se observa la cuantificación del número de células totales que migraron hacia el suero. Se asignó un valor arbitrario de 100 a la muestra control. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Las cruces indican diferencias significativas con respecto al control (++$p<0.01$).

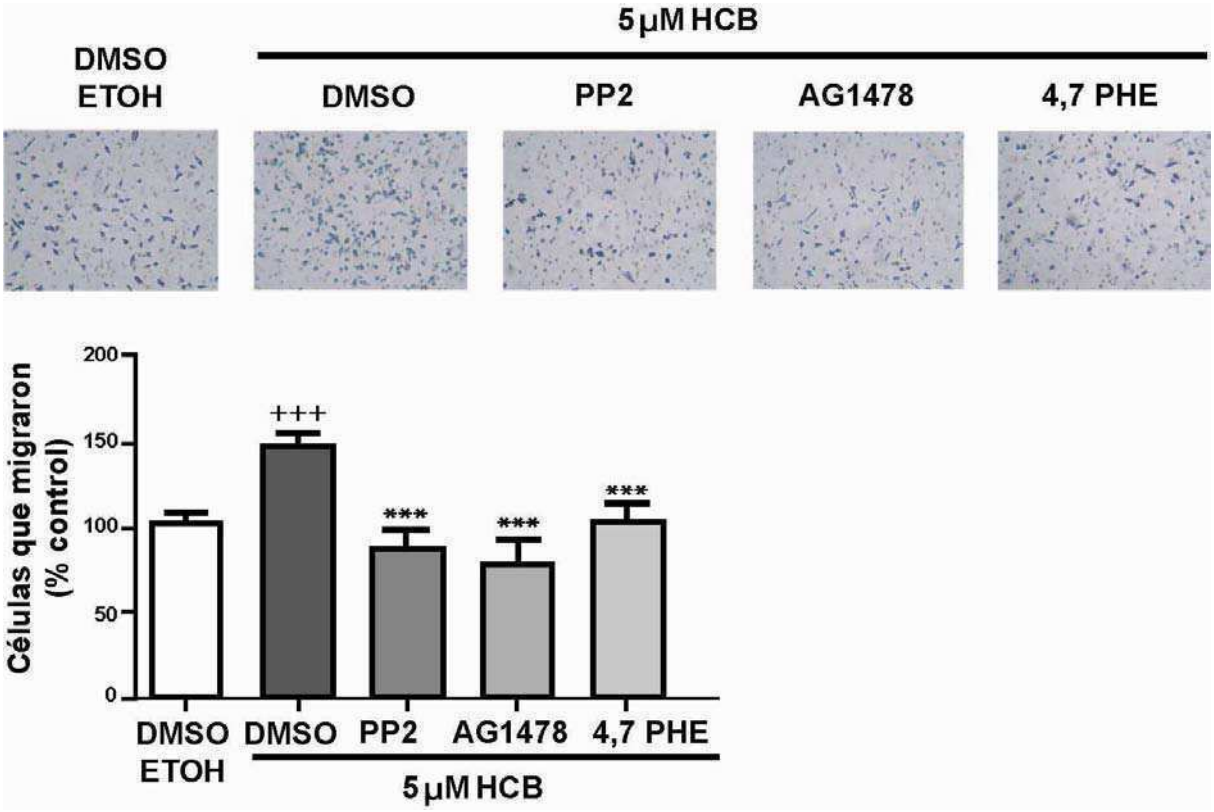
10. Rol de c-Src, HER1 y RHA en la migración celular promovida por HCB

Se ha observado que la activación de c-Src y HER1 media una gran variedad de aspectos relacionados con el crecimiento y progresión tumoral, incluyendo proliferación, migración, invasión, sobrevida y angiogénesis (Koppikar et al., 2008). Es por ello, que a continuación nos propusimos analizar si el aumento en la migración celular promovido por HCB, es dependiente de las activaciones de c-Src y HER1. Para esto realizamos el ensayo del transwell con células pretratadas durante 3 horas con inhibidores específicos de éstas proteínas (PP2 2 nM para c-Src, AG1478 10 μM para HER1), y luego las expusimos al HCB (5 μM) en presencia de los mismos. Nuestros resultados mostraron que los inhibidores ensayados bloquearon completamente la estimulación producida por el HCB en la migración celular (**Figura 28**).

Además, se ha demostrado que la migración celular está regulada por el RHA y sus ligandos (Barouki et al., 2007). Debido a esto, nos resultó interesante estudiar si la unión del HCB al RHA estaba involucrada en la migración celular inducida por el tóxico. Para ello, las células se pretrataron con un antagonista del RHA como la 4,7-PHE (50 μM) durante 3 horas, luego se

expusieron al HCB (5 μM) durante 24 horas, y se sembraron en los transwells en presencia de HCB y 4,7-PHE. Observamos que el inhibidor del RHA previno totalmente el aumento de la migración celular inducida por el pesticida (**Figura 28**).

Todos estos resultados, nos demuestran que la migración celular inducida por HCB en la línea MDA-MB-231 depende de la unión del tóxico al RHA, y de la actividad de c-Src y HER1, indicando que ambas vías de señalización podrían estar involucradas.



-Fig. 28. Rol de c-Src, HER1 y el RHA en la migración celular inducida por el tóxico. Las MDA-MB-231 se pretrataron durante 3 horas con los diferentes inhibidores (PP2 2 nM para c-Src, AG1478 10 μM para HER1, y 4,7-PHE 50 μM para RHA), se expusieron al HCB (5 μM) ó vehículo durante 24 horas en presencia de los inhibidores y luego se procedió a realizar el ensayo del transwell como lo descripto previamente. En el panel de arriba se observan fotografías representativas de cada tratamiento, del filtro poroso por donde migran las células. En el panel de abajo se muestra la cuantificación del número de células totales que migraron hacia el suero. Se asignó un valor arbitrario de 100 a la muestra control. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Las cruces indican diferencias significativas con respecto al control (+++$p < 0.001$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al HCB (5 μM) (***$p < 0.001$).

PARTE II:

ACCIÓN DEL HEXACLOROBENCENO EN LA INVASIÓN CELULAR Y METÁSTASIS. ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO.* IMPLICANCIA DE c-SRC, HER1 Y DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS

1. Acción del HCB sobre la expresión, secreción y actividad de las metaloproteasas 2 y 9 (MMP2 y 9)

Las metaloproteasas son endopeptidasas capaces de degradar la membrana basal y los componentes de la ME. Su actividad permite que las células malignas de un tumor logren atravesar la ME y las paredes de los vasos sanguíneos, favoreciendo esto el desarrollo de metástasis (Chambers y Matrisian, 1997). En particular, la MMP2 (gelatinasa A) y la MMP9 (gelatinasa B) están asociadas a la progresión tumoral y metástasis debido a su habilidad de degradar uno de los principales componentes de la ME, el colágeno de tipo IV. En cáncer de mama, estas dos gelatinasas están usualmente sobreexpresadas, y se cree que cumplen un rol muy importante en la invasión celular, metástasis y angiogénesis (Mendes et al., 2005; Pellikainen et al., 2004; Jones et al, 1999; Duffy et al, 2000).

Dado que la expresión y secreción de MMP2 y 9 son importantes para la migración e invasión celular en cáncer de mama, y que hemos observado en la primer parte de esta Tesis que el HCB estimula la migración de las MDA-MB-231; el siguiente paso fue estudiar si el tóxico era capaz de alterar la expresión, secreción y actividad de estas gelatinasas.

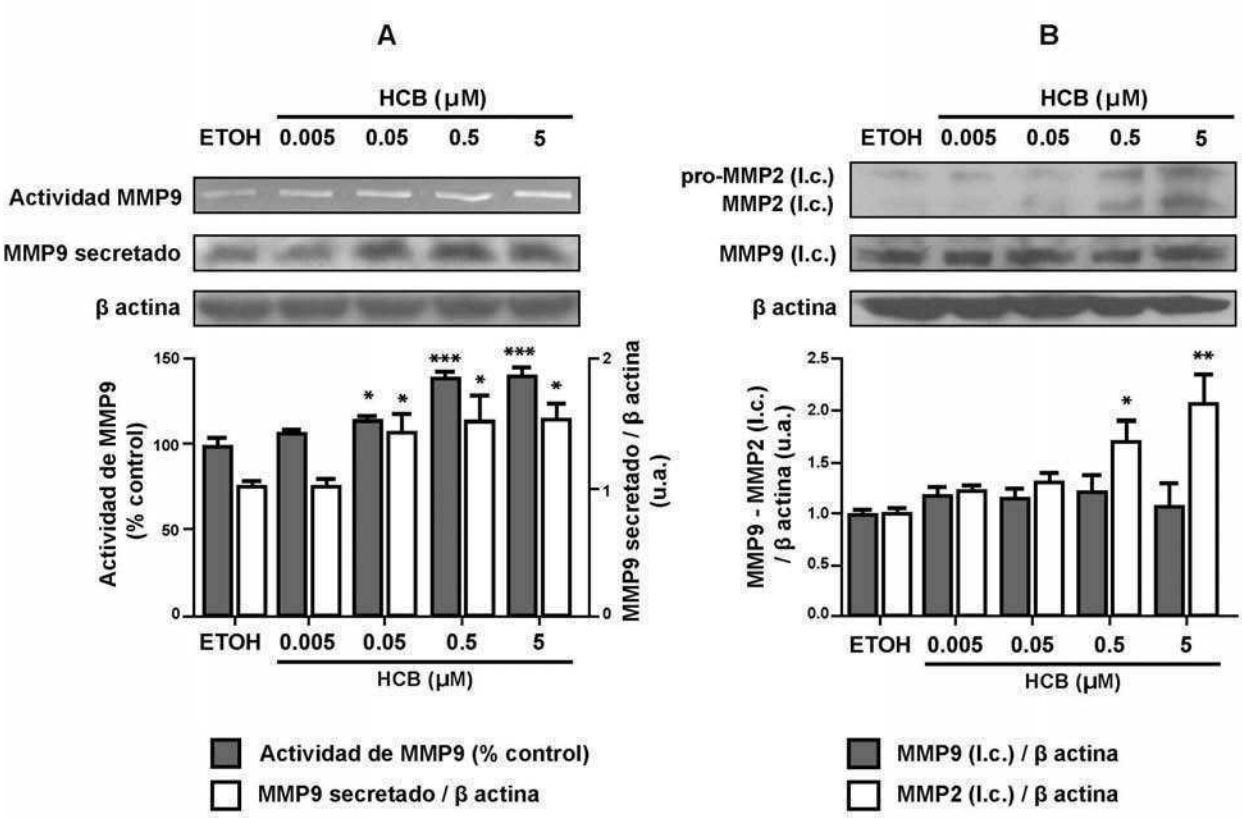
Para ello las células fueron tratadas con HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo durante 24 horas, y luego los sobrenadantes fueron colectados y las células fueron lisadas como se describe en Materiales y Métodos. Los sobrenadantes fueron utilizados para medir los niveles de actividad de las MMPs con la técnica de zimografía en geles con gelatina. A su vez, se analizaron los niveles proteicos intracelulares de MMP2 y 9 a partir de los lisados celulares; y los niveles secretados utilizando los sobrenadantes, en ensayos de inmunoblot. Observamos que el tóxico en dosis de 0.05, 0.5 y 5 μM incrementa en forma significativa la secreción (44, 53 y 54%, respectivamente) y actividad de MMP9 (16, 40 y 40% respectivamente) (**Figura 29A**). Por otro lado observamos que en dichas dosis, no se observa una disminución de los niveles de MMP9 en el lisado celular asociado al incremento en su secreción (**Figura 29B**). Esto implicaría que el tóxico (0.05, 0.5 y 5 μM) estaría estimulando la expresión, secreción y actividad de MMP9 en dicha línea celular.

Seguidamente, nos propusimos estudiar los niveles de MMP2 secretados y su actividad, sin embargo por problemas metodológicos no logramos detectar niveles de dicha proteína ni su actividad en el sobrenadante. Creemos que esto podría deberse a que basalmente la MMP2 se expresa en menor cantidad que la MMP9 en las MDA-MB-231, por lo cual la sensibilidad de las técnicas usadas no es la suficiente para detectar la concentración de esta proteína en el sobrenadante. Sin embargo, pudimos evaluar los niveles totales de MMP2 en los lisados celulares.

Obsevamos que el tóxico (0.5 y 5 μM) incrementa significativamente los niveles de dicha proteína en el lisado celular, en un 70 y 105

%, respectivamente. (**Figura 29B**).

Los resultados obtenidos nos demuestran que el tóxico estimula la expresión, secreción y actividad de MMP9, así como la expresión de MMP2 de una manera dependiente de la dosis.



- **Fig. 29. Acción del HCB en la expresión, secreción y actividad de MMP2 y 9 en MDA-MB-231.** (A) Actividad y niveles de MMP9 secretados al medio extracelular por células MDA-MB-231 expuestas a diferentes dosis de HCB, y (B) Niveles intracelulares de MMP2 y 9 de células tratadas con HCB. Las células fueron hambreadas y expuestas al HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo por 24 horas según lo descripto en Materiales y Métodos. Al finalizar el experimento se colectaron los sobrenadantes y se lisaron las células. (A) Los sobrenadantes fueron utilizados para medir la actividad de MMP9 por zimografía y los niveles de proteínas secretados por inmuboblot. (B) Los lisados celulares se utilizaron para detectar los niveles intracelulares de MMP2 y 9 por inmunoblot. Los niveles de proteínas tanto en sobrenadante (A) como en lisado celular (B) fueron relativizados a los niveles de β Actina detectados por inmunoblot en el lisado celular del experimento correspondiente. Un experimento representativo se muestra en los paneles superiores. La cuantificación de los niveles de actividad y de proteínas por densitometría óptica de 3 experimentos independientes se muestra en los paneles inferiores. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001).

2. Rol de c-Src y HER1 en los efectos inducidos por HCB en la expresión, secreción y actividad de MMP2 y 9

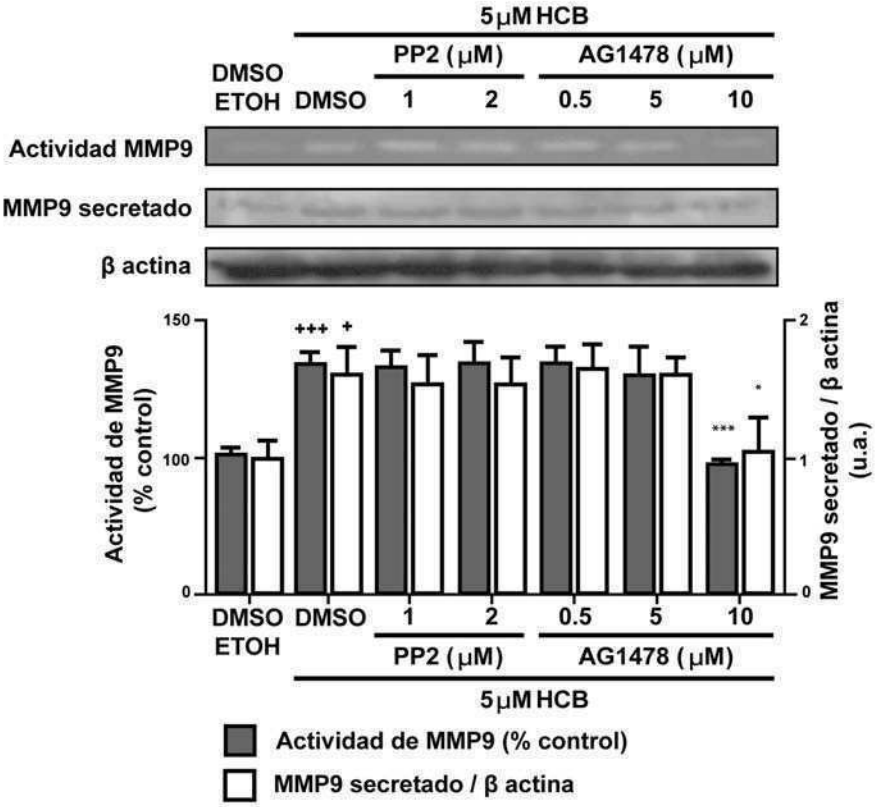
Existen numerosos trabajos que demuestran que las vías de señalización activadas por la quinasa c-Src y por el receptor HER1 inducen la expresión, secreción o actividad de MMP9 y MMP2 (Soto-Guzman et al., 2010; Chiang-Wen et al., 2007; Frame 2004; Kuo et al., 2006; Tanimura et al., 2003). En la primer parte de este trabajo, hemos demostrado que el tóxico estimula las vías de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2. Por lo tanto, en esta segunda etapa nos propusimos estudiar si los efectos del tóxico sobre la expresión, secreción y actividad de MMP2 y 9 están mediados por c-Src y HER1.

Con este fin realizamos ensayos como los descriptos previamente, pero en presencia ó ausencia de diferentes concentraciones de inhibidores específicos de dichas moléculas (PP2 1 y 2 μM para c-Src, AG1478 0.5, 5 y 10 μM para HER1). Para llevar a cabo los experimentos con inhibidores, expusimos las células solamente a la dosis de HCB 5 μM, en la cual observamos que el tóxico mostró tener un efecto estimulador tanto sobre la MMP9 como sobre la MMP2.

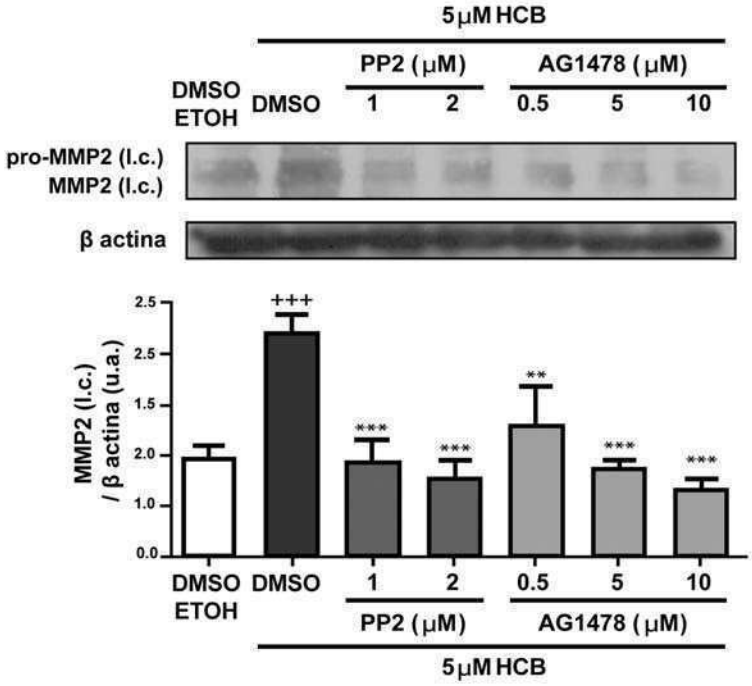
Nuestros resultados mostraron que solo la dosis más alta ensayada del AG1478 (10 μM) previene el incremento en la secreción y actividad de MMP9 estimuladas por el tóxico, mientras que el PP2 en ninguna de las dosis ensayadas tuvo efecto (**Figura 30**). No conocemos que hubiera ocurrido con estos inhibidores, si exponíamos las células a otras dosis de HCB (0.05 ó 0.5 μM), porque por metodología y por tiempo, se nos hacía muy complicado utilizar todas las dosis del tóxico para evaluar los inhibidores.

Por otro lado, observamos que el incremento de los niveles de proteínas de MMP2 estimulados por el tóxico se previno con PP2 y con AG1478 con todas las dosis ensayadas (**Figura 31**).

Estos resultados demuestran que el HCB 5 μM incrementa la expresión, secreción y actividad de MMP9 de una manera dependiente del HER1, mientras que induce la expresión de MMP2 vía c-Src y HER1.



-Fig. 30. Rol de c-Src y HER1 en el incremento de la secreción y actividad de MMP9 inducido por HCB. Niveles de secreción y actividad de MMP9 en MDA-MB-231 tratadas con HCB en presencia ó ausencia de inhibidores específicos de c-Src (PP2) y HER1 (AG1478). Las células fueron pretratadas por 3 horas con diferentes dosis de PP2 (1 y 2 μM) ó AG1478 (0.5, 5 y 10 uM) y luego tratadas con HCB (5 μM) ó vehículo en presencia de los inhibidores durante 24 horas, según lo descripto en Materiales y Métodos. Al finalizar el experimento se colectaron los sobrenadantes y se lisaron las células. Los sobrenadantes fueron utilizados para medir la actividad de la MMP9 por zimografía y los niveles de proteínas secretados por inmunoblot. Los lisados celulares se utilizaron para detectar los niveles de β Actina por inmunoblot. Los niveles proteicos y de actividad de MMP9 en el sobrenadante fueron relativizados a los niveles de β Actina del lisado celular del experimento correspondiente. Un experimento de inmunoblot y uno de actividad representativos se muestran en el panel superior. La cuantificación de los niveles de actividad y de proteínas por densitometría óptica de 3 experimentos independientes se muestra en el panel inferior. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Las cruces indican diferencias significativas respecto al control (+$p< 0.05$, +++$p< 0.001$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al HCB (5 μM) (*$p< 0.05$, ***$p< 0.001$).

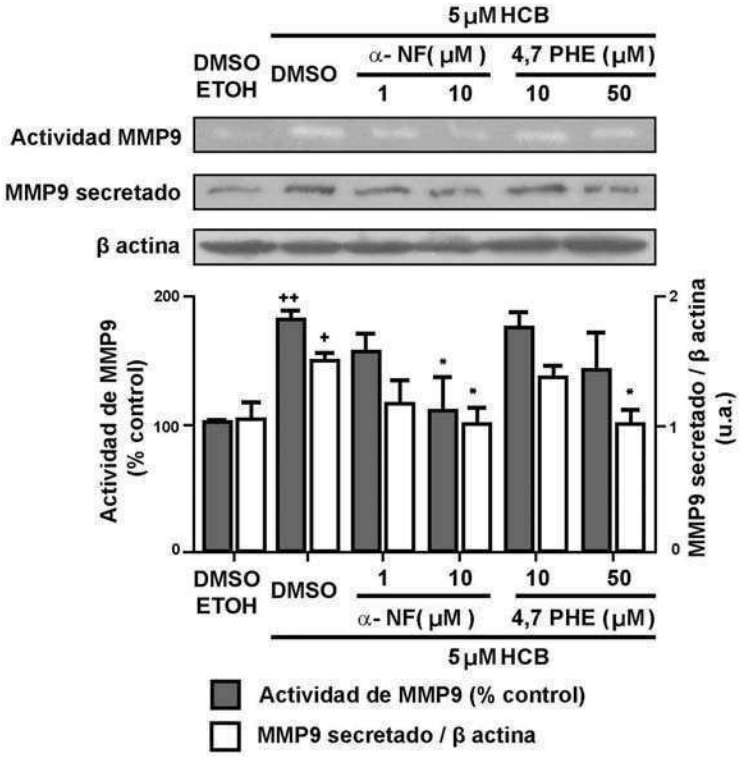


-Fig. 31. Rol de c-Src y HER1 en el aumento de la expresión de MMP2 inducido por HCB. Niveles de expresión de MMP2 en MDA-MB-231 tratadas con HCB en presencia ó ausencia de inhibidores específicos de c-Src (PP2) y HER1 (AG1478). Las células fueron pretratadas por 3 horas con diferentes dosis de PP2 (1 y 2 μM) ó AG1478 (0.5, 5 y 10 uM) y luego tratadas con HCB (5 μM) ó vehículo durante 24 horas en presencia de los mismos, según lo descripto en Materiales y Métodos. Los lisados celulares se utilizaron para detectar los niveles de MMP2 por inmunoblot que fueron relativizados a los niveles de β Actina. Un experimento de inmunoblot representativo se muestra en el panel superior. La cuantificación de los niveles de proteínas por densitometría óptica de 3 experimentos independientes se muestra en el panel inferior. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Las cruces indican diferencias significativas respecto al control (+++p< 0.001). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al HCB (5 μM) (**p< 0.01, ***p< 0.001).

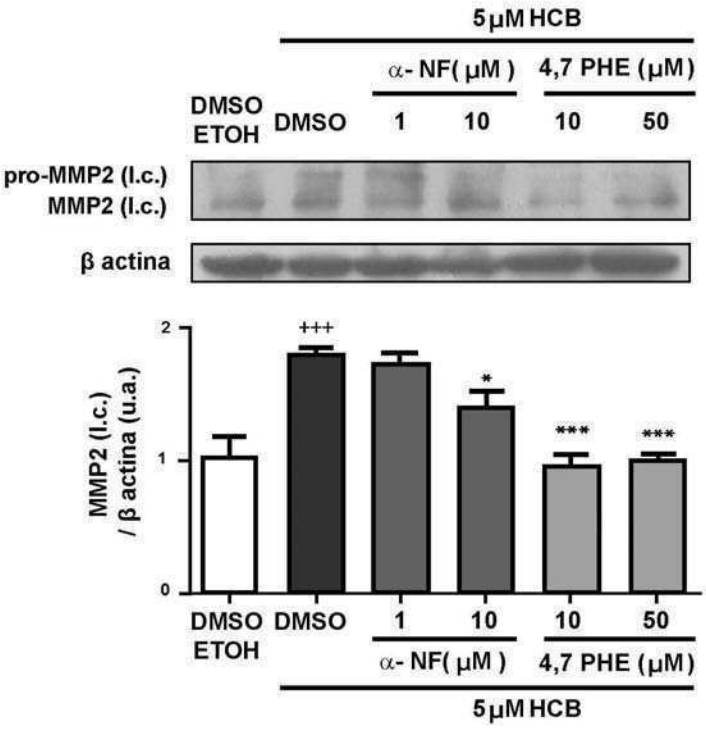
3. Rol del RHA en los efectos del HCB sobre la expresión, secreción y actividad de MMP2 y 9

Estudios recientes sugieren que el RHA puede modular la expresión y actividad de las metaloproteasas (Villano et al. 2006; Hillegass et al. 2006; Meng et al. 2009; Tie-Li et al. 2009, Ishida et al. 2010). A continuación, nos propusimos analizar la posible implicancia de este receptor en los efectos previamente observados. Para ello en ensayos similares a los descriptos con anterioridad, se pretrataron las células con dos antagonistas de dicho receptor, la 4,7-PHE (10 y 50 μM) ó α–NF (1 y 10 μM) y luego se incubaron las células en presencia de estos inhibidores con HCB (5 μM) por 24 horas. En cuanto a la MMP9, se observa que la α-NF (10 μM) previene la secreción y actividad estimuladas por HCB; mientras que la 4,7 PHE (50 μM) solamente afecta la secreción (**Figura 32**). A su vez, encontramos que el incremento de los niveles de MMP2 inducidos por el tóxico se previene tanto en presencia de α-NF (10 μM) como de 4,7 PHE (10 y 50 μM) (**Figura 33**).

Estos resultados nos permiten concluir que la expresión, secreción y actividad de MMP9, así como la expresión de MMP2 inducidas por el tóxico (5 μM), involucran la unión del HCB al RHA.



-Fig. 32. Rol del RHA en los efectos del HCB sobre la secreción y actividad de MMP9. Niveles de secreción y actividad de MMP9 en MDA-MB-231 tratadas con HCB en presencia de dos antagonistas del RHA, 4,7-ortofenantrolina (4,7 PHE) ó α-naftoflavona (α-NF). Las células fueron pretratadas por 3 horas con diferentes dosis de α-NF (1 y 10 μM) ó 4,7 PHE (10 y 50 uM) y luego tratadas con HCB (5 μM) o vehículo durante 24 horas en presencia de los inhibidores. Se procedió según lo descripto en Materiales y Métodos. Al finalizar el experimento se colectaron los sobrenadantes y se lisaron las células. Los sobrenadantes fueron utilizados para medir la actividad de la MMP9 por zimografía y los niveles de proteínas por inmuboblot. Los lisados celulares se utilizaron para detectar los niveles de β Actina por inmunoblot. Los niveles de proteínas y de actividad de MMP9 fueron relativizados a los niveles de β Actina en el lisado celular del experimento correspondiente. Un experimento de inmunoblot y de actividad representativos se muestran en el panel superior. La cuantificación de los niveles de actividad y de proteínas por densitometría óptica de 3 experimentos independientes se muestra en el panel inferior. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Las cruces indican diferencias significativas respecto al control (+$p< 0.05$, ++$p< 0.01$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al HCB (5 μM) (*$p< 0.05$).

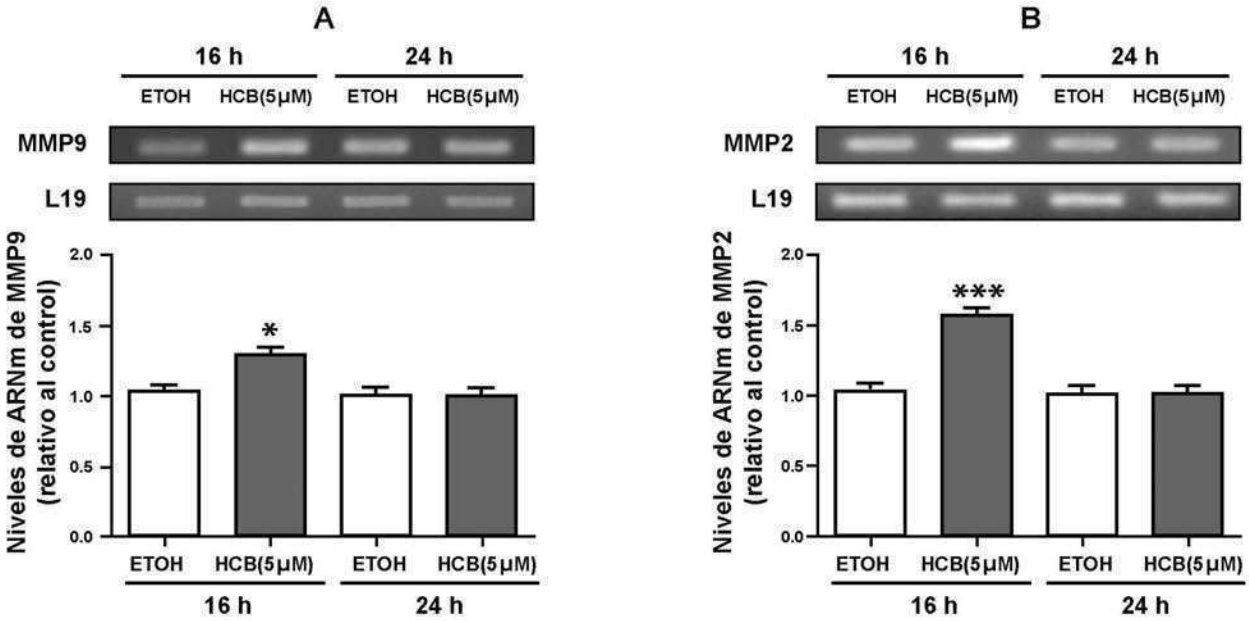


-Fig. 33. Rol del RHA en los efectos del HCB sobre la expresión de MMP2. Niveles de expresión de MMP2 en MDA-MB-231 tratadas con HCB en presencia de dos antagonistas del RHA, 4,7-ortofenantrolina (4,7 PHE) ó α-naftoflavona (α-NF). Las células fueron pretratadas por 3 horas con diferentes dosis de α-NF (1 y 10 µM) ó 4,7 PHE (10 y 50 uM) y luego tratadas con HCB (5 µM) o vehículo durante 24 horas en presencia de los inhibidores, según lo descripto en Materiales y Métodos. Los lisados celulares se utilizaron para detectar los niveles expresados de MMP2 por inmunoblot que fueron relativizados a los niveles de β Actina. Un experimento de inmunoblot representativo se muestra en el panel superior. La cuantificación de los niveles de proteínas por densitometría óptica de 3 experimentos independientes se muestra en el panel inferior. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Las cruces indican diferencias significativas respecto al control (+++p< 0.001). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al HCB (5 µM) (*p< 0.05, ***p< 0.001).

4. El HCB altera los niveles de ARNm de MMP2 y 9

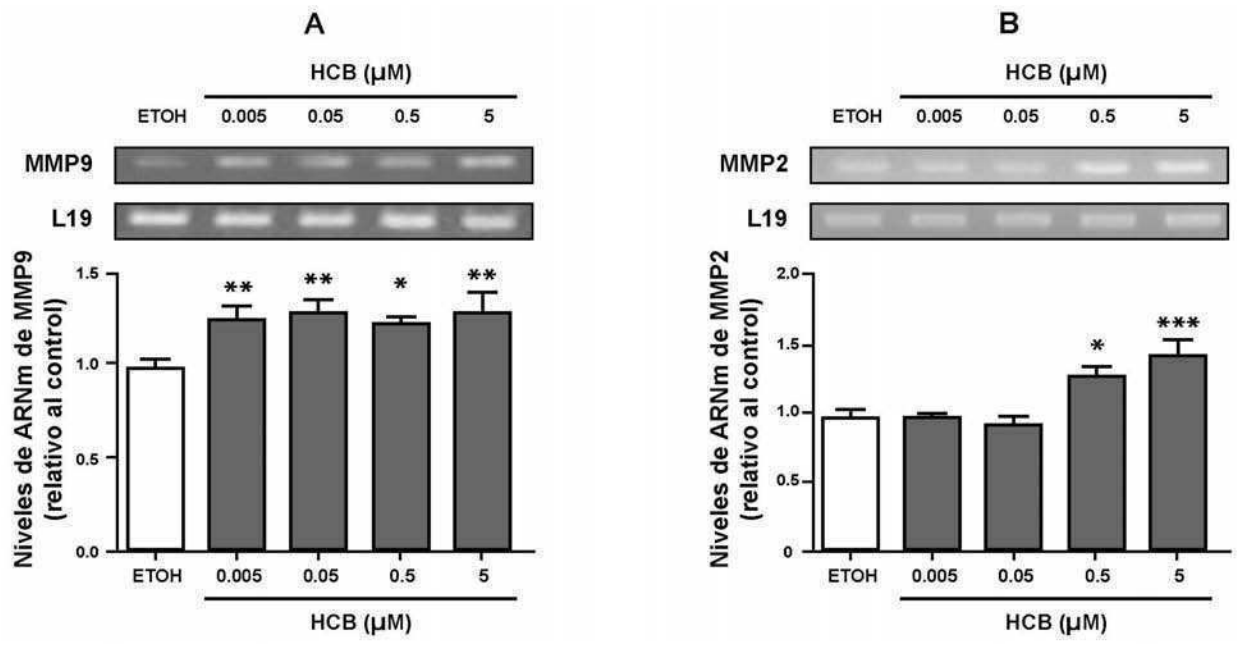
Una vez analizados los efectos del tóxico sobre niveles proteicos de metaloproteasas, nos propusimos estudiar si el HCB podría alterar los niveles de los mensajeros correspondientes. Para ello en una primera etapa tratamos las células MDA-MB-231 con HCB (5 µM) ó vehículo durante 16 y 24 horas y luego medimos los niveles de ARNm de MMP2 y 9 por RT-PCR. Es de interés remarcar que para obtener niveles detectables de ARNm de MMP2 se debió utilizar el doble de ADN-c que el utilizado para amplificar MMP9 en la reacción de PCR. Esto puede deberse, como se especuló previamente, a que la MMP2 estaría expresada en menor grado respecto a la MMP9 en la línea celular en estudio.

Observamos que el HCB incrementa los niveles de mensajeros de MMP9 (26 %) y MMP2 (54%) luego de 16 horas de tratamiento, no observándose diferencias a tiempos mayores (**Figura 34A y B).**



-Fig. 34. El HCB altera los niveles de ARNm de MMP2 y 9 en función del tiempo de exposición. (A) Niveles de ARNm de MMP9 y (B) de MMP2 analizados por RT-PCR. Las células MDA-MB-231 fueron tratadas con HCB (5μM) ó vehículo durante 16 y 24 horas. Luego se midieron los niveles de ARNm por la técnica de RT-PCR según lo descripto en Materiales y Métodos. Un experimento representativo se muestra en los paneles superiores. La cuantificación de los niveles de ARNm por densitometría óptica de 3 experimentos independientes se muestra en los paneles inferiores. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*$p< 0.05$, ***$p< 0.001$).

En una segunda etapa, nuestro objetivo fue evaluar el efecto de las diferentes dosis de HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) sobre los niveles de ARNm de las MMP2 y 9, usando como tiempo de tratamiento las 16 horas. Los resultados mostraron que el HCB aumenta en forma significativa los niveles de mensajeros en todas las dosis ensayadas en el caso de MMP9 (27, 30, 23 y 30%, respectivamente) y en las dosis de 0.5 y 5 μM para MMP2 (31 y 46%, respectivamente), coincidiendo estos resultados con los obtenidos sobre los niveles de expresión de proteínas de las mismas (**Figura 35A y B).**



-Fig. 35. El HCB altera los niveles de ARNm de MMP2 y 9 en función de la dosis de exposición. (A) Niveles de ARNm de MMP9 y (B) de MMP2 analizados por RT-PCR. Las células fueron tratadas por 16 horas con HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo. Luego se midieron los niveles de ARNm por la técnica de RT-PCR según lo descripto en Materiales y Métodos. Un experimento representativo se muestra en los paneles superiores. La cuantificación de los niveles de ARNm por densitometría óptica de 3 experimentos independientes se muestra en los paneles inferiores. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001).

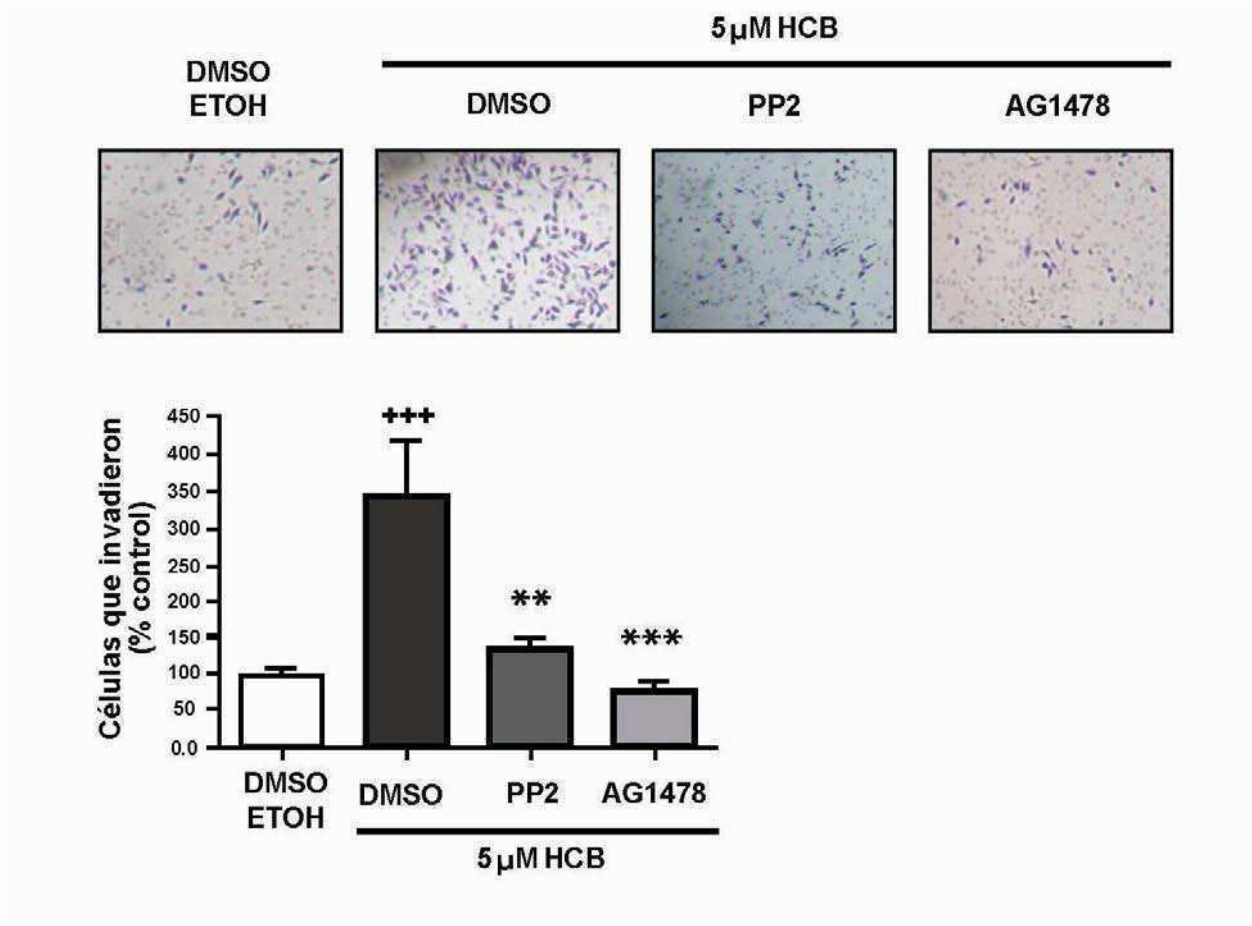
5. El HCB incrementa la invasión celular. Dependencia de c-Src, HER1 y RHA en la invasión celular inducida por el tóxico

Teniendo en cuenta que las metaloproteasas cumplen un rol esencial en la invasión celular, y dado que observamos que el HCB incrementa la expresión, secreción y actividad de MMP9 y los niveles de expresión de MMP2, a continuación nos propusimos evaluar si el tóxico podría estimular la capacidad invasiva de las MDA-MB-231.

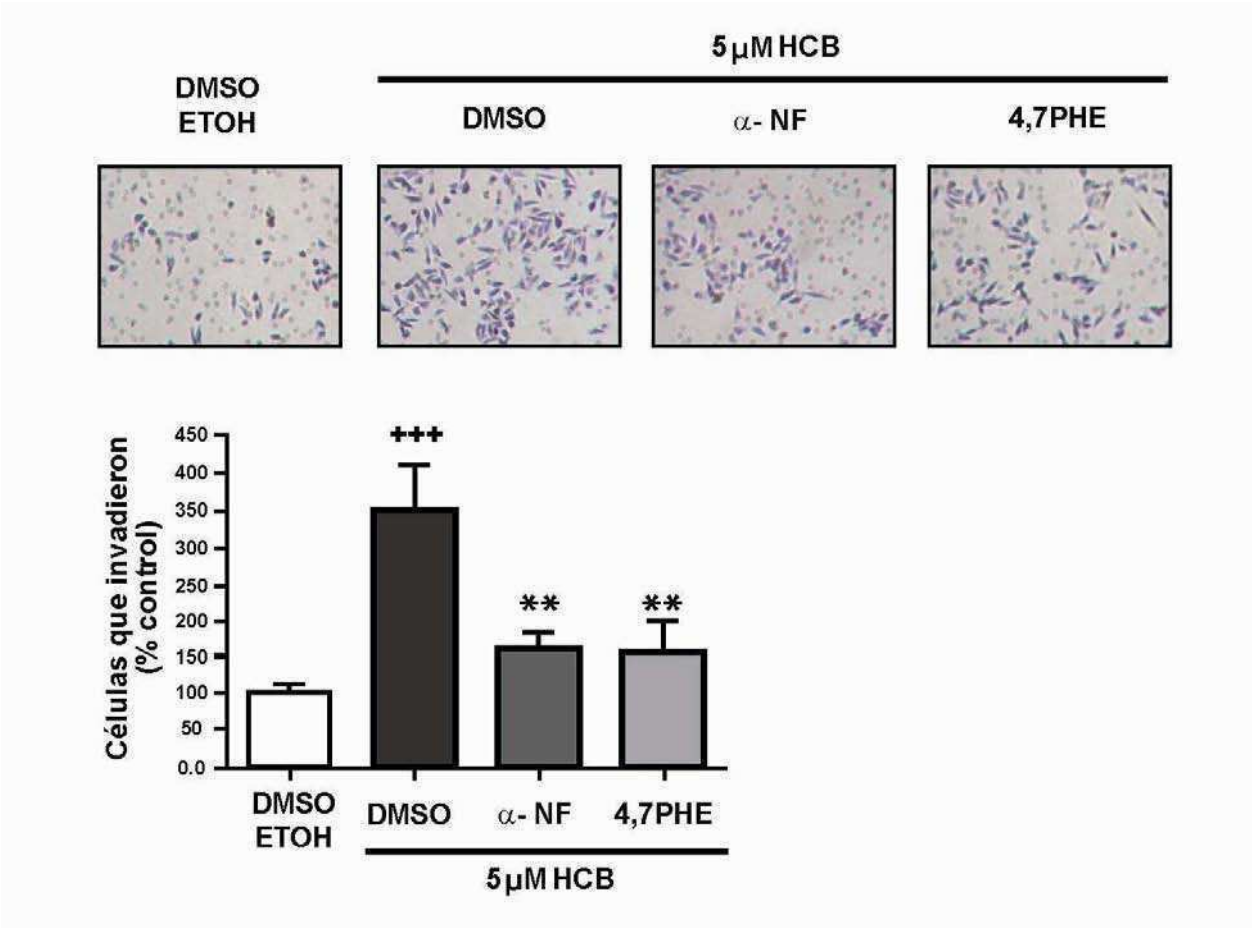
Con este fin, sembramos las células sobre transwells cubiertos con matrigel en presencia de HCB 5 μM, y evaluamos su invasividad durante 48 horas, utilizando como quimioatractante SFB 10% en la parte inferior del transwell. Nuestros resultados mostraron que el tóxico incrementa en forma significativa (245%) la capacidad de las células de invadir respecto al control **(Figuras 36 y 37)**.

A su vez, nos propusimos estudiar si la quinasa c-Src y los receptores HER1 y RHA activados por HCB en las MDA-MB-231, estaban involucrados en la invasión inducida por el tóxico. De ésta manera realizamos ensayos de invasión, pretratando las células durante 3 horas con 2 μM PP2 (para c-Src), 10 μM AG1478 (para HER1) ó 10 μM α-NF y 10 μM 4,7-PHE (para RHA). Luego las células se sembraron en la parte superior del transwell con matrigel y se agregó HCB 5 μM ó vehículo en presencia de los inhibidores durante 48 horas. Nuestros resultados muestran

que tanto la c-Sr y el HER1 **(Figura 36)**, como el RHA **(Figura 37)**, median la invasión celular estimulada por el tóxico**.**



-Fig. 36. El HCB incrementa la invasión celular en forma dependiente de c-Src y HER1. Efecto del HCB en la invasión celular en presencia o ausencia de inhibidores de c-Src (PP2) y HER1 (AG1478) evaluada por el ensayo del transwell con matrigel. Las MDA-MB-231 se pretrataron durante 3 horas con los diferentes inhibidores (2 μM PP2, 10 μM AG1478), y luego se sembraron en los transwells con matrigel adicionando el tratamiento correspondiente (5 μM de HCB ó vehículo en presencia de los inhibidores). A las 48 horas las células que invadieron hacia el suero fueron fijadas y teñidas. En el panel de arriba se observan fotografías representativas de cada tratamiento; mientras que en el panel de abajo se observa la cuantificación del número de células totales que invadieron hacia el suero. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Las cruces indican diferencias significativas con respecto al control (+++$p< 0.001$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al HCB (5 μM) (**$p< 0.01$, ***$p< 0.001$).



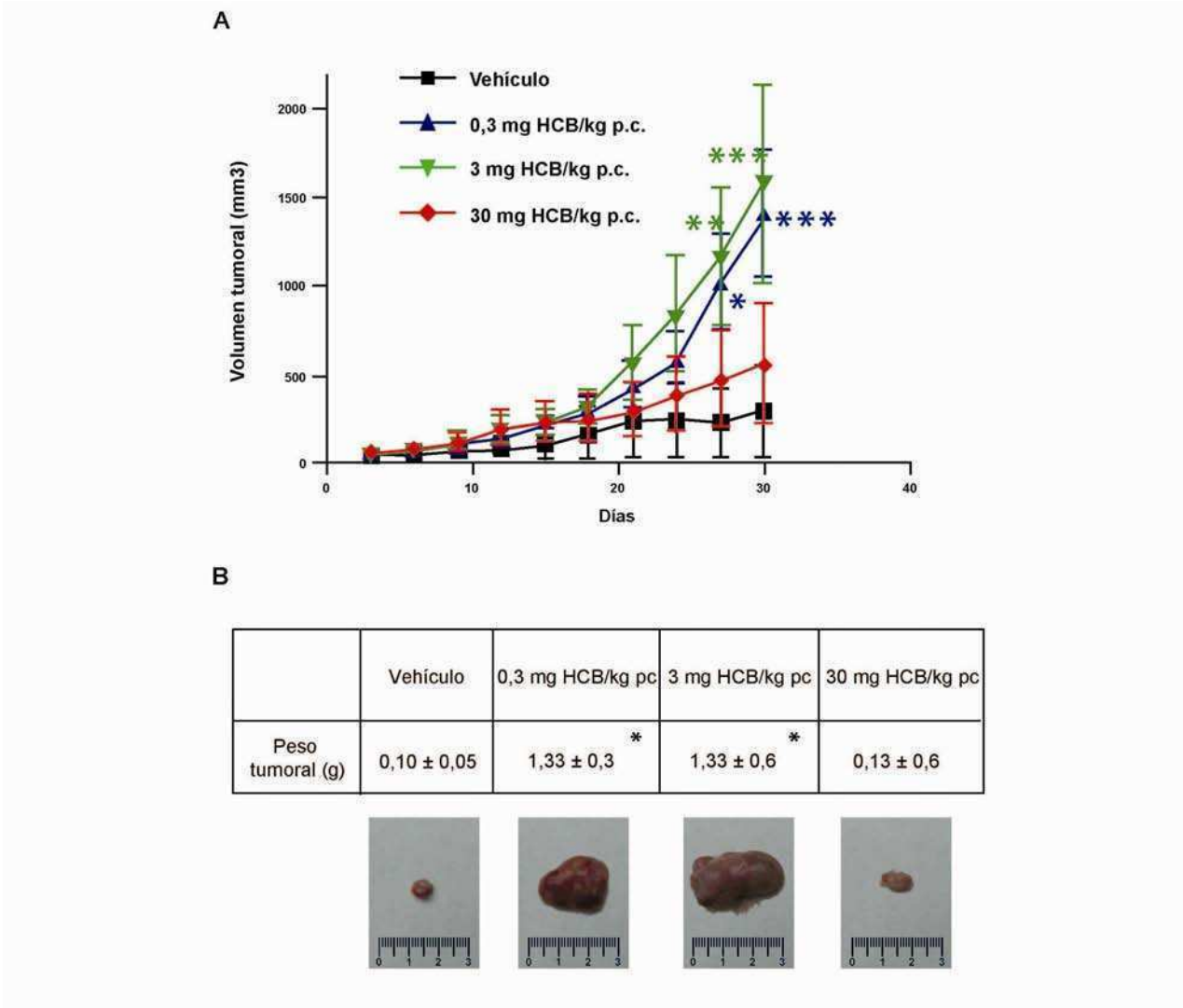
-Fig. 37. Rol del RHA en la invasión celular inducida por el tóxico. Efecto del HCB en la invasión celular en presencia o ausencia de dos antagonistas del RHA, 4,7-ortofenantrolina (4,7 PHE) y α-naftoflavona (α-NF) evaluada por el ensayo del transwell con matrigel. Las MDA-MB-231 se pretrataron durante 3 horas con los diferentes inhibidores α-NF (10 μM) ó 4,7 PHE (10 μM), y luego al ser sembradas en los transwells con matrigel, se expusieron al HCB (5 μM) en presencia de los mismos. Finalizada las 48 horas, las células que invadieron hacia el suero fueron fijadas y teñidas. En el panel de arriba se observan fotografías representativas de cada tratamiento; mientras que en el panel de abajo se observa la cuantificación del número de células totales que invadieron hacia el suero. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Las cruces indican diferencias significativas con respecto al control (+++p< 0.001). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al HCB (5 □ M) (**p< 0.01).

6. Modelo de xenotrasplante con MDA-MB-231 en ratones hembra BALB-c atímicos.

6.1. Incremento del crecimiento tumoral inducido por el pesticida

Hasta el momento, en nuestro trabajo hemos demostrado que el HCB induce la expresión, secreción y actividad de MMP9 y la expresión de MMP2 junto con un aumento en la migración e invasión celular, *in vitro* en la línea MDA-MB-231. Con el objetivo de seguir profundizando sobre los efectos del tóxico en la progresión tumoral en cáncer de mama, nos propusimos utilizar un modelo de estudio *in vivo* de xenotrasplante con MDA-MB-231 en ratones atímicos.

En resumen, se inocularon las células subcutáneamente en los cordones mamarios de ratones hembra BALB-c atímicas como se describe en Materiales y Métodos. Una vez generados los tumores de mama, se trasplantaron dichos tumores en 40 ratones y cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 0.25 x 0.25 cm, los animales se inocularon intraperitonealmente (i.p.) con HCB disuelto en aceite de maíz (0.3, 3 ó 30 mg/kg p.c.) ó vehículo (aceite de maíz) 3 veces por semana hasta el término del experimento. Con el fin de estudiar los efectos del tóxico sobre el crecimiento tumoral realizamos mediciones de los mismos tres veces por semana, a lo largo del tiempo. Por otro lado, al momento de la necropsia de los animales, los tumores fueron fotografiados y pesados. Nuestros resultados muestran que el HCB incrementa en forma significativa el volumen (**Figura 38A**) y peso tumoral (**Figura 38B**) en dosis de 0.3 y 3 mg/kg p.c.



-Fig. 38. El pesticida induce el crecimiento de tumores de mama derivados de la línea celular MDA-MB-231 en ratones atímicos. (A) Volumen tumoral y (B) Peso tumoral. Las MDA-MB-231 fueron inoculadas en cordones mamarios de ratones hembra BALB-c atímicos. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 0.25 x 0.25 cm, se comenzó a intoxicar los ratones por inyección i.p. con HCB (0.3, 3 ó 30 mg/kg p.c.) ó vehículo 3 veces por semana. Los tumores se midieron tres veces por semana y al momento de la necropsia fueron fotografiados y pesados. (A) Los volúmenes tumorales fueron calculados con la fórmula $\pi DP^2/6$ donde D es el diámetro mayor y P es el diámetro perpendicular al mismo. Se graficó el volumen tumoral en función del tiempo. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos factores, seguido por el test de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p< 0.001$). (B) En el panel de arriba se muestran los pesos tumorales al momento de la necropsia, mientras que en el panel de abajo se observan fotografías representativas de los tumores de mama de los ratones con los diferentes tratamientos. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*$p< 0.05$).

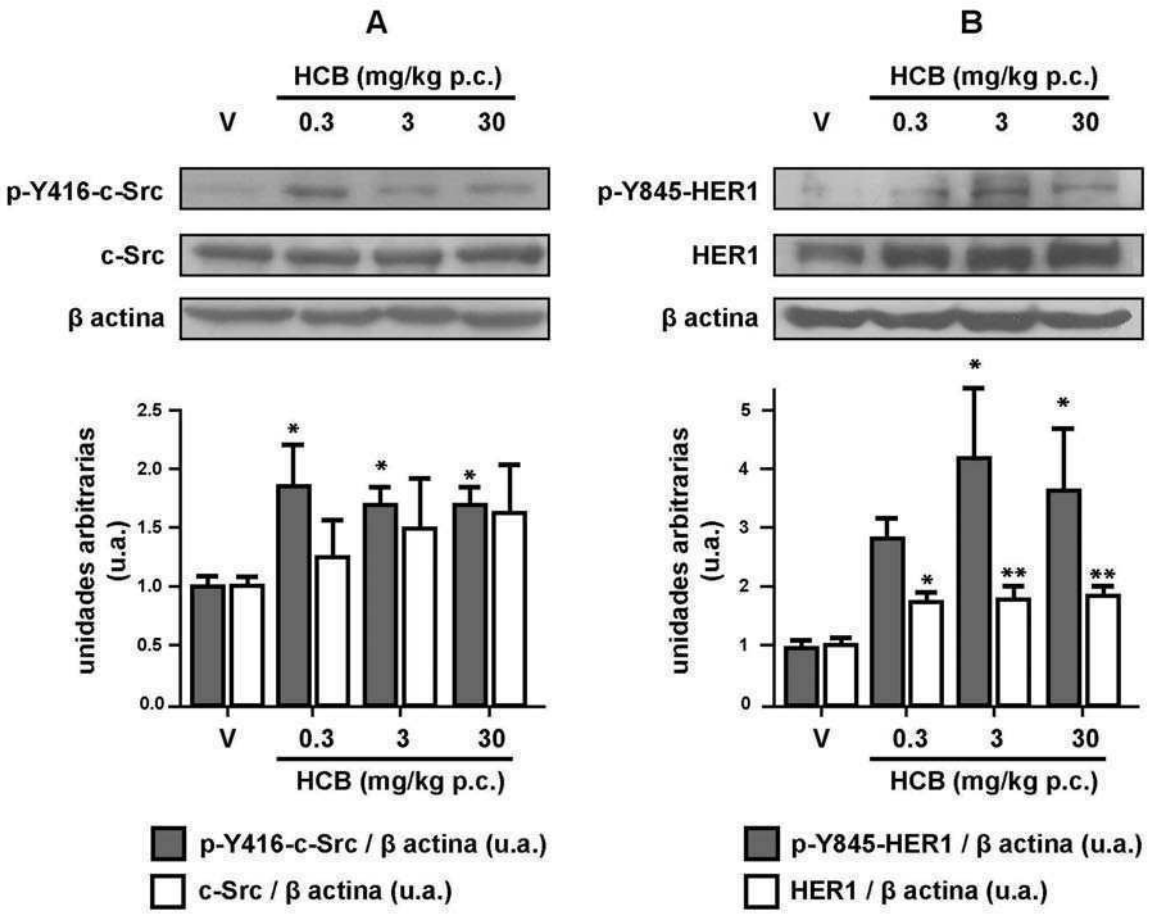
6.2. El HCB induce activación de c-Src y HER1 en los tumores de mama de ratones atímicos

En la primer parte de nuestro trabajo evidenciamos la activación de las vías de señalización de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2 por el tratamiento con HCB en MDA-MB-231*, in vitro*. Por otro lado, demostramos que tanto la c-Src como el HER1 están involucrados en el incremento de la migración e invasión celular, así como en la actividad y secreción de MMPs inducidos por el tóxico *in vitro*. Es por ello que nos resultó de especial interés analizar los niveles totales y fosforilados de estas proteínas en el modelo *in vivo* aquí establecido.

Por lo tanto, al momento de la necropsia de los animales, parte de los tumores primarios fue congelado en nitrógeno líquido. Estas muestras posteriormente, fueron homogeneizadas y se realizó un fraccionamiento subcelular obteniéndose citosoles, microsomas y extractos nucleares; como se describe en Materiales y Métodos. Se utilizaron las fracciones citosólicas para estudiar los niveles totales y fosforilados de c-Src; y las microsomales para analizar los niveles totales de HER1 y la fosforilación en la Y845.

Como se observa en la **Figura 39A**, el tratamiento de los ratones con HCB estimula la fosforilación de c-Src en los tumores mamarios en todas las dosis ensayadas (0.3, 3 ó 30 mg/kg p.c.), sin embargo no altera en forma significativa los valores de proteínas totales en ninguno de los casos. Acorde con estos resultados, notamos que en los ratones intoxicados con el pesticida, aumenta la fosforilación en Y845-HER1 en las mismas dosis, observándose además en este caso un incremento, pero en menor grado, de los niveles totales de proteínas (**Figura 39B**).

Estos resultados sugieren que el tratamiento con las diferentes dosis de HCB (0.3, 3 y 30 mg/kg p.c.) estimula la actividad de c-Src, y con ello la fosforilación en la Y845 del HER1 en los tumores de mama derivados de MDA-MB-231. De forma interesante, estos datos provenientes de ensayos *in vivo* en ratones atímicos coinciden con lo observado previamente en este estudio *in vitro* en las MDA-MB-231*,* donde encontramos que el pesticida aumenta la actividad de c-Src y del HER1, en forma dependiente de la dosis.

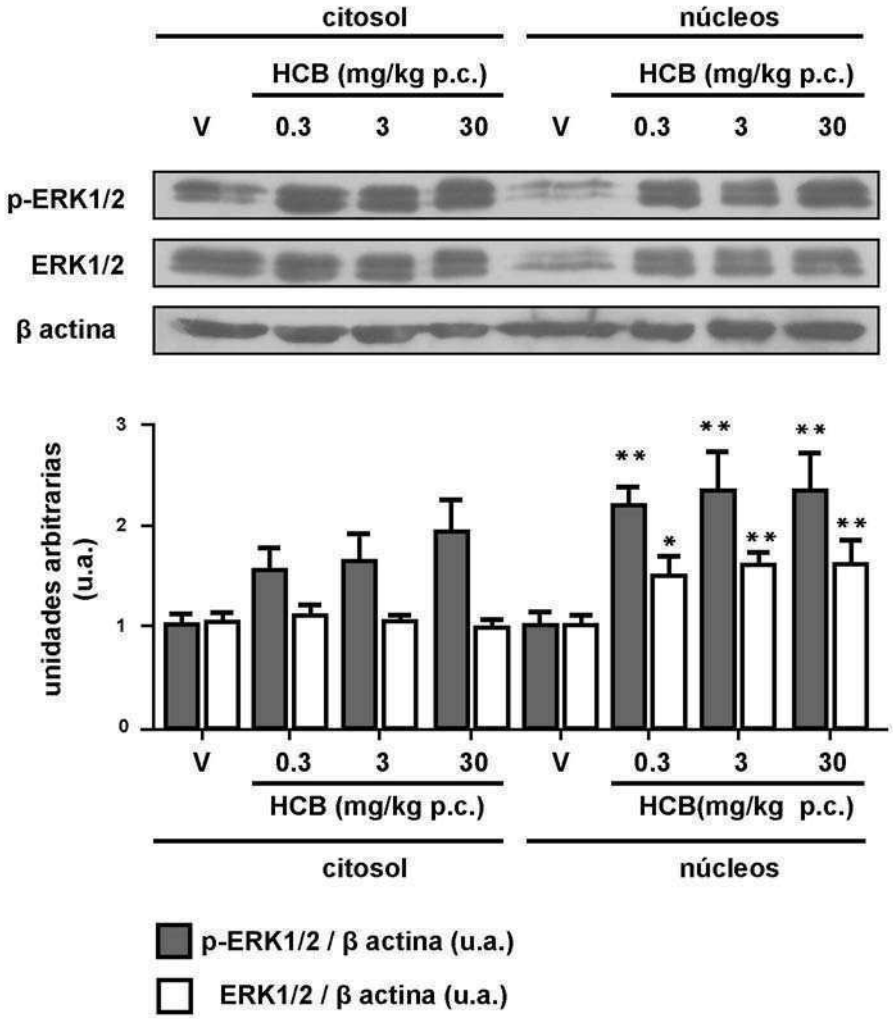


-Fig. 39. El HCB activa la c-Src e incrementa los niveles de fosfo-Y845-HER1 en tumores de mama derivados de MDA-MB-231 en ratones atímicos. (A) Niveles totales de c-Src y fosforilados en Y416-cSrc; y (B) niveles totales de HER1 y fosforilados en Y845-HER1. Las MDA-MB-231 fueron inoculadas en la mama de ratones hembra BALB-c atímicos. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 0.25 x 0.25 cm se comenzaron a intoxicar los animales, como se describió previamente. Al momento de la necropsia, los tumores mamarios fueron congelados y luego se realizó fraccionamiento subcelular. Las fracciones citosólicas (A) ó las microsomales (B) fueron resueltas por SDS-PAGE. Las membranas se incubaron con anticuerpos anti-fosfo-Y416-c-Src (A) ó anti-fosfo-Y845-HER1 (B), se estripearon y reincubaron con las formas totales de los anticuerpos, y finalmente se incubaron con anticuerpo anti-β Actina como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles totales y fosforilados de c-Src y HER1 fueron relativizados a los niveles de β Actina correspondientes. Experimentos de inmunoblot representativos se muestran en los paneles superiores. La cuantificación de los niveles fosforilados y totales de c-Src y HER1, por densitometría óptica de 3 experimentos independientes, se muestra en los paneles inferiores. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*$p< 0.05$, **$p< 0.01$).

6.3. El tóxico induce la fosforilación de ERK1/2 y de STAT5b en los tumores de mama de ratones atímicos

El siguiente paso fue evaluar si el pesticida alteraba los niveles de fosforilación de ERK1/2 y STAT5b, dos proteínas asociadas a la vías de transducción de señales activadas por c-Src y/ó HER1. Para ello, se analizaron los niveles totales y fosforilados de ambas proteínas tanto en fracciones citosólicas como nucleares de los tumores de mama derivados de las MDA-MB-231. Observamos que los tumores de ratones tratados con HCB (0.3, 3 y 30 mg/kg p.c.) muestran una tendencia, no significativa, a aumentar los niveles fosforilados de ERK1/2 en la fracción citosólica. Por otro lado, encontramos un incremento significativo de los niveles totales y fosforilados de ERK1/2 en la fracción nuclear por efecto del tóxico **(Figura 40).**

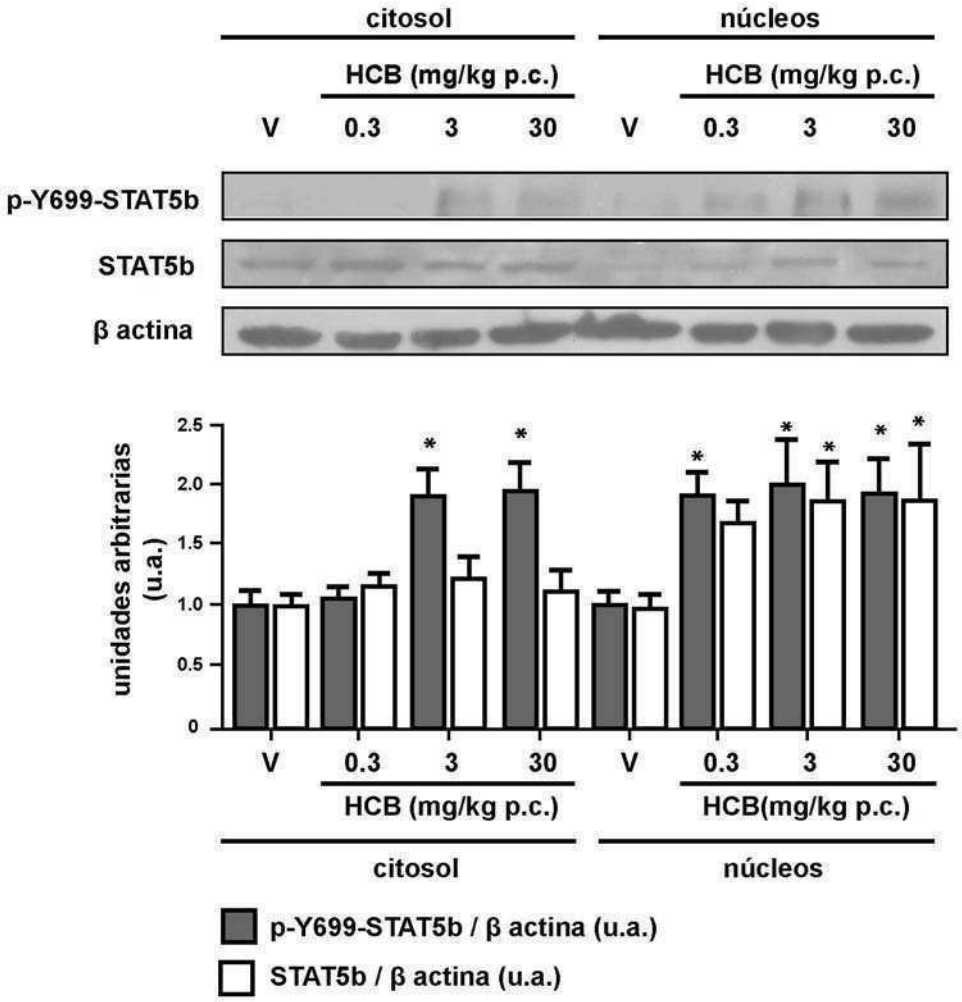
Nuestros resultados nos sugieren, que el tratamiento de los ratones con HCB induce la fosforilación de ERK1/2, llevando esto, a su activación y posterior translocación al núcleo para ejercer su rol como factor de transcripción.



-Fig. 40. El HCB induce la fosforilación de ERK1/2 en los tumores de mama de ratones atímicos. Las MDA-MB-231 fueron inoculadas en los cordones mamarios de ratones hembra BALB-c atímicos. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 0.25 x 0.25 cm se comenzó a intoxicar los ratones, por inyección i.p. con HCB (0.3, 3 ó 30 mg/kg p.c.) ó vehículo 3 veces por semana. Al momento de la necropsia, los tumores mamarios fueron congelados y se realizó fraccionamiento subcelular. Las fracciones citosólicas y nucleares fueron resueltas por SDS-PAGE. Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-fosfo-ERK1/2 y luego se estripearon y reincubaron con el anticuerpo contra la forma total, y finalmente con anticuerpo anti-β Actina como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles totales y fosforilados de ERK1/2 fueron relativizados a los niveles correspondientes de β Actina. Un experimento de inmunoblot representativo se muestra en el panel superior. La cuantificación de los niveles totales y fosforilados de ERK1/2 por densitometría óptica de tres experimentos independientes, se muestra en el panel inferior. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*$p< 0.05$, **$p<0.01$).

La evaluación de STAT5b, muestra que en los tumores de ratones tratados con el tóxico a las dosis de 3 y 30 mg/kg p.c., se induce un aumento significativo de la fosforilación de Y699-STAT5b en las fracciones citosólicas. En cambio, en las fracciones nucleares, se incrementan los niveles totales y fosforilados del STAT5b a todas las dosis ensayadas. Es importante destacar que en los tumores del grupo control la STAT5b no se encuentra fosforilada en la fracción citosólica y se observa muy poco

en la fracción nuclear, o al menos sus niveles no son fácilmente detectables por inmunoblot. Con la dosis menor del tóxico (0.3 mg/kg p.c.) observamos que se induce la fosforilación, activación y translocación al núcleo de toda la proteína fosforilada, por lo cual solamente se detecta en núcleos; mientras que con las dosis de 3 y 30 mg HCB/kg p.c se induciría quizás un incremento mayor en la fosforilación de STAT5b, pudiéndose observar, por ende, proteína fosforilada tanto en el citosol, como en el núcleo (**Figura 41**).



-Fig. 41. Efecto del HCB sobre los niveles totales y fosforilados de STAT5b en los tumores de mama derivados de MDA-MB-231. Las MDA-MB-231 fueron inoculadas en los cordones mamarios de ratones hembra BALB-c atímicos. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 0.25 x 0.25 cm se comenzó a intoxicar los ratones, según se describe en Materiales y Métodos. Al momento de la necropsia, los tumores mamarios fueron congelados y luego se realizó fraccionamiento subcelular. Las fracciones citosólicas y nucleares fueron resueltas por SDS-PAGE. Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-fosfo-Y699-STAT5b y luego se estripearon y reincubaron con el anticuerpo contra la forma total, y finalmente con anticuerpo anti-β Actina como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles totales y fosforilados de STAT5b fueron relativizados a los niveles correspondientes de β Actina. Un experimento de inmunoblot representativo se muestra en el panel superior. La cuantificación de los niveles totales y fosforilados de STAT5b por densitometría óptica de tres experimentos independientes, se muestra en el panel inferior. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*$p < 0.05$).

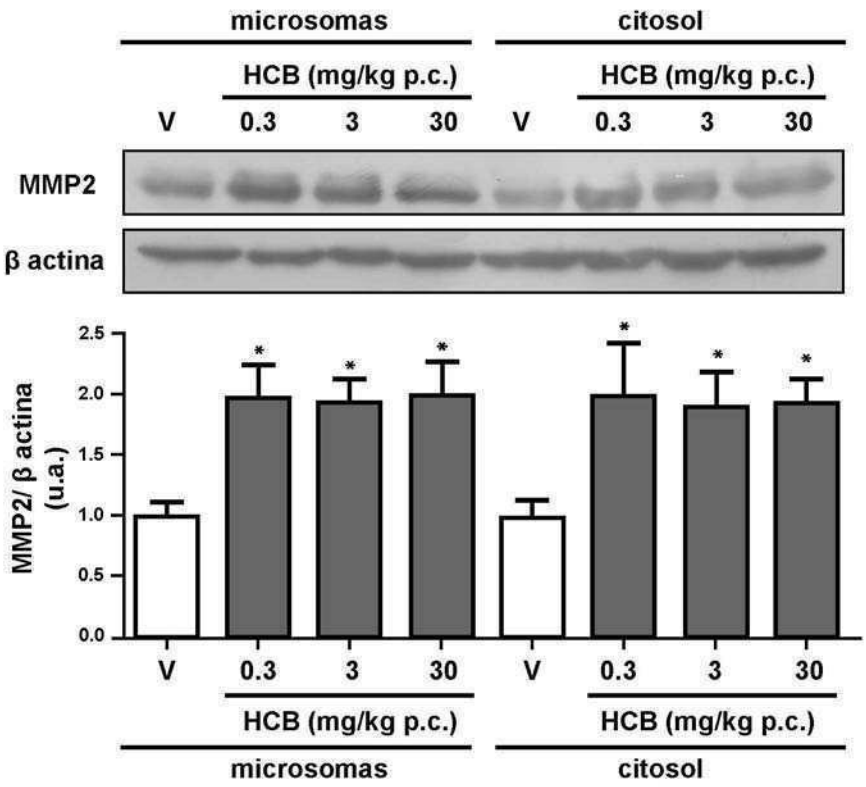
Es interesante resaltar que el tóxico induce la activación de ERK1/2 y STAT5b en todas las dosis ensayadas, coincidiendo estos resultados con los obtenidos para c-Src y HER1. En conclusión estas observaciones nos sugieren que el tóxico podría estar induciendo las vías de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2 en los tumores de mama de ratones BALB-c atímicos inoculados ortotípicamente con la línea celular MDA-MB-231.

6.4. Aumento en los niveles de MMP2 y 9 inducido por HCB, en tumores de mama de ratones atímicos

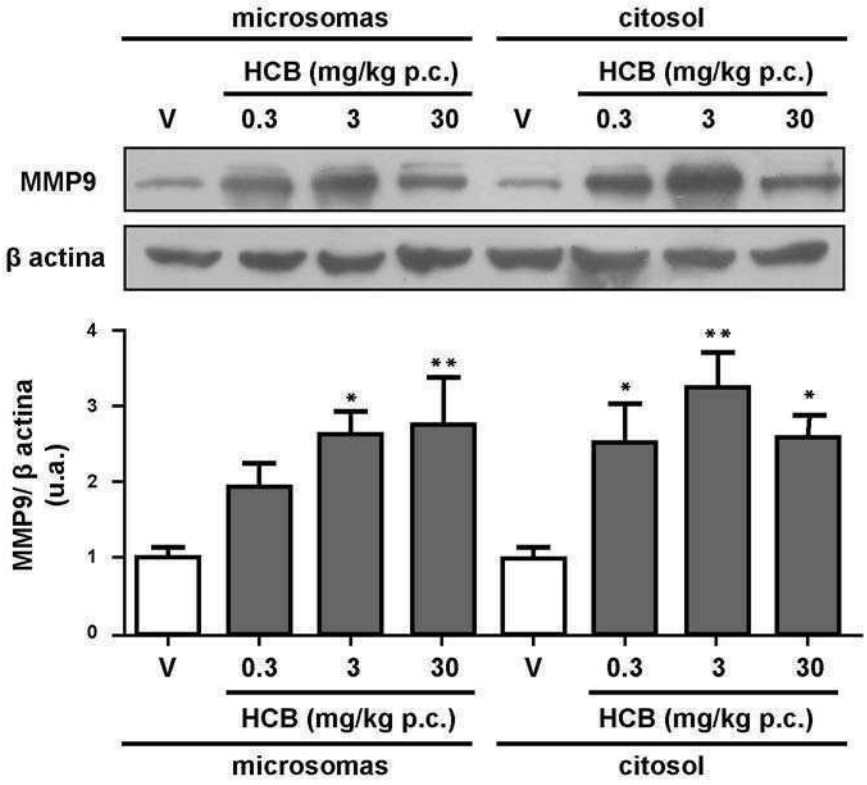
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios *in vitro,* y el rol que cumplen las metaloproteasas tanto en la iniciación y crecimiento del tumor, como en la progresión tumoral; nos propusimos analizar si el incremento en el tamaño tumoral inducido por el pesticida en este modelo *in vivo*, estaba asociado a alteraciones en los niveles de MMP2 y 9. Con este fin, evaluamos los niveles de las MMPs en las fracciones citosólicas y microsomales de los tumores de mama. Nos ha resultado atractivo estudiar el contenido de las mismas, en la fracción citosólica, así como en la fracción microsomal. Esto se debe a que los microsomas incluyen las vesículas de secreción, siendo de particular interés para el estudio de MMP2 y 9 que son enzimas proteolíticas que deben ser secretadas al medio extracelular para cumplir su función.

Los resultados obtenidos muestran que los niveles de ambas MMPs son incrementados en las fracciones citosólicas y microsomales de los tumores provenientes de ratones tratados con el tóxico a todas las dosis. Esto podría implicar, que el HCB estaría estimulando la expresión y, quizás la secreción de MMP2 y 9 en los tumores de mama (**Figuras 42 y 43**).

Previamente demostramos que el pesticida induce la expresión de MMP2 y 9 en forma dependiente de c-Src y HER1 en las MDA-MB-231, *in vitro.* A su vez, en los experimentos *in vivo* en tumores derivados de la misma línea celular, observamos que el HCB induce la actividad de c-Src y HER1 y aumenta la expresión de estas MMPs. Considerando los resultados *in vitro*, estos datos nos sugieren que el pesticida podría estar aumentando los niveles de MMP2 y 9 a través de la activación de c-Src y HER1 en este modelo de xenotrasplante.



-Fig. 42. El pesticida aumenta los niveles de MMP2 en los tumores de mama derivados de MDA-MB-231. Las MDA-MB-231 fueron inoculadas en los cordones mamarios de ratones hembra BALB-c atímicos. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 0.25 x 0.25 cm se comenzó a intoxicar los ratones, por inyección i.p. con HCB (0.3, 3 ó 30 mg/kg p.c.) ó vehículo 3 veces por semana. Al momento de la necropsia, los tumores mamarios fueron congelados y luego se realizó fraccionamiento subcelular. Las fracciones citosólicas y microsomales fueron resueltas por SDS-PAGE. Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-MMP2 y luego reincubadas con anticuerpo anti-β Actina. Los niveles de MMP2 fueron relativizados a los niveles correspondientes de β Actina. Un experimento de inmunoblot representativo se muestra en el panel superior. La cuantificación de los niveles de MMP2 por densitometría óptica de tres experimentos independientes, se muestra en el panel inferior. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*$p < 0.05$).



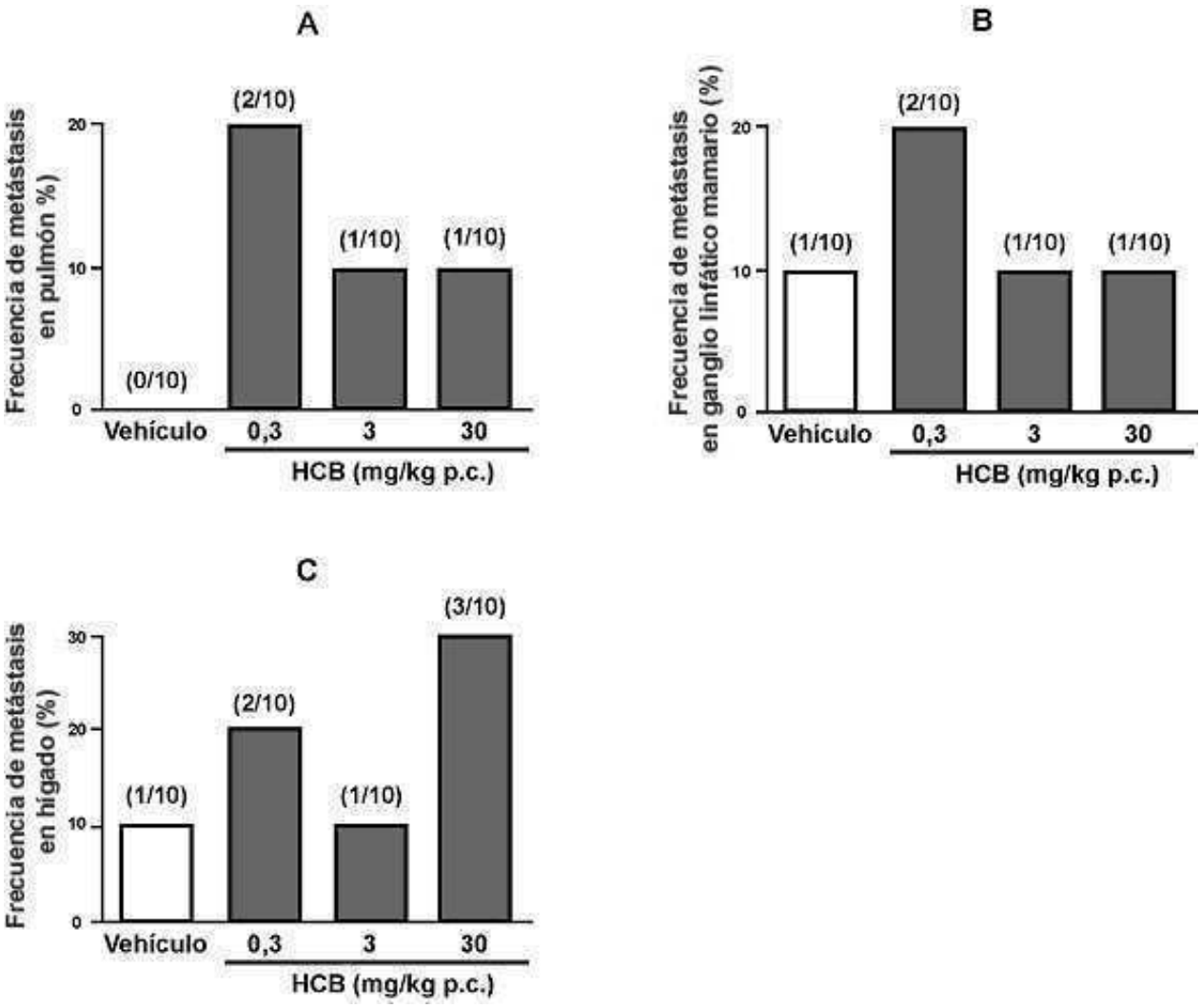
-Fig. 43. Efecto del HCB sobre los niveles de MMP9 en tumores de mama derivados de MDA-MB-231. Las MDA-MB-231 fueron inoculadas en los cordones mamarios de ratones hembra BALB-c atímicos. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 0.25 x 0.25 cm se comenzó a intoxicar los ratones como se describe en Materiales y Métodos. Al momento de la necropsia, los tumores mamarios fueron congelados y luego se realizó fraccionamiento subcelular. Las fracciones citosólicas y microsomales fueron resueltas por SDS-PAGE. Las membranas fueron incubadas con anticuerpo anti-MMP9 y reincubadas con anticuerpo anti-β Actina. Los niveles de MMP9 fueron relativizados a los niveles de β Actina correspondientes. Un experimento de inmunoblot representativo se muestra en el panel superior. La cuantificación de los niveles de MMP9 por densitometría óptica de tres experimentos independientes se muestra en el panel inferior. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*$p< 0.05$, **$p<0.01$).

6.5. Efecto del HCB sobre la metástasis en ratones BALB-c atímicos

Los resultados del presente trabajo, demuestran que el pesticida induce la migración e invasión celular, en las MDA-MB-231 *in vitro*. Habiendo establecido este interesante modelo de xenotrasplante en el cual se reproducen la mayoría de los efectos del HCB observados *in vitro;* el siguiente paso fue estudiar si el tóxico alteraba la capacidad de metastatizar de las células MDA-MB-231, *in vivo*. De ésta manera, luego de un lapso aproximado de un mes y medio de iniciado el experimento, los ratones fueron sacrificados y los pulmones, ganglios linfáticos axilares e hígado fueron extraídos, fijados e incluidos. Se realizaron cortes semi-seriados de los tejidos y se analizó, al microscopio, la aparición de focos metastáticos o micrometástasis en estos órganos.

La evaluación del análisis histológico de todos los órganos fijados, reveló una baja cantidad de micrometástasis en todos los grupos, tanto control como tratados. Sin embargo, se observa una ligera tendencia al incremento en la frecuencia de animales con metástasis al tratar con el pesticida (**Figura 44**). Particularmente, observamos que en pulmón los animales controles no desarrollaron metástasis, mientras que los grupos tratados lo hicieron: 2 animales de 10 (2/10) para el grupo de 0.3 mg/kg p.c. de HCB y 1 animal de 10 (1/10) para los grupos tratados con 3 y 30 mg/kg p.c. de HCB (**Figura 44A**). En ensayos posteriores nos propusimos extender la duración del experimento con la finalidad de obtener mayores niveles de metástasis. Dado que los animales se deterioraban al prolongar el ensayo, y por cuestiones éticas hacia el manejo de animales de laboratorio, no pudimos obtener mejores resultados en dicho modelo.

Debido a que no logramos evidenciar claramente la acción del pesticida sobre la metástasis en este modelo, el siguiente paso fue estudiar los efectos del HCB sobre otros dos modelos experimentales. Utilizamos entonces, un modelo de **metástasis espontánea** que a diferencia del anterior es singenéico, utilizando la línea tumoral C4-HI en ratones BALB-c (Lanari et al., 2009); y otro modelo de **metástasis experimental** singenéico, en el que se inocula la línea celular LM3 en la vena de la cola de ratones BALB-c (Carnevale et al., 2007).



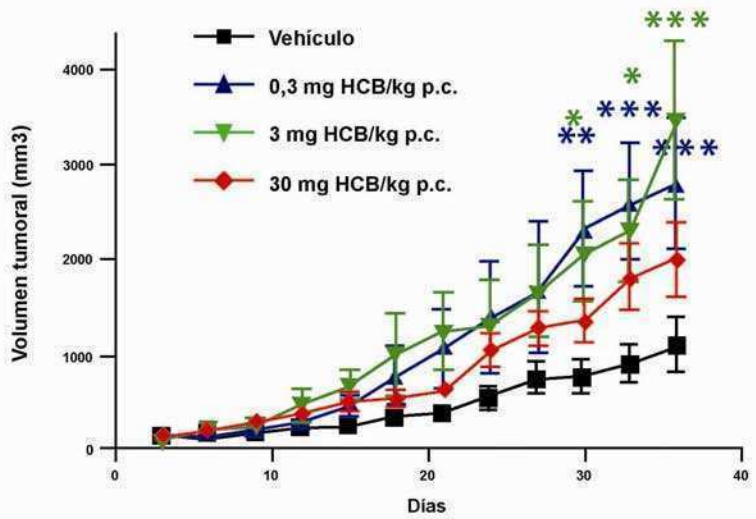
-Fig. 44. Efecto del tóxico sobre la metástasis en ratones BALB-c atímicos con tumores de mama derivados de MDA-MB-231. Frecuencia de animales que presentaron metástasis en pulmón (A), en ganglio linfático axilar (B) y en hígado (C) para el grupo control (vehículo) y los grupos tratados con HCB (0.3, 3 y 30 mg/kg p.c.). Las MDA-MB-231 fueron inoculadas en los cordones mamarios de ratones hembra BALB-c atímicos. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 0.25 x 0.25 cm se comenzó el protocolo de intoxicación como se describe en Materiales y Métodos. Aproximadamente, al mes y medio de iniciado el experimento los animales fueron sacrificados y los pulmones, ganglios linfáticos axilares e hígado fueron fijados e incluidos. Se realizaron cortes semi-seriados de los tejidos, se tiñeron con H-E y se analizó la aparición de focos metastáticos o micrometástasis bajo microscopio óptico. Se grafica el número de animales que presentaron al menos una micrometástasis en cada tejido.

7. Modelo de trasplante singenéico con la línea tumoral C4-HI en ratones BALB-c

7.1. El HCB induce el crecimiento de los tumores de mama C4-HI

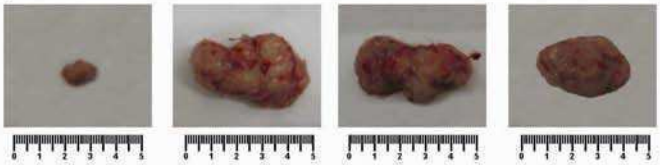
A continuación, estudiamos los efectos del HCB sobre un modelo de metástasis espontánea, en ratones BALB-c con la línea tumoral C4-HI. Resumidamente, se trasplantó dicho tumor en ratones hembra BALB-c y cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 0.25 x 0.25 cm, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con HCB (0.3, 3 ó 30 mg/kg p.c.) ó vehículo 3 veces por semana. Luego de un lapso aproximado de dos meses de iniciado el experimento, los ratones fueron sacrificados y los pulmones, el hígado y los ganglios linfáticos axilares fueron extraídos, fijados e incluídos.

Nuestro primer análisis, fue evaluar si el HCB alteraba el crecimiento de los tumores C4-HI en los ratones hembra BALB-c. Para ello se realizaron mediciones de los tumores 3 veces por semana durante el transcurso del experimento y al momento de la necropsia los tumores fueron fotografiados y pesados. Los resultados evidencian un incremento significativo del tamaño tumoral en los grupos tratados con HCB 0.3 y 3 mg/kg p.c, mientras que con dosis de HCB 30 mg/kg p.c. se observó un aumento no significativo **(Figura 45A)**. Resultados similares se obtuvieron para los pesos tumorales **(Figura 45B)**. Los datos aquí presentes concuerdan con los obtenidos en el modelo de xenotrasplante de las MDA-MB-231 en ratones atímicos estudiado previamente, donde el tratamiento de ratones con las dosis menores del tóxico (0.3 y 3 mg/kg p.c) produjeron un aumento tanto en el volumen como en el peso tumoral.



B

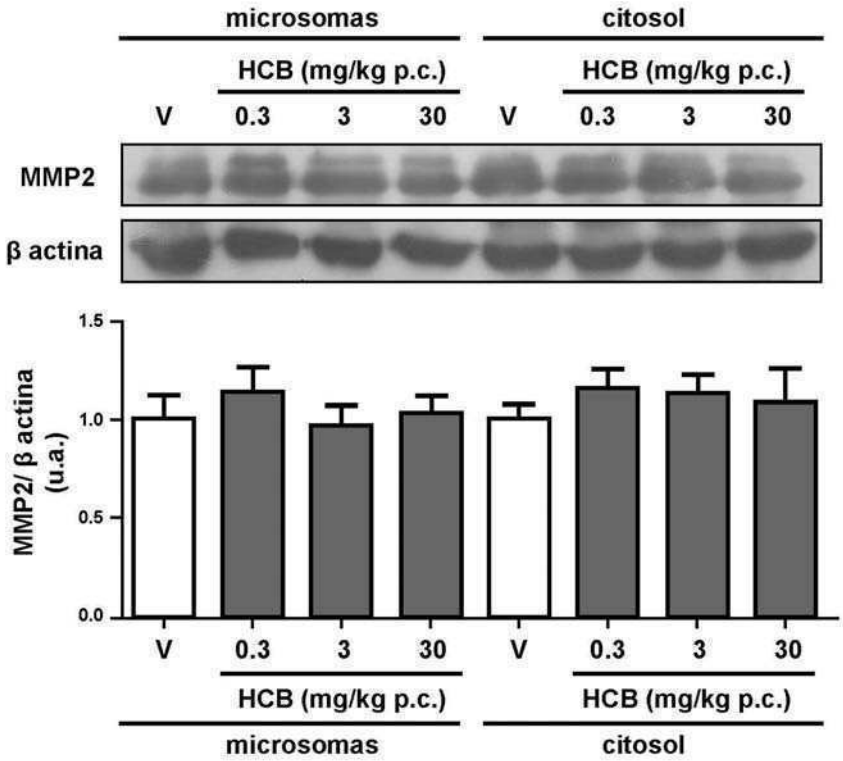
	Vehículo	0,3 mg HCB/kg pc	3 mg HCB/kg pc	30 mg HCB/kg pc
Peso tumoral (g)	1,3 ± 0,4	4,5 ± 1,1 *	4 ± 1,1 *	3,4 ± 0,8



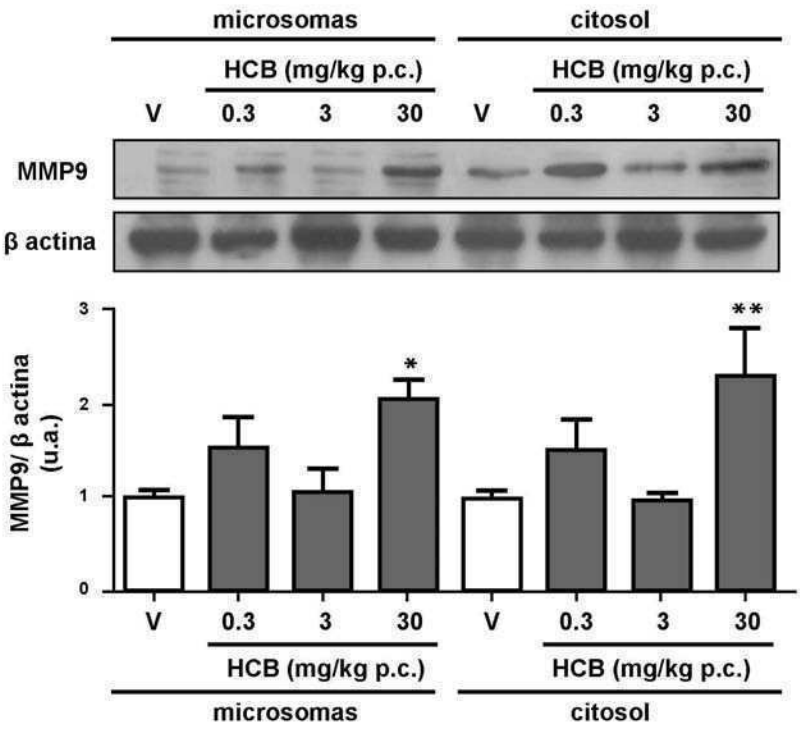
-Fig. 45. El HCB estimula el crecimiento de los tumores C4-HI en ratones BALB-c. (A) Volumen tumoral y (B) Peso tumoral. Se trasplantó el tumor C4-HI a ratones hembra BALB-c. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 0.25 x 0.25 cm se comenzó a intoxicar los ratones por inyección i.p. con HCB (0.3, 3 ó 30 mg/kg p.c.) ó vehículo 3 veces por semana. Se midió el tamaño de los tumores tres veces por semana y al momento de la necropsia los tumores fueron fotografiados y pesados. (A) Los volúmenes tumorales fueron calculados con la fórmula $\pi DP^2/6$ donde D es el diámetro mayor y P es el diámetro perpendicular al mismo. Se graficó el volumen tumoral en función del tiempo. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos factores, seguido por el test de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*$p<0.05$; **$p<0.01$; ***$p< 0.001$). (B) En el panel de arriba se observan los pesos tumorales al momento de la necropsia, mientras que en el panel de abajo se observan fotografías representativas de tumores de ratones con los diferentes tratamientos. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*$p< 0.05$).

7.2. Acción del tóxico sobre los niveles de MMP2 y 9 en los tumores de mama C4-HI en ratones BALB-c

Observamos que el pesticida estimula el crecimiento de los tumores C4-HI en los ratones BALB-c. El siguiente paso fue estudiar si el HCB alteraba los niveles de las metaloproteasas 2 y 9 en dichos tumores. Muestras de los tumores de mama fueron congeladas en nitrógeno líquido al momento de la necropsia, y posteriormente se realizaron los homogenatos y se obtuvieron fracciones citosólcas y microsomales para analizar los niveles proteicos de MMP2 y 9 por inmunoblot. Nuestros resultados muestran que el pesticida no afecta la expresión de MMP2 en ninguna de las fracciones estudiadas **(Figura 46)**. Por otro lado, al evaluar los niveles proteicos de MMP9, encontramos un aumento significativo en dosis de HCB 30 mg/kg p.c., tanto en citosoles como en microsomas **(Figura 47)**. Estos resultados revelan que el pesticida (30 mg/kg p.c) estimula la expresión de MMP9, y quizás su secreción en los tumores de mama C4-HI, mientras que no produce cambios en la MMP2.



-Fig. 46. El HCB no modifica los niveles de MMP2 en tumores de mama C4-HI. Se trasplantó el tumor C4-HI a ratones hembra BALB-c. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 0.25 x 0.25 cm se comenzó a intoxicar los ratones por inyección i.p. con HCB (0.3, 3 ó 30 mg/kg p.c) ó vehículo 3 veces por semana. Al momento de la necropsia, los tumores mamarios fueron congelados y luego se realizó fraccionamiento subcelular. Las fracciones citosólicas y microsomales fueron resueltas por SDS-PAGE. Las membranas fueron incubadas con anticuerpo anti-MMP2 y luego reincubadas con anticuerpo anti-β Actina. Los niveles de MMP2 fueron relativizados a los niveles correspondientes de β Actina. Un experimento de inmunoblot representativo se muestra en el panel superior. La cuantificación de los niveles de MMP2 por densitometría óptica de tres experimentos independientes se muestra en el panel inferior. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey.

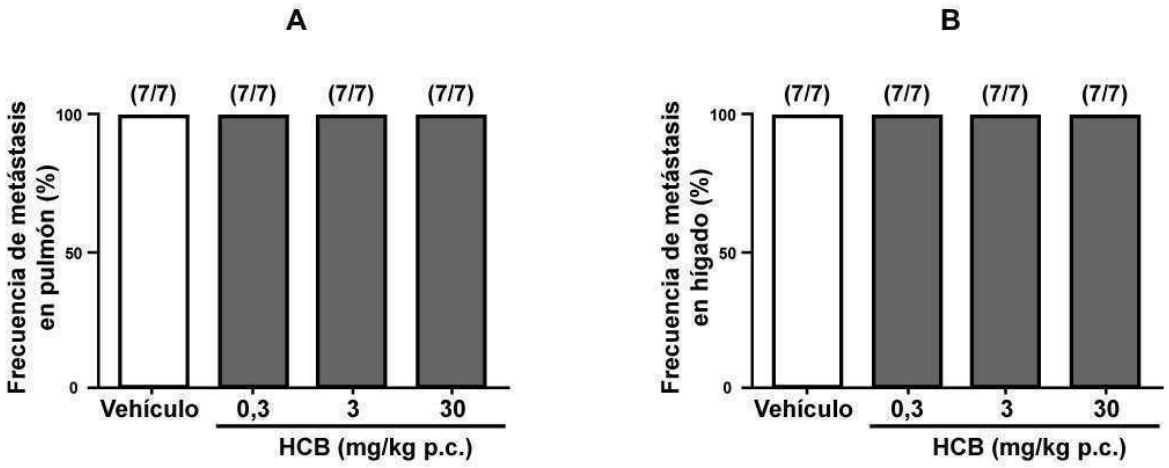


-Fig. 47. Aumento en los niveles de MMP9 inducidos por el pesticida en tumores de mama C4-HI. Se trasplantó el tumor C4-HI a ratones hembra BALB-c. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 0.25 x 0.25 cm se comenzó a intoxicar los ratones por inyección i.p. con HCB (0.3, 3 ó 30 mg/kg p.c.) ó vehículo 3 veces por semana. Al momento de la necropsia, los tumores mamarios fueron congelados y se realizó fraccionamiento subcelular. Las fracciones citosólicas y microsomales fueron resueltas por SDS-PAGE. Las membranas fueron incubadas con anticuerpo anti-MMP9 y reincubadas con anticuerpo anti-β Actina. Los niveles de MMP9 fueron relativizados a los niveles de β Actina correspondientes. Un experimento de inmunoblot representativo se muestra en el panel superior. La cuantificación de los niveles de MMP9 por densitometría óptica de tres experimentos independientes se muestra en el panel inferior. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*$p< 0.05$, **$p<0.01$).

7.3. Acción del HCB sobre la generación de micrometástasis a partir de tumores C4HI en ratones BALB-c

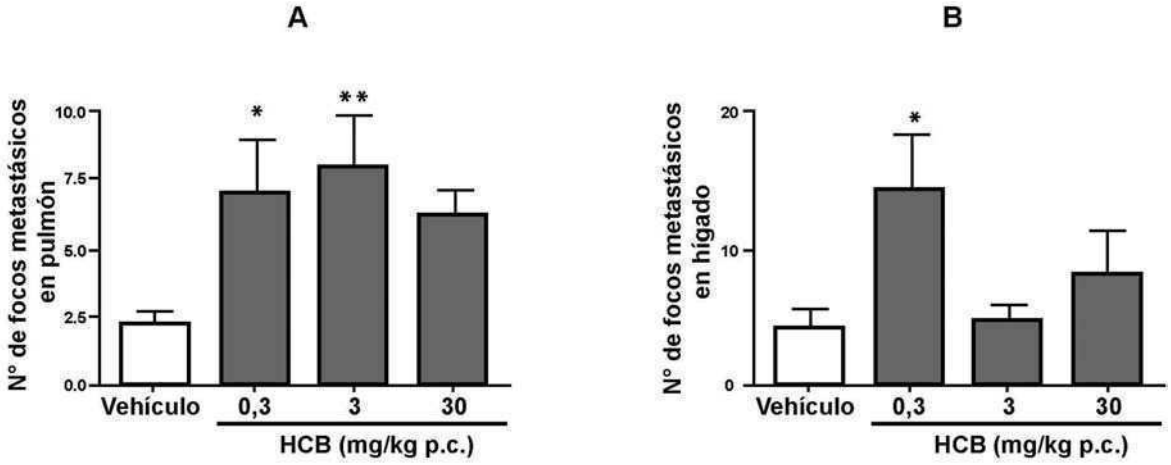
Finalmente, nos propusimos evaluar los efectos del HCB sobre la metástasis espontánea, en pulmón, ganglio linfático e hígado. Se analizó la aparición de focos metastáticos o micrometástasis en cortes semi-seriados de dichos tejidos bajo microscopio óptico.

En una primera etapa, estudiamos la frecuencia de animales que presentaban metástasis en los diferentes órganos analizados. Se observó que todos los animales presentaban micrometástasis tanto en pulmón (**Figura 48A**), como en hígado (**Figura 48B**). Sin embargo, no observamos micrometástasis en ganglio linfático axilar.



-**Fig. 48. Acción del HCB en la frecuencia de metástasis en hígado y pulmón en ratones BALB-c con tumores de mama C4-HI.** Frecuencia de animales que presentaron metástasis en pulmón (A) y en hígado (B) para el grupo control (vehículo) y los grupos tratados con HCB (0.3, 3 y 30 mg/kg p.c.). Se trasplantó el tumor C4-HI en ratones hembras BALB-c y cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 0.25 x 0.25 cm se comenzó con el protocolo de intoxicación según lo descripto en Materiales y Métodos. Aproximadamente, a los dos meses de iniciado el experimento los animales fueron sacrificados y los pulmones, ganglios linfáticos axilares e hígado fueron extraídos, fijados e incluidos. Se realizaron cortes semi-seriados de los tejidos, se tiñeron con H-E y se analizó la aparición de focos metastáticos o micrometástasis bajo microscopio óptico.

El hecho de haber obtenido mayores niveles de metástasis en este modelo singenéico respecto al modelo anterior de xenotrasplante, nos permitió analizar en una segunda etapa, el número de focos metastáticos presentes en los órganos en estudio (**Figura 49**). De esta manera advertimos que el pesticida incrementa el número de micrometástasis en pulmón en forma significativa en dosis de 0.3 y 3 mg/kg p.c., observándose un aumento no significativo en la dosis mayor ensayada (**Figura 49A**). A su vez, el tratamiento con HCB solo en dosis de 0.3 mg/kg p.c. incrementó el número de micrometástasis en hígado respecto al control (**Figura 49B**).



-Fig. 49. Análisis del número de focos metastásicos en hígado y pulmón en ratones BALB-c con tumores de mama C4-HI, tratados con HCB. Número de focos metástásicos presentes en pulmón (A) y en hígado (B) para el grupo control (vehículo) y los grupos tratados con HCB (0.3, 3 y 30 mg/kg p.c.). Se trasplantó el tumor C4-HI en ratones hembra BALB-c y cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 0.25 x 0.25 cm se comenzó con el protocolo de intoxicación según lo descripto en Materiales y Métodos. Aproximadamente, a los dos meses de iniciado el experimento los animales fueron sacrificados y los pulmones, el hígado y los ganglios linfáticos axilares fueron extraídos, fijados e incluidos. Se realizaron cortes semi-seriados de los tejidos, se tiñeron con H-E y se analizó la aparición de focos metastáticos o micrometástasis. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*$p< 0.05$, **$p<0.01$).

En la **Figura 50** se muestran fotos representativas de la estructura histológica de tumores primarios de mama C4-HI a diferentes aumentos (**Figura A y B**). En la **Figura 51** se puede observar la estructura histológica de un pulmón normal **(A)**, de un pulmón con metástasis proveniente de un animal inyectado con vehículo **(B)** y proveniente de un animal tratado con HCB **(C)**. Por otro lado, se muestran fotos representativas de la histología de un hígado normal **(D)**, así como de un hígado con metástasis proveniente de un animal inyectado con vehículo **(E)** y proveniente de un animal tratado con HCB **(F)**.

Estos resultados demuestran que el tratamiento con HCB de ratones BALB-c en el modelo de trasplante singenéico con la línea tumoral C4-HI, incrementa los niveles de micrometástasis en pulmón e hígado, dependiendo de la dosis de exposición. La dosis de HCB que genera un aumento en las metástasis en ambos tejidos fue la menor ensayada (0.3 mg/kg p.c.).

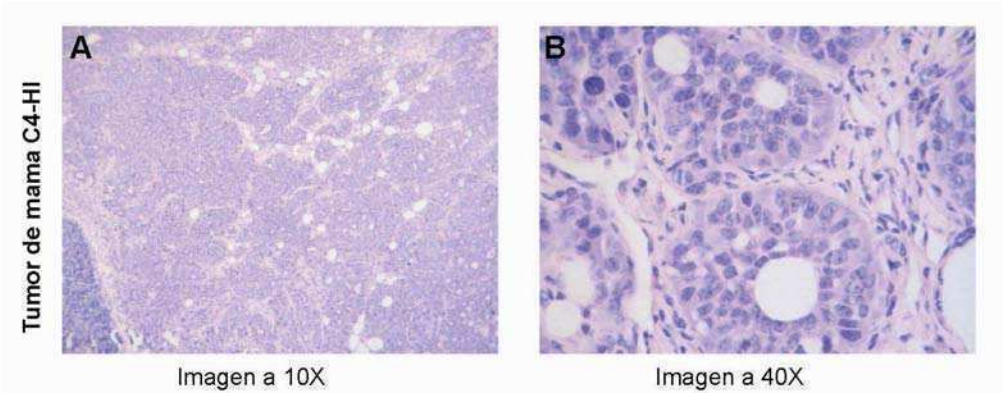


Fig. 50. Fotografías de tumor mamario C4-HI en ratones hembra BALB-c. Fotos representativas de la estructura histológica de un tumor de mama C4-HI. (A) Aumento 10x y (B) 40x. Se trasplantó el tumor C4-HI en ratones hembra BALB-c y cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 0.25 x 0.25 cm se comenzó con el protocolo de intoxicación según lo descripto en Materiales y Métodos. A los dos meses de iniciado el experimento, los animales fueron sacrificados y los tumores primarios fueron extraídos, una parte fue guardada en nitrógeno líquido para estudios de inmunoblot y otra porción fue fijada e incluida. Luego se realizaron cortes, se tiñeron con H-E y se observaron bajo microscopio óptico.

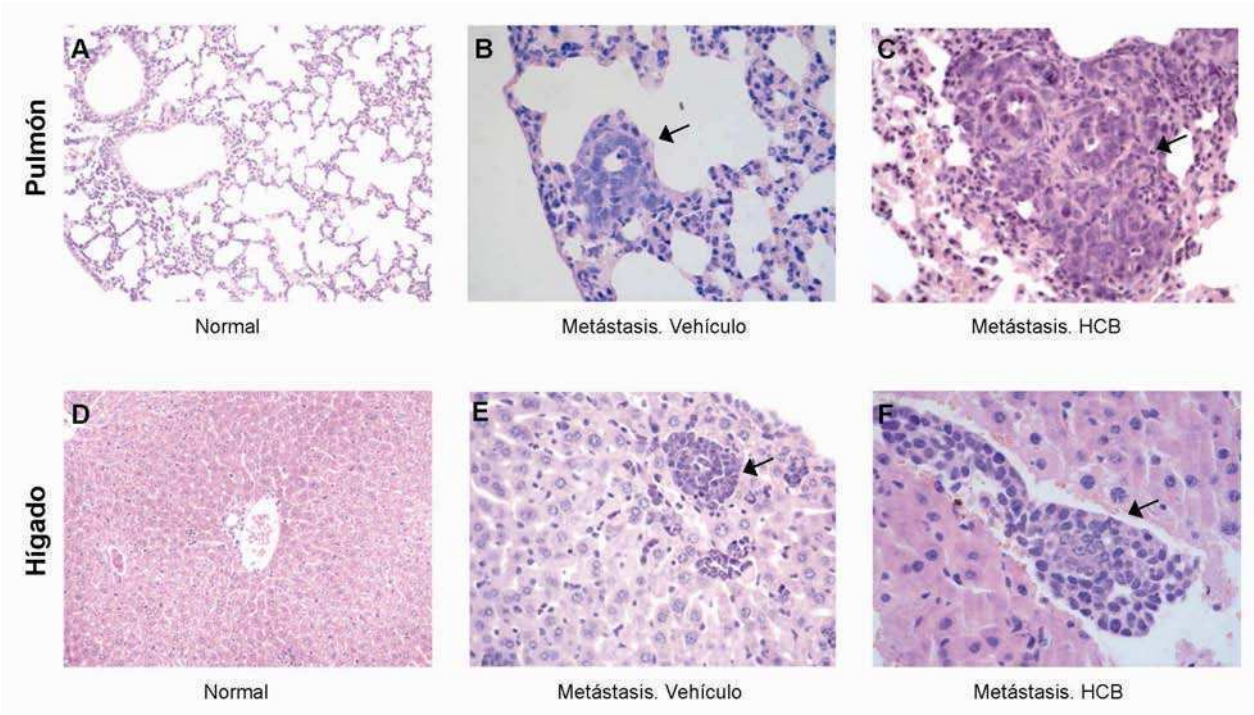


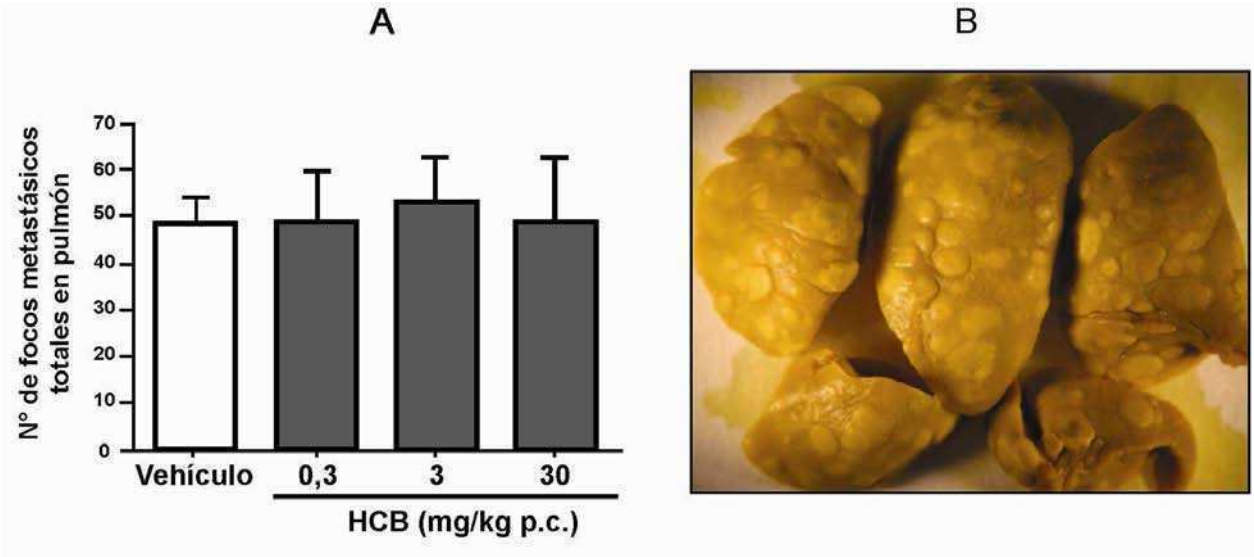
Fig. 51. Fotografías de metástasis en hígado y pulmón de ratones BALB-c con tumores de mama C4-HI. Fotos representativas de la estructura histológica de un pulmón normal (10x) (A), un pulmón con metástasis proveniente de un ratón inyectado con vehículo (40x) (B), y proveniente de un ratón tratado con HCB (40x) (C). Fotos representativas de la estructura histológica de un hígado normal (10x) (D), de un hígado con metástasis proveniente de un animal inyectado con vehículo (40x) (E), y proveniente de un animal tratado con HCB (40x) (F). Se trasplantó el tumor C4-HI a ratones hembra BALB-c y cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 0.25 x 0.25 cm se comenzó con el protocolo de intoxicación según lo descripto en Materiales y Métodos. Aproximadamente, a los dos meses de iniciado el experimento los animales fueron sacrificados y los pulmones, ganglios linfáticos axilares e hígados completos fueron fijados e incluidos. Se realizaron cortes semi-seriados de dicho material incluido y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina para evaluar la aparición de focos metastáticos o micrometástasis bajo microscopio óptico.

8. Modelo de metástasis experimental singenéico con células LM3 en ratones hembra BALB-c

Previamente, demostramos que el tóxico aumenta el número de focos metastásicos tanto en pulmón como en hígado, en un modelo de metástasis espontánea, trasplantando ortotópicamente los tumores de mama C4-HI en ratones BALB-c. A continuación, con el objetivo de seguir investigando sobre los efectos del tóxico en este proceso, elegimos un modelo de estudio de metástasis experimental en el cual se inocula la línea celular de adenocarcinoma mamario murino LM3 en la vena de la cola de ratones hembra BALB-c. Está descripto que las LM3 originan múltiples metástasis en pulmón (Carnevale et al., 2007).

Resumidamente, se inició el protocolo de intoxicación de los ratones una semana antes de ser inoculados en la vena de la cola con las LM3. Los ratones se inyectaron en forma intraperitoneal con HCB disuelto en aceite de maíz (0.3, 3 ó 30 mg/kg de p.c.) ó vehículo (aceite de maíz) 3 veces por semana. Seguidamente, los ratones fueron inoculados en la vena de la cola con las células LM3 ($5x10^4$). Una vez transcurridas tres semanas más con el tratamiento con el pesticida, los ratones fueron sacrificados y los pulmones fueron fijados. Este diseño experimental se pensó para asemejarlo a una situación de una población humana con un tiempo previo de exposición al pesticida. De ésta manera estaríamos evaluando como afecta el HCB al establecimiento y crecimiento de células tumorales en pulmones de organismos expuestos al tóxico.

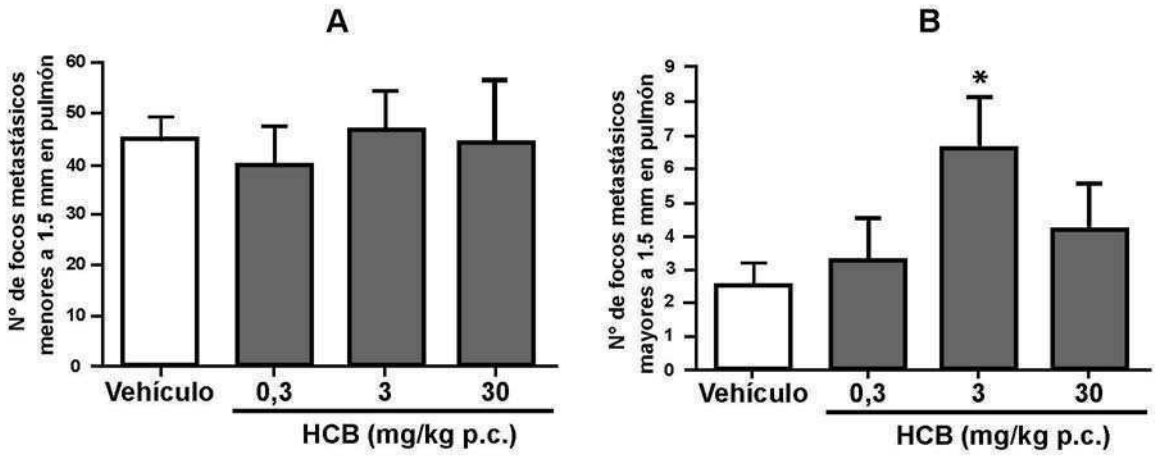
A diferencia de los ensayos anteriores, los pulmones presentaban macrometástasis visibles (**Figura 52B**). Esto nos permitió hacer un análisis del número de macrometástasis y determinar sus tamaños, al examinar los pulmones bajo lupa estereoscópica como se describe en Materiales y Métodos. Cuando se estudió el número de focos metastásicos totales presentes en este órgano, notamos que se obtuvieron niveles muy altos de los mismos y que no se observaban diferencias entre los distintos tratamientos (**Figura 52A**).



-Fig. 52. Efecto del HCB sobre el número de metástasis en pulmón, en un modelo de metástasis experimental. (A) Número de focos metastásicos totales presentes en pulmón para el grupo control (vehículo) y los grupos tratados con HCB (0.3, 3 y 30 mg/kg p.c.). (B) Foto representativa de las macrometástasis presentes en pulmón observadas bajo lupa estereoscópica. Los ratones hembra BALB-c fueron inyectados i.p. con HCB (0.3, 3 ó 30 mg/kg p.c.) ó vehículo 3 veces por semana. Al transcurrir una semana, las LM3 fueron inoculadas en la vena de la cola de los ratones y se continuó con la intoxicación durante 3 semanas más. Luego los animales fueron sacrificados y los pulmones se extrajeron y fijaron en Bovin. Se contaron el número de macrometástasis en dichos órganos utilizando una lupa estereoscópica. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey.

Sin embargo, al analizar el tamaño de los focos metastásicos, encontramos que el tratamiento de los ratones con HCB 3 mg/kg p.c. incrementa en forma significativa el número de focos metastásicos de mayor tamaño (con diámetros mayores a 1.5 mm) (**Figura 53B**). Por otro lado, el número de macrometástasis con diámetros menores de 1.5 mm no difieren significativamente entre los diferentes grupos (**Figura 53A**).

Estos resultados demuestran que el tratamiento con HCB (3 mg/kg p.c.) aumenta el tamaño de las metástasis desarrolladas en pulmón, en ratones BALB-c inoculados en la vena de la cola con la línea celular LM3.



-Fig. 53. El HCB incrementa el tamaño de las metástasis de pulmón en ratones BALB-c inoculados con la línea celular LM3 en la vena de la cola. (A) Número de focos metastásicos presentes en pulmón con diámetros menores a 1.5 mm ó (B) mayores a 1.5 mm para el grupo control (vehículo) y los grupos tratados con HCB (0.3, 3 y 30 mg/kg p.c.). Los ratones BALB-c fueron inoculados i.p. con las diferentes dosis de HCB ó vehículo 3 veces por semana. Al transcurrir una semana, las LM3 fueron inoculadas en la vena de la cola de los ratones y se continuó con la intoxicación durante 3 semanas más. Luego los animales fueron sacrificados y sus pulmones fueron extraídos y fijados en Bovin. Los pulmones fueron analizados bajo lupa estereoscópica. Se contaron el número de macrometástasis con tamaños menores y mayores a 1.5 mm de diámetro, según lo descripto en Materiales y Métodos. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*$p < 0.05$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

PARTE I

a) Acción del HCB en las vías de señalización de c-Src y HER1

Los compuestos organoclorados se degradan muy lentamente, son solubles en lípidos y se bioacumulan en la cadena trófica, pudiéndose encontrar en tejido adiposo humano (Muñoz de Toro et al., 2006), sí como en muestras de suero y leche materna. En un estudio epidemiológico realizado en nuestro país, se analizaron muestras de leche materna de puérperas, donde se hallaron como organoclorados más frecuentes el Dicloro Difenil dicloro Etileno (DDE), metabolito del Dicloro Difenil Dicloroetano (DDT) y el hexaclorobenceno (HCB) (Der Parsehian, 2008). Los niveles de compuestos organoclorados en los tejidos humanos, están asociados positivamente con la edad, como resultado de una exposición crónica. Debido a que se encontró que algunos compuestos organoclorados ejercen efectos estrogénicos o antiestrogénicos en ensayos *in vitro*, así como en animales de experimentación, se plantea una asociación entre la exposición a estos compuestos y el riesgo de cáncer de mama.

Con respecto al efecto del HCB en la incidencia de cáncer de mama en humanos, existen datos contradictorios. En algunos casos, se encontró una correlación positiva entre los niveles de HCB en suero y en tejido adiposo y la incidencia de cáncer de mama, y en otros no existió una asociación específica. En un estudio realizado por la IARC (2001), se observó que en mujeres post-menopáusicas existía una asociación significativa entre el contenido de HCB en tejido mamario y la presencia de tumores mamarios positivos para el REα. Por otra parte, Dewailly et al. (1994) demostraron que mujeres con adenocarcinomas mamarios presentaban niveles de HCB en suero y en tejido mamario significativamente mayores que aquellas con tumores mamarios benignos. Estudios más recientes encuentran una correlación positiva entre los niveles de HCB en suero y cáncer de mama (Charlier et el., 2004). De manera interesante, Charlier y Dejardin (2007) encontraron una fuerte asociación entre la incidencia de recidivas en cáncer de mama humano y altos niveles séricos de DDE y HCB. Es por contradicciones entre diferentes estudios epidemiológicos que el HCB se encuentra bajo la categoría de "probable carcinógeno humano" en la IARC (IARC, 2001).

La tumorigénesis ocurre frecuentemente como resultado de la sobreexpresión de proteínas que están involucradas en los procesos celulares normales. Ejemplos de ellas son la familia del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (HER1) y la quinasa de tirosina c-Src (Biscardi et al., 1999b; Ottenhoff-Kalff et al., 1992). Estas dos proteínas están sobreexpresadas en un alto porcentaje de tumores de mama de estadios tardíos, y se sabe que cooperan en la formación y progresión tumoral (Biscardi et al., 1999a). Está reportado que algunos tóxicos ambientales pueden causar la activación incrementada y prolongada de vías de señalización intracelular asociadas a los receptores de factores de crecimiento que contribuyen al desarrollo de cánceres

epiteliales (Rho et al., 2010). El receptor HER1, y específicamente su fosforilación en la Y845 por c-Src, parece tener un rol importante en mediar la respuesta celular a un gran número de señales externas (Biscardi et al., 1999a). Por otro lado, existe un interés particular en estudiar la función de la quinasa c-Src en el mecanismo de acción tóxica de las dioxinas, debido a que otros autores han encontrado que la TCDD estimula a ésta quinasa en diferentes tipos celulares (Matsumura 1994). A su vez, Mazina et al., (2004) encontraron que el tratamiento con esta dioxina de la línea celular epitelial de mama normal MCF-10 causa una rápida activación de la c-Src a los 30 minutos.

En la primera parte de este trabajo, nos propusimos estudiar, en la línea celular MDA-MB-231, los efectos del HCB en la activación de c-Src y HER1, así como de STAT5b, ERK1/2 y Akt, tres vías de señalización "downstream". La dosis más alta de HCB (5 μM) utilizada en este trabajo está en el mismo orden que las concentraciones del pesticida encontradas en sueros humanos de poblaciones altamente contaminadas (To-Figueras et al., 1997). Estudios previos muestran que cuando c-Src y HER1 se sobreexpresan, la quinasa de tirosina c-Src se une físicamente al HER1, fosforilándolo en su Y845 (Tice et al., 1999). En nuestro trabajo observamos que el HCB incrementa los niveles de fosforilación en Y416-c-Src y en Y845-HER1 a tiempos muy cortos de exposición (5-30 min), y que estos efectos son dosis dependientes. Nuestros resultados de ensayos con inhibidores indican que la actividad de quinasa de c-Src es indispensable para la fosforilación en Y845 del HER1 inducida por el tóxico. De manera similar, en estudios recientes de nuestro laboratorio demostramos que el HCB estimula la fosforilación de c-Src y la proliferación celular en la línea de cáncer de mama humano MCF-7 (+REα) (García et al., 2010). Además, observamos que el pesticida aumenta la activación de c-Src y la fosforilación en Y845-HER1, así como la asociación física entre ambas moléculas en glándula mamaria y en tumores inducidos por NMU en ratas (Peña et al., 2012).

Por otro lado, en trabajos desarrollados en nuestro laboratorio previamente, mostramos que en hígado de ratas hembra intoxicadas con HCB (1 y 10 mg/kg p.c.), así como en la línea celular de hígado normal de rata WBF-344 expuestas al HCB (0.05 y 0.5 μM), se incrementa la interacción física entre c-Src y HER1, además de la fosforilación en Y845-HER1 (Randi et al., 2008).

Un gran número de reportes ponen en evidencia el rol de la c-Src en la fosforilación de STAT5b (Kloth et al., 2003). Se cree que la activación de c-Src es necesaria para la máxima actividad transcripcional de STAT5b inducida por EGF, y que la fosforilación en Y845 de HER1 es esencial tanto para la asociación de HER1 con STAT5b, como para la fosforilación de STAT5b (Biscardi et al., 1999a). Observamos recientemente, en ratas tratadas con el pesticida, un aumento en la fosforilación de Y699-STAT5b y en su translocación al núcleo tanto en glándula mamaria como en tumores inducidos por NMU (Peña et al, 2012). En el presente trabajo, mostramos que se incrementa rápidamente la fosforilación de la STAT5b con la exposición al HCB, coincidiendo esto con los tiempos de activación de c-Src y de fosforilación en Y845-HER1 (5, 15 y 30 minutos) estimulados por el pesticida. En los ensayos en función de la dosis, observamos que el

tóxico incrementa la actividad de STAT5b, c-Src y la fosforilación en Y845-HER1 en las mismas dosis ensayadas (0.05, 0.5 y 5 μM). A su vez, mostramos que tanto c-Src como HER1 están involucrados en la activación de STAT5b inducida por el HCB en estudios en presencia de inhibidores específicos. Todos estos resultados demuestran que el pesticida induce la vía de transducción de señales c-Src/HER1/STAT5b en la línea celular MDA-MB-231. De manera similar, otros autores han encontrado que las quinonas del benzo(a)pireno incrementan la fosforilación de Y699-STAT5b así como la translocación nuclear en células epiteliales mamarias humanas MCF-10A (Rodríguez-Fragoso et al., 2009). Por otro lado, Riggins et al., (2006) han desarrollado un estudio muy interesante en cáncer de mama, donde demuestran que el camino de señalización Cas/c-Src/EGFR/STAT5b es el principal regulador del crecimiento y sobrevida de células de cáncer de mama resistentes a la terapia con tamoxifeno.

Nuestros resultados indican que el HCB induce la fosforilación de ERK1/2 a tiempos cortos de exposición. Por otro lado, es interesante remarcar que tanto los niveles de p-ERK1/2 como los de HER1 fosforilado en tirosina total, incrementan en función del aumento de la dosis de exposición. En un estudio reciente demostramos que el HCB aumenta la fosforilación y translocación al núcleo de ERK1/2 en glándula mamaria, pero la disminuye en tumores mamarios inducidos por NMU en rata (Peña et al, 2012). Asimismo, Bulayeva y Watson (2004), encontraron que los compuestos organoclorados DDE y dieldrin, inducían la fosforilación del ERK1/2 en forma dosis-dependiente en la línea celular de prolactinoma GH3/B6/F10. En un estudio en células epiteliales de mama MCF-10A expuestas a quinonas del benzo(a)pireno, Burdick et al., (2003) observaron una estimulación en las actividades de HER1 y ERK1/2 lo cual produjo un aumento en el número de células en ausencia de EGF. Por otro lado nuestros resultados muestran que el EGF y el HCB activan a ERK1/2 con patrones similares en los tiempos de exposición, sugiriendo que el HER1 estaría involucrado en el mecanismo de acción del pesticida. Al respecto, en ensayos con inhibidores observamos que la fosforilación de ERK1/2 depende únicamente de la actividad de HER1. Acorde con estos hallazgos, Tice et al. (1999) encontraron que la fosforilación en Y845 del HER1 ejerce una baja contribución a la capacidad de HER1 de activar ERK1/2 en células de cáncer de mama, implicando que la c-Src no estaría involucrada en la activación de esta vía. En resumen, nuestros resultados demuestran claramente que el pesticida estimula la vía de señalización HER1/ERK1/2 en la línea celular MDA-MB-231.

Respecto a la fosforilación de Akt2, encontramos que el tóxico no altera dicho parámetro en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Sin embargo, en un estudio reciente de nuestro laboratorio, observamos que el pesticida aumenta la fosforilación en T308-Akt en muestras de tumores mamarios inducidos por NMU en rata, sin encontrar cambios en glándula mamaria (Peña et al, 2012). Otros autores mostraron que el HCB incrementa los niveles de Akt en hígado de rata (Plante et al., 2005). Burdick et al., (2003) observaron una aumento en la actividad de Akt en células MCF-10A por exposición a quinonas del benzo(a)pireno. Existen estudios que demuestran que la actividad de Akt bloquea eficientemente tanto la migración como

la invasión en células de cáncer de mama que expresan una Akt constitutivamente activa (Yoeli-Lerner et al., 2005). Contrariamente, está reportado que particularmente Akt2 está involucrada en la migración celular basal en MDA-MB-231 (Wang et al., 2008; Liu et al., 2009). Sorprendentemente, a pesar de que el tóxico induce migración, en este trabajo no encontramos un estímulo en la fosforilación de T308-Akt. Esto no contradice el estudio antes mencionado ya que en el mismo se demuestra que Akt2 cumple un rol esencial en la migración basal de esta línea celular, pudiendo a pesar de ello no estar implicada en el mecanismo de acción del pesticida.

El HCB es un ligando débil del RHA (Hahn et al., 1989), y por ende podría desencadenar efectos dependientes e independientes del receptor. Ha sido propuesto que el RHA al unirse a sus ligandos puede afectar funciones celulares porque activa quinasas como c-Src. Cuando el RHA se une a sus ligandos, la c-Src se disocia del complejo citosólico original y actúa como un elemento co-transductor de vías de señalización que se activan a partir de receptores de factores de crecimiento, como el HER1 (Kohle et al., 1999). Es por ello que las interacciones entre el RHA, c-Src y HER1 pueden representar uno de los caminos de señalización iniciales más importantes asociadas a la toxicidad de las dioxinas (Haarman-Stemmann et al., 2009).

En nuestro trabajo, demostramos que el HCB (0.05 y 5 μM) induce la fosforilación de STAT5b a través de su unión al RHA, ya que al pretratar con 4,7-PHE ó α-NF, dos antagonistas estructuralmente no relacionados del receptor, se previene este efecto. Proponemos que el tóxico, luego de unirse al RHA, podría estimular la actividad de la c-Src y su posterior translocación a la membrana celular, donde fosforilaría al HER1 en su Y845 llevando a la activación de STAT5b (**Modelos propuestos 1: Vía de Señalización 1**).

Por otro lado, nuestros resultados muestran que el HCB solamente en la dosis de 5 μM estimula la activación de ERK1/2 a través de un mecanismo dependiente del RHA (**Modelos propuestos 1: Vía de Señalización 2A**). Una posibilidad es que cuando el HCB se encuentra en concentraciones altas pueda activar al RHA, produciendo un incremento de los niveles intracelulares de AMPc por un mecanismo desconocido, que llevaría a la activación de la PKA que podría mediar indirectamente la fosforilación del HER1, como han sugerido previamente Haarmann-Stemmann et al. (2009). De manera diferente, observamos que el efecto estimulatorio del HCB en dosis de 0.05 μM sobre la fosforilación del ERK1/2 fue independiente del RHA, sugiriendo que el tóxico en bajas concentraciones activaría al HER1 por otro mecanismo (**Modelos propuestos 1: Vía de Señalización 2B**). Se reportó que el HCB, TCDD y otros compuestos aromáticos polihalogenados inducen estrés oxidativo en líneas celulares de cáncer de mama (Lin et al., 2007), así como en otros tejidos (Kopf y Walker, 2010; Park et al., 1996). Entonces, podemos hipotetizar que la activación del HER1 inducida a dosis bajas del pesticida estaría mediada por un aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS) como reportan otros autores (Chen et al., 2007). Respecto a este tema, se demostró que los ROS pueden activar varios receptores con actividad de quinasa de tirosina (Martindale y Holbrook, 2002). En un primer momento, se postuló que la activación del HER1 por H_2O_2 ocurría por una inhibición de la fosfatasa de tirosina que desfosforila al receptor (Knebel et al., 1996). Sin embargo, reportes más

recientes indican que la activación del HER1 por H_2O_2 puede ocurrir a través del clivaje de EGF-HB dependiente de metaloproteasas en células musculares lisas vasculares (Frank et al., 2000).

La dosis más baja efectiva (0.05 μM) utilizada en este trabajo para analizar los efectos del HCB en las vías de señalización en estudio, demuestra que muchos de los niveles de contaminantes ambientales considerados previamente subtóxicos pueden ejercer efectos disruptivos significativos en la señalización intracelular y en consecuencia, en diversas funciones celulares.

Por otro lado hemos determinado por RT-PCR que el HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) no estimula la transcripción del CYP1A1, un gen cuya expresión es inducida por ligandos del RHA en la línea celular MDA-MB-231 (Döhr et al., 1995). En el presente estudio, hemos probado que el HCB activa las vías de transducción de señales de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2 a tiempos cortos de exposición y que las mismas dependen de la unión del tóxico al RHA. Todos estos resultados sugieren que el mecanismo de acción del HCB en la activación de dichas vías podría involucrar efectos no genómicos del RHA, fundamentalmente debido a que la estimulación de las mismas ocurre a tiempos cortos. De manera similar, Park et al. (2004) encontraron que la TCDD inducía la activación de c-Src y de ERK1/2 a los 15 minutos de exposición, sin observar inducción del CYP1A1 en la línea celular de mama humana MCF10A. Sin embargo, hemos observado anteriormente en trabajos de nuestro laboratorio, que el HCB a dosis de 0.5 y 5 μM estimula la expresión del CYP1A1 en células de cáncer de mama MCF-7 (García et al, 2010).

b) <u>Efecto del HCB en la migración celular</u>

Estudios previos de nuestro laboratorio, demuestran que el HCB induce proliferación celular y la vía de señalización de IGFs, de manera dependiente del REα en la línea celular MCF-7 (García et al., 2010). Sin embargo, al tratar las MDA-MB-231 con el pesticida, no se observó efecto alguno sobre la proliferación celular, a pesar de evidenciarse la activación de la vía de IGFs (García, 2008). Este comportamiento podría deberse a que las MDA-MB-231 tienen un fenotipo más agresivo, y basalmente muestran una tasa de proliferación alta. De manera similar a nuestros resultados, Price et al., (1999) encontraron que las MDA-MB-231 presentaban una falta de respuesta proliferativa al estímulo con EGF. Por otro lado, se ha reportado que la vía de señalización de IGFs en tumores independientes de hormonas y en líneas celulares con fenotipo maligno, participa en procesos asociados a la progresión tumoral, como la migración celular (Bartucci et al., 2001). Es por ello que nos planteamos estudiar si el HCB estaría alterando la migración en dicha línea celular. Con ese fin llevamos a cabo dos tipos de experimentos, el ensayo de la herida y el ensayo del transwell.

En el ensayo de la herida, observamos que el pesticida induce un aumento en la migración a todas las dosis excepto a la dosis más baja (0.005 μM). Sin embargo, cuando evaluamos este proceso a partir del ensayo del transwell, nos sorprendió que solo el HCB en dosis de 5 μM incrementa la migración. La razón por la cual se da esta diferencia en respuesta a las distintas dosis del tóxico

no es comprendida del todo hasta el momento. Podría deberse a que ambos ensayos a pesar de medir la capacidad migratoria de las células impliquen mecanismos diferentes. El ensayo del transwell, a diferencia del de la herida, implica migración por quimiotaxis, donde se encuentran involucradas moléculas solubles llamadas quimiokinas, que se unen a receptores de quimiokinas presentes en células tumorales. Varios grupos de investigadores encontraron que CXCR4 (receptor de quimiokina) y su ligando CXCL12 (quimiokina) pueden promover migración e invasión en células de cáncer de mama (Fernandis et al, 2004). Mitsui et al (2011) observaron que la exposición de fetos de ratones a la TCDD inducía la expresión de quimiokinas. Existe un gran número de evidencias que muestra que los compuestos organoclorados estimulan la migración celular. Zou y Matsumura (2003), han demostrado que la exposición a largo plazo de las MCF-7 con β-Hexaclorociclohexano promueve la transformación y la migración. A su vez, se encontró que la TCDD induce migración en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 por la vía de señalización de NFATc1/ATX (Seifert et al., 2009).

Previamente se ha demostrado que la sobreexpresión de HER1 y c-Src desencadena un programa de señalización que lleva a la hiperproliferación, la pérdida de polaridad, un marcado incremento en la migración e invasión y al crecimiento independiente de anclaje (Dimri et al., 2007). A su vez, reportes anteriores han indicado que los niveles elevados de c-Src en células de cáncer de mama que expresan HER1 promueven la migración celular (Toker y Yoeli-Lerner, 2006). La actividad catalítica de c-Src inicia vías de transducción de señales intracelulares que alteran el crecimiento y la fuerza de adhesión celular, contribuyendo este último al control de la migración. De manera interesante, nuestros resultados en presencia de inhibidores específicos, muestran que la migración inducida por el tóxico (5 μM) depende tanto de la actividad de c-Src como de HER1. Existen numerosas evidencias que sostienen la hipótesis de que la interacción c-Src/HER1 contribuye a la progresión tumoral afectando la migración, invasión o metástasis en tipos celulares de estadíos tardíos en cáncer de mama (Biscardi et al., 1998). La fosforilación en Y925-FAK por c-Src modifica su interacción con otras proteínas y es crítica para la promoción de la migración (Westhoff et al., 2004). González et al., (2006) generaron una línea celular MCF-7 con c-Src dominante negativa, que presenta una disminución en la adhesión, así como en la migración. Dimri et al., (2007) observaron que en líneas celulares de epitelio mamario normal, la sobreexpresión de c-Src aumentó significativamente la capacidad del HER1 para inducir migración, invasión y crecimiento independiente de anclaje en agar blando. La actividad elevada de c-Src promueve la invasión y motilidad en células MCF-7 resistentes al tamoxifeno (Hiscox et al., 2007). Por otro lado, se ha demostrado previamente que el HER1 está involucrado en la migración tanto en células normales como tumorales, incluyendo células de mama epiteliales normales y tumorales como las MDA-MB-231 (Price et al., 1999; Matthay et al., 1993).

Si bien no analizamos la migración inducida por el tóxico inhibiendo en forma directa la STAT5b, al inhibir la c-Src y el HER1 se inhiben las vías downstream activadas por éstas. Al respecto, también hemos observado que la migración inducida por el pesticida depende de la actividad de ERK1/2 (resultados no mostrados en la tesis). Entonces, como la migración celular incrementada por el HCB involucra la actividad de c-Src, HER1 y ERK1/2, podemos hipotetizar

que la STAT5b estaría participando de este proceso. Estudios de Bernaciak et al., (2009) encontraron que al bloquear la expresión de STAT5b inhiben la migración de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-549. En dicho trabajo, se propone que la STAT5b podría actuar como molécula adaptadora, usando sus dominios SH2 para unir proteínas fosforiladas en tirosina en el citosol, y de esa manera direccionar la migración celular. Por otro lado, existe evidencia sustancial que demuestra que el ERK1/2 cumple un rol importante en la progresión tumoral en cáncer de mama, estando involucrados en procesos como la migración e invasión celular (Whyte et al., 2009).

No se conoce aún con claridad cómo los compuestos organoclorados podrían alterar la migración celular. La contribución del RHA a los procesos que involucran interacciones célula-célula y sustrato-célula, migración y metástasis, están siendo evaluados recientemente, y varios laboratorios están analizando a qué nivel interactúa el RHA en estos caminos de señalización. Mulero Navarro et al., (2005) mostraron que fibroblastos mamarios inmortalizados de ratones nulos para el RHA, presentaban una disminución en la migración en cultivo. Los caminos de señalización que regulan la migración celular se encontraron disminuidos en células nulas para el RHA, en las que se encontró baja activación de FAK, PKB/Akt, ERK1/2 y Rac-1. En nuestro trabajo demostramos que la migración incrementada por el HCB (5 μM) en la línea celular MDA-MB-231 depende de la unión del tóxico al RHA, ya que al pretratar con un antagonista del receptor como la 4,7-PHE, se bloqueaba este efecto del pesticida. Por otra parte, Peng et al., (2009) encontraron que la TCDD induce la migración e invasión a través del RHA en células de cáncer gástrico *in vitro*. Otros investigadores, observaron que la TCDD aumenta la migración celular dependiente de RHA en MCF-7 (Diry et al., 2006), y que esta inducción de la migración se desencadenaba por la vía NFAT/ATX (Seifert et al., 2009).

En conclusión, en la etapa inicial del presente trabajo, demostramos por primera vez que el HCB activa las vías de transducción de señales de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2, así como la migración en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231, *in vitro*. A su vez, observamos que la activación de las vías en estudio está mediada por la unión del tóxico al RHA, dependiendo de la dosis ensayada. Finalmente, evidenciamos que la c-Src, HER1 y RHA median la migración celular incrementada por el pesticida.

PARTE II

a) El HCB estimula la expresión, secreción y actividad de metaloproteasas

En la segunda etapa de nuestro trabajo, nos propusimos estudiar si el HCB altera los procesos de invasión celular y metástasis. Para ello, comenzamos estudiando el mecanismo de acción del pesticida sobre las metaloproteasas 2 y 9 en la línea celular MDA-MB-231, *in vitro*. Las MMPs son una familia de enzimas proteolíticas constituida por 23 miembros diferentes que degradan los componentes de la matriz extracelular y otros sustratos. En la invasión tumoral y la metástasis las MMPs juegan un rol esencial ya que al destruir la ME y la membrana basal permiten la migración e invasión celular (Brinckerhoff et al., 2002).

Al estudiar los efectos del HCB sobre la MMP9*,* observamos que el tóxico induce un incremento de la secreción al medio extracelular y de su actividad, en función de la dosis de exposición, sin alterar así los niveles de ésta proteína en el lisado celular. Acorde con esto, mostramos un aumento en los niveles de expresión de ARN mensajero de MMP9 en todas las dosis ensayadas. Estas observaciones nos indican que el pesticida estimula la expresión, secreción y actividad de MMP9 en la línea celular MDA-MB-231.

Por otro lado al analizar la MMP2, demostramos que el tóxico induce la expresión de esta enzima, revelándose un aumento tanto a nivel proteico como de ARNm, en función de la dosis de tratamiento con HCB, siendo significativo a dosis de 0.5 y 5 μM.

Está reportado que los genes que codifican para las metaloproteasas pueden ser regulados por los factores de transcripción AP1 y NFκB (Pendas et al., 1997; Bond et al., 1998). De esta manera, las MMPs están reguladas por una gran variedad de estímulos que desencadenan vías de señalización intracelulares que activan a dichos factores transcripcionales. Existen numerosos trabajos que demuestran que las vías de señalización activadas por la quinasa c-Src y por el receptor HER1 inducen la expresión, secreción o actividad de MMP9 y 2 (Soto-Guzman et al., 2010; Chiang-Wen et al., 2007; Frame 2004; Kuo et al., 2006; Kim et al., 2009).

Nuestros resultados de los ensayos en presencia de inhibidores específicos, muestran que el aumento en la secreción y actividad de la MMP9 depende únicamente del HER1. Respecto a esto, el incremento dosis dependiente aquí observado para la MMP9, coincide con el descripto previamente para la activación de la vía de HER1/ERK1/2 reportada en la primer parte de este trabajo. Por otro lado, demostramos en experimentos con inhibidores, que tanto la c-Src como el HER1 juegan un rol importante en la expresión de MMP2 inducida por el pesticida. Si bien no realizamos ensayos inhibiendo directamente ERK1/2 o STAT5b, podemos asumir que al inhibir c-Src ó HER1 se estarían bloqueando las vías "downstream" estimuladas por el pesticida. De esta manera podríamos especular que el HCB estaría estimulando la expresión, secreción y actividad de MMP9 al incrementar la vía de HER1/ERK1/2; mientras que induciría un aumento en los niveles de MMP2 al estimular la vía c-Src/HER1/STAT5b.

Esta bien documentada la implicancia de ERK1/2 en la inducción de la expresión de las MMPs, ya que esta quinasa desencadena la transcripción génica vía AP-1 (Arai et al., 2003; Eberhardt et

al., 2000; Moon et al., 2004; Luo et al., 2009; McCawley et al., 1999). Este podría ser un posible mecanismo por el cuál el tóxico estaría induciendo la expresión de MMP9, llevando consecuentemente a un aumento ulterior de la secreción y actividad. Por otro lado no se ha descripto hasta el momento funciones del STAT5b asociadas en forma directa a la expresión de MMPs. Sin embargo, el STAT5b activado por el HCB podría inducir la expresión de c-Fos, componente del factor de transcripción AP-1, llevando esto consecuentemente a la inducción transcripcional de la MMP2, como han propuesto previamente Catterall et al. (2001). Otra posibilidad, es que el STAT5b induzca la transcripción de IGF-I, estimulándose el Receptor de IGF-I (RIGF-I) que desencadenaría la activación de AP-1 implicado en la regulación de la expresión de las MMPs. Woelfle et al. (2003) identificaron un sitio de unión para STAT5b en el promotor de IGF-I. Particularmente en las MDA-MB-231, Lim et al. (2010) han demostrado que en condiciones de hipoxia el STAT5b se activa e induce la expresión de IGF-I. Consistente con la idea aquí propuesta, previamente en nuestro laboratorio observamos que el HCB incrementa la actividad del RIGF-I y del Receptor de Insulina en las MDA-MB-231 (García, 2008).

Estudios recientes sugieren que el RHA puede modular la expresión y actividad de las metaloproteasas y consecuentemente alterar la motilidad e invasividad celular (Hillegass et al. 2006; Kung et al., 2009). Villano et al., (2006) reportaron que el camino del RHA activado por la TCDD contribuyó a la progresión del melanoma, al estimular la expresión y actividad de MMP1, MMP2 y MMP9, así como la invasión celular. Ishida et al., (2010) observaron que la TCDD a través de su unión al RHA aumenta los niveles de ARNm de MMP1 y MMP9 llevando a un incremento de la invasión en células de carcinoma uretral T24. A su vez, otros estudios demuestran que el benzopireno induce la expresión de MMP1, 2, 3 y 9, como la migración e invasión de manera dependiente del RHA en células de la musculatura lisa vascular (Meng et al., 2009). Tie-Li et al. (2009) revelaron que la TCDD se une al RHA incrementando la invasión de células de cáncer gástrico a través de la inducción de MMP9 dependiente de c-Jun.

En el presente estudio comprobamos fehacientemente que tanto la secreción y actividad de MMP9 como la expresión de MMP2 inducidas al tratar las MDA-MB-231 con 5 μM de HCB están mediadas por la unión del pesticida al RHA.

b) <u>Acción del HCB en la invasión celular *in vitro* y en el crecimiento tumoral y metástasis *in vivo*</u>

La alta frecuencia con la cual se observa expresión y/ó actividad elevada de c-Src en una gran variedad de cánceres epiteliales (Biscardi et al., 1999b) sugiere fuertemente que esta proteína facilita la progresión maligna. Existe evidencia convincente respecto a que la actividad de c-Src controla la adhesión y migración celular. Se ha reportado que células que expresaban una quinasa c-Src defectuosa presentaban mayores niveles de adhesión focal y una migración celular suprimida (Fincham y Frame, 1998). A su vez, células derivadas de un embrión que no expresaba c-Src, mostraban un impedimento en la migración dependiente de integrinas (Klinghoffer et al.,

1999). Por otro lado, la c-Src es un regulador positivo de la dispersión celular que ocurre durante la TEM asociada a la progresión tumoral. La dispersión de las células cancerosas se produce cuando las mismas se liberan de la rigidez establecida por sus uniones con las células epiteliales vecinas. La dispersión de las células tumorales es inducida frecuentemente por factores de crecimiento migratorios como el EGF. Por otro lado, se ha demostrado en un modelo de progresión tumoral colorectal humano (Williams et al., 1990) que la cooperación entre c-Src y HER1 promueve la transición del adenoma (benigno) al carcinoma (maligno) (Brunton et al., 1997). En estas células de carcinoma de colon, el EGF estimula la invasión celular *in vitro,* y esto se ve acompañado por la activación de c-Src y su redistribución en la periferia celular (Brunton et al., 1997). Otros estudios revelan que la interacción entre c-Src y HER1 en cáncer de colon está asociada a un alto potencial metastásico (Mao et al., 1997). Todos estos hallazgos, sugieren que uno de los roles más importantes de la c-Src es cooperar con receptores de factores de crecimiento activos para inducir los cambios en la adhesión celular y reestructuración del citoesqueleto de actina asociados a la invasión y metástasis.

En la mayoría de los tumores epiteliales la función del HER1 está desregulada, y la señalización de este receptor juega un papel fundamental tanto en la progresión del cáncer como en la TEM. Se demostró que el EGF promueve la migración e invasión celular, en parte por la desfosforilación e inactivación de la quinasa de adhesión focal (FAK) (Price et al., 1996; Shibata et al. 1996; Lu et al., 2001). El tratamiento con EGF de células tumorales que sobreexpresan HER1 también disminuye los niveles de caveolina 1, que lleva a una pérdida de la cadherina E, la activación transcripcional de β-catenina y a un incremento de la invasión celular (Lu et al., 2003). A su vez, se ha reportado que formas constitutivamente activas de HER1 pueden incrementar la motilidad e invasividad de células tumorales y que inhibidores del mismo bloquean estos procesos (Cole et al., 2005; Lal et al., 2002; Seton-Rogers et al., 2004; Mateus et al., 2007). En resumen, existe evidencia suficiente que demuestra que el HER1 está involucrado en la invasión celular y metástasis en diversos cánceres de origen epitelial.

En el presente estudio demostramos que el HCB aumenta significativamente la invasión celular a través de c-Src, HER1 y del RHA. Inicialmente demostramos que el HCB (5 μM) se une al RHA y estimula las vías de señalización de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2. Todo esto nos lleva a plantear que el HCB (5 μM) se uniría al RHA y estimularía, por un lado la vía de HER1/ERK1/2 llevando a la posterior expresión, secreción, y activación de MMP9 (**Modelos propuestos 2: Vía Señalización 2**); y por otro a la vía de c-Src/HER1/STAT5b desencadenando la expresión de MMP2 (**Modelos propuestos 2: Vía de Señalización 1**). Finalmente esto conduciría a la invasión celular de las MDA-MB-231 expuestas al pesticida. Estudios posteriores, bloqueando los efectos del tóxico sobre las MMP2 y 9 deberán realizarse para confirmar la implicancia de la actividad de dichas enzimas en la invasión estimulada por el HCB.

Con el fin de continuar analizando los efectos del pesticida sobre la progresión tumoral en cáncer de mama nos propusimos evaluar su acción en ensayos *in vivo*. Para ello, utilizamos dosis del

pesticida similares a las que previamente habían tenido un efecto androgénico en próstata de ratones (Ralph et al., 2003). Entonces, nos propusimos utilizar un modelo de xenotransplante con las MDA-MB-231 en ratones BALB-c atímicos, en el cual observamos que el HCB estimula el crecimiento tumoral primario, en forma significativa en dosis de 0.3 y 3 mg/kg p.c. Acorde con los resultados obtenidos *in vitro*, demostramos que el tratamiento con el pesticida (0.3, 3 y 30 mg/kg p.c) incrementa la fosforilación en Y416-c-Src, Y845-HER1, ERK1/2 y Y699-STAT5b y los niveles de proteína de MMP2 y 9 en los tumores derivados de las MDA-MB-231. A pesar de que se acepta que las MMPs están especialmente implicadas en el proceso metastásico dado que degradan proteínas estructurales de la ME, otros autores sugieren que estas enzimas además tienen una función más compleja en la formación del tumor, desarrollo y progresión específicamente a través de la regulación del crecimiento, de la apoptosis y angiogénesis (Manes et al., 1997; Levi et al., 1996; Stetler-Stevenson 1999). Por ende, podríamos especular que la acción del HCB sobre el volumen tumoral podría estar mediada por las MMPs. Sin embargo, no logra comprenderse con claridad el hecho de que los ratones tratados con HCB 30 mg/kg p.c. no muestren un efecto significativo en el crecimiento tumoral, a pesar de observarse un incremento en los niveles proteicos de las MMPs. Quizás a esta dosis el pesticida, además de activar las vías en estudio y de aumentar la expresión de las MMPs, desencadene otras vías de señalización que conduzcan a un aumento de la apoptosis de algunas células tumorales.

En el modelo aquí estudiado, podemos hipotetizar que el pesticida estimularía las vías de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2 llevando a la expresión de las MMPs en los tumores derivados de MDA-MB-231, siendo esto consistente con lo observado en los estudios *in vitro*. Finalmente, el incremento de los niveles de MMPs podría favorecer el crecimiento tumoral inducido por el HCB. Se ha discutido previamente la importancia de HER1 y c-Src en cáncer de mama. Respecto a la STAT5b, Kazansky et al. (2003) han sugeridon que existe una correlación entre la activación de ésta proteína y la progresión tumoral en cáncer de próstata, proponiéndola como un posible blanco terapéutico. Específicamente, estos autores reportan que la sobreexpresión de una forma inactiva de STAT5b en la línea celular de cáncer de próstata metastásica C2H, bloquea la progresión del ciclo celular, disminuye la proliferación e inhibe su potencial invasivo *in vitro* y la habilidad de formar tumores en ratones atímicos. A su vez, estudios previos del mismo grupo demuestran que la STAT5b es fundamental para el crecimiento celular, tumorigénesis y motilidad dependiente de c-Src en la línea NIH-3T3 (Kazansky y Rosen, 2001). Por otro lado, está ampliamente estudiada la implicancia de ERK1/2 en la progresión tumoral en cáncer de mama (Whyte et al., 2009).

Teniendo en cuenta la acción del tóxico sobre la invasión celular en las MDA-MB-231, *in vitro,* el paso siguiente fue analizar la capacidad metastásica de los tumores derivados de las MDA-MB-231 en animales intoxicados con HCB. Desafortunadamente por problemas metodológicos, no logramos demostrar con claridad los efectos del pesticida en la metástasis en este modelo, ya que obtuvimos un bajo número o ausencia de metástasis en la mayoría de los ratones. Sin embargo, en este modelo observamos que en pulmón al tratar con HCB muy pocos animales del total presentaron metástasis, no observándose ninguno para el grupo control.

Con el objetivo de obtener resultados concluyentes al respecto, realizamos diferentes abordajes experimentales utilizando para ello dos modelos diferentes, uno de metástasis espontánea y otro de metástasis experimental. En el modelo de metástasis espontánea singenéico, en el que trasplantamos la línea tumoral C4-HI en ratones BALB-c pusimos en evidencia el efecto del tóxico sobre la metástasis en pulmón, demostrando un aumento en el número de focos metastáticos en dicho órgano en dosis de 0.3 y 3 mg/kg p.c. A su vez, encontramos que el tratamiento de ratones con HCB (0.3 mg/kg) aumentaba las metástasis en hígado. No pudimos observar micrometástasis en ganglio axilar linfático en ningún ratón.

Por otro lado, en un modelo de metástasis experimental, en el que se inocula la línea celular LM3 en la vena de la cola de ratones BALB-c previamente tratados con HCB, demostramos que el tóxico (3 mg/kg p.c.) aumenta el número de metástasis de mayor tamaño en pulmón. Sin embargo, el hecho de que no se observen diferencias a nivel del número de focos metastáticos totales, creemos que se debe a los altos niveles obtenidos para este parámetro (comparar con los resultados obtenidos con el modelo de las C4-HI en BALB-c). El incremento en el número de macrometástasis de mayor tamaño observado en pulmón puede deberse a que el HCB acelere el proceso invasivo, permitiendo que los focos se formen antes, teniendo más tiempo para crecer. Otras posibles explicaciones son que el pesticida favorezca la proliferación en los nichos metastáticos; ó simplemente que los focos de mayor tamaño observados sean el producto de la fusión de varios focos pequeños. Teniendo en cuenta la última hipótesis no se descartaría que al igual que en el modelo anterior, el tóxico estuviera incrementando el número de metástasis.

En resumen, las dosis efectivas para los ensayos de metástasis han sido con HCB 0.3 y 3 mg/kg p.c. A pesar de las complicaciones metodológicas, de utilizar abordajes experimentales diferentes, el empleo de estos modelos para el estudio del proceso metastásico nos ha permitido demostrar que el HCB favorece el desarrollo de metástasis en pulmón en los dos ensayos *in vivo* abordados (metástasis espontánea con C4-HI y metástasis experimental). Esto hace que los resultados obtenidos en nuestro trabajo sean más robustos, ya que no dependen de un sólo modelo experimental, o de una única línea celular tumoral específica.

Se han reportado estudios que demuestran que algunos compuestos organoclorados favorecen el proceso metastásico en cáncer de mama. Liu et al, (2010) reportaron que el tratamiento con bifenilos policlorados (PCBs) de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 induce la migración celular *in vitro*, e incrementa la capacidad metastásica de las MDA-MB-231 en hígado y pulmón*, in vivo*, al activar la quinasa asociada a Rho (ROC). En ensayos *in vitro* se observó que el tratamiento con TCDD de las MCF-7 producía alteraciones morfológicas como la aparición de lamelipodios y mayor motilidad asociadas a una reorganización del citoesqueleto de actina y a una disminución en la expresión de caderina E (Barouki et al., 2007). A su vez, se ha reportado que el tratamiento con 7,12 dimetilbenzantraceno de una línea celular de cáncer de mama murina rel-3983 induce la TEM a través de la activación de NFκB (Shin et al., 2006). Eum et al. (2004) sugieren que el PCB 104 podría contribuir al desarrollo de metástasis en cáncer de mama, ya que en estudios *in vitro* observaron que este compuesto induce la expresión de VEGF, la hiperpermeabilidad de la línea endotelial HMEC-1, y la migración transendotelial de las MDA-MB-231. Otros estudios

demuestran que la TCDD inhibe las uniones intercelulares GAP en las células de cáncer de mama MCF-7 y en las células epiteliales normales HMEC (Gakhar et al., 2009).

Nuestros resultados muestran que el HCB estimula el crecimiento de los tumores de mama C4-HI en los ratones BALB-c. Al igual que lo observado en el modelo de xenotrasplante con las MDA-MB-231, dicho incremento fue solo significativo con dosis de 0.3 y 3 mg/kg p.c. Por otro lado, a diferencia del modelo de xenotrasplante, demostramos que el pesticida incrementa los niveles proteicos de MMP9 solo con la dosis más alta ensayada, no alterando así los niveles de MMP2 en los tumores C4-HI. A la hora de analizar las diferencias en el efecto del pesticida en estos dos modelos es importante tener en cuenta que el modelo con MDA-MB-231 es hormono-independiente mientras que el modelo con C4-HI responde al tratamiento con antiprogestágenos, tamoxifeno y estrógenos (Lanari et al., 2009). Se conoce que la gran mayoría de los tumores de mama es inicialmente hormono-dependiente, y en estos casos los estrógenos juegan un rol crucial en su desarrollo y evolución inicial (Russo et al., 2003). Sin embargo, se sabe que con la progresión tumoral usualmente se da la pérdida de la dependencia hormonal asociada a la activación de otras vías, como la del HER1 ó HER2 pasando a tener éstas el papel preponderante en la evolución de dichos tumores. Si bien en el modelo de xenotrasplante (hormono-independiente), estudiado con mayor profundidad, creemos que el tóxico estaría estimulando el crecimiento tumoral al activar las vías de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2 e incrementar los niveles de MMPs; otros mecanismos diferentes podrían estar operando en los tumores C4-HI. Estudios previos de nuestro laboratorio *in vitro,* en la línea celular MCF-7 demostraron que el tóxico induce la proliferación celular y la vía de señalización de IGFs de una manera dependiente del REα (García et al., 2010). Tal vez, un mecanismo similar podría estar operando en los tumores C4-HI en los ratones BALB-c tratados con el pesticida, llevando esto al crecimiento tumoral *in vivo.* Estudios posteriores tomando en cuenta estas vías de transducción de señales, permitirán profundizar sobre ello.

Con respecto a las acciones encontradas en función de la dosis del pesticida, en todo nuestro trabajo observamos que el HCB tiene efecto a dosis bajas y altas, pero en algunos parámetros sólo a dosis altas o sólo a dosis bajas. Particularmente en el caso del estudio del crecimiento tumoral y metástasis *in vivo*, encontramos que las dosis efectivas fueron las más bajas ensayadas (0.3 y 3 mg/kg p.c.), produciéndose una curva de respuesta en forma de U invertida. Este comportamiento también se observa en la fosforilación de algunas proteínas inducida por el HCB (Vía de señalización c-Src/HER1/STAT5b, Resultados Parte I). A su vez, muchos estudios toxicológicos asumen una respuesta lineal que parece ser válida para la mayoría de los efectos (Vía de señalización HER1/ERK1/2, Resultados Parte I). Sin embargo, en el caso de acciones asociadas a perturbaciones endocrinas se conoce que las hormonas en altos niveles tienen la capacidad de suprimir la respuesta endocrina que es aparente a bajos niveles. Este comportamiento conduce a una curva Dosis-Respuesta gauseana. Frente a este análisis, se considera que los estudios toxicológicos relevantes con disruptores endócrinos para las poblaciones humanas, son aquellos realizados a dosis bajas, donde ocurren efectos que no se observan cuando se trabajan a dosis altas (Gierthy 2002).

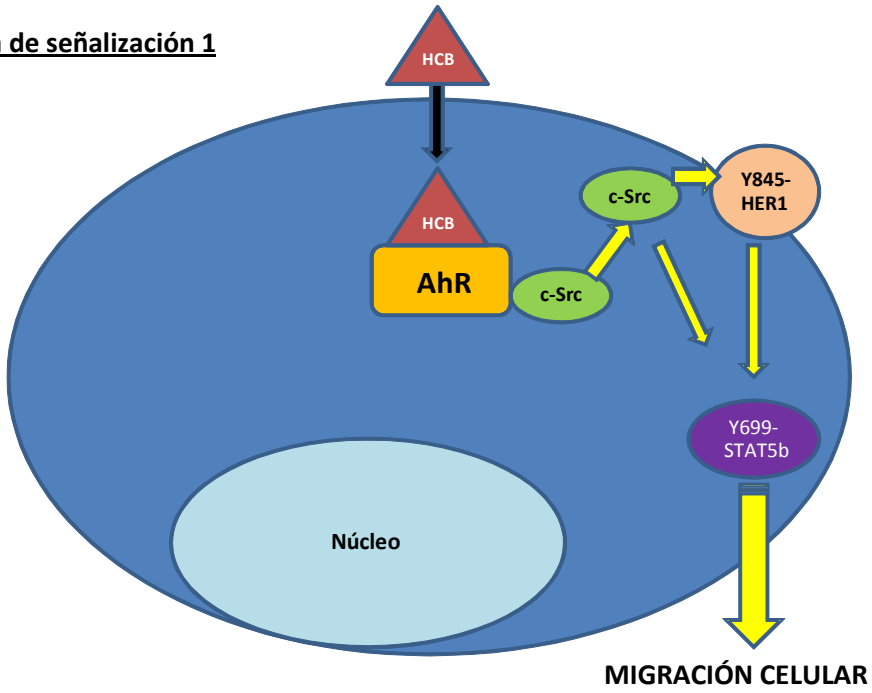
Por otro lado, es sorprendente que según lo reportado por la EPA (USA), las dosis de HCB que no generan efectos adversos sobre el sistema reproductivo (NOAEL) en las crías de ratas tratadas con HCB, son de 0.3 y 1.6 mg/kg p.c. Esto se basa en un estudio realizado por Arnold et al., (1994) en el cual se le suministran diferentes dosis de HCB a ratas hembra durante 90 días y luego estudian sus efectos en las crías.

En conclusión, en esta segunda etapa de nuestro trabajo, demostramos que el HCB estimula la invasión celular, la expresión de MMP2 y 9 y la secreción y actividad de MMP9 en la línea celular MDA-MB-231, *in vitro*. A su vez, evidenciamos el rol esencial de c-Src, HER1 y del RHA en dichos efectos del tóxico. Por otro lado demostramos que el HCB favorece el crecimiento tumoral mamario y el desarrollo de metástasis en pulmón utilizando diferentes modelos de estudio (espontáneo y experimental), así como metástasis en hígado (espontáneo). Todo esto nos lleva a concluir que el HCB favorece la progresión tumoral en cáncer de mama.

El presente estudio, provee una profundización en el conocimiento de los eventos moleculares involucrados en el mecanismo de acción del HCB en la carcinogénesis mamaria. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la presencia y bioacumulación del HCB en tejidos con alto contenido graso como la glándula mamaria, hacen de este compuesto un factor de riesgo no sólo para el desarrollo de tumores sino para la progresión tumoral. Es importante aclarar que las dosis de HCB utilizadas en este estudio son 10, 100 y 1000 veces menores que las halladas en sueros humanos de poblaciones altamente contaminadas (To-Figueras et al., 1997).

MODELOS PROPUESTOS 1

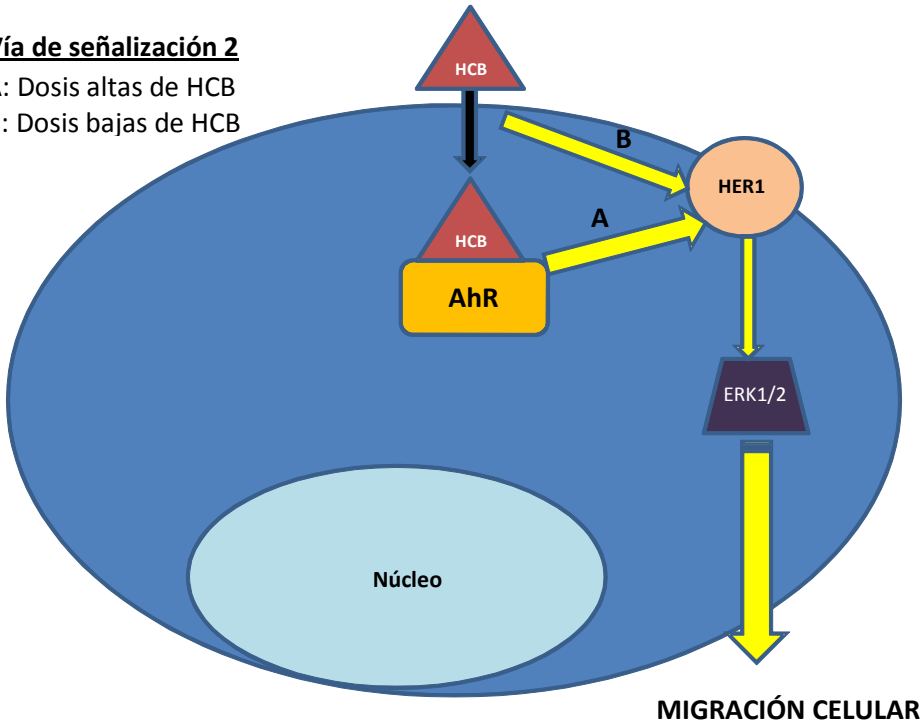
Vía de señalización 1



Vía de señalización 2

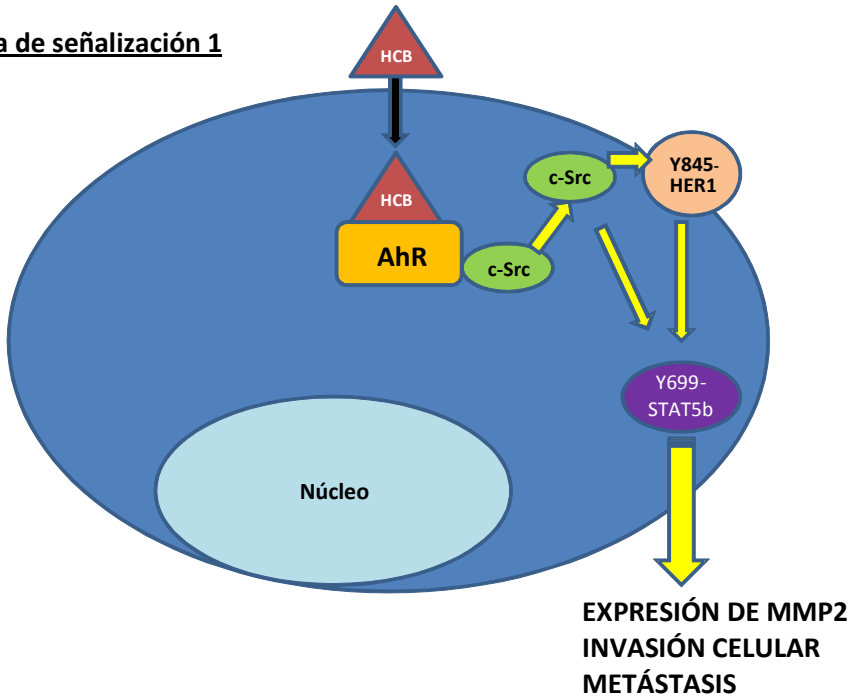
A: Dosis altas de HCB

B: Dosis bajas de HCB

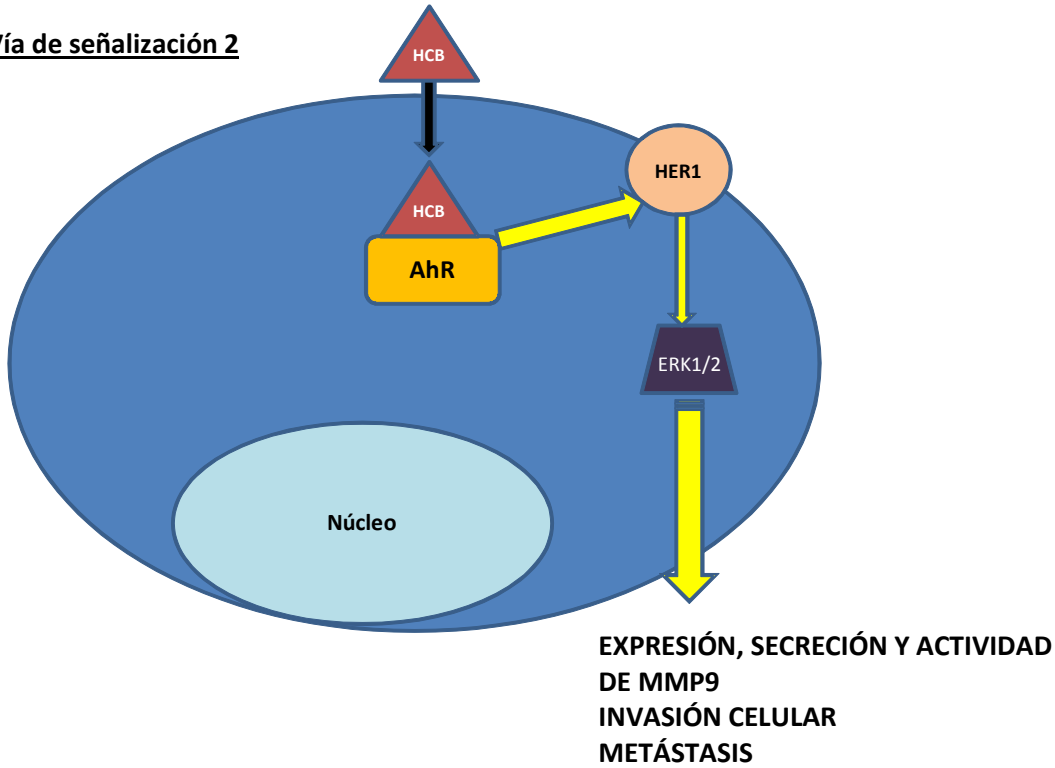


MODELOS PROPUESTOS 2

Vía de señalización 1



Vía de señalización 2



CONCLUSIONES

En Resumen, en este estudio demostramos por primera vez que el HCB:

PARTE I

a) Estimula las vías de señalización de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2 en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Observamos que el RHA está involucrado en la activación de c-Src/HER1/STAT5b a dosis bajas (0.05 μM) y altas (5 μM); mientras que sólo está implicado en la estimulación de la vía de HER1/ERK1/2 a dosis altas (5 μM).

b) Activa las vías de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1/2 a través de mecanismos no genómicos del RHA en esta línea celular.

c) Aumenta la migración de las MDA-MB-231 de manera dependiente de la c-Src, HER1 y del RHA.

PARTE II

a) Induce un aumento en la expresión, secreción y actividad de MMP9 y en la expresión de MMP2 en las MDA-MB-231, *in vitro*.

b) Estimula la expresión, secreción y actividad de MMP9 por la vía HER1/ERK1/2, mientras que aumenta la expresión de MMP2 por el camino de c-Src/HER1/STAT5b.

c) En dosis de 5 μM, estos efectos están mediados por la unión del pesticida al RHA.

d) Estimula la invasión de esta línea celular a través de la quinasa de c-Src, HER1 y el RHA.

e) Incrementa la fosforilación en Y416-c-Src, Y845-HER1, ERK1/2 y Y699-STAT5b y los niveles de proteína de MMP2 y 9 en los tumores de mama, en un modelo de xenotrasplante con la línea celular MDA-MB-231 en ratones BALB-c atímicos.

f) En dosis de 0.3 y 3 mg/kg p.c., estimula el crecimiento tumoral mamario en el modelo de trasplante singenéico con C4-HI en BALB-c, así como en el modelo de xenotrasplante con MDA-MB-231 en ratones BALB-c atímicos.

g) Aumenta el número de focos metastásicos en pulmón en dosis de 0.3 y 3 mg/kg p.c., y en hígado en dosis de 0.3 mg/kg p.c. en el modelo de metástasis espontánea singenéico, con la línea tumoral C4-HI en ratones BALB-c.

h) En dosis de 3 mg/kg p.c., aumenta el tamaño de las metástasis en pulmón en un modelo de metástasis experimental, con la línea celular LM3 en ratones BALB-c.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci USA; **100**:3983–3988.

Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SA (2001). "Histological and biological evolution of human premalignant breast disease". Endocr Relat Cancer; **8**:47–61.

Alvarez L, Randi A, Alvarez P, Piroli G, Chamson-Reig A, Lux-Lantos V, Kleiman de Pisarev D (2000). "Reproductive effects of hexachlorobenzene in female rats." J Appl Toxicol; **20**(1):81-7.

Andersson PL, Blom A, Johannisson A, Pesonen M, Tysklind M, Berg AH, Olsson PE, Norrgren L (1999). "Assessment of PCBs and hydroxylated PCBs as potential xenoestrogens: In vitro studies based on MCF-7 cell proliferation and induction of vitellogenin in primary culture of rainbow trout hepatocytes." Arch Environ Contam Toxicol; **37**(2):145-50.

Angus WG, Larsen MC, Jefcoate CR (1999). "Expression of CYP1A1 and CYP1B1 depends on cell-specific factors in human breast cancer cell lines: role of estrogen receptorstatus." Carcinogenesis; **20**(6):947-55.

Arai K, Lee SR, Lo EH (2003). "Essential role for ERK mitogen-activated protein kinase in matrix metalloproteinase-9 regulation in rat cortical astrocytes." Glia; **43**:254–264.

Arnold DL, Moodie CA, Charbonneau SM, Grice HC, McGuire PF, Bryce FR, Collins BT, Zawidzka ZZ, Krewski DR, Nera EA, et al. (1985). "Long-term toxicity of hexachlorobenzene in the rat and the effect of dietary Vitamin A." Fd Chem. Toxic; **23**(9): 779-793.

Aronson KJ, Miller AB, Woolcott CG, Sterns EE, McCready DR, Lickley LA, Fish EB, Hiraki GY, Holloway C, Ross T, Hanna WM, SenGupta SK, Weber JP (2000). "Breast adipose tissue concentrations of polychlorinated biphenyls and other organochlorines and breast cancer risk." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; **9**:55–63.

ATSDR (Agency for Toxics Substances and Disease Registry), U.S. Department of Health and Human Services (2002). "Toxicological Profile for Hexachlorobenzene". 1-352 pp.

Bailey RE (2001). "Global hexachlorobenzene emissions." Chemosphere; **43**(2): 167-82.

Bal de Kier Joffé E, Puricelli L, Lustig ES (1986). "Modified adhesion behavior after in vitro passage of two related murine mammary adenocarcinomas with different metastasizing ability." Invasion Metastasis; **6**:302–12.

Barber JL, Sweetman AJ, van Wijk D, Jones KC (2005). "Hexachlorobenzene in the global environment: emissions, levels, distribution, trends and processes." Sci Total Environ; **349**(1-3): 1-44.

Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM (2007). "The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein." FEBS Lett; **581**(19):3608-3615.

Barr S, Thomson S, Buck E, Russo S, Petti F, Sujka-Kwok I, Eyzaguirre A, Rosenfeld-Franklin M, Gibson NW, Miglarese M, Epstein D, Iwata KK, Haley JD (2008). "Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-mesenchymal-like transitions." Clin Exp Metastasis; **25**(6):685-93.

Bartucci M, Morelli C, Mauro L, Andó S, Surmacz E (2001). "Differential insulin-like growth factor I receptor signaling and function in estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cells." Cancer Res; **61**(18):6747-54.

Battaglia F, Scambia G, Rossi S, Panici PB, Bellantone R, Polizzi G, Querzoli P, Negrini R, Iacobelli S, Crucitti F, et al (1988). "Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with steroid hormone receptors and axillary lymph node involvement." Eur J Cancer Clin Oncol; **24**(11):1685-90.

Beischlag TV, Morales JL, Hollingshead BD, Perdew GH (2008). "The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression." Crit Rev Eukaryot Gene Expr; **18**(3):207-50.

Belsches-Jablonski AP, Biscardi JS, Peavy DR, Tice DA, Romney DA, Parsons SJ (2001). "Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival." Oncogene; **20**(12):1465-75.

Bernaciak TM, Zareno J, Parsons JT y Silva CM (2009). "A novel role for signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b) in β1-integrin-mediated human breast cancer cell migration." Breast Cancer Res; **11**:1-11.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004). "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression." Nature; **432**:332–337.

Biscardi JS, Belsches AP, Parsons SJ (1998). "Characterization of human epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in human breast tumor cells." Mol Carcinog; **21**(4):261-272.

Biscardi JS, MaaMC, Tice DA, Cox ME, Leu TH, Parsons SJ (1999a). "c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function." J Biol Chem; **274**:8335–43.

Biscardi JS, Tice DA, Parsons SJ (1999b). "c-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer." Review. Adv Cancer Res; **76**:61-119.

Biscardi JS, Ishizawar RC, Silva CM, Parsons SJ (2000). "Tyrosine kinase signalling in breast cancer: epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in breast cancer." Breast Cancer Res; **2**:203–210.

Bissell MJ, Labarge MA (2005). "Context, tissue plasticity, and cancer; are tumour stem cells also regulated by the microenvironment?." Cancer Cell; **7**:17–23.

Bock KW, Kohle C (2005). "Ah receptor- and TCDD-mediated liver tumor promotion: clonal selection and expansion of cells evading growth arrest and apoptosis." Biochem Pharmacol; **69**(10):1403-8.

Bock KW, Kohle C (2006). "Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions." Biochem Pharmacol; **72**(4):393-404.

Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC (1998). "Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappaB." FEBS Lett; **435**:29-34.

Bouchard L, Lamarre L, Tremblay PJ, Jolicoeur P (1989). "Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV/c-neu oncogene." Cell; **57**:931–936.

Boyer S, Roche M, Denoyelle JP, Thiery (1997). "Src and Ras are involved in separate pathways in epithelial cell scattering." EMBO J, **16**: 5904– 5913.

Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz- Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T (2001). "Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment." Proc Natl Acad Sci U S A; **98**(18):10356–61.

Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T (2005). "Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin." Cells Tissues Organs; **179**(1–2):56–65.

Bradford MM (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem; **72**:248-54.

Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H (2000). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function." Biochim Biophys Acta; **1477**:267-283.

Brinckerhoff CE, Matrisian LM (2002). "Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince." Nat Rev Mol Cell Biol; **3**:207–214.

Broussard JA, Webb DJ, Kaverina I (2008). "Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells". Curr Opin Cell Biol; **20**:85–90.

Brown NM, Lamartiniere CA (1995). "Xenoestrogens alter mammary gland differentiation and cell proliferation in the rat." Environ Health Perspect, **103**(7-8):708-13.

Brunton VG, Ozanne BW, Paraskev C, Frame MC (1997). "A role for epidermal growth factor receptor, c-Src and focal adhesion kinase in an in vitro model for the progression of colon cancer." Oncogene; **14**:283-93.

Bulayeva NN, Watson CS (2004). "Xenoestrogen-induced ERK1 and ERK-2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways." Environ Health Perspect; **112**:1481–1487.

Burdick AD, Davis JW, Liu KJ, Hudson LG, Shi H, Monske ML, Burchiel SW (2003). "Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells." Cancer Res; **63**:7825-7833.

Burstein HJ, Polyak K., Wong JS, Lester SC y Kaelin CM (2004). "Ductal carcinoma in situ of the breast." N Engl J Med; **350**:1430–1441.

Cabral JR, Shubik P, Mollner T, Raitano F (1977). "Carcinogenic activity of hexacholorobenzene in hamsters." Nature; **269**(5628):510-11.

Cabral JR, Shubik P (1986). "Carcinogenic activity of hexachlorobenzene in mice and hamsters." IARC Sci Publ; **77**:411-6.

Calaf G, Russo J (1993). "Transformation of human breast epithelial cells by chemical carcinogens." Carcinogenesis; **14**(3):483-92.

Calle EE, Frumkin H, Henley SJ, Savitz DA, Thun MJ (2002). "Organochlorines and breast cancer risk." CA Cancer J Clin; **52**(5):301-309.

Carnevale RP, Proietti CJ, Salatino M, Urtreger A, Peluffo G, Edwards DP, Boonyaratanakornkit V, Charreau EH, Bal de Kier Joffé E, Schillaci R, Elizalde PV (2007). "Progestin effects on breast cancer cell proliferation, proteases activation, and in vivo development of metastatic phenotype all depend on progesterone receptor capacity to activate cytoplasmic signaling pathways." Mol Endocrinol; **21**(6):1335-58.

Catterall JB, Carrère S, Koshy PJ, Degnan BA, Shingleton WD, Brinckerhoff CE, Rutter J, Cawston TE, Rowan AD (2001). "Synergistic induction of matrix metalloproteinase 1 by interleukin-1alpha and oncostatin M in human chondrocytes involves signal transducer and activator of transcription and activator protein 1 transcription factors via a novel mechanism." Arthritis Rheum; **44**(10):2296-310.

Celentano DC, Frishman WH (1997). "Matrix metalloproteinases and coronary artery disease: a novel therapeutic target." J Clin Pharmacol; **37**:991-1000.

Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED (2007). "Mesenchymal to epithelial transition in development and disease." Cells Tissues Organs; **185**(1-3):7-19.

Chambers AF, Matrisian LM (1997). "Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis." J Natl Cancer Inst; **89**:1260–1270.

Chang JH, Gill S, Settleman J, Parsons SJ (1995). "c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. " J Cell Biol; **130**(2):355-68.

Charlier C, Albert A, Herman P, Hamoir E, Gaspard U, Meurisse M, Plomteux G (2003). "Breast cancer and serum organochlorine residues." Occup Environ Med; **60**:348–351.

Charlier C, Foidart JM, Pitance F, Herman P, Gaspard U, Meurisse M, Plomteux G (2004). "Environmental dichlorodiphenyltrichlorethane or hexachlorobenzene exposure and breast cancer: is there a risk?." Clin Chem Lab Med; **42**(2):222-7.

Charlier CJ, Dejardin MT (2007). "Increased risk of relapse after breast cancer with exposure to organochlorine pollutants." Bull Environ Contam Toxicol; **78**(1):1-4.

Chen JX, Zeng H, Tuo QH, Yu H, Meyrick B, Aschner JL (2007). "NADPH oxidase modulates myocardial Akt, ERK1/2 activation, and angiogenesis after hypoxia-reoxygenation." Am J Physiol Heart Circ Physiol; **292**:1664–1674.

Chhabra ES, Higgs HN (2007). "The many faces of actin, matching assembly factors with cellular structures." Nat Cell Biol; **9**:1110–1121.

Chiang-Wen L, Chih-Chung L, Wei-Ning L, Kao-Chih L, Shue-Feng L, Chow-Bin W, Shyi-Wu W, Chuen-Mao Y (2007). "TNF-α induces MMP-9 expression via activation of Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt cascade and promotion of NF–κB/p300 binding in human tracheal smooth muscle cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol; **292**:799–812.

Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J, Baselga J (1999). "Clevage of the HER-2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue-inhibitor of metalloprotease-1 in breast cancer cells." Cancer Res; **59**:1196–1201.

Cole GW Jr, Alleva AM, Reddy RM, Maxhimer JB, Zuo J, Schrump DS, Nguyen DM (2005). "The selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PD153035 suppresses expression of prometastasis phenotypes in malignant pleural mesothelioma cells in vitro." J Thorac Cardiovasc Surg; **129**(5):1010–1017.

Condeelis J, Segall JE (2003). "Intravital imaging of cell movement in tumours." Nat Rev Cancer; **3**(12):921–30.

Courtney KD (1979). "Hexachlorobenzene (HCB): a review." Environ Res; **20**(2):225-66.

Davis JW , Lauer FT, Burdick AD, Hudson LG, Burchiel SW (2001). "Prevention of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the MCF-10A cell line: correlation with increased transforming growth factor alpha production." Cancer Res; **61**(8):3314-20.

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." Am J Epidemiol; **155**:629–635.

den Besten CM, Bennik H, Bruggeman I, Schielen P, Kuper F, Brouwer A, Koeman JH, Vos JG, Van Bladeren PJ (1993). "The role of oxidative metabolism in hexachlorobenzene-induced porphyria and thyroid hormone homeostasis: a comparison with pentachlorobenzene in a 13-week feeding study." Toxicol Appl Pharmacol; **119**(2): 181-94.

Der Parsehian S (2008). "Plaguicidas organoclorados en leche materna." Rev Hosp Mat If Ramón Sardá; **27**:70-78.

Dewailly E, Dodin S, Verreault R, Ayotte P, Sauve L, Morin J, y Brisson J (1994). "High organochlorine body burden in women with estrogen receptor-positive breast cancer." J Natl Cancer Institute; **86**(3):232-234.

Dietrich C, Kaina B (2010). "The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth." Carcinogenesis; **31**(8):1319-28.

Dimri M, Naramura M, Duan L, Chen J, Ortega-Cava C, Chen G, Goswami R, Fernandes N, Gao Q, Dimri GP, Band V, Band H (2007). "Modeling breast cancer-associated c-Src and EGFR overexpression in human MECs: c-Src and EGFR cooperatively promote aberrant three-dimensional acinar structure and invasive behavior." Cancer Res; **67**(9):4164-72.

Diry M, Tomkiewicz C, Koehle C, Coumoul X, Bock KW, Barouki R, Transy C (2006). "Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AHR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism." Oncogene; **25**(40):5570-5574.

Döhr O, Vogel C, Abel J (1995). "Different response of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-sensitive genes in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells." Arch Biochem Biophys; **321**(2):405-12.

Duffy MJ, McCarthy K (1998). "Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and targets for therapy." Int J Oncol; **12**:1343–1348.

Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins (2000). "Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis." Breast Cancer Res; **2**:252–257.

Eberhardt W, Huwiler A, Beck KF, Walpen S, Pfeilschifter J (2000). "Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways." J Immunol; **165**:5788–5797.

Enan E, Matsumura F (1996). "Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin (TCDD) through the protein phosphorylationpathway." Biochem Pharmacol; **52**:1599–1612.

Etienne-Manneville S, Hall A (2002). "Rho GTPases in cell biology". Nature; **420**:629–635.

Eum SY, Lee YW, Henning B, Toborek M (2004). "VEGF regulates PCB 104-mediated stimulation of permeability and transmigration of breast cancer cells in human microvascular endothelial cells." Exp Cell Res; **296**:231– 244.

Ezendam J, Vissers I, Bleumink R, Vos JG, Pieters R (2003). "Immunomodulatory effects of tetrachlorobenzoquinone, a reactive metabolite of hexachlorobenzene." Chem Res Toxicol; 16(6):688-94.

Ezendam J, Hassing I, Bleumink R, Vos JG, Pieters R (2004). "Hexachlorobenzene-induced Immunopathology in Brown Norway rats is partly mediated by T cells." Toxicol Sci; **78**(1):88-95.

Fernandis AZ, Prasad A, Band H, Klosel R, Ganju RK (2004). "Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells." Oncogene; **2**:157–167.

Fidler IJ, Kripke ML (1977). "Metastasis results from Preexisting variant cells within a malignant tumour." Science; **197**:893–895.

Fidler IJ (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." Nat Rev Cancer; **3**:453–458.

Fincham VJ, Frame MC (1998). "The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during cell motility." EMBO J; **17**(1):81-92.

Foster WG, McMahon A, Villeneuve DC, Jarrell JF (1992). "Hexachlorobenzene (HCB) suppresses circulating progesterone concentrations during the luteal phase in the cynomolgus monkey." J Appl Toxicol; **12**(1):13-7.

Foster WG, Mertineit C, Yagminas A, McMahon A, Lecavalier P (1995). "The effects of hexachlorobenzene on circulating levels of adrenal steroids in the ovariectomized rat." J Biochem Toxicol; **10**(3):129-35.

Frame MC (2002). "Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour." Biophysica Acta; **1602**:114–130.

Frame MC (2004). "Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it." Journal of Cell Science; **117**:989-998.

Frank GD, Eguchi S, Yamakawa T, Tanaka S, Inagami T, Motley ED (2000). "Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II." Endocrinology; **141**(9):3120-6.

Friedl P, Noble PB, Walton PA, Laird DW, Chauvin PJ, Tabah RJ, Black M, Känker KS (1995). "Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro." Cancer Res; **55**(20):4557–60.

Friedl P, Wolf K (2003). "Tumor-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms." Nat Rev Cancer; **3**:362–374.

Friedl P, Gilmour D (2009). "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer." Nat Rev Mol Cell Biol; **10**(7):445-57.

Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Behrens J, Sommer T, Birchmeier W (2002). "Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex." Nat Cell Biol; **4**(3):222–231.

Gakhar G, Schrempp D, Nguyen TA (2009). "Regulation of gap junctional intercellular communication by TCDD in HMEC and MCF-7 breast cancer cells." Toxicol Appl Pharmacol; **235**(2):171-81.

Galvagni F, Pennacchini S, Salameh A, Rocchigiani M, Neri F, Orlandini M, Petraglia F, Gotta S, Sardone GL, Matteucci G, Terstappen GC, Oliviero S (2010). "Endothelial cell adhesion to the extracellular matrix induces c-Src-dependent VEGFR-3 phosphorylation without the activation of the receptor intrinsic kinase activity." Circ Res; **106**(12):1839-1848.

García MA (2008). "Mecanismo de acción del Hexaclorobenceno sobre la proliferación celular y la transducción de señales del camino de Insulina/IGFs en líneas celulares neoplásicas de mama humanas." Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, FCEyN, UBA.

García MA, Peña D, Alvarez L, Cocca C, Pontillo C, Bergoc R, Kleiman de Pisarev D, Randi A (2010). **"**Hexachlorobenzene induces cell proliferation and IGF-I signaling pathway in an estrogen receptor alpha-dependent manner in MCF-7 breast cancer cell line." Toxicol Lett; **192**(2):195-205.

García-Olmo D, Garcia-Olmo DC, Ontanon J, Martinez E, Vallejo M (1999). "Tumour DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genometastasis." Histol Histopathol; **14**:1159–1164.

Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, Sahai E (2009). "Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility." Nat Cell Biol; **11**(11):1287–96.

Gierthy JF (2002). "Toxicological Highlight.Testing for Endocrine Disruption: How Much is Enough ?." Toxicological Sciences; **68**:1-3.

Giunciuglio D, Culty M, Fassina G, Masiello L, Melchiri A, Paglialunga G, Arand G, Ciardiello F, Basolo F, Thompson EW, et al (1995). "Invasive phenotype of MCF10A cells overexpressing c-Ha-ras and c-erbB-2 oncogenes." Int J Cancer; **63**:815–822.

Gocmen A, Peters HA, Cripps DJ, Morris CR, Dogramaci I (1986). "Porphyria turcica: hexachlorobenzene-induced porphyria." IARC Sci Publ; **77:**567-73.

Gocmen A, Peters HA, Cripps DJ, Bryan GT, Morris CR (1989). "Hexachlorobenzene episode in Turkey." Biomed Environ Sci; **2**(1):36-43.

Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenov GP, Bartunik H, Bode W (1997). "Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1." Nature; **389**:77-81.

Gonfloni S, Frischknecht F, Way M, Superti-Furga G (1999). "Leucine 255 of Src couples intramolecular interactions to inhibition of catalysis." Nat Struct Biol; **6**(8):760-4.

Gonfloni S, Weijland A, Kretzschmar J, Superti-Furga G (2000). "Crosstalk between the catalytic and regulatory domains allows bidirectional regulation of Src." Nat Struct Biol; **7**(4):281-6.

González L, Agulló-Ortuño MT, García-Martínez JM, Calcabrini A, Gamallo C, Palacios J, Aranda A, Martín-Pérez J (2006). "Role of c-Src in human MCF7 breast cancer cell tumorigenesis." J Biol Chem; **281**(30):20851-20864.

Gorman N, Trask HS, Robinson SW, Sinclair JF, Gerhard GS, Smith AG, Sinclair PR (2007). "Hexachlorobenzene stimulates uroporphyria in low affinity AHR mice without increasing CYP1A2." Toxicol Appl Pharmacol; **221**(2):235-42.

Gravekamp C, Sypniewska R, Gauntt S, Tarango M, Price P, Reddick R (2004). "Behavior of metastatic and nonmetastatic breast tumors in old mice." Exp Biol Med; **229**:665-675.

Guarino M, Rubino B, Ballabio G (2007). "The role of epithelialmesenchymal transition in cancer pathology." Pathology; **39**(3):305–18.

Guliaeva LF, Grishanova AIu, Liakhovich VV (1994). "Induction of cytochromes P-4501A and 2B in various rat organs, subjected to hexachlorobenzene and aroclor 1254." Biokhimiia; **59**(4):531-6.

Gustafson DL, Long ME, Thomas RS, Benjamin SA, Yang RS (2000). "Comparative hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene, pentachlorobenzene, 1,2,4,5-tetrachlorobenzene, and 1,4-dichlorobenzene: application of a medium-term liver focus bioassay and molecular and cellular indices." Toxicol Sci; **53**(2):245-52.

Guttes S, Failing K, Neumann K, Kleinstein J, Georgii S y Brunn H (1998). "Chlororganic pesticides and polychlorinated biphenyls in breast tissue of women with benign and malignant breast disease." Arch Environ Contam Toxicol; **35**(1):140-7.

Haarmann-Stemmann T, Bothe H, Abel J (2009). "Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling pathways." Biochemical Pharmacology; **77**: 508–520.

Hahn ME, Goldstein JA, Linko P, Gasiewicz TA (1989). "Interaction of Hexachlorobenzene with the receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vitro and in vivo." Arch Biochem Biophys; **270**:344-355.

Hall A (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science; **279**:509–514.

Hanemaaijer R, Verheijen JH, Maguire TM, Visser H, Toet K, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ (2000). "Increased gelatinase –A and gelatinase B activities in malignant vs. Benign breast tumors." Int J Cancer; **86**(2):204-7.

Haque M, Francis J, Sehgal I (2005). "Aryl hydrocarbon exposure induces expression of MMP-9 in human prostate cancer cell lines." Cancer Lett; **225**(1):159-66.

Hardy KM, Booth BW, Hendrix MJC, Salomon DS, Strizzi L (2010). "ErbB/EGF Signaling and EMT in Mammary Development and Breast Cancer." J Mammary Gland Biol Neoplasia; **15**(2):191–199.

Hauck CR, Sieg DJ, Hsia DA, Loftus JC, Gaarde WA, Monia BP, Schlaepfer DD (2001). "Inhibition of focal adhesion kinase expression and activity disrupts epidermal growth factorstimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells." Cancer Res; **61**:7079-90.

Hay ED (2005). "The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it." Dev Dyn; **233**(3):706–20.

Heasman SJ, Ridley AJ (2008). "Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies". Nat Rev Mol Cell Biol; **9**:690–701.

Hellman S (1994). "Karnofsky Memorial Lecture. Natural history of small breast cancers." J Clin Oncol; **12**:2229–2234.

Henson ES, Gibson SB (2006). "Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy." Cell Signal; **18**(12):2089-97.

Hill RP, Chambers AF, Ling V, Harris JF (1984). "Dynamic heterogeneity: rapid generation of metastatic variants in mouse B16 melanoma cells." Science; **224**:998–1001.

Hillegass JM, Murphy KA, Villano CM, White LA (2006). "The impact of arylhydrocarbon receptor signaling on matrix metabolism: implications for development and disease." Biol Chem; **387**:1159-1173.

Hiscox S, Jordan NJ, Morgan L, Green TP, Nicholson RI (2007). "Src kinase promotes adhesion-independent activation of FAK and enhances cellular migration in tamoxifen-resistant breast cancer cells." Clin Exp Metastasis; **24**(3):157-67.

Hoyer AP, Jorgensen T, Brock JW, Grandjean P (2000). "Organochlorine exposure and breast cancer survival." J Clin Epidemiol; **53**:323–330.

Hurst J, Maniar N, Tombarkiewicz J, Lucas F, Roberson C, Steplewski Z, James W, Perras J (1993). "A novel model of a metastatic human breast tumour xenograft line." Br J Cancer; **68**:274-276.

Institute of Laboratory Animal Resources. Comission on Life Sciences, National Research Council. National Academy Press, Washigton DC (1996). "Guide for the care and use of laboratory animals."; 1-124 pp.

Interational Agency for Research on Cancer (IARC), OMS (2001). "Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans."; **79**: 493-569.

IPCS (International Programme on Chemical Safety)-O.M.S (1992). "Polychlorinated biphenyls and terphenyls." Environmental Health Criteria; 1-140 pp.

Irby RB, Mao W, Coppola D, Kang J, Loubeau JM, Trudeau W, Karl R, Fujita DJ, Jove R, Yeatman TJ (1999). "Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers." Nat Genet; **21**(2):187-90.

Ishida M, Mikami S, Kikuchi E, Kosaka T, Miyajima A, Nakagawa K, Mukai M, Okada Y, Oya M (2010). "Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway enhances cancer cell invasion by upregulating the MMP expression and is associated with poor prognosis in upper urinary tract urothelial cancer." Carcinogenesis; **31**(2):287-95.

Jiang P, Enomoto A, Takahashi M (2009). "Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signalling and the actin cytoskeleton." Cancer Lett; **284**(2):122-30.

Jiménez MJ, Balbin M, Alvarez J, Komori T, Bianco P, Holmebeck K, Birkedal-Hansen H, Lopez J, Lopez-otin C (2001). "A regulatory cascade involving retinoic acid, Cbfa1, and matrix metalloproteinases is coupled to the development of a process of perichondrial invasion and osteogenic differentiation during bone formation." J Cell Biol; **155**:1333-44.

Jones JL, Glynn P, Walker RA (1999). "Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas." J Pathol; **189**:161–168.

Kalluri R y Weinberg RA (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest; **119**(6):1420–8.

Kamangar F, Dores GM y Anderson, WF (2006). "Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world". J Clin Oncol; **24**:2137–2150.

Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordón-Cardo C, Guise TA, Massagué J (2003). "A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone." Cancer Cell; **3**:537–549.

Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y (2007). "Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor." Arch Biochem Biophys; **464**(2):207-12.

Kazansky AV, Rosen JM (2001). "Signal transducers and activators of transcription 5B potentiates v-Src-mediated transformation of NIH-3T3 cells."Cell Growth Differ; **12**(1):1-7.

Kazansky AV, Spencer DM, Greenberg NM (2003). "Activation of signal transducer and activator of transcription 5 is required for progression of autochthonous prostate cancer: evidence from the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate system." Cancer Res; **63**(24):8757-62.

Kerbel RS, Waghorne C, Korczak B, Lagarde A, Breitman ML (1988). "Clonal dominance of primary tumours by metastatic cells: genetic analysis and biological implications." Cancer Surv; **7**:597–629.

Khanna C, Hunter K (2005). "Modeling metastasis in vivo." Carcinogenesis; **26**:513-523.

Khazaie K, Schirrmacher V, Lichtner RB (1993). "EGF receptor in neoplasia and metastasis." Cancer Metastasis Rev; **12**(3-4):255-74.

Kim IS, Baek SH (2010). "Mouse models for breast cancer metastasis." Mini Review. Biochem Biophys Res Commun; **394**:443–447.

Kim S, Choi JH, Lim HI, Lee SK, Kim WW, Cho S, Kim JS, Kim JH, Choe JH, Nam SJ, Lee JE, Yang JH (2009). "EGF-induced MMP-9 expression is mediated by the JAK3/ERK pathway, but not by the JAK3/STAT-3 pathway in a SKBR3 breast cancer cell line." Cell Signal; **21**(6):892-8.

Kleiman de Pisarev DL, Rios de Molina MC, San Martin de Viale LC (1990). "Thyroid function and thyroxine metabolism in hexachlorobenzene-induced porphyria." Biochem Pharmacol; **39**(5):817-25.

Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA, Soriano P (1999). "Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction." EMBO J; **18**(9):2459-71.

Kloth MT, Laughlin KK, Biscardi JS, Boerner JL, Parsons SJ, Silva CM (2003). "STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor." JBC; **278**:1671-79.

Knebel A, Rahmsdorf HJ, Ullrich A, Herrlich P (1996). "Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents." EMBO J; 15(19): 5314-5325.

Kohle C, Gschaidmeier H, Lauth D, Topell S, Zitzer H, Bock KW (1999). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)- mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells." Arch Toxicol; **73**:152–158.

Kopf PG, Walker MK (2010). "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases reactive oxygen species production in human endothelial cells via induction of cytochrome P4501A1." Toxicol Appl Pharmacol; **245**(1):91-9.

Koppikar P, Lui VW, Man D, Xi S, Chai RL, Nelson E, Tobey AB, Grandis JR (2008). "Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 5 contributes to tumor growth, epithelial-mesenchymal transition, and resistance to epidermal growth factor receptor targeting." Clin Cancer Res; 14(23):7682-90.

Krieger N, Wolff MS, Hiatt RA, Rivera M, Vogelman J y Orentreich N (1994). "Breast cancer and serum organochlorines: a prospective study among white, black, and Asian women." J Natl Cancer Inst; **86**(8):589-99.

Krishnaswamy N, Lacroix-Pepin N, Chapdelaine P, Taniguchi H, Kauffenstein G, Chakravarti A, Danyod G, Fortier MA (2010). **"**Epidermal growth factor receptor is an obligatory intermediate for oxytocin-induced cyclooxygenase 2 expression and prostaglandin F2 alpha production in bovine endometrial epithelial cells." Endocrinology ; **151**(3):1367-1374.

Kung T, Murphy KA, White LA (2009). "The Aryl Hydrocarbon Receptor pathway as a regulatory pathway for cell adhesion and matrix metabolism." Biochem Pharmacology; **77**:536-546.

Kuo L, Chang HC, Leu TH, Maa MC, Hung WC (2006). "Src oncogene activates MMP-2 expression via the ERK/Sp1 pathway." J Cell Physiol; **207**:729-734.

Laden F, Collman G, Iwamoto K, Alberg AJ, Berkowitz GS, Freudenheim JL, Hankinson SE, Helzlsouer KJ, Holford TR, Huang HY, Moysich KB, Tessari JD, Wolff MS, Zheng T, Hunter DJ (2001). "1,1-Dichloro-2,2-bis(pchlorophenyl) ethylene and polychlorinated biphenyls and breast cancer: combined analysis of five U.S. studies." J Natl Cancer Inst; **93**:768–776.

Lal A, Glazer CA, Martinson HM, Friedman HS, Archer GE, Sampson JH, Riggins GJ (2002). "Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion." Cancer Res; **62**(12):3335–3339.

Lamoreaux WJ, Fitzgerald MEC, Reiner A, Hasty KA, Charles ST (1998). "Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of

metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro." Microvascular Res; **55**:29-42.

Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD (1986). "Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice." Cancer Lett; **33**:215-223.

Lanari C, Kordon E, Molinolo A, Pasqualini CD, Charreau EH (1989). "Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines." Int J Cancer; **43**:845-850.

Lanari C, Lamb CA, Fabris VT, Helguero LA, Soldati R, Bottino MA, Giulianelli S, Cerliani JP, Wargon V y Molinolo A (2009). "The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer." Review. Endocrine-Related Cancer; **16**:333–350.

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA (1999). "Cancer statistics, 1999." CA Cancer J Clin; **49**(1):8-31,1.

Lee YT (1983). "Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy." J Surg Oncol; **23**:175–180.

Levi E, Fridman R, Miao H-Q, Ma YS, Yayon A, Vlodavsky I (1996). ".Matrix metalloproteinase releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor 1." Proc Natl Acad Sci USA; **93**:7069–7074.

Lichtner RB, Kaufmann AM, Kittmann A, Rohde-Schulz B, Walter J, Williams L, Ullrich A, Schirrmacher V, Khazaie K (1995). "Ligand mediated activation of ectopic EGF receptor promotes matrix protein adhesion and lung colonization of rat mammary adenocarcinoma cells." Oncogene; **10**(9):1823-32.

Lim EJ, Joung YH, Jung SM, Park SH, Park JH, Kim SY, Hwang TS, Hong DY, Chung SC, Ye SK, Moon ES, Park EU, Park T, Chung IM, Yang YM (2010). "Hemin inhibits cyclin D1 and IGF-1 expression via STAT5b under hypoxia in ER -negative MDA-MB 231 breast cancer cells." Int J Oncol; **36**:1243-1251.

Lin PH, Lin CH, Huang CC, Chuang MC, Lin P (2007). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces oxidative stress, DNA strand breaks, and poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in human breast carcinoma cell lines." Toxicol Lett; **172**:146–158.

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):e11272.

Liu Y, Wang J, Wu M, Wan W, Sun R, Yang D, Sun X, Ma D, Ying G, Zhang N (2009). "Down-regulation of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 levels inhibits migration and experimental metastasis of human breast cancer cells." Mol Cancer Res; **7**(6):944-54.

Lopez-Cervantes M, Torres-Sanchez L, Tobias A, Lopez-Carrillo L (2004). "Dichlorodiphenyldichloroethane burden and breast cancer risk: a meta-analysis of the epidemiologic evidence." Environ Health Perspect; **112**:207–214.

Lopez-Novoa JM, Nieto MA (2009). "Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression." EMBO Mol Med; **1**(6–7):303–14.

Lotz M, Wang HH, Cance W, Matthews J, Pories S (2003). "Epidermal Growth Factor Stimulation Can Substitute for c-Src Overexpression in Promoting Breast Carcinoma Invasion." J Surg Res; **109**(2):123-9.

Lu J, Steeg PS, Price JE, Krishnamurthy S, Mani SA, Reuben J, Cristofanilli M, Dontu G, Bidaut L, Valero V, Hortobagyi GN, YuD (2009). "Breast cancer metastasis: challenges and opportunities." Cancer Res; **69**(12):4951-3.

Lu Z, Jiang G, Blume-Jensen P, Hunter T (2001). "Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase." Mol Cell Biol; **21**(12):4016–4031.

Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T (2003). "Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion." Cancer Cell; **4**(6):499–515.

Luo Y, Liang F, Zhang ZY (2009). "PRL1 promotes cell migration and invasion by increasing MMP2 and MMP9 expression through Src and ERK1/2 pathways." Biochemistry; **48**(8):1838-46.

Luttrell DK, Luttrell LM, Parsons SJ (1988). "Augmented mitogenic responsiveness to epidermal growth factor in murine fibroblasts that overexpress pp60c-src." Mol Cell Biol; **8**(1):497-501.

Luttrell DK, Lee A, Lansing TJ, Crosby RM, Jung KD, Willard D, Luther M, Rodriguez M, Berman J, Gilmer TM (1994). "Involvement of pp60c-src with two major signaling pathways in human breast cancer." Proc Natl Acad Sci U S A; **4**:91(1):83-7.

Maa MC, Leu TH, McCarley DJ, Schatzman RC, Parsons SJ (1995). "Potentiation of EGF receptor-mediated oncogenesis by c-Src implications for the etiology of multiple human cancers." Proc Natl Acad Sci USA; **92**:6981–6985.

MacDougall JR, Bani MR, Lin Y, Rak J, Kerbel RS (1995). "The 92-kDa gelatinase B is expressed by advanced stage melanoma cells: Suppression by somatic cell hybridization with early stage melanoma cells." Cancer Res; **55**:4174-4181.

Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN (1995). "Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors." J Natl Cancer Inst; **87**(22):1681-5.

Mahon M J, Gasiewicz AT (1992). "Chelatable metal ions are not required for aryl hydrocarbon receptor transformation to a DNA binding form: phenanthrolines are possible competitive antagonists of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin." Arch Biochem Biophys; **297**:1–8.

Mandal PK (2005). "Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology." J Comp Physiol B; **175**(4):221-30.

Manes S, Mira E, Barbacid MM, Cipres A, Fernandez-Resa P, Buesa JM, Merida I, Aracil M, Marquez G, Martinez AC (1997). "Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3." J Biol Chem; **272**:25706-12.

Mao W, Irby R, Coppola D, Fu L, Wloch M, Turner J, Yu H, Garcia R, Jove R, Yeatman TJ (1997). "Activation of c-Src by receptor tyrosine kinases in human colon cancer cells with high metastatic potential." Oncogene; **15**(25):3083-90.

Marlowe JL, Puga A (2005). "Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis." J Cell Biochem; **96**(6):1174-84.

Martindale JL, Holbrook NJ (2002). "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival." Review. J Cell Physiol; **192**(1):1-15.

Mascarel I, Bonichon F, Durand M, Mauriac L, MacGrogan G, Soubeyran I, Picot V, Avril A, Coindre JM, Trojani M (1998). "Obvious peritumoural emboli: an elusive prognostic factor reappraised. Multivariate análisis of 1320 node-negative breast cancers." Eur J Cancer; **34**:58–65.

Massagué J, Pandiella A (1993). "Membrane-anchored growth factors." Annu Rev Biochem; **62**:515-41.

Masson R, Lefebvre R, Noel A, Fahime ME, Chenard MP, Wendling C, Kebers F, LeMeur M, Dierich A, Foidart JM, Basset P, Rio MC (1998). "In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy." J Cell Biol; **140**:1535–1541.

Mateus AR, Seruca R, Machado JC, Keller G, Oliveira MJ, Suriano G, Luber B (2007). "EGFR regulates RhoA-GTP dependent cell motility in E-cadherin mutant cells." Hum Mol Genet; **16**(13):1639–1647.

Matsumura F (1994). "How important is the protein phosphorylation pathway in the toxic expression of dioxin –type chemicals?." Biochem Pharmacol; **48**:215-224.

Matthay MA, Thiery JP, Lafont F, Stampfer F, Boyer B (1993).“Transient effect of epidermal growth factor on the motility of an immortalized mammary epithelial cell line.” J Cell Sci; **106**:869–878.

Mazina O, Park S, Sano H, Wong P, Matsumura F (2004). “Studies on the mechanism of rapid activation of protein tyrosine phosphorylation activities, particularly c-Src kinase, by TCDD in MCF10A.” J Biochem Mol Toxicol; **18**(6):313-21.

McCawley LJ, Li S, Wattenberg EV, Hudson LG (1999). “Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase-9 induction and cell migration.” J Biol Chem; **274**:4347-4353.

Mendes O, Kim HT, Stoica G (2005). “Expression of MMP2, MMP9 and MMP3 in breast cancer brain metastasis in a rat model.” Clin Exp Metastasis; **22**:237–246.

Meng D, Lv DD, Zhuang X, Sun H, Fan L, Shi XL, Fang J. (2009). “Benzo[a]pyrene induces expression of matrix metalloproteinases and cell migration and invasion of vascular smooth muscle cells.” Toxicology Letters; **184**:44–49.

Merchant M, Arellano L , Safe S (1990). “The mechanism of action of alpha-naphthoflavone as an inhibitor of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxininduced CYP1A1 gene expression.” Arch Biochem Biophys; **281**:84–89.

Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL (2010). “Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression.” J Mammary Gland Biol Neoplasia; **15**(2):117-34.

Michielsen CC, van Loveren H, Vos JG (1999). “The role of the immune system in hexachlorobenzene-induced toxicity.” Environ Health Perspect; **107**(5): 783-92.

Milas L, Peters LJ, Ito H (1983). “Spontaneous metastasis: random or selective?.” Clin Exp Metastasis; **1**:309–315.

Miller ME, Holloway AC, Foster WG (2005). “Benzo-[a]-pyrene increases invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells via increased COX-II expression and prostaglandin E2 (PGE2) output.” Clin Exp Metastasis; **22**(2):149-156.

Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massagué J (2005). “Genes that mediate breast cancer metastasis to lung.” Nature; **436**:518–524.

Mitsui T, Taniguchi N, Kawasaki N, Kagami Y, Arita J (2011). “Fetal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces expression of the chemokine genes Cxcl4 and Cxcl7 in the perinatal mouse brain.” J Appl Toxicol; **31**(3):279-84.

Miyake H, Yoshimura K, Hara I, Eto H, Arakawa S, Kamidono S (1997). “Basic fibroblast growth factor regulates matrix metalloproteinases production and in vitro invasiveness in human bladder cancer cell lines.” J Urology; **157**:2351-2355.

Moon SK, Cha BY, Kim CH (2004). “ERK1/2 mediates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF-kappaB and AP-1: Involvement of the ras dependent pathway.” J Cell Physiol; **198**(3):417-27.

Mulero-Navarro S, Pozo-Guisado E, Perez-Mancera PA, Alvarez-Barrientos A, Catalina-Fernandez I, Hernandez-Nieto E, Sáenz-Santamaria J, Martínez N, Rojas JM, Sánchez-García I, Fernández-Salguero PM (2005). “Immortalized mouse mammary fibroblasts lacking dioxin receptor have impaired tumorigenicity in a subcutaneous mouse xenograft model.” J Biol Chem; **280**:28731–28741.

Muñoz de Toro M, Beldoménico HR, García SR, Stokera C, De Jesus JJ, Beldoménico PM, Ramos JG, Luque EH (2006). “Organochlorine levels in adipose tissue of women from a littoral region of Argentina.” Environmental Research; **102**:107–112.

Muthuswamy SK, Siegel PM, Dankort DL, Webster MA, Muller WJ (1994). "Mammary tumors expressing the neu proto-oncogene possess elevated c-Src tyrosine kinase activity." Mol Cell Biol; **14**(1):735-43.

Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Kataoka H, Koono M (1999). "Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets." Histol Histopathol; **14**(4):1183–97.

Nagase H y Woessner JF Jr (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem; **274**:21491-21494.

Nakashima Y, Ohsawa S, Umegaki K, Ikegami S (1997). "Hexachlorobenzene accumulated by dams during pregnancy is transferred to suckling rats during early lactation." J Nutr; **127**(4):648-54.

Nicholson RI, McClelland RA, Gee JMW, Manning DL, Cannon P, Robertson JF, Ellis IO, Blamey RW (1994). "Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer: association with response to endocrine terapy." Breast Cancer Res Treat; **29**:117-125.

Noguerol TN, Boronat S, Casado M, Raldua D, Barcelo D, Pina B (2006). "Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays." Anal Bioanal Chem; **385**(6):1012-9.

Okada M, Nakagawa H (1989). "A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-src function." J Biol Chem; **264**(35): 20886-93.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000). "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." Embo J; **19**(13):3159-67.

Ostrander JH, Daniel AR, Lofgren K, Kleer CG, Lange CA (2007). "Breast tumor kinase (Protein Tyrosine Kinase 6) regulates heregulin induced activation of ERK5 and p38 MAP kinases in breast cancer cells". Cancer Res; **67**:4199–4209.

Ottenhoff-Kalff AE, Rijksen G, van Beurden EA, Hennipman A, Michels AA, Staal GE (1992). "Characterization of protein tyrosine kinases from human breast cancer: involvement of the c-src oncogene product." Cancer Res; **52**(17):4773-8.

Ou YC, Conolly RB, Thomas RS, Xu Y, Andersen ME, Chubb LS, Pitot HC, Yang RS (2001). "A clonal growth model: time-course simulations of liver foci growth following penta- or hexachlorobenzene treatment in a medium-term bioassay." Cancer Res; **61**(5):1879-89.

Oude-Weernink PA, Ottenhoff-Kalff AE, Vendrig MP, van Beurden EA, Staal GE, Rijksen G (1994). "Functional interaction between the epidermal growth factor receptor and c-Src kinase activity." FEBS Lett; **352**:296-300.

Page DL (1991). "Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favourable prognostic types." Am J Surg Pathol; **15**:334–349.

Park JY, Shigenaga MK, Ames BN (1996). "Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A; **93**(6): 2322-2327.

Park S, Mazina O, Kitagawa A, Wong P, Matsumura F (2004). "TCDD causes suppression of growth and differentiation of MCF10A, human 705 mammary epithelial cells by interfering with their insulin receptor signaling through c-Src kinase and ERK activation." J Biochem Mol Toxicol;**18**:322–331.

Park S, Dong B, Matsumura F (2007). "Rapid activation of c-Src kinase by dioxin is mediated by the Cdc37-HSP90 complex as part of Ah receptor signaling in MCF10A cells." Biochemistry; **46** (3):899-908.

Parkin DM (2001). "Global cancer statistics in the year 2000." Lancet Oncol; **2**(9):533-43.

Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJ (1997). "Matrix Metalloproteinases." Brit J Surgery; **84**:160-166.

Peles E, Yarden Y (1993). "Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors." Bioessays; **15**(12):815-24.

Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM (2004). "Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis." Clin Cancer Res; **10**:7621–7628.

Pendas AM, Balbin M, Llano E, Jimenez MG, Lopez-Otin C (1997). "Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase- 3 gene (MMP13)." Genomics; **40**:222-33.

Peng TL, Chen J, Mao W, Song X, Chen MH (2009). "Aryl hydrocarbon receptor pathway activation enhances gastric cancer cell invasiveness likely through a c-Jun-dependent induction of matrix metalloproteinase-9." BMC Cell Biol; **16**:10-27.

Peña D, Pontillo C, García MA, Cocca C, Alvarez L, Chiappini F, Bourguignon N, Frahm I. Bergoc R, Kleiman de Pisarev DL, Randi A (2012). "Alterations in c-Src/HER1 and Estrogen Receptor α signaling pathways in mammary gland and tumors of Hexachlorobenzene-treated rats." Toxicology; DOI: 10.1016/j.tox.2011.12.012.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." Nature; **406**:747-752.

Plante I, Cyr DG, Charbonneau M (2005). "Involvement of the integrin-linked kinase pathway in hexachlorobenzene-induced gender-specific rat hepatocarcinogenesis." Toxicol Sci; **88**:346–357.

Pollard TD, Borisy GG (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." Cell; **112:**453-465.

Pollenz RS (1996). "The aryl-hydrocarbon receptor, but not the arylhydrocarbon receptor nuclear transporter protein, is rapidly depleted inhepatic and nonhepatic culture cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzop- dioxin." Mol Pharmacol; **49**:391–398.

Polyak K (2007). "Breast cancer: origins and evolution." J Clin Invest; **117**(11):3155-63.

Price JT, Wilson HM, Haites NE (1996). "Epidermal growth factor (EGF) increases the in vitro invasion, motility and adhesion interactions of the primary renal carcinoma cell line, A704." Eur J Cancer; **32**A(11):1977–1982.

Price JT, Tiganis T, Agarwal A, Djakiew D, Thompson EW (1999). "Epidermal Growth Factor Promotes MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Migration through a Phosphatidylinositol 3´-Kinase and Phospholipase C-dependent Mechanism". Cancer Research; **59**:5475–5478.

Puga A, Tomlinson CR, Xia Y (2005). "Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways." Biochem Pharmacol; **69**(2):199-207.

Puga A, Ma C, Marlowe JL (2009). "The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiplesignal transduction pathways." Biochemical pharmacology; **77**:713–722.

Radinsky R, Risin S, Fan D, Dong Z, Bielenberg D, Bucana CD, Fidler IJ (1995). "Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells." Clin Cancer Res; **1**(1):19-31.

Radisky ES, Radisky DC (2010). "Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer." J Mammary Gland Biol Neoplasia; **15**:201–212.

Ralph JL, Orgebin-Crist MC, Lareyre JJ, Nelson CC (2003). "Disruption of androgen regulation in the prostate by the environmental contaminant hexachlorobenzene." Environ Health Perspect; **111**(4):461-6.

Randi AS, Hernandez S, Alvarez L, Sanchez M, Schwarcz M, Kleiman de Pisarev DL (2003a). "Hexachlorobenzene-induced early changes in ornithine decarboxylase and protein tyrosine kinase activities, polyamines and c-Myc, c-Fos and c-Jun proto-oncogenes in rat liver." Toxicol Sci; **76**(2):291-8.

Randi AS, Sancovich HA, Ferramola de Sancovich AM, Loaiza A, Kolliker Frers RA, Spinelli F, Kleiman de Pisarev DL (2003b). "Effect of in vivo administered hexachlorobenzene on epidermal growth factor receptor levels, protein tyrosine kinase activity, and phosphotyrosine content in rat liver." Biochem Pharmacol ; **65**(9):1495-506.

Randi AS, Cocca C, Carbone V, Nuñez M, Croci M, Gutierrez A, Bergoc R, Kleiman de Pisarev DL (2006). "Hexachlorobenzene is a tumor Co-carcinogen and induces alterations in Insulin Growth Factors Signaling Pathway in the Rat Mammary Gland." Toxicological Sciences; **89** (1):83-92.

Randi AS, Sanchez MS, Alvarez L, Cardozo J, Pontillo C, Kleiman de Pisarev D (2008). "Hexachlorobenzene triggers RHA translocation to the nucleus, c-Src activation and EGFR transactivation in rat liver." Toxicol Lett; **177**(2):116-22.

Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA (2004). "The JAK/STAT signaling pathway." J Cell Sci; **117**(8):1281-3.

Reed L, Buchner V, Tchounwou PB (2007). "Environmental toxicology and health effects associated with hexachlorobenzene exposure." Rev Environ Health; **22**(3):213-43.

Rho O, Kim DJ, Kiguchi K, DiGiovanni J (2010). "Growth factor signaling pathways as targets for prevention of epithelial carcinogenesis." Mol Carcinog; **50**(4):264-79.

Riggins RB, Thomas KS, Ta HQ, Wen J, Davis RJ, Schuh NR, Donelan SS, Owen KA, Gibson MA, Shupnik MA, Silva CM, Parsons SJ, Clarke R, Bouton AH (2006). "Physical and functional interactions between Cas and c-Src induce tamoxifen resistance of breast cancer cells through pathways involving epidermal growth factor receptor and signal transducer and activator of transcription 5b." Cancer Res; **66**:7007-7015.

Roche S, Koegl M, Barone MV, Roussel MF, Courtneidge SA (1995). "DNA synthesis induced by some but not all growth factors requires Src family protein tyrosine kinases." Mol Cell Biol; **15**(2):1102-9.

Rodríguez-Fragoso L, Melendez K, Hudson LG, Lauer FT, Burchiel SW (2009). "EGF-receptor phosphorylation and downstream signaling are activated by benzo[a]pyrene 3,6-quinone and benzo[a]pyrene 1,6-quinone in human mammary epithelial cells." Toxicol Appl Pharmacol; **235**:321-328.

Roman BL, Timms BG, Prins GS, Peterson RE (1998). "In utero and lactational exposure of the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs prostate development 2. Effects on growth and cytodifferentiation." Toxicol Appl Pharmacol; **150**(2):254-70.

Romieu I, Hernandez-Avila M, Lazcano-Ponce E, Weber JP, Dewailly E (2000). "Breast cancer, lactation history, and serum organochlorines." Am J Epidemiol; **152**:363–370.

Roskoski R Jr (2005). "Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation." Biochem Biophys Res Commun; **331**(1):1-14.

Russo J, Hu YF, Yang X, Russo IH (2000). "Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer." J Natl Cancer Inst Monogr; (27):17-37.

Russo JM, Hasan Lareef G, Balogh S, Guo, Russo IH (2003). "Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells." J Steroid Biochem Mol Biol; **87**(1):1-25.

Safe S, Wormke M, Samudio I (2000). "Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells." J Mammary Gland Biol Neoplasia; **5**(3):295-306.

Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL (1987). "Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer." Lancet; **1**(8547):1398-402.

Salehi F, Turner MC, Phillips KP, Wigle DT, Krewski D, Aronson KJ (2008). "Review of the etiology of breast cancer with special attention to organochlorines as potential endocrine disruptors." J Toxicol Environ Health B Crit Rev; **11**(3-4):276-300.

Sasaoka T, Langlois WJ, Leitner JW, Draznin B, Olefsky JM (1994). "The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras." J Biol Chem; **269**(51):32621-5.

Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, RHA A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA (2003). "From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression." Proc Natl Acad Sci USA; **100**:7737–7742.

Seifert A, Rau S, Küllertz G, Fischer B, Santos AN (2009). "TCDD induces cell migration via NFATc1/ATX-signaling in MCF-7 cells." Toxicol Lett; **184**(1):26-32.

Seton-Rogers SE, Lu Y, Hines LM, Koundinya M, LaBaer J, Muthuswamy SK, Brugge JS (2004). "Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells." Proc Natl Acad Sci USA; **101**(5):1257–1262

Shibata T, Kawano T, Nagayasu H, Okumura K, Arisue M, Hamada J, Takeichi N, Hosokawa M (1996). "Enhancing effects of epidermal growth factor on human squamous cell carcinoma motility and matrix degradation but not growth." Tumour Biol; **17**(3):168–175.

Shin SR, Sánchez-Velar N, Sherr DH, Sonenshein GE (2006). "7,12-dimethylbenz(a)anthracene treatment of a c-rel mouse mammary tumor cell line induces epithelial to mesenchymal transition via activation of nuclear factor-kappaB." Cancer Res; **66**(5):2570-5.

Silva CM y Shupnik MA (2007). "Integration of steroid and growth factor pathways in breast cancer: focus on signal transducers and activators of transcription and their potential role in resistance." Mol Endocrinol; **21**(7):1499-512.

Smith AG, Carthew P, Francis JE, Cabral JR, Manson MM (1993). "Enhancement by iron of hepatic neoplasia in rats caused by hexachlorobenzene." Carcinogenesis; **14**(7): 1381-7.

Song G, Ouyang G, Bao S (2005). "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival." J Cell Mol Med; **9**(1):59-71.

Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen- Dale AL (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc Natl Acad Sci U S A; **98**:10869-10874.

Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D (2003). "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets." Proc Natl Acad Sci U S A; **100**:8418-8423.

Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C (1994). "The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells." Environ Health Perspect; **102**(4):380-3.

Soto-Guzman A, Navarro-Tito N, Castro-Sanchez L, Martinez-Orozco R, Perez-Salazar E. (2010) "Oleic acid promotes MMP-9 secretion and invasion in breast cancer cells." Clin Exp Metastasis; **27**:505–515.

Spink DC, Spink BC, Cao JQ, De Pasquale JA, Pentecost BT, Fasco MJ, Li Y, Sutter TR (1998). "Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells." Carcinogenesis; **19**(2):291–298.

Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart. HE (1990). "Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation." Proc Natl Acad Sci USA; **87**:364-368.

Stamenkovic (2003). "Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases." J Pathol; **200**:448-464.

Stanford JL, Herrinton LJ, Schwartz SM, Weiss NS (1995). "Breast cancer incidence in Asian migrants to the United States and their descendants." Epidemiology; **6**(2):181-3.

Stetler-Stevenson W (1999). "Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention." J Clin Invest; **103**:1237–1241.

Summy JM, Gallick GE (2003). "Src family kinases in tumor progression and metastasis." Cancer Metastasis Rev; **22**(4):337-58.

Sundlof SM, Parker AJ, Simon J, Dorner JL, Hansen LG (1981). "Sub-acute toxicity of hexachlorobenzene in female beagles, including electroencephalographic changes." Vet Hum Toxicol; **23**(2):92-6.

Takagi TN, Matsui KA, Yamashita K, Ohmori H, Yasuda M (2000). "Pathogenesis of cleft palate in mouse embryos exposed to 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)." Teratog Carcinog Mutagen; **20**(2):73-86.

Tanimura S, Asato K, Fujishiro SH, Kohno M (2003). "Specific blockade of the ERK pathway inhibits the invasiveness of tumor cells: down-regulation of matrix metalloproteinase-3/-9/-14 and CD44." Biochem Biophys Res Commun; **304**(4):801-6.

Tavassoli FA y Devilee P (2003). "World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs." IARC press, Lyon.

Thiery JP (2002): "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer; **2**:442-454.

Thiery JP (2003). "Epithelial-mesenchymal transitions in developmentand pathologies." Curr Opin Cell Biol; **15**:740-746.

Tice DA, Biscardi JS, Nickles AL, Parsons SJ (1999). "Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor." Proc Natl Acad Sci U S A; **16**:96(4):1415-20.

Tie-Li P, Jie C, Wei M, Xin S y Min-Hu C (2009). "Aryl hydrocarbon receptor pathway activation enhances gastric cancer cell invasiveness likely through a c-Jun-dependent induction of matrix metalloproteinase-9." BMC Cell Biology; **10**:27-34.

To-Figueras J, Sala M, Otero R, Barrot C, Santiago-Silva M, Rodamilans M, Herrero C, Grimalt J, Sunyer J (1997). "Metabolism of Hexachlorobenzene in humans: Association between serum levels and urinary metabolites in a highly exponed population." Envirom Health Perspect; **105**:78-83

Toi M, Osaki A, Yamada H, Toge T. (1991). "Epidermal growth factor receptor expression as a prognostic indicator in breast cancer." Eur J Cancer; **27**(8):977-80.

Toker A, Yoeli-Lerner M (2006). "Akt signaling and cancer: surviving but not moving on." Cancer Res; **66**:3963–3966.

Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, Wei G, Shen L, Tanner SM, Creasap N, Rosol TJ, Robinson ML, Eng C, Ostrowski MC, Leone G (2008). "Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer." Cancer Res; **68**(3):937–45.

Turner T, Chen P, Goodly LJ, Wells A (1996). "EGF receptor signaling enhances in vivo invasiveness of DU-145 human prostate carcinoma cells." Clin Exp Metastasis; **14**(4):409-18.

Ueda Y, Imai K, Tsuchiya H Fujimoto N, Nakanishi I, Katsuda S, Seiki M, Okada Y (1996). "Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B) is expressed in multinucleated giant cells of human giant cell tumor of bone and is associated with vascular invasion." Amer J Pathol; **148**:611-622.

Ueng TH, Chang YL, Tsai YY, Su JL, Chan PK, Shih JY,Lee YC, Ma YC, Kuo ML (2010). "Potential roles of fibroblast growth factor-9 in the benzo(a)pyrene-induced invasion in vitro and the metastasis of human lung adenocarcinoma." Arch Toxicol; **84**(8):651-60.

Urtreger AJ, Ladeda VE, Puricelli L, Rivelli A, Vidal M del C, Sacerdote de Lustig E, Bal de Kier Joffe´ E (1997). "Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in 2 new murine mammary tumor cell lines." Int J Oncol; **11**:489–96.

Usami Y, Satake S, Nakayama F, Matsumoto M, Ohnuma K, Komori T, Semba S, Ito A, Yokozaki H (2008). "Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression." J Pathol; **215**(3):330–9.

Valastyan S, Weinberg RA (2011). "Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms." Cell; **147**(2):275-92.

Valerón PF, Pestano JJ, Luzardo OP, Zumbado ML, Almeida M, Boada LD (2009). "Differential effects exerted on human mammary epithelial cells by environmentally relevant organochlorine pesticides either individually or in combination." Chemico-Biological Interactions; **180**:485–491.

Valster A, Tran NL, Nakada M, Berens ME, Chan AY, Symons M (2005). "Cell migration and invasion assays." Methods; **37**(2):208-15.

van Birgelen AP (1998). "Hexachlorobenzene as a possible major contributor to the dioxin activity of human milk." Environ Health Perspect ; **106**(11): 683-688.

van Raaij JA, Frijters CM, van den Berg KJ (1993). "Hexachlorobenzene-induced hypothyroidism. Involvement of different mechanisms by parent compound and metabolite." Biochem Pharmacol; **46**(8): 1385-91.

van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH (2002). "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer." Nature; **415**:530–536.

van Wart HE, Birkedal-Hansen H (1990). "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family." Proc Natl Acad Sci USA; **87**:5578-5582.

Vergara D, Merlot B, Lucot JP, Collinet P, Vinatier D, Fournier I, Salzet M (2010). "Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer." Cancer Lett; **291**(1):59-66.

Villano CM, Murphy KA, Akintobi A, White LA (2006). "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells." Toxicol Appl Pharmacol; **210**(3):212-24.

Wang C, Navab R, Iakovlev V, Leng Y, Zhang J, Tsao MS, Siminovitch K, McCready DR, Done SJ (2007). "Abelson interactor protein-1 positively regulates breast cancer cell proliferation, migration, and invasion." Mol Cancer Res; **5**(10):1031-9.

Wang J, Wan W, Sun R, Liu Y, Sun X, Ma D, Zhang N (2008). "Reduction of Akt2 expression inhibits chemotaxis signal transduction in human breast cancer cells." Cell Signal; **20**(6):1025-34.

Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer L (2005). "Breast cancer metastasis: markers and models." J Nat Rev Cancer; **5**(8):591-602.

Westhoff MA, Serrels B, Fincham VJ, Frame MC and Carragher NO (2004). "c-Src-mediated phosphorylation of Focal Adhesion Kinase coples actin and adhesion dinamics to suvival signaling." Mol and Cel Biology; **24**(18):8113-8133.

Whyte J, Bergin O, Bianchi A, McNally S, Martin F (2009). "Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development." Breast Cancer Res; **11**(5):209.

Wilde A, Beattie EC, Lem L, Riethof DA, Liu SH, Mobley WC, Soriano P, Brodsky FM (1999). "EGF receptor signaling stimulates src kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake." Cell; **96**:677–687.

Williams AC, Harper SJ, Paraskeva C (1990). "Neoplastic transformation of a human colonic epithelial cell line: in vitro evidence for the adenoma to carcinoma sequence." Cancer Res; **50**(15):4724-30.

Wilson LK, Luttrell DK, Parsons JT, Parsons SJ (1989). "pp60c-src tyrosine kinase, myristylation, and modulatory domains are required for enhanced mitogenic responsiveness to epidermal growth factor seen in cells overexpressing c-src." Mol Cell Biol; **9**(4):1536-1544.

Woelfle J, Chia DJ, Rotwein P (2003). "Mechanisms of growth hormone (GH) action. Identification of conserved Stat5 binding sites that mediate GH-induced insulin-like growth factor-I geneactivation." J Biol Chem; **278**:51261-51266.

Wolff MS, Toniolo PG, Lee EW, Rivera M, Dubin N (1993). "Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer." J Natl Cancer Inst; **85**:648–652.

Wolff MS, Toniolo PG (1995). "Environmental organochlorine exposure as a potential etiologic factor in breast cancer." Environ Health Perspect; **103**(7):141-5.

Wong PS, Matsumura F (2007). "Promotion of breast cancer by beta-hexachlorocyclohexane in MCF10AT1 cells and MMTV-neu mice." BMC Cancer; **7**:130-138.

Woolcott CG, Aronson KJ, Hanna WM, SenGupta SK, McCready DR, Sterns EE, Miller AB (2001). "Organochlorines and breast cancer risk by receptor status, tumor size, and grade (Canada)." Cancer Causes Control; **12**(5):395-404.

Wright C, Nicholson S, Angus B, Sainsbury JR, Farndon J, Cairns J, Harris AL, Horne CH (1992). "Relationship between c-erB2 protein product expression and response to endocrine therapy in advanced breast cancer." Br J Cancer; **65**:118- 121.

Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, Graf T, Pollard JW, Segall J, Condeelis J (2004). "A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors." Cancer Res; **64**(19):7022–9.

Xie H, Pallero MA, Gupta K, Chang P, Ware MF, Witke W, Kwiatkowski DJ, Lauffenburger DA, Murphy-Ullrich JE, Wells A (1998). "EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLCgamma signaling pathway." J Cell Sci; **111**(5):615-624.

Xue, C, Wyckoff J, Liang F, Sidani M, Violini S, Tsai KL, Zhang ZY, Sahai E, Condeelis J, Segall. JE (2006). "Epidermal growth factor receptor overexpression results in increased tumor cell motility in vivo coordinately with enhanced intravasation and metastasis". Cancer Res; **66**:192-197.

Yilmaz M, Christofori G, Lehembre F (2007). "Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis." Trends Mol Med; **13**(12):535-41.

Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, Toker A (2005). "Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT." Mol Cell; **20**:539–550.

Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS (2003). "Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis." J Biochem Mol Biol; **36**(1):128-37.

Zheng T, Holford TR, Mayne ST, Tessari J, Owens PH, Zahm SH, Zhang B, Dubrow R, Ward B, Carter D, Boyle P (1999). "Environmental exposure to hexachlorobenzene (HCB) and risk of female breast cancer in Connecticut." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; **8**(5): 407-11.

Zou E, Hatakeyama M, Matsumura F (2002). "Foci formation of MCF7 cells as an in vitro screening method for estrogenic chemicals." Environ Toxicol Pharmacol; **11**(2):71-7.

Zou E, Matsumura F (2003). "Long-term exposure to beta-hexachlorocyclohexane (beta-HCH) promotes transformation and invasiveness of MCF-7 human breast cancer cells." Biochem Pharmacol; **66**(5):831-840.