



Tesis Doctoral

**PAPEL DE B-RAF EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE TIROIDES:
COOPERACIÓN CON TGF β EN LA TRANSICIÓN
EPITELIO-MESÉNQUIMA**

Pablo Baquero Valls

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Alcalá de Henares 2012

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Antonio Chiloeches Gálvez, Doctor en Biología y Profesor Titular de Universidad del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá,

INFORMA:

Que el trabajo presentado por **Don. Pablo Baquero Valls**, titulado **“PAPEL DE B-RAF EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE TIROIDES: COOPERACIÓN CON TGF β EN LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA”**, ha sido realizado bajo mi dirección en este Departamento y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que el interesado opte al Grado de Doctor.

Alcalá de Henares, a 29 de Marzo de 2012

Dr. Antonio Chiloeches Gálvez

M^a José Carmena Sierra, Directora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título **“PAPEL DE B-RAF EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE TIROIDES: COOPERACIÓN CON TGF β EN LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA”** ha sido realizada por **Don. Pablo Baquero Valls** en este Departamento, bajo la dirección del **Dr. Antonio Chiloeches Gálvez** y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que el interesado opte al Grado de Doctor.

Alcalá de Henares, a 29 de Marzo de 2012

Dra. M^a José Carmena Sierra

AGRADECIMIENTOS

Dicen que ser agradecido es de bien nacido. Pues yo debo haber nacido mejor que bien porque solo tengo palabras de agradecimiento para todos vosotros. ¡Vamos que Almodóvar en los Oscar es un aficionado a mi lado! No sois precisamente la Virgen de Fátima o la de Guadalupe a las que mentó ese día pero también me habéis traído suerte a lo largo de estos años. ¡Y qué años! ¡Ha habido de todo! Si es que solo de pensar en todos los momentos que hemos pasado me río, por no decir otra palabra en público. Hemos jugado al padel, hemos jugado al baloncesto, hemos nadado, hemos hecho excursiones, hemos hecho viajes (¡y que viajes!), hemos hecho cenas, hemos hecho potatos, hemos salido de fiestasaaaaa (¡y qué fiestas!) y para rematar... ¡España ha ganado una Eurocopa y un Mundial! ¡Qué locura! Personalmente, estos años también han sido la mar de ajetreados. Me he independizado y mudado dos veces, me he comprado una casa, me han robado, he tenido problemas con hacienda, he pasado del “dyc-cola” a la “sal de frutas-limón”... en fin, que me he hecho mayor.

Leyendo lo anterior parece que no he dado un palo al agua. Pues no, no he sido ningún Pocholo ni el hijo de “la Thyssen”. También he trabajado mucho. Parece que fue ayer cuando entré en el laboratorio con la melena al viento.

A los primeros que conocí fueron a Javi, Mali y Ariel. Allí estaban los tres con cara de no haber roto un plato en su vida. Gracias a los tres por vuestros consejos en mis primeros pasos en el laboratorio.

Luego llegó Irene de su congreso de Córdoba. ¡Qué tía! Lo primero que pensé fue: “que Dios me pille confesado”. Tendría que escribir otra tesis para darte las gracias por todo, pero va a ser que no. Una vez escuché que a parte de la familia hay 4 ó 5 personas que te marcan la vida y por las que siempre sentirás un cariño especial. En estas páginas mencionaré a 3 de ellas, y la primera eres tú, y con eso te lo digo todo. A ti, David, por cercanía, te toca aguantarme y compartir tus riquezas conmigo cuando seas un alto ejecutivo en chanclas. Gracias por ser el mejor amigo que he tenido estos años, eres un crack.

Gracias a ti también Eva, y a ti, Ana, por las risas que nos hemos echado juntos. Espero que allí donde estéis os vaya todo muy bien y que nos encontremos algún día. Da igual donde, lo pasaremos bien seguro. Juanito, que grande eres campeón. Espero que estés buceando mucho y que algún día nos volvamos a ver, aunque sea en una boda en Galicia o algo... Eres un fenómeno en detalle atomístico. Gracias a ti también Claire, porque aunque en la carrera subieras las campanas de Gauss de las notas, durante estos años lo has arreglado con creces. Eres una fenómeno.

Nadia. Llegaste al laboratorio con pinta de mosquita muerta, pero de eso nada. Has sido un apoyo muy grande para mí estos años y lo hemos pasado de cine, tanto dentro como fuera del laboratorio. Estáte donde estés te echaré mucho de menos, te has ganado a pulso ser la segunda persona que ha marcado esta etapa de mi vida. No cambies nunca.

Anita. ¡Qué te voy a decir! Si buscas *la alegría de la huerta* en google sale tu cara. No pierdas nunca esa sonrisa que me ha encandilado cada mañana durante este tiempo. Gracias por compartir las naranjas, por reírte tanto de mis tonterías y por hacerme el trabajo mucho más llevadero. ¡Todos los trabajos tendrían que tener una Ana!

Gracias a ti también Raúl, porque aunque fuiste desterrado del laboratorio siempre te tuve en el corazón... Deja de echarle cuento a lo de la rodilla y vente a jugar al baloncesto ya. No creo que notemos mucha diferencia pero por lo menos nos reimos un rato. Eres un majete.

A Eva y a Volmir. Porque aunque no hayamos coincidido mucho en el tiempo a la buena gente se la reconoce en seguida, y vosotros sois de lo mejorcito. Gracias por aguantarme las manías del laboratorio, sobre todo a ti Eva. Alguna vez también pondrá tú los carteles en los congeladores, ya lo verás.

Gracias a Santiago y Begoña por ser tan buena gente. Contad conmigo para ser el representante de Diego cuando sea un profesional de Hockey. Prometo no dejarle ir con mujeres malas ni beber nada que lleve alcohol. A ti Pilar, gracias también por ser tan maja y ayudarme siempre en lo que has podido. Gracias a los tres por todo.

Gracias a vosotros, los Jimenez. A ti Carlos Mario, por tus clases y tus tablas de natación. ¡Hijuepuuuta! ¡Eres un fenómeno! A ti Miguel, alias “Panchi Barbecho”. Gracias por el *Layout*, si lo sé te llamo antes. Aunque no lo pareces, eres listo tronco. Aquí tenéis un amigo para lo que queráis, sobre todo para invitarle a Colombia. Kilian y Cris. Aunque con vosotros no he tenido tanta relación, siempre seréis bien recibidos en mi casa. Gracias a ti también Antonio Jimenez por las paellas y los “refrescos” en tu porche. ¡Qué gozada! Gracias también por dejarme el microscopio de fluorescencia y perdona por los *settings* que a día de hoy no sé si borré o no. A Federico. A ti te debo parte de mi formación universitaria y eso se merece un buen agradecimiento, muchas gracias.

No quiero olvidarme de gente con la que, aunque he tenido menos relación, han facilitado que esta tesis se llevara a cabo. Gracias a Guillermo y a Juan. A Juan por ser tan buena gente como es y a Guillermo por los puritos al sol que nos hemos “metido pal pecho”. Alguna vez iré a Ciudad Rodrigo y nos tomaremos unas cañas. Gracias a Pilar Rubio y a Olga por vuestra paciencia con las q-pcrs. A Isabel y a las chicas de cultivos. En especial a Isabel, gracias por tu paciencia en el confocal y por los test de los malditos micoplasmas. Gracias también a Laura-Alicia que después de todo, igual volvemos a coincidir en un laboratorio y a lo mejor, hasta voy a tu tesis express y todo. Gracias a todas las chicas de Fisio porque no solo hemos compartido pasillo, sino que también hemos compartido risas y buenos momentos. Gracias también a Manolo Puyol. A él también le debo parte de mi formación como a Inés y a Nieves. Ellas fueron las directoras de la primera edición del Máster, y por eso, y el apoyo que nos distéis os quiero dar las gracias más sinceras. Gracias también a vuestras chicas, Nuria, Diana y Cecilia por los ratos revelando en los que hemos compartido la frustración del *western en blanco*.

Gracias en especial a Angélica, porque si todo el mundo trabajara como ella se acabaría la crisis echando... ¿seguro que no eres alemana? Un beso muy grande para ti.

Gracias en especial a mi jefe y amigo Antonio. Porque hemos sido más pobres que vagos, porque las noches han sido más que alegres y las mañanas no han sido tan tristes y porque después de todas las reuniones de pastores no ha habido tantas ovejas muertas. Alguien dijo alguna vez que el éxito se consigue cuando la gente a la que admiras alguna vez siente lo mismo por tu trabajo. Si alguna vez tengo éxito, significará entonces que mi trabajo te ha parecido admirable...o admirablemente farragoso. Sí, así es, te has ganado a pulso ser la tercera persona especial en mi vida. Por eso, nunca comerás conejo en mi casa, ni salchichas frescas, pero sí oreja porque tu mujer se lo merece todo. Gracias a ti también Marina por los buenos ratos que me has hecho pasar.

¿Como me enrolla eh? Ya falta poco. Gracias a mis amigos de toda la vida porque como vosotros no hay nadie. Siento no mencionarlos pero ya os haré en buen discurso en vuestra boda, así que arreando majetes. Ya sabéis, la confianza da asco. Cuando lea la tesis os podéis preparar para hacer un buen maratón de cubatas de los que solíamos hacer.

Esta tesis se la dedico a mi familia. Gracias Papá y Mamá por darme todo a cambio de nada. A ti Papá por haber estudiado y trabajado tanto para darme todo lo que he necesitado. ¡Ójala algún día pueda yo hacer lo mismo por un hijo! A ti Mamá, por ser *la autora de mis días*, cuidarme y animarme en todo momento. Perdona por no llamarte más. A partir de ahora prometo hacerlo con más frecuencia... y también prometo ser bueno en las bodas familiares. Porque un Dr tiene que ser bueno... ¿o a lo mejor no? Gracias Moni por ser la mejor hermana que uno podría tener y por convertirte en una mujer tan lista como eres. Me podría tatuar tranquilamente "orgullo de hermana" en el brazo, pero va a ser que no. Gracias también al resto de mi familia, a los que están y a los que no están. A mis tías y tíos, a todos mis primos. Gracias por quererme tanto aunque a veces no me lo merezca por ser tan "despegao". Con mi familia también incluyo a la de María. Gracias a todos por ser como sois y por habernos ayudado tanto. Un beso especial a Osquitar y a Alejandra, que aunque aún no ha nacido será una niña guapísima... ¡si se parece a la madre claro!

Pienso que todos estos agradecimientos que acabo de escribir no los podría hacer nadie que no fuera sobradamente feliz. Eso se lo debo a una sola persona. Gracias cariño. Por estar siempre a mi lado, por quererme tanto y por aguantarme, que no es poco. Eres la mejor persona que he conocido nunca. Tú eres mi Oscar. Este trabajo y todo lo que venga después es de los dos. Te quiero "gorda".

GRACIAS A TODOS.

Pablo.

ABSTRACT

Cancer development is a multistep process in which a succession of genetic alterations leads to the progressive conversion of normal cells into highly malignant derivatives by conferring growth advantage. In this way, transformation allows cancer cells to survive and proliferate under conditions that would normally be deleterious. In tumor cells, there are certain types of genes that are often mutated or highly expressed, called oncogenes. Normally, the protein products of these oncogenes belong to signalling pathways involved in key regulatory processes, such as proliferation, survival and migration. One example is the serine/threonine kinase B-RAF included in the Ras-RAF-MEK-ERK, which is mutated in approximately 10% of human cancers.

The most common genetic alteration in thyroid carcinoma is the oncogenic T1799A transversion of B-RAF. This mutation results in a V600E substitution which transforms the wild type protein in a constitutively activated kinase. Recent studies have shown that this mutant is important not only in early stages of the tumour, but also for the maintenance and progression of the disease.

The aim of this work is to study the implication of ^{V600E}B-RAF in processes related to cancer progression, such as migration and invasion, and elucidate new molecular mechanisms mediated by this oncogene in the development of thyroid carcinoma. For this purpose, we used three thyroid cancer cell lines, two of them harbouring ^{V600E}B-RAF mutation and one containing ^{WT}B-RAF. This model, together with several molecular strategies including the treatment with the specific ^{V600E}B-RAF inhibitor PLX4720, silencing B-RAF by small interference RNA and treatment with the MEK inhibitor U0126, allowed us to describe the role of B-RAF in thyroid carcinoma progression. Furthermore, to confirm some of the results obtained in this study, we overexpressed the mutant ^{V600E}B-RAF, by lentiviral transduction, in thyroid cells containing wild type B-RAF

Overall, in the first part of this work, we show that ^{V600E}B-RAF promotes cell migration and invasion. Moreover, this oncogene is involved in epithelial to mesenchymal transition (EMT) through the increase of Snail1 expression and E-cadherin repression. In addition, these effects are related to cell scattering observed when we overexpressed ^{V600E}B-RAF in ^{WT}B-RAF-cells. We also demonstrate that the expression of Snail1 is required for ^{V600E}B-RAF-induced E-cadherin repression. Furthermore, we show that overexpression of Snail1 promotes migration and invasion, indicating that one possible mechanism by which ^{V600E}B-RAF participates in the progression of thyroid cancer may be through regulating Snail1 and E-cadherin levels.

On the other hand, we demonstrate that, in our model, the multifunctional cytokine TGFβ lacks its antiproliferative and proapoptotic effects characteristic of some types and cellular contexts. By contrast, TGFβ promotes both EMT and cell migration, demonstrating a tumor promoting role in advanced stages of thyroid cancer. Importantly, these TGFβ-mediated effects were blocked by inhibition of ^{V600E}B-RAF and MEK, suggesting a cooperation between the MEK/ERK pathway and TGFβ signalling in thyroid cancer progression.

In addition, our data establish that ^{V600E}B-RAF induces secretion of functional TGFβ through a MEK-ERK dependent mechanism. Interestingly, the blocking of TGFβ signaling doesn't rescue

the ^{V600E}B-RAF-induced aggressive phenotype, showing that ^{V600E}B-RAF-induced cancer progression, is not mediated through TGFβ overexpression.

Finally, we observed that TGFβ affects two major focal contacts associated proteins. TGFβ increases ILK expression through a ^{V600E}B-RAF dependent mechanism but interestingly, this is not related to the EMT or the induction of a more migratory phenotype. On the other hand, treatment with TGFβ also raises FAK activity and its interaction with Src. In contrast with ILK, we show that both Src and FAK are involved in TGFβ-mediated EMT, since its inhibition decrease Snail1 levels. In this context, the role of ^{V600E}B-RAF appears to be independent of Src activity, suggesting the wide range of mechanisms by which TGFβ can induce EMT and clarifying alternatives to inhibit tumor aggressiveness of thyroid carcinoma.

Although further studies are warranted to characterize the molecular details of ^{V600E}B-RAF-mediated signal transduction and TGFβ function in thyroid cancer, the results reported here contribute to a better understanding of the molecular mechanisms underlying the progression and tumor malignancy of these kinds of tumors. Indeed, all these data demonstrate that oncogenic ^{V600E}B-RAF plays an important role in the induction of an invasive phenotype, and provide more evidences that support the therapeutic intervention by using ^{V600E}B-RAF inhibitors in advanced stages of thyroid cancer.

ATC: Carcinoma anaplásico tiroideo	MMP: Metaloproteinasa de la matriz extracelular
^{WT}B-RAF: B-RAF <i>wild type</i> , silvestre	MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol
Co-IP: Co-inmunoprecipitación	NES: Señal de exportación nuclear
CRD: Dominio rico en cisteínas	NIS: Co-transportador sodio yodo
CDK: Quinasa dependiente de ciclinas	NF-κB: Factor nuclear κB
DMSO: Dimetilsulfóxido	PCR: Reacción encadena de la polimerasa
ECM: Matriz extracelular	PH: Dominio de homología a pleckstrina
EMT: Transición epitelio-mesénquima	PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa
ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares	PIP3: Fosfatidilinositol trifosfato
FA: Filamento de actina	PLX: PLX4720, inhibidor de ^{V600E} B-RAF
FAK: Quinasa de adhesión focal	PTC: Carcinoma papilar tiroideo
FTC: Carcinoma folicular tiroideo	Q-PCR: PCR a tiempo real o PCR cuantitativa
GAP: Proteína activadora de la actividad GTPasa	RBD: Dominio de unión a Ras
GEF: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina	R-Smads: Smads asociadas al receptor
GPCR: Receptor acoplado a proteínas G	RTK: Receptor tirosina quinasa
GSK-3β: Glucógeno sintasa quinasa 3β	SBE: Elemento de unión a Smads
ILK: Quinasa ligada a integrinas	sc: <i>scrambled</i> ; secuencia de siRNA desordenada
ILKAP: Proteína asociada a ILK	SH: Dominio de homología a Src
I-Smads: Smads inhibitoras	siB-RAF: siRNA para B-RAF
JNK: Quinasa del dominio C-terminal de <i>c-Jun</i>	siFAK: siRNA para FAK
LOXL2: Lisil-oxidasa <i>like 2</i>	siILK: siRNA para ILK
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos	siRNA: ARN pequeño de interferencia
MAPKK: Proteína quinasa de MAPK	Tg: Tiroglobulina
MAPKKK: Proteína quinasa de MAPKK	TGFβ: Factor de crecimiento transformante
MET: Transición mesénquima-epitelio	TPO: Tiroperoxidasa
miARN: Micro ARN	TβR: Receptor de TGFβ
MLC: Cadena ligera de miosina	TSH: Hormona estimuladora del tiroides
MLCK: Quinasa de la cadena ligera de miosina	TSRH: Receptor de la hormona estimuladora del tiroides
	U0: U0126, inhibidor de MEK

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
PRÓLOGO	1
I. TIROIDES.....	3
1. GENERALIDADES	3
2. CÁNCER DE TIROIDES	4
2.1 Aspectos clínicos	4
2.2 Mecanismos moleculares implicados en el cáncer de tiroides	6
II. MIGRACIÓN CELULAR.....	7
1. EL MOVIMIENTO CELULAR	8
2. FORMACIÓN DE CONTACTOS FOCALES	10
2.1 FAK	10
2.2 Src	13
2.3 ILK	14
III. TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA.....	17
1. E-cadherina	18
1.1 Estructura	18
1.2 Regulación	19
1.3 Implicación en cáncer	21
2. Snail	21
2.1 Estructura y regulación	21
2.2 Funciones moleculares de Snail	24
2.3 Implicación en cáncer	24
IV. LA VÍA RAF-MEK-ERK.....	26
V. PROTEÍNAS RAF.....	29
1. ESTRUCTURA Y REGULACIÓN	29
1.1 Unión a Ras. Reclutamiento a la membrana	30
1.2 Fosforilación y activación	30
1.3 Activación de las proteínas RAF por dimerización	32
2. PAPEL DE ^{V600E} B-RAF EN CÁNCER	33
2.1 Efectos de ^{V600E} B-RAF en la tumorigénesis	34
2.2 Efectos de ^{V600E} B-RAF sobre la progresión tumoral	36
2.3 Efectos paradójicos de los inhibidores de ^{V600E} B-RAF	38
VI. TGFβ.....	40
1. SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR TGFβ	40
1.1 Vía TGFβ-Smads	40
1.2 Vías independientes de Smads	42

2. PAPEL DE TGF β EN CÁNCER	44
2.1 Papel de TGF β como supresor tumoral	45
2.2 Papel de TGF β en la progresión tumoral	46
2.3 Papel de TGF β en la EMT	47

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... 51

MATERIALES Y MÉTODOS..... 55

1. MATERIALES	57
2. MÉTODOS	61
2.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo	61
2.2 Transfecciones transitorias: <i>siRNA</i> y vectores de expresión	62
2.3 Transfecciones estables. Transducción con lentivirus	62
2.4 Preparación de extractos y determinación de la concentración de proteínas	63
2.5 Electroforesis y electrotransferencia de proteínas a membrana de PVDF	64
2.6 Inmunodetección de proteínas	64
2.7 Rehibridación de las membranas	65
2.8 Inmunoprecipitación (IP)	65
2.9 Inmunofluorescencia	65
2.10 Secuenciación	66
2.11 Extracción de ARN y retrotranscripción	67
2.12 PCR a tiempo real (Q-PCR)	67
2.13 Detección de la cantidad de TGF- β 1 mediante inmunoensayo	67
2.14 Ensayos de migración “cierre de herida”	67
2.15 Ensayos de Migración en cámaras <i>transwells</i>	68
2.16 Ensayos de invasión	68
2.17 Ensayo de incorporación de [3 H]-timidina	69
2.18 Ensayo de viabilidad celular	69
2.19 Análisis del contenido celular de ADN por marcaje con yoduro de propidio	69
2.20 Análisis de los datos	70

RESULTADOS..... 71

1. PAPEL DE ^{V600E} B-RAF EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE TIROIDES	74
1.1 Implicación de ^{V600E} B-RAF en los procesos de migración e invasión celular	74
1.2 Mecanismos moleculares mediados por B-RAF implicados en la progresión del cáncer tiroideo	81
2. PAPEL DE TGF β EN EL CÁNCER DE TIROIDES	89
2.1 Efecto de TGF β en la proliferación y supervivencia celular	89
2.2 Implicación de TGF β en la EMT	89
2.3 Efecto de TGF β sobre la migración celular	93

3. IMPLICACIÓN DE LA SECRECIÓN DE TGF β MEDIADA POR ^{V600E} B-RAF EN EL CÁNCER DE TIROIDES	95
3.1 Niveles de TGF β en las líneas WRO, 8505C y BHT101	95
3.2 Papel de ^{V600E} B-RAF en la secreción de TGF β	95
4. COOPERACIÓN ENTRE ^{V600E} B-RAF Y TGF β EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE TIROIDES	97
4.1 Papel de ^{V600E} B-RAF en la regulación de E-cadherina y Snail1 mediada por TGF β	98
4.2 Papel de ^{V600E} B-RAF en el aumento de la migración mediada por TGF β	101
5. PAPEL DE ^{V600E} B-RAF Y TGF β EN LA REGULACIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA MIGRACIÓN CELULAR	102
5.1 Papel de ILK en la EMT regulada por ^{V600E} B-RAF e ILK	102
5.2 Papel de FAK y Src en la EMT regulada por ^{V600E} B-RAF y TGF β	105

DISCUSIÓN.....111

1. ^{V600E} B-RAF REGULA LA PROLIFERACIÓN Y LA APOPTOSIS EN CÉLULAS TUMORALES TIROIDEAS	114
2. ^{V600E} B-RAF INDUCE LA EMT Y PARTICIPA EN EL AUMENTO DE MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR	116
3. TGF β INDUCE LA EMT EN CÁNCER DE TIROIDES	119
4. ^{V600E} B-RAF Y TGF β COOPERAN EN LA INDUCCIÓN DE LA EMT EN CÁNCER DE TIROIDES	121
5. ^{V600E} B-RAF Y TGF β REGULAN LA EMT INDEPENDIENTEMENTE DE ILK	124
6. LA VÍA Src/FAK Y ^{V600E} B-RAF COOPERAN EN LA EMT Y LA MIGRACIÓN CELULAR MEDIADA POR TGF β	126

CONCLUSIONES.....129

BIBLIOGRAFÍA.....133

A mis padres y a mi hermana

A María

Al Avi

"Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas, de pronto, cambiaron todas las preguntas". Mario Benedetti.

INTRODUCCIÓN

PRÓLOGO

Las células del cuerpo humano normalmente crecen, se dividen y mueren. Durante los primeros años de vida de un individuo las células se dividen con mayor rapidez permitiendo el crecimiento normal del organismo; en cambio, en la fase adulta, la mayoría de células únicamente se dividen para reemplazar células dañadas o muertas. Un tumor aparece cuando las células adquieren la capacidad de dividirse indefinidamente y evitar la muerte, causando, por tanto, un crecimiento incontrolado. Estas células, además de crecer en su localización de origen, pueden llegar a invadir tejidos adyacentes o distales y es entonces cuando hablamos de tumor maligno, tumor canceroso o simplemente, cáncer.

Para que una célula normal se transforme en cancerosa ha de cumplir una serie de requisitos descritos por Hanahan y Weinberg en el año 2000. Estos son: autosuficiencia para proliferar en ausencia de señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias de proliferación, evasión de la muerte celular programada o apoptosis, adquisición de potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, e invasión de tejidos y metástasis (1). Recientemente, gracias al progreso de la investigación en la última década a esta lista se han sumado otros dos factores: la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción provocada por la respuesta inmune. La adquisición de todas estas propiedades es posible gracias a dos características. La primera de ellas es la inestabilidad genómica, que da lugar a mutaciones aleatorias, deleciones, translocaciones, amplificaciones y ganancia o pérdida de un cromosoma completo, y generalmente conllevan a la activación de proteínas proto-oncogénicas o la inactivación de genes supresores de tumores. La segunda característica que permite la transformación celular es la respuesta inflamatoria que se da en lesiones crónicas, en la cual participan células del sistema inmune, que en algunos casos liberan moléculas bioactivas y/o sustancias químicas que actúan sobre las células vecinas induciendo el desarrollo tumoral (figura 1)(2).

Hoy en día, la mayoría de estrategias terapéuticas para abordar el tratamiento del cáncer están dirigidas sobre moléculas específicas que, de una manera o de otra, están implicadas en alguna de las características descritas anteriormente (figura 1). Aunque de este modo se pretende reducir los efectos colaterales y/o secundarios derivados de la acción del fármaco sobre una diana terapéutica diferente a la elegida, en la realidad, el efecto terapéutico es transitorio y en muchos de los casos aparecen resistencias y en consecuencia recaídas e incluso agravamiento de la enfermedad. Una explicación para este hecho es que cada una de las características implicadas en la transformación celular puede estar regulada por varias vías de señalización, sugiriendo que aunque se inhiba una de ellas, las células pueden sobrevivir mediante la regulación de otra vía, e incluso adquirir nuevas mutaciones y seguir proliferando. Por ello, es necesario el estudio de las alteraciones genéticas que dan lugar a proteínas mutantes capaces de iniciar la tumorigénesis, el conocimiento de las vías de señalización implicadas en la progresión tumoral y la posible relación que pueda existir entre ellas.

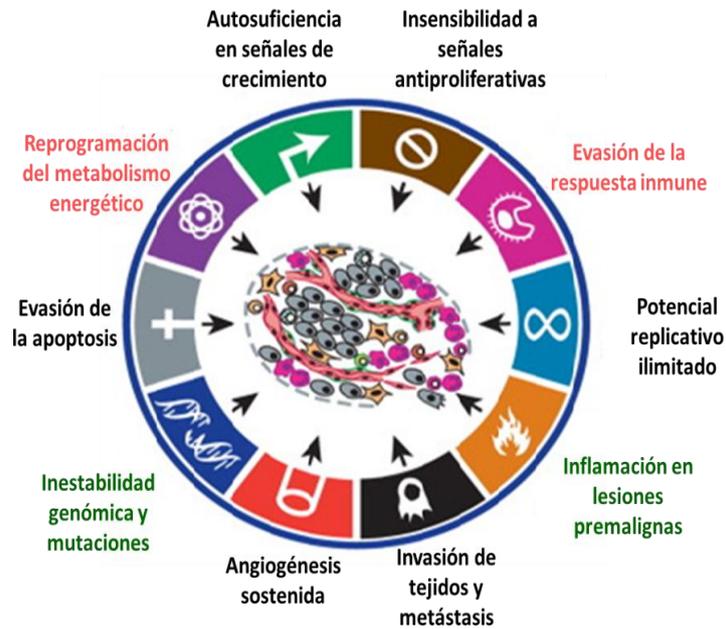


Figura 1. Principales requisitos y características para la transformación celular. En letra negra se describen los requisitos descritos para la progresión tumoral en el año 2000 (1), en letra roja, los dos requisitos incorporados recientemente, y finalmente, en letra verde, se especifican las características que permiten la transformación celular. Adaptado de Hanahan y Weinberg, 2011 (2).

I. TIROIDES

1. GENERALIDADES

La glándula tiroides es uno de los órganos endocrinos más grandes del cuerpo humano. Se localiza en la parte anterior de la tráquea, en la base del cuello, justo debajo de la “nuez de Adán” o cartílago tiroides (figura 2A). Está formada por dos lóbulos en forma de mariposa y compuesta por dos tipos celulares, las células foliculares y las células parafoliculares o células C (figura 2B). Las primeras son mayoritarias, tienen una morfología cuboidal, forman un epitelio alrededor de una masa proteica denominada coloide y se encargan de sintetizar las hormonas tiroideas. Las células parafoliculares se intercalan entre las foliculares y su función es la producción y secreción de la calcitonina.

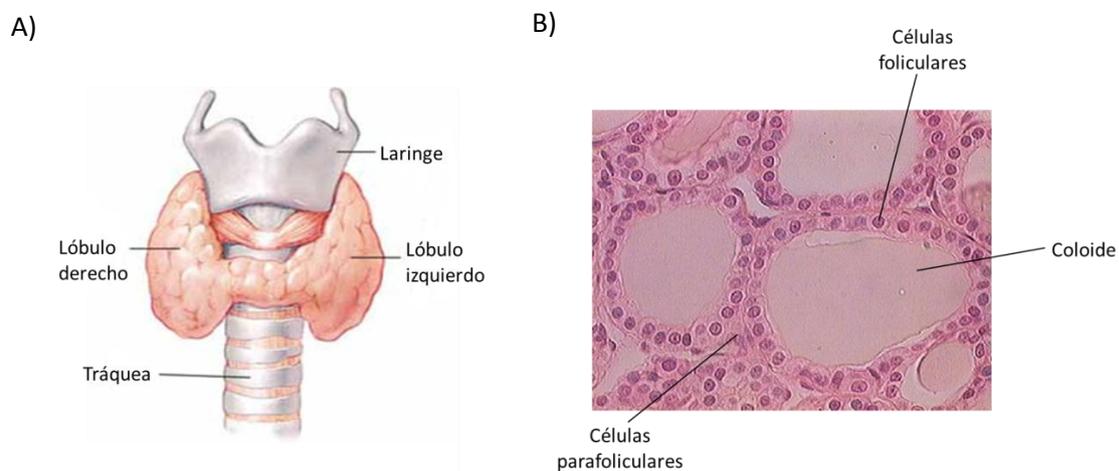


Figura 2. Glándula Tiroides y folículos tiroideos. A) Localización y representación de la glándula Tiroides. B) Imagen de un corte histológico de la glándula tiroidea donde se muestran las células foliculares, las células parafoliculares y el coloide.

La glándula Tiroides se regula a nivel hipotalámico a través de la liberación de la hormona liberadora de tirotrina (TRH, *Thyrotropin Releasing Hormone*). La TRH, a su vez, actúa en la hipófisis anterior induciendo la secreción de la hormona estimuladora del tiroides (TSH, *Thyroid Stimulating Hormone*). Finalmente, la TSH estimula la Tiroides produciendo la liberación de las hormonas tiroideas almacenadas en el coloide, la T4 o Tiroxina y la T3 o Triyodotironina. Las hormonas tiroideas están implicadas en gran cantidad de procesos vitales, pero especialmente en el aumento general del metabolismo celular, maduración y desarrollo de ciertos tejidos como el cerebro, la producción de energía y calor, y la regulación de las funciones mentales, cardíacas, respiratorias, reproductivas y sexuales.

En el proceso de síntesis de las hormonas tiroideas, el yodo es captado desde el torrente sanguíneo a las células tiroideas a través del cotransportador de sodio/yodo NIS, (*Sodium dependent Iodine Symporter*), localizado en la membrana basal (figura 3). A continuación, el yodo es transportado desde el interior de la célula folicular al coloide a través de

transportadores como la pendrina (también llamado SLC26A4), donde a través de la enzima tiroperoxidasa (TPO), es incorporado a la tiroglobulina (Tg), proceso que recibe el nombre de organificación del yodo. La Tg, una vez yodada, es almacenada en el coloide en forma de vesículas hasta su utilización. Cuando el tirocito es estimulado por la acción de la TSH sobre su receptor TSHR (*Thyroid Stimulating Hormone Receptor*), la Tg yodada del coloide se introduce en el tirocito. Una vez dentro, las vesículas se fusionan con fagolisosomas y se produce la lisis parcial de la Tg, dando lugar a las hormonas tiroideas, T₃ y T₄. Finalmente, las hormonas tiroideas salen del tirocito, se liberan a la sangre, y son transportadas a diferentes tejidos donde ejercen diversas funciones vitales para el organismo.

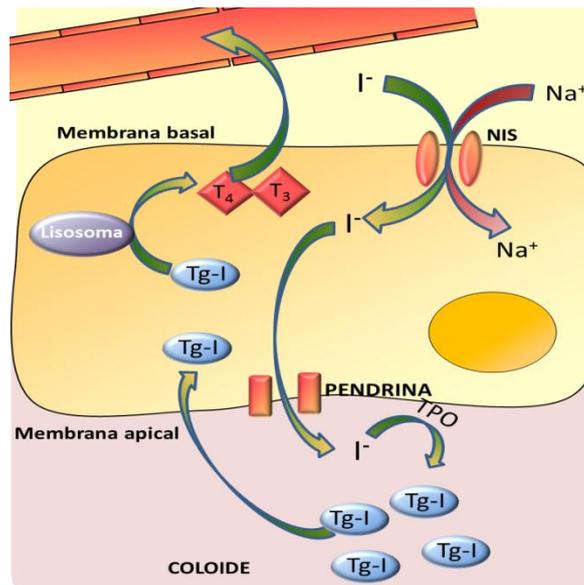


Figura 3. Síntesis y secreción de hormonas tiroideas. El yodo penetra en la células a través del transportador NIS. Posteriormente, éste sale al coloide a través del transportador pendrina, la TPO cataliza la incorporación del yodo a la tiroglobulina y se almacenan en forma de vesículas. Cuando la célula tiroidea es estimulada, las vesículas se introducen en la célula liberándose las hormonas tiroideas a través de la fusión con lisosomas.

2. CÁNCER DE TIROIDES

2.1. Aspectos clínicos

El cáncer de Tiroides es la patología endocrina más frecuente con una tasa de incidencia en Europa de unos 25.000 casos al año, una prevalencia de unos 250.000 casos y una mortalidad de unos 6.000 casos por año (3). Aunque este tipo de cáncer tiene un pronóstico de mortalidad muy bajo, ya que el tratamiento combinado de la ablación de la glándula tiroidea junto con la radioterapia es altamente curativo, presenta un alto riesgo de recurrencia y, en algunos casos, el paciente no responde al tratamiento y muere. En los últimos 20 años se han triplicado el número de casos de cáncer de tiroides anuales y se espera que esta incidencia siga aumentando, ya que gracias a las actuales campañas de salud cada vez se diagnostica más precozmente, lo que unido al envejecimiento progresivo de las sociedades industrializadas y a la expansión del modo de vida occidental convierte al cáncer de tiroides en un serio problema sanitario a nivel nacional e internacional.

Existen diversos tipos de cánceres tiroideos que se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- Derivados de células foliculares. Entre los que se encuentran el Carcinoma Papilar Tiroideo (**PTC**, *Papillary Thyroid Carcinoma*), el cual representa el 80% de los tumores tiroideos, el Carcinoma Folicular Tiroideo (**FTC**, *Follicular Thyroid Carcinoma*) y el Carcinoma Anaplásico Tiroideo (**ATC**, *Anaplastic Thyroid Carcinoma*).

- Derivados de células parafoliculares o células C. Este tipo de cáncer también llamado Cáncer Medular Tiroideo representa el 3% de los tumores tiroideos.

Entre los tumores derivados de células foliculares, al FTC y al PTC se les denomina comúnmente cáncer diferenciado de tiroides (TDC), debido a que las células tumorales están todavía suficientemente diferenciadas y conservan muchas características de las células tiroideas normales, incluyendo la capacidad de captación de yodo y la secreción de tiroglobulina (Tg). Este tipo de tumores son los que normalmente responden al tratamiento y tienen un buen pronóstico, aunque hay casos en los que se comportan de manera más agresiva y no hay una forma efectiva de tratamiento. Por otra parte, el ATC es un cáncer indiferenciado en el que las células han perdido su funcionalidad. Esta es la forma más agresiva y letal del cáncer de tiroides, llegando a producir la muerte en un año tras el diagnóstico (4). Los ATCs derivan de los carcinomas diferenciados (FTC y PTC), ya que algunas células todavía conservan genes específicos de tiroides pero poseen una tasa de mutaciones más elevada, lo que da lugar a un tipo de carcinoma más invasivo y por tanto con peor pronóstico (5).

Los factores de riesgo asociados al cáncer de tiroides son: la falta de yodo en la dieta, la tiroiditis linfocítica, la exposición a radiaciones y los factores genéticos asociados a la historia familiar. Asimismo, cada factor de riesgo se relaciona con un tipo de cáncer tiroideo. Por ejemplo, la exposición a radiaciones procedentes de una catástrofe nuclear (Hiroshima y Nagasaki, 1945 y Chernobyl, 1986) se han asociado con el PTC. Por otra parte, se ha visto que la incidencia del FTC es mayor en zonas con una dieta deficiente en yodo y, por el contrario, el PTC es más frecuente en zonas con una dieta rica en este elemento (6).

La mayoría de carcinomas diferenciados se dan en pacientes entre 25 y 50 años y, además, esta enfermedad se manifiesta de tres a cuatro veces más en mujeres que en hombres. La incidencia ligada al sexo se relaciona con los receptores de estrógenos, indicando una posible regulación de la carcinogénesis tiroidea a través de las hormonas femeninas (7, 8).

Por último, varios síndromes asociados a mutaciones en las líneas germinales se han relacionado con la aparición de cánceres tiroideos hereditarios, como la Poliposis Adenomatosa Familiar (asociado con mutaciones del gen *APC*) o el Síndrome de Cowden (asociado con mutaciones en el gen *PTEN*) (9).

2.2. Mecanismos moleculares implicados en el cáncer de tiroides

Durante los últimos quince años se han definido algunas de las bases genéticas que regulan la tumorigénesis y el desarrollo de los cánceres diferenciados de tiroides. Las principales alteraciones son mutaciones que activan oncogenes, así como alteraciones epigenéticas responsables del silenciamiento de genes supresores de tumores. En PTC las alteraciones genéticas en los genes RET/PTC, NTRK y B-RAF son las más comunes, mientras que en FTC las mutaciones en Ras, PTEN y PPAR γ -PAX8 son las más frecuentes (10). Asimismo, se ha observado que en ciertos tumores tiroideos hay una expresión distinta de determinados microRNAs (miRNAs) respecto a células tiroideas normales (11).

En el 80% de los tumores tiroideos se ha observado una activación de la vía de señalización Ras-RAF-MEK-ERK (12). De los componentes de esta vía hay tres eventos importantes que conducen a la activación de esta vía y a la formación y progresión del cáncer de tiroides, las proteínas fusión RET/PTC, las mutaciones en Ras, y las mutaciones en B-RAF.

Mutación RET/PTC. RET (*Rearranged in Transformation*) es un gen que codifica para un receptor tirosina quinasa (RTK) que, en condiciones normales, está regulado por la interacción de factores neurotróficos derivados de la glia (GDNF, *Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor*) (13). En tumores derivados de células foliculares se ha observado la fusión del dominio tirosina quinasa del gen RET con el dominio N-terminal de ciertos genes, dando lugar a una proteína cuya activación es independiente de la unión de ligandos. Esta proteína constitutivamente activa, llamada RET/PTC, es capaz de activar vías de señalización implicadas en proliferación, supervivencia y progresión tumoral como la vía de Ras-RAF-MEK-ERK. Hasta el momento se conocen 12 proteínas RET/PTC y su variabilidad depende de la proteína con la que se fusiona el gen RET (14).

Mutaciones en Ras. En tumores tiroideos derivados de células foliculares, las mutaciones en Ras se dan con una frecuencia variable. Estas mutaciones son más frecuentes en FTCs, donde se han observado en el 20-50% de los mismos con la siguiente frecuencia relativa entre las 3 isoformas: N-Ras 7%, H-Ras 4% y K-Ras 2% (15). Además, estas mutaciones también se han observado en adenomas y carcinomas tiroideos tempranos, sugiriendo que la activación de Ras podría ser un evento temprano en el FTC (12). Por otra parte, en PTCs, las mutaciones en Ras se dan en un 10% de los mismos y mientras que algunos estudios las han asociado con una mayor encapsulación tumoral y una menor tasa de metástasis linfáticas (16), otros las han relacionado con una mayor agresividad tumoral y mayor frecuencia de metástasis (17).

Mutaciones en B-RAF. ^{V600E}B-RAF. B-RAF se ha encontrado mutado entre el 29 y el 89% de PTCs, con una frecuencia media de un 45% de los casos (18-21). Sin embargo, dentro del cáncer de tiroides, las mutaciones de B-RAF no son exclusivas de PTCs, ya que también se han encontrado entre el 20 y 26% en ATCs (22-24). Como se comentará más adelante, de todas las mutaciones encontradas en B-RAF, la mutación V600E es la más frecuente en este tipo de cáncer.

II. MIGRACIÓN CELULAR

La migración celular es un término general que se refiere a los procesos involucrados en el desplazamiento de la célula de un lugar a otro. Las células pueden migrar en respuesta a múltiples situaciones a lo largo de su vida. Algunos ejemplos incluyen los procesos en los que se necesita una movilidad celular para generar nuevas estructuras y órganos, como el desarrollo embrionario y la organogénesis, así como situaciones en las que las células responden a su entorno celular acudiendo al lugar donde se necesitan, como la cicatrización de heridas y la respuesta inmune. Sin embargo, la migración también está involucrada en procesos patológicos como los síndromes autoinmunes y el cáncer. En este último caso, la migración celular participa en el proceso generalmente conocido como metástasis, causante de la muerte del 90% de los pacientes diagnosticados con cáncer.

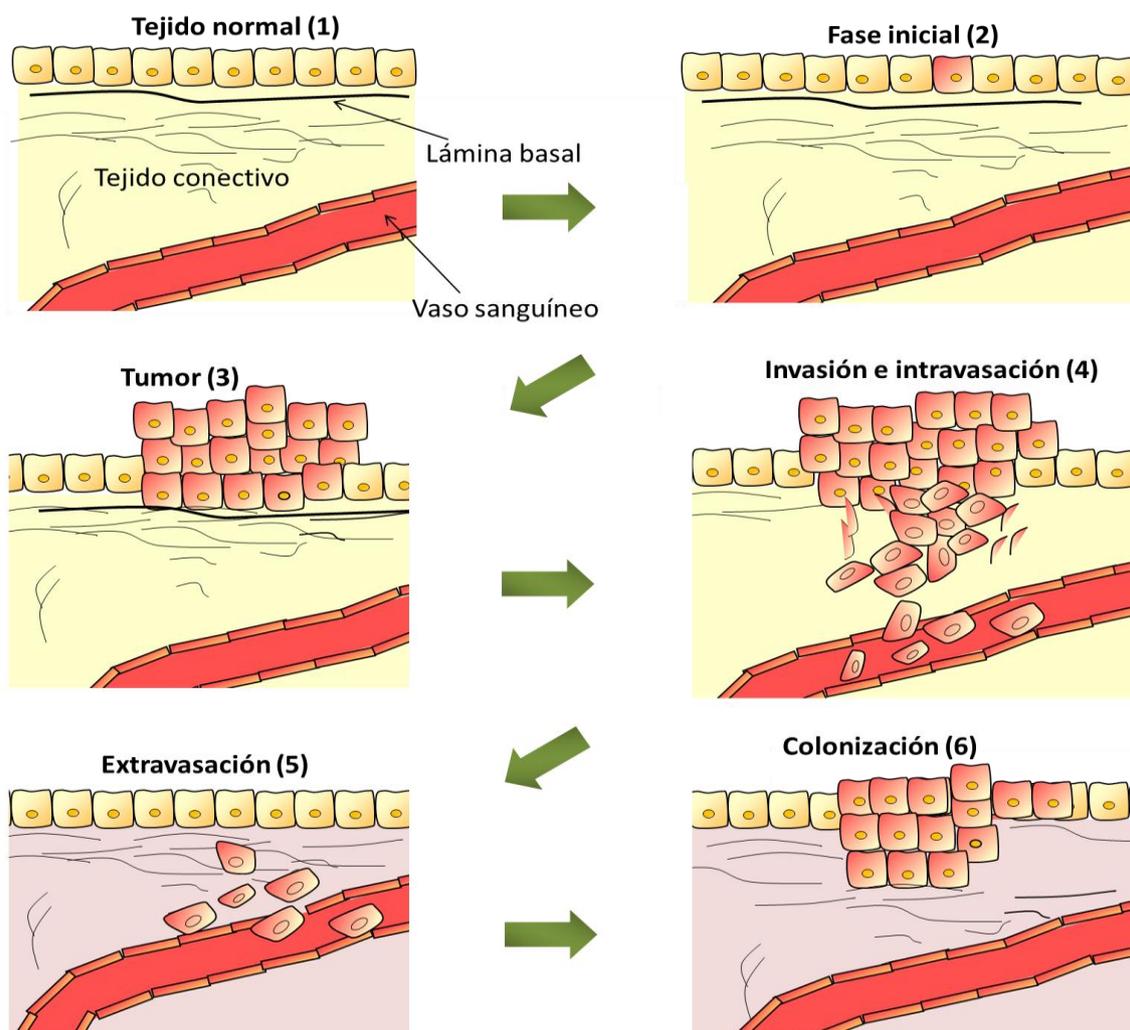


Figura 4. Desarrollo tumoral y metástasis. La formación tumoral comienza cuando una célula alterada da lugar a una población celular con un crecimiento descontrolado (2 y 3). La adquisición de nuevas mutaciones selecciona las células más aptas para seguir proliferando. Finalmente las células pueden desprenderse del tumor primario, invadir los tejidos adyacentes y migrar hasta llegar a la circulación sanguínea o linfática (4), a través de la cual se diseminan por el organismo pudiendo generar un segundo foco tumoral y completando así el proceso metastásico (5 y 6).

Para que las células del tumor primario se transformen en células malignas y puedan iniciar la metástasis, han de adquirir una serie de características. Primero deben proliferar de una forma descontrolada (figura 4). En segundo lugar, requieren la formación de una nueva red vascular para tener su propio suministro de nutrientes y oxígeno que las permita crecer independientemente del resto del organismo (angiogénesis). Además, deben adquirir la capacidad de movimiento, y así poder migrar e invadir otros tejidos. Así, la metástasis es un conjunto de procesos secuenciales e interrelacionados en los que las células malignas se desprenden del tumor primario y se propagan a órganos distales. Durante la metástasis, la célula cancerígena invade los tejidos adyacentes y, a continuación, penetra en la microvasculatura sanguínea o linfática (intravasación) mediante la cual llega a la circulación general y es transportada a los tejidos distales. Posteriormente, las células tumorales pueden salir de los vasos (extravasación), penetrar en los tejidos y, finalmente, localizarse y proliferar en un nuevo órgano (colonización) (figura 4) (25, 26).

1. EL MOVIMIENTO CELULAR

Las células tumorales para poder migrar deben modificar su tamaño y su rigidez con el fin de poder interactuar con las estructuras del tejido circundante o matriz extracelular (MEC), la cual proporciona tanto el sustrato como la barrera para las células en movimiento. Además, la habilidad de las células para moverse también requiere la generación de una fuerza que supere a los factores que se oponen al movimiento, como las adhesiones célula-célula o la interacción célula-MEC.

Para que se produzca este proceso es necesario que las células reorganicen su citoesqueleto. Este es el componente celular esencial para coordinar las distintas fuerzas de resistencia e interacción con la MEC que dan lugar al movimiento celular y está formado por tres tipos de biopolímeros: los filamentos de actina, los microtúbulos, y los filamentos intermedios. De los tres, la polimerización de monómeros de actina en filamentos de actina (FA) es el proceso más importante en la motilidad celular (27). Así, este proceso se puede dividir en tres etapas (figura 5):

- 1) La célula se polariza formando una zona de avance a través de la polimerización de la actina.
- 2) La zona de avance se adhiere a la MEC y, a su vez, la parte trasera del cuerpo celular se va despegando del sustrato.
- 3) Finalmente, las fuerzas contráctiles generadas por las interacciones de actina-miosina empujan la parte trasera de la célula, completando así el movimiento.

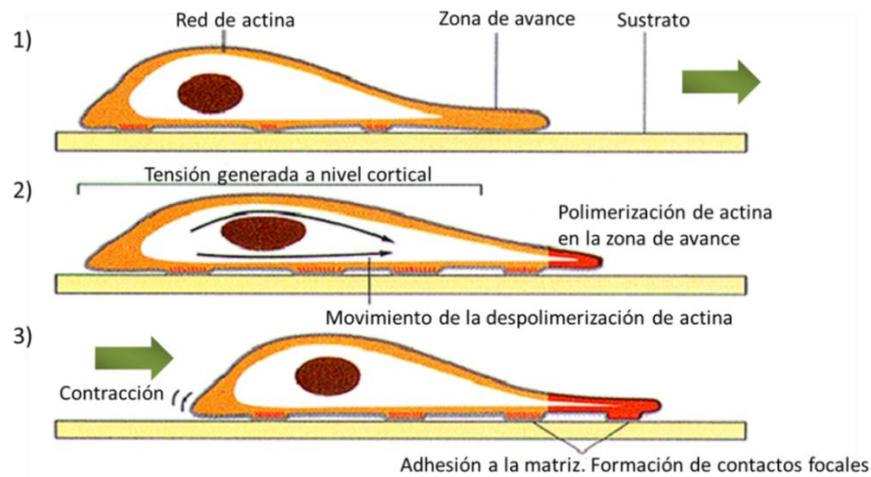
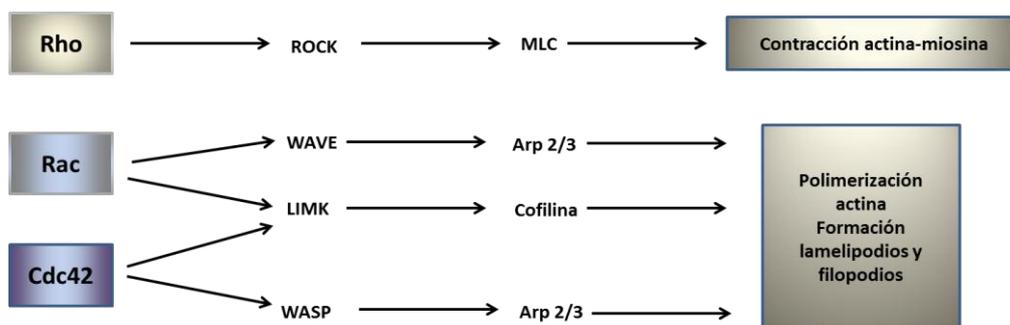


Figura 5. Movimiento celular. La célula genera una zona de avance y se adhiere al sustrato a través de la polimerización de actina. Simultáneamente la célula despega su parte trasera y a través de las fuerzas de contracción generadas y la despolimerización de fibras de actina se produce el desplazamiento.

A)



B)

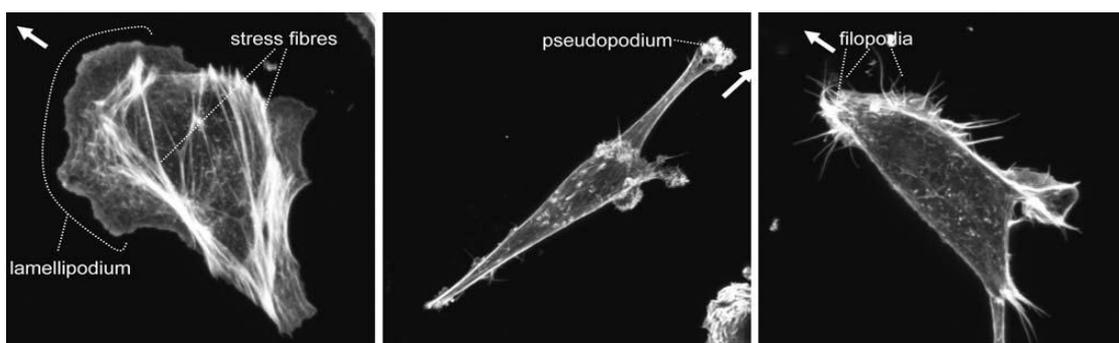


Figura 6. Regulación del movimiento celular y formación de protusiones. A) Las GTPasas pequeñas de la familia Rho regulan la migración celular a través de la interacción actina-miosina y la formación de protusiones formadas por filamentos de actina. B) La diversidad en la organización de la actina da lugar a protusiones celulares con diferentes formas. En el cuadro de la izquierda se muestra una célula de carcinoma de mama con una protusión ancha en el frente llamada lamelipodio y con fibras de estrés en el cuerpo celular. En el panel del medio aparece una células de carcinoma de colon con una forma alargada y una protusión gruesa llamada pseudópodo. Finalmente, en la figura de la derecha se muestra una células de carcinoma de células escamosas con numerosos filamentos en la zona frontal llamados filopodios. Modificado de Olson y Sahai, 2009 (28).

En todos estos procesos, las GTPasas pequeñas de la familia Rho, RhoA, Rac y Cdc42 desempeñan una función clave en la reorganización del citoesqueleto de actina. Tanto las señales extracelulares por factores de crecimiento, como las interacciones con componentes de la MEC regulan la actividad de estas GTPasas. Así, estas tres GTPasas, en su forma activa, interactúan con sus efectores y median las respuestas celulares. RhoA, a través de su quinasa asociada ROCK (*Rho-associated coiled-coil containing kinase*) y de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLC) regula la fuerza contráctil mediante la formación de complejos actina-miosina, mientras que Rac y Cdc42, a través de la activación de las proteínas WAVE y WASP respectivamente y de LIMK, regulan la polimerización de actina y la formación de protusiones celulares (figura 6A). Estas protusiones o prolongaciones de la membrana celular están formadas por haces de FA, denominados fibras de estrés, y adquieren distinta forma según el mecanismo que regule la polimerización de actina. De esta manera, se ha observado que Cdc42 es responsable de la formación de estructuras finas con forma digital denominadas filopodios, mientras que Rac media la formación de lamelipodios, protrusiones amplias y lisas de la membrana que aparecen en la zona de avance de la célula (28, 29). Asimismo, cuando los filopodios son más anchos y aparecen en zonas donde hay degradación de la MEC se denominan pseudópodos o invadopodios (30) (figura 6B).

2. FORMACIÓN DE CONTACTOS FOCALES

Una vez generada la protusión membranosa o filopodio en la zona de avance, ésta se adhiere a la MEC, mayoritariamente a través de receptores de membrana de la familia de las integrinas. Las integrinas conectan la MEC con el citoesqueleto de actina a través de proteínas adaptadoras, formando un conjunto de proteínas denominados complejos focales. Estos complejos pueden crecer y madurar reclutando más proteínas y generando los denominados contactos focales, estructuras que mantienen una interacción más estable y prolongada con el citoesqueleto de actina (30). Las integrinas forman una familia de 24 miembros, cada uno de los cuales está formado por una subunidad α y una subunidad β . Hasta el momento se han descubierto 18 subunidades α y 8 subunidades β y, dependiendo de la combinación que se produzca, éstas se unen a diferentes componentes de la MEC (31). Además, a través de diferentes rutas de señalización, las integrinas son capaces de regular una variedad de procesos celulares, como la proliferación, diferenciación, apoptosis y la migración. Asimismo, se ha observado que la interacción de las integrinas con otros receptores de membrana, produce el reclutamiento de proteasas que se encargan de degradar la MEC un proceso clave durante la invasión celular (30). Por otra parte, las integrinas, en determinados tipos celulares, son capaces de activar directamente receptores para factores de crecimiento sin la necesidad de que éstos se unan a su ligando (32), o bien, reclutar los receptores a los complejos de adhesión, en cuyo caso mejora la eficacia de la activación.

2.1. FAK

Una de las proteínas más importantes activada por las integrinas presentes en los contactos focales es la quinasa de adhesión focal, FAK (*Focal Adhesion Kinase*). FAK es una proteína tirosina quinasa de tipo no receptor, que se expresa de forma ubicua y está implicada en numerosos procesos celulares como la adhesión, la migración, la proliferación y la

supervivencia. Numerosos estudios han relacionado la sobreexpresión de FAK con varios tipos de tumores (33-35). Además, mediante mutagénesis dirigida en células epiteliales de ratón, se ha demostrado que FAK es indispensable para la progresión del carcinoma de células escamosas (36).

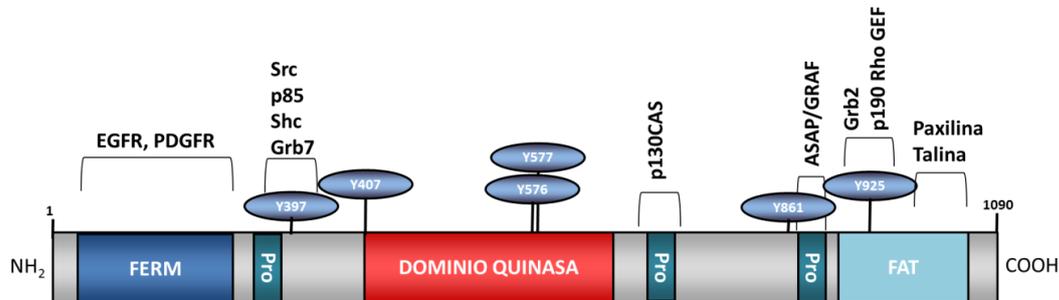


Figura 7. Estructura de la proteína FAK. FAK presenta un dominio FERM en el extremo N-terminal, que le permite interactuar con los receptores EGFR y PDGFR, tres dominios ricos en prolina (Pro), que le permiten interactuar con proteínas que poseen dominios SH3, un dominio tirosina quinasa, y un dominio FAT en el extremo C-terminal, el cual recluta a FAK a nivel de los contactos focales. Además, FAK presenta múltiples sitios de fosforilación en tirosina que le permiten interactuar y activar distintas cascadas de señalización celular. Modificado de Mitra y col., 2005 (37).

Estructura y regulación

Estructuralmente, FAK presenta varios dominios funcionales (figura 7); tiene un dominio quinasa localizado en el centro de la proteína, flanqueado por un largo dominio N-terminal que contiene la región FERM (*Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin*) y por el dominio FAT en el C-terminal, que incluye la secuencia diana para las adhesiones focales (*Focal Adhesion Target*). En el extremo N-terminal, el residuo de autofosforilación Y397 y el dominio FERM median las interacciones proteína-proteína. De estas interacciones, la más conocida es la del dominio FERM con la parte citoplasmática de las subunidades β de las integrinas. En células en suspensión, FAK está inhibido debido al plegamiento originado por la interacción del dominio FERM con el dominio quinasa, lo que impide la autofosforilación de la Y397, necesaria para la activación de FAK. En cambio, durante la adhesión de la célula a su substrato, la interacción del dominio FERM con las integrinas causa un cambio conformacional, permitiendo la autofosforilación de la Y397 y activación de FAK (38). A continuación, el dominio FERM puede interactuar con receptores de membrana como EGFR o PDGFR y el dominio FAT, asociarse a proteínas adaptadoras como talina y paxilina, para mediar nuevas interacciones con integrinas. Entre FAT y el dominio quinasa, se encuentran dos dominios ricos en prolina, importantes para la interacción con los dominios SH3 de p130CAS, GRAF (*GTPase regulator associated with FAK*) y ASAP1 (*Arf-GAP containing SH3 domain, ankyrin repeats, and PH domain*).

Vías de señalización mediadas por FAK

Para que FAK sea completamente activo ha de fosforilarse en varios residuos de tirosina, además del residuo de autofosforilación Y397. Estos son: Y397, Y407, Y576, Y577, Y861 y Y925. La fosforilación de la Y397 genera un sitio de unión para proteínas con dominios de homología

a Src 2 (SH2). Entre estas proteínas, están incluidas distintas tirosinas quinasa de la familia de Src (Src, Fyn, Yes, etc), la proteína adaptadora Shc, Grb7 y la subunidad p85 de la PI3K. De todas estas interacciones, la unión de Src es la que juega un papel más importante, ya que promueve la máxima actividad catalítica de FAK a través de las fosforilaciones de los residuos Y576 y Y577. Src también fosforila las tirosinas Y407, Y861 y Y925, a través de las cuales FAK media la señalización de numerosas vías implicadas en la migración y la invasión celular (figura 8). Por ejemplo, la fosforilación de la Y861 facilita la unión de p130Cas, la cual está implicada en el incremento de la actividad de Rac y por tanto en la formación de lamelipodios y en la motilidad celular (39). Asimismo, la fosforilación de la Y925, constituye un sitio de unión para la proteína adaptadora Grb2, la cual conecta FAK con la vía Ras-RAF-MEK-ERK a través de SOS. La activación de ERK da lugar a la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC), produciéndose la contracción actina-miosina necesaria para el movimiento celular (40). A su vez, la proteína p190Rho-GEF se une a FAK a través de la fosforilación de la Y925 y activa Rho, la cual también fosforila a MLC. Finalmente, se ha descubierto que varias de las fosforilaciones de FAK, incluyendo la Y407 son activadas por TGF β , implicando a FAK en la transición epitelio-mesénquima (41), proceso fundamental en la adquisición de un fenotipo celular más agresivo que se describirá en detalle más adelante.

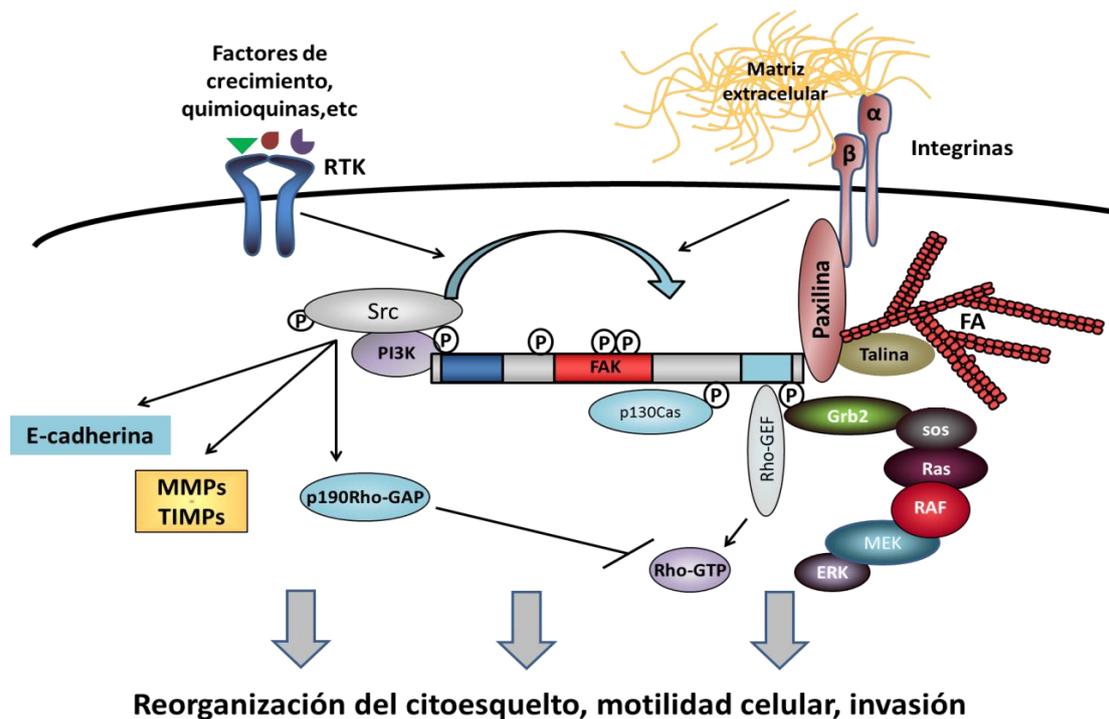


Figura 8. Vías de señalización reguladas por FAK y Src. FAK y Src regulan la migración y la invasión celular a través de la interacción con numerosas proteínas. La actividad de ambas proteínas se estimula a través de receptores tirosina quinasa (RTK) o vía integrinas. La autofosforilación de FAK crea sitios de unión para Src, la cual completa la activación de FAK mediante fosforilaciones en diferentes residuos de tirosina. FAK, por una parte, interacciona con proteínas asociadas al citoesqueleto de actina (FA) formando los contactos focales y, por otra, activa proteínas como Rho y ERK, que regulan la motilidad celular. En su caso, Src también forma parte de los contactos focales y, además de ejercer sus funciones a través de la activación de FAK, es capaz de participar en la reorganización del citoesqueleto a través de la activación de Rho-GAP y regular la invasión celular mediante el control de los niveles de E-cadherina y MMPs.

2.2. Src

Como se ha mencionado, Src es otra proteína importante en la regulación de los contactos focales. Src pertenece a una familia de proteínas tirosina quinasas no receptor compuesta por 9 miembros: LYN, FYN, LCK, HCK, FGR, BLK, YRK, YES y Src. De todas ellas, la proteína mejor caracterizada y más estudiada es Src, la cual está implicada en proliferación, supervivencia, migración y angiogénesis. Además, Src también juega un papel importante en cáncer, donde se ha observado que un aumento de su actividad y/o expresión está relacionado con una mayor agresividad tumoral (42).

Estructura y regulación

Src presenta distintas regiones funcionales con zonas altamente conservadas entre los distintos miembros de la familia y otras proteínas, denominadas dominios de homología a Src (SH) (figura 9A). El dominio 1 de homología a Src (SH1) es el responsable de la actividad tirosina quinasa y donde se encuentra el residuo Y419, cuya fosforilación es indispensable para la activación de Src. Por su parte, el dominio 2 de homología a Src (SH2) es el responsable de la interacción con residuos de tirosina fosforilados. El dominio SH3 posee secuencias específicas de unión a prolina importantes para su regulación y el dominio SH4 permite a Src anclarse a la membrana plasmática por la unión de ácido mirístico al extremo N-terminal. Además de estos dominios, en el extremo C-terminal hay un pequeño fragmento que contiene una tirosina reguladora negativa (Y530).

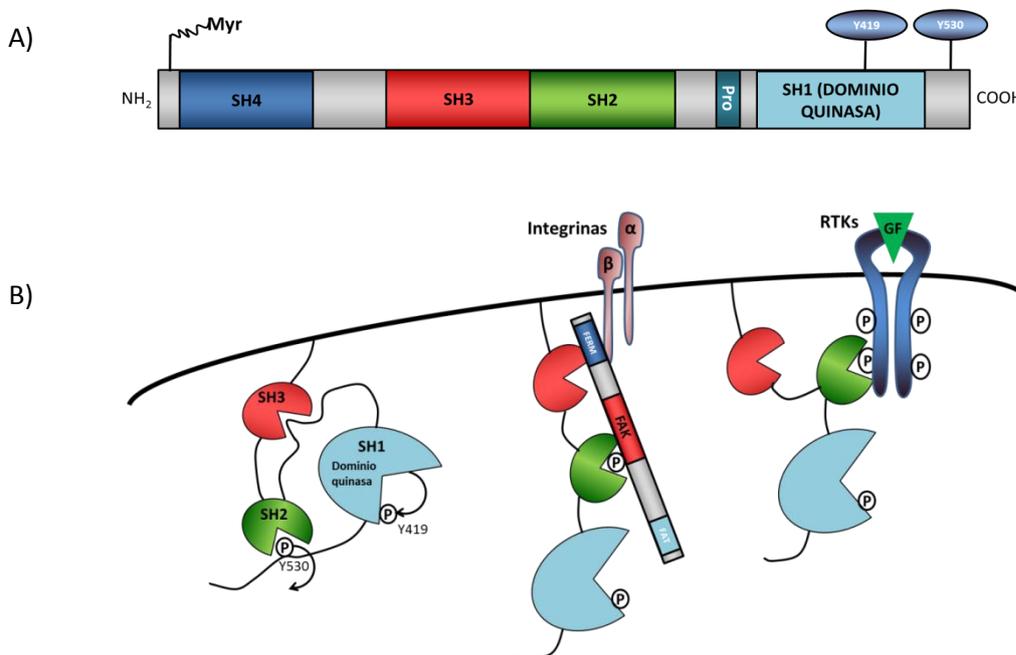


Figura 9. Estructura y activación de Src. A) La proteína Src contiene 4 dominios denominados SH1-4, de los cuales el dominio SH1 es el dominio catalítico. Src puede unirse a la membrana a través de su miristoilación por el extremo N-terminal. B) Modelo de activación de Src. La fosforilación de la Y530 en el dominio C-terminal mantiene a Src en una conformación cerrada e inactiva, a través de su interacción con el dominio SH2, y la interacción del dominio SH3 con residuos de prolina del dominio quinasa. La desfosforilación de la Y530 y la autofosforilación en la Y419 permiten una conformación abierta y activa. La actividad de Src es estimulada tanto por receptores tirosina quinasa (RTKs) como por la unión directa con FAK a través del dominio SH2. Adaptado de Aleshin y Finn, 2010 (43).

Para la completa activación de Src se requiere la desfosforilación de la Y530 y la fosforilación en la Y419 del dominio catalítico (figura 9B). Cuando Src está inactiva, la Y530 se encuentra fosforilada, manteniendo así a la proteína en una conformación cerrada a través de la interacción con el dominio SH2. Además, esta conformación está estabilizada por la interacción entre el dominio SH3 y regiones ricas en prolinas cercanas al dominio quinasa (figura 9B). Así, se ha observado que la pérdida del segmento C-terminal causa un aumento de la actividad y de la capacidad transformante de Src (44, 45). Por lo tanto, la actividad de Src está regulada a través de un balance entre fosfatasa y quinasas que actúan sobre el residuo Y530. Las quinasas CSK (*C-terminal Src Kinase*) y CHK (*CSK-homologous kinase*) fosforilan la Y530, inactivando a Src. En este sentido, se ha observado que la sobreexpresión de CSK suprime la metástasis en modelos animales (46) y sus niveles se han encontrado disminuidos en hepatocarcinomas (47). Por el contrario, Src puede activarse por proteínas tirosinas fosfatasa como PTP α (*Protein tyrosine phosphatase α*) y SHP1/SHP2 (*SH-containing phosphatases*) (44). Finalmente, una vez que la fosforilación de la Y530 desaparece, Src completa su activación a través de la autofosforilación en la Y419 (figura 9B).

Vías de señalización mediadas por Src

Src forma parte de los contactos focales y junto con FAK y otras muchas proteínas como talina, paxilina y p130Cas regulan la motilidad celular a través de la conexión de la MEC con el citoesqueleto (figura 8). La asociación de Src a FAK promueve la migración a través de distintos mecanismos. Por una parte, Src activa la p190 RhoGAP, la cual bloquea la actividad de RhoA y da lugar al desensamblaje de los contactos focales (48). Además, el complejo Src/FAK fosforila a paxilina y a p130Cas, que a su vez reclutan más proteínas para regular la reorganización del citoesqueleto (figura 8). Por otra parte, Src también se ha relacionado con la regulación de metaloproteasas (MMPs) encargadas de degradar la MEC y con los inhibidores de las mismas, TIMPs (49). Por último, es importante destacar que Src activa la vía Ras-RAF-MEK-ERK regulando así la fosforilación de MLC. Además, al igual que FAK, Src también participa en la transición epitelio-mesénquima, en este caso reduciendo los contactos intercelulares a través de la degradación de E-cadherina (50).

2.3. ILK

La quinasa ligada a integrinas ILK (*Integrin Linked Kinase*) es otra de las proteínas responsable de la formación de los contactos focales y juega un papel fundamental en la señalización mediada por las integrinas. ILK es una serina treonina quinasa que regula diversos procesos como la proliferación, supervivencia, diferenciación, migración, invasión y angiogénesis. Además, su sobreexpresión se ha relacionado frecuentemente con una mayor agresividad tumoral y con un peor pronóstico (51).

Estructura y regulación

ILK posee una estructura diferenciada en tres regiones características que determinan su multifuncionalidad. La primera región en el extremo N-terminal contiene 4 dominios conservados de ankirina, la segunda es un dominio de homología a plextrina (PH) que se

encuentra en la parte central de la estructura y, por último, el extremo C-terminal, que contiene el dominio quinasa (figura 10).

El dominio N-terminal, a través de sus dominios de ankirina, interacciona con la proteína PINCH (*particularly interesting new cysteine-histidine protein*), la cual se encarga de unir ILK con receptores de factores de crecimiento a través de la proteína adaptadora Nck2. Además, el dominio N-terminal interacciona con la fosfatasa ILKAP (*ILK-associated protein*), la cual regula negativamente la actividad de ILK. El dominio PH se une a fosfoinosítidos de la membrana plasmática como PIP₃, lo que da lugar a la activación de ILK a través de PI3K y a su inhibición por parte de PTEN. El dominio catalítico de ILK, se une con las subunidades $\beta 1$ y $\beta 3$ de las integrinas y, además, media la interacción con las proteínas adaptadoras α y β -parvina y con paxilina, a través de las cuales se une a los filamentos de actina. Es importante destacar que del residuo de lisina invariable y de los tres tripletes de aminoácidos comunes en los dominios catalíticos de las quinasas (HRD, DFG y APE), en ILK solo están conservados el residuo de lisina y el triplete APE, lo que ha puesto en duda que ILK se comporte como una proteína quinasa y se la haya calificado como una quinasa atípica, considerándose que actúa fundamentalmente como una proteína adaptadora (52).

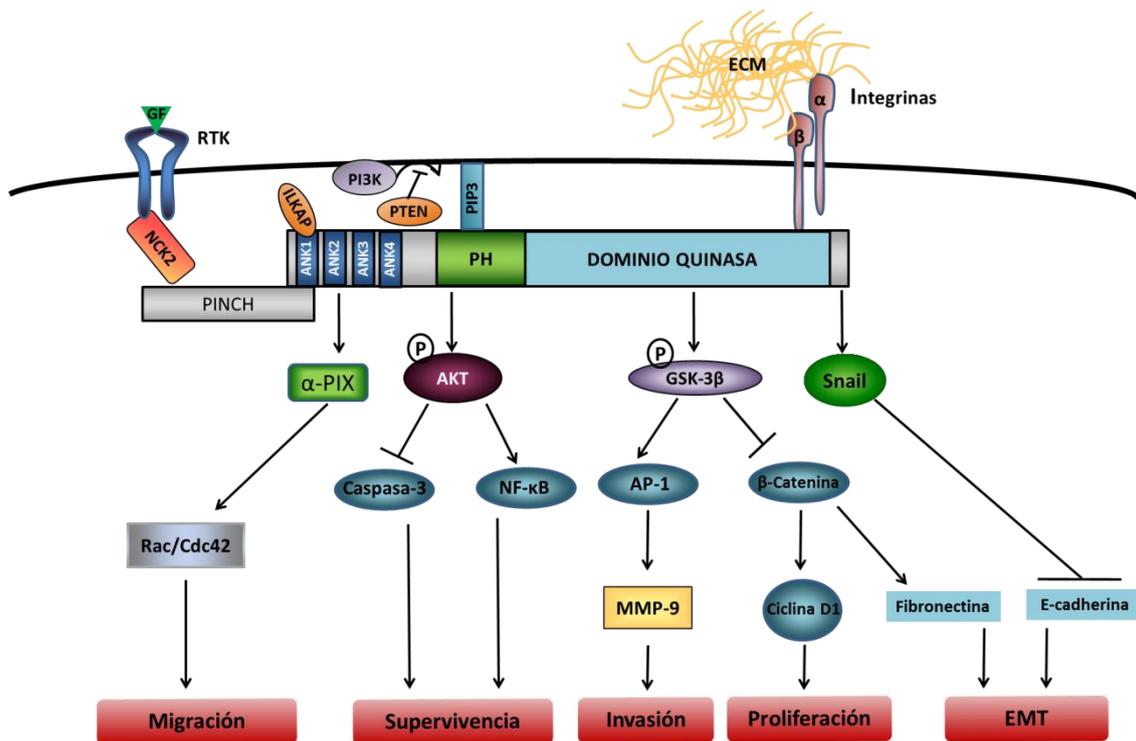


Figura 10. Estructura, regulación, y vías de señalización mediadas por ILK. La actividad de ILK puede ser estimulada a través de la integrinas y factores de crecimiento. ILK se une a los PIP₃ de la membrana plasmática producidos por PI3K y es regulada por las fosfatasas PTEN e ILKAP. Una vez activada, ILK regula diversas proteínas efectoras controlando diferentes procesos celulares como la proliferación, supervivencia, la motilidad y la invasión celular. Adaptado de McDonald et al., 2008 (51). GF: Factor de crecimiento. MEC: Matriz extracelular. EMT: Transición Epitelio-Mesénquima. MMP: Metaloproteasas de la matriz extracelular.

Vías de señalización mediadas por ILK

La actividad de ILK está regulada por integrinas, factores de crecimiento, quimioquinas y como se ha comentado anteriormente, por PI3K. Asimismo, también se ha asociado a ILK como mediador de la vía de TGF β , implicada en la progresión tumoral y en la metástasis (53, 54). En relación a PI3K, ILK fosforila a AKT y a la glucógeno sintasa quinasa GSK3 β (figura 10), dos de sus efectores, indicando que ILK regula la señalización mediada por PI3K (55, 56). Así, se ha demostrado que el aumento de actividad de ILK producido por la adhesión es bloqueado por inhibidores de PI3K (56). Además, la fosfatasa PTEN disminuye los niveles de ILK activa y en células tumorales sin PTEN se ha observado un incremento en la actividad de ILK y de AKT (57). El aumento de actividad de AKT producido por ILK se debe a la fosforilación de la S473 y supone la regulación de numerosos procesos biológicos como la supervivencia, incluyendo los que implican la inactivación de caspasas y la activación del factor de transcripción NF- κ B (figura 10) (52, 58).

En cuanto a GSK3- β , esta quinasa fosforila β -catenina marcándola para la ubiquitinación y posterior degradación proteosomal. β -catenina media la señalización de la vía Wnt y tiene una función estructural estabilizando las uniones adherentes junto con E-cadherina en la cara interna de la membrana plasmática. ILK fosforila a GSK3- β en la S9 produciendo su inactivación, lo que da lugar a una estabilización de los niveles de β -Catenina (figura 10). Así, β -Catenina puede translocarse al núcleo, y junto con los factores de transcripción LEF-1/TCF (*Lymphoid enhancer factor/T cell factor transcription factors*) regular la expresión de genes implicados en tumorigénesis como c-myc, CiclinaD1, fibronectina, MMPs, e Id2 (59, 60). Además, la inhibición de GSK3- β a través de ILK, produce la activación de los factores de transcripción AP1, lo que da lugar a un aumento en la expresión de la metaloproteasa MMP-9, promoviendo el fenotipo invasivo (figura 10) (61). En el caso de la función estructural, la sobreexpresión de ILK, se ha relacionado con una pérdida de β -Catenina en las uniones adherentes, resultando de nuevo en una translocación al núcleo y en un aumento de genes implicados en el fenotipo invasivo (62, 63). Por otra parte, también se ha observado que niveles elevados de ILK disminuyen la expresión de E-cadherina, estimulando la expresión de su represor transcripcional Snail1, y por tanto, promoviendo la transición epitelio-mesénquima (64) (figura 10). Además, varios estudios indican que ILK favorece la migración celular mediante la activación de Rac y Cdc42 a través del factor intercambiador de nucleótidos de guanina α -PIX (*PAK-interactive exchange factor*) en células tumorales prostáticas y de riñón (figura 10) (65). Por último, aunque solo se ha demostrado en células de músculo liso, ILK también estimula la motilidad celular a través de la fosforilación de MLC y de la inactivación de su fosfatasa, causando un aumento de la contracción actina-miosina (66, 67).

III. TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso biológico por el que las células epiteliales polarizadas que están interaccionando con la membrana basal cambian a un fenotipo mesenquimal. Este proceso se debe a cambios bioquímicos que confieren a las células una mayor capacidad migratoria, una mayor invasividad, una elevada resistencia a la apoptosis, y un gran aumento de la producción de componentes de la MEC (68).

La EMT se produce en procesos fisiológicos como, la formación de las tres capas germinales durante el desarrollo embrionario, la regeneración tisular y la cicatrización de heridas, así como en la inflamación y en la fibrosis. Sin embargo, debido a las características de este proceso, también se ha relacionado con la progresión tumoral y la formación de metástasis. En este sentido, se ha observado que las células derivadas de focos metastásicos y las células del tumor primario tienen un fenotipo similar, lo que indica que la EMT es un proceso reversible y que también puede darse la transición mesénquima-epitelio (MET), que tendría lugar durante la colonización de órganos distales (69).

La caracterización de la EMT se basa en el cambio de expresión de determinadas proteínas durante este proceso. Así, se han denominado marcadores epiteliales a los que mantienen la polaridad apico-basal y la estructura del epitelio y cuya expresión se pierde durante la EMT; mientras que se consideran marcadores mesenquimales a los que aumentan su expresión a lo largo de la EMT, causando una pérdida de la polaridad celular y un aumento de la migración (figura 11).

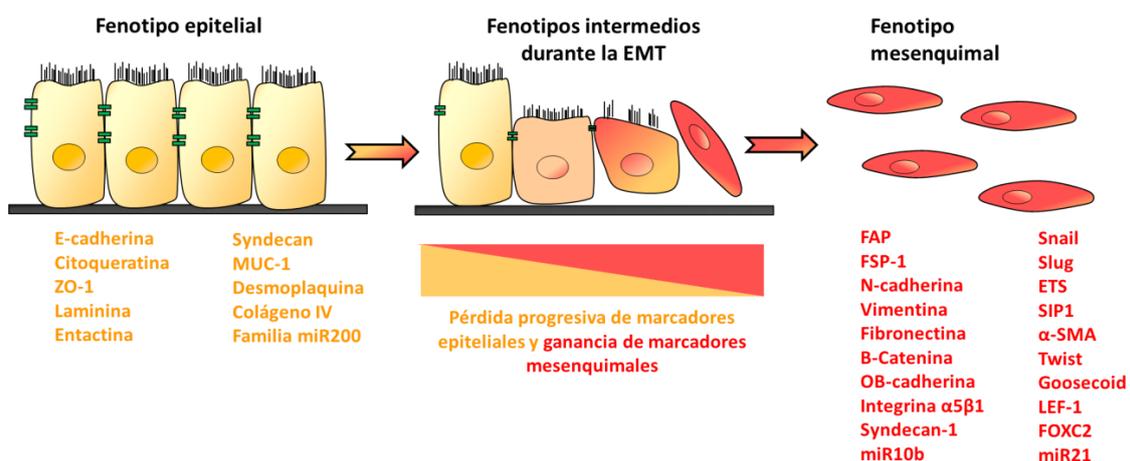


Figura 11. Marcadores epiteliales y mesenquimales de la EMT. La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso regulado por múltiples factores. En el fenotipo epitelial, caracterizado por las uniones intercelulares, predominan los denominados marcadores epiteliales (color naranja). Durante la EMT los marcadores epiteliales se van perdiendo a la vez que se sintetizan nuevas proteínas correspondientes a los marcadores mesenquimales (color rojo), predominantes cuando la EMT se ha completado y responsables de un fenotipo migratorio más agresivo. Adaptado de Kalluri y Weinberg, 2009 (70).

Los marcadores epiteliales son en su mayor parte proteínas implicadas en las uniones intercelulares que contribuyen a la estabilidad del epitelio, entre las que se encuentran la E-cadherina, desmoplaquina, ZO-1 y MUC-1. Además, también se han considerado marcadores epiteliales a componentes de la lámina basal como la laminina, colágeno IV y entactina, ya que su ausencia se ha asociado a una mayor capacidad invasiva.

Por su parte, los marcadores mesenquimales incluyen componentes del citoesqueleto como la vimentina y proteínas de la MEC como la fibronectina, las cuales estimulan la señalización mediada por integrinas y la formación de contactos focales. Además, el fenotipo mesenquimal se caracteriza por un aumento en la secreción de metaloproteasas que degradan la MEC y permiten la invasión de tejidos adyacentes. No obstante, la característica fundamental de la EMT es la pérdida de las adhesiones intercelulares que mantienen unido el epitelio (figura 11). En este sentido, existen 3 tipos de uniones intercelulares: las uniones ocluyentes, las uniones adherentes y los desmosomas. Las primeras son uniones muy estrechas que proporcionan un “sellado” intercelular. En las etapas tempranas de la EMT se ha observado una pérdida de sus componentes más importantes, las ocludinas y las claudinas, resultando en una pérdida de polaridad celular y una reorganización del citoesqueleto (71). Las uniones adherentes se localizan adyacentes a las uniones ocluyentes en la superficie basolateral de la célula. El componente fundamental de este tipo de uniones es la E-cadherina y su pérdida se considera una característica principal durante la EMT, causando una reorganización del citoesqueleto y cambios morfológicos asociados a una mayor formación de fibras de estrés ancladas a los complejos de adhesión focal (71). Por último, los desmosomas, localizados en la membrana basolateral, son parejas de cadherinas formadas por la desmogleína y la desmocolina y aunque la pérdida de sus componentes se ha asociado a la EMT (72-75), su implicación en este proceso es controvertida.

1. E-cadherina

La gran familia de las cadherinas, con más de 80 miembros incluyendo vertebrados e invertebrados, se puede dividir en tres grupos: las cadherinas clásicas que median las adhesiones intercelulares de una forma dependiente de calcio, las cadherinas no clásicas que incluyen las cadherinas que forman los desmosomas y las recientemente descubiertas protocadherinas implicadas en la formación del sistema nervioso (76).

1.1. Estructura

Las cadherinas clásicas (en adelante únicamente cadherinas) son glicoproteínas transmembrana que contienen un dominio extracelular, un segmento transmembrana, y un dominio citoplasmático (figura 12). El dominio extracelular consta de 5 regiones repetidas de alrededor de 100 aminoácidos denominadas EC1-EC5 (Extracelular 1-5) entre las cuales se sitúan varios dominios de unión a iones Ca^{2+} . Estos dominios son responsables de la formación de homodímeros de moléculas de cadherina, los cuales se estabilizan por medio de los iones Ca^{2+} , formando parejas en la superficie de las células y constituyendo las uniones adherentes (76) (figura 12). El dominio citoplasmático interacciona con el citoesqueleto a través de las α -, las β -, y las γ -cateninas. La β - y la γ -catenina comparten una gran homología estructural, por lo

que se unen a la misma región de la cadherina de forma mutuamente exclusiva. La α -catenina es la que conecta las β - y γ -catenina con el citoesqueleto y, finalmente, la p120-catenina interacciona con varios residuos del dominio citoplasmático y de la región transmembrana de E-cadherina (figura 12).

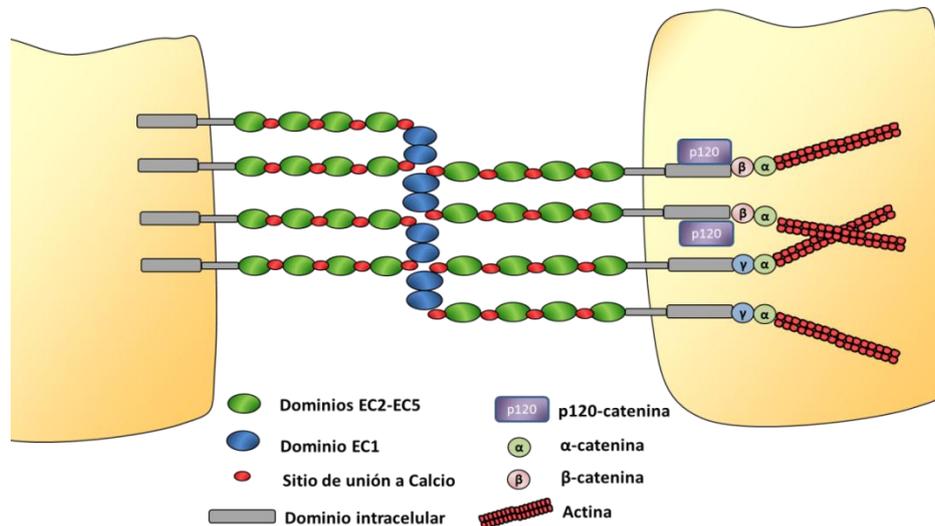


Figura 12. Estructura de E-cadherina. Las moléculas de E-cadherina forman homodímeros en las uniones adherentes de los espacios intercelulares a través de sus dominio EC1. Las regiones citoplasmáticas de las E-cadherinas interaccionan con proteínas de la familia de las cateninas, las cuales se unen a los filamentos de actina formando el complejo de adhesión celular citoplasmático (CCC). Modificado de Cavallaro y Chistofori, 2004 (76).

1.2. Regulación

En cuanto a la regulación de E-cadherina, su función se puede inhibir a nivel postranscripcional impidiendo su transporte a la membrana plasmática, a través de la O-glucosilación (77), o bien por endocitosis desde la membrana plasmática (78-81). Además, los complejos de E-cadherina y β -catenina pueden ser desestabilizados por fosforilaciones mediadas por RTKs o por Src causando endocitosis, ubiquitinación y posterior degradación proteosomal de E-cadherina (figura 13) (50, 82). La degradación proteolítica libera fragmentos de E-cadherina capaces de activar vías de señalización e inducir invasión a través del aumento de MMPs o regulación de factores de transcripción implicados en este proceso (83).

Sin embargo, en la mayoría de los casos la regulación de E-cadherina se produce a nivel transcripcional (figura 13). Mediante el análisis del promotor proximal de E-cadherina de ratón se identificaron secuencias cortas de 6 nucleótidos (-CACCTG- o -CAGGTG-), denominadas cajas E que determinan su expresión específica en células epiteliales. La inactivación de estas secuencias activa la transcripción de E-cadherina, lo que indica la existencia de factores de transcripción que reprimen su expresión. Los primeros represores descubiertos fueron los factores de transcripción Snail1 (Snail) y Snail2 (Slug) y los factores de transcripción ZEB (*Zinc finger E-box binding Homeobox*), entre los que se encuentran ZEB1 (δ EF-1/ZFHX1A) y ZEB2 (SIP1-Smad interacting protein/ZFH1B), los cuales interaccionan con las cajas E del promotor de E-cadherina a través de sus dominios tipo dedos de zinc. Otros represores son los denominados bHLH (*basic hélix-loop-helix*), que incluyen los factores de transcripción E12/E47

(TCF3) y Twist, los cuales reprimen la expresión reclutando correpresores (84). Asimismo, la expresión de E-cadherina puede regularse indirectamente a través de los factores Id (*Inhibitors of differentiation*), los cuales favorecen su expresión inhibiendo la actividad transcripcional de los represores E12/E47. Por otra parte, recientemente se ha descubierto una región en el promotor de E-cadherina con la que interacciona el complejo formado por Snail y las proteínas efectoras de TGF β Smad2 y Smad3 (85). Esta región, denominada SBE (*Smad Binding Element*), se encuentra próxima a una caja E, y su interacción con los factores de transcripción mencionados produce la represión de E-cadherina. Por último, la regulación transcripcional de E-cadherina también puede darse a través de mecanismos epigenéticos por metilación de su promotor (86).

Respecto a las señales que median la expresión de E-cadherina, existen un gran número de factores de crecimiento que provocan la disminución de E-cadherina. Entre éstos se incluye el TGF β (*Transforming Growth Factor*), HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), IGF (*Insulin Growth Factor*) y Notch (87). Normalmente, las vías de señalización activadas por estos factores producen una activación de los represores transcripcionales de E-cadherina. Por ejemplo, TGF β reprime la expresión de las proteínas Id2 e Id3 causando la disminución en la expresión de E-cadherina (figura 13) (88).

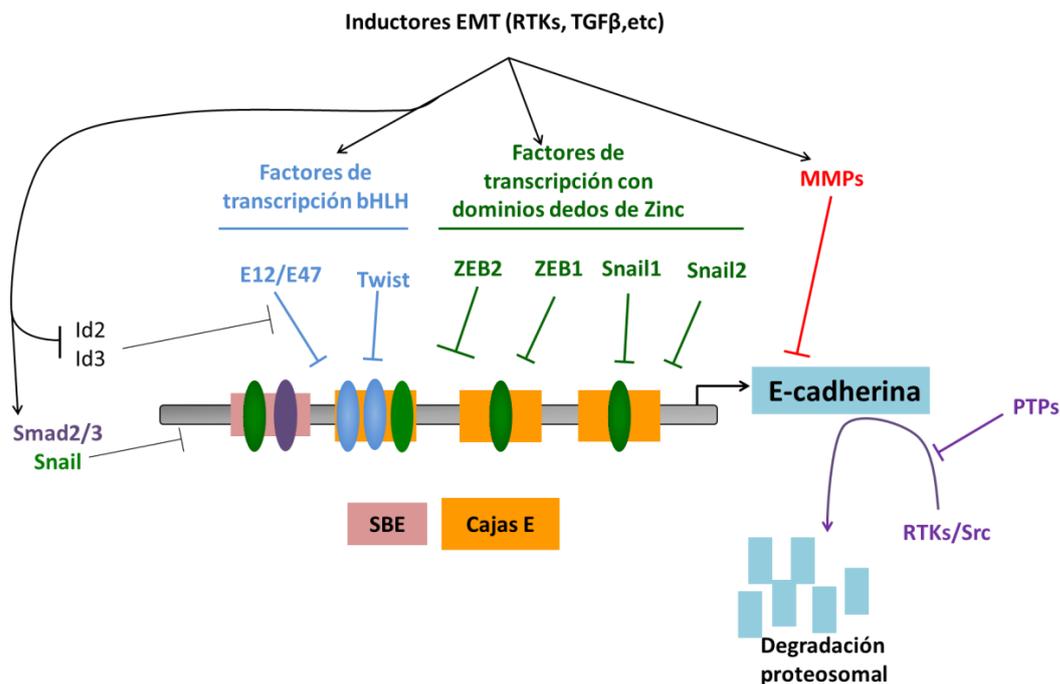


Figura 13. Regulación de la expresión y estabilidad de E-cadherina. En su mayor parte, la expresión de E-cadherina se regula a nivel transcripcional. Los represores transcripcionales con dominios de dedos de zinc (verde) y los factores de transcripción de las familias de bHLH (azul) reprimen la transcripción a través de la interacción con las cajas E localizadas en el promotor de E-cadherina. Inductores de la EMT como RTKs y TGF β (líneas negras) pueden reprimir E-cadherina a través de la expresión de sus represores o a través de la inhibición de proteínas como Id2 e Id3, que bloquean represores como E12/E47. Adicionalmente, TGF β activa a Smad2/3 que, junto con Snail pueden interactuar, con el dominio SBE (*Smad Binding Element*) (rosa) e igualmente reprimir la expresión de E-cadherina. La degradación proteolítica mediada por MMPs (rojo) y el marcaje para su ubiquitinación y degradación proteosómica mediada por RTKs y Src (violeta) son otros de los mecanismos de regulación de E-cadherina, en este caso a nivel postraduccional. Adaptado de Huber et al., 2005 (89).

1.3. Implicación en cáncer

Debido a que E-cadherina es la principal responsable del mantenimiento de los epitelios, esta proteína también juega un papel importante en cáncer. Así, en la mayoría de los carcinomas se produce una pérdida de los niveles de E-cadherina asociada a la EMT, la cual ocurre frecuentemente durante la invasión celular y está asociada a un peor pronóstico y a una mayor mortalidad (90-93). En este sentido, se ha demostrado que la inhibición de la expresión de E-cadherina en modelos animales o la expresión de formas truncadas de E-cadherina induce invasión y metástasis, resultando en la progresión de adenoma a carcinoma, mientras que la recuperación de los niveles de E-cadherina provoca la detención en el estado de adenoma (94). Todos estos datos indican que E-cadherina es un supresor de la progresión y la invasión tumoral. Durante la progresión tumoral, la pérdida funcional de E-cadherina puede darse a través de mutaciones somáticas en el gen de E-cadherina (CDH1) que dan lugar a una pérdida de su funcionalidad, como en el caso carcinoma gástrico, carcinoma de mama y en menor medida en el carcinoma tiroideo (86). Además, en células tumorales también se ha visto la disminución de la expresión de E-cadherina por los mecanismos mencionados anteriormente, entre los que se incluyen, metilación del promotor, represión transcripcional, e incluso a través de la degradación proteosomal (76).

2. Snail

Los miembros de la familia de Snail forman parte de una superfamilia de factores de transcripción compuesta por la familia de Snail y la familia de Scratch. Los tres miembros presentes en los vertebrados que forman parte de la familia de Snail se conocen con el nombre de Snail1, Snail2 (Slug) y el menos caracterizado Snail3 (Smuc) (95). Snail1 se expresa en la mayoría de procesos del desarrollo embrionario en los que se requiere la EMT, como la formación del mesodermo, la gastrulación y la formación de la cresta neural (96). De hecho, Snail1 fue descrito por primera vez en *Drosophila Melanogaster*, donde se descubrió que era esencial para la formación del mesodermo (97). En el caso de Snail2, también se expresa en mesodermo y en células migratorias de la cresta neural, así como en otros tejidos no siempre asociados a la EMT (98).

2.1. Estructura y regulación

Los genes de la familia Snail codifican factores de transcripción que comparten una estructura similar compuesta por una región C-terminal bien conservada que contiene de 4 a 6 dominios (dependiendo del miembro de la familia) en forma de dedos de zinc y una región N-terminal bastante divergente (figura 14) (96) (99).

Snail actúa como un represor transcripcional uniéndose a través de las secuencias de dedos de zinc a la secuencia consenso de DNA del tipo caja E (*E-box*, -CAGGTG-), idéntica a la que se encuentra en el promotor de E-cadherina y, por tanto, inhibiendo su expresión. Sin embargo, la represión transcripcional no depende únicamente de los dedos de zinc, sino que también requiere el dominio SNAG (Snail/Gfi) presente en el extremo N-terminal (96). Este dominio interacciona con otras proteínas represoras como las histonas desacetilasas 1 y 2 (HDAC1 y 2)

(100) y el grupo de proteínas Polycomb 2 (PCR2) (101). La región central de las proteínas Snail contiene un dominio rico en serina y prolina muy variable entre los distintos miembros. En este sentido, mientras que Slug contiene un solo dominio denominado dominio Slug, Snail1 posee 2 dominios, uno regulador con una señal de exportación nuclear (NES) y otro de destrucción. Las fosforilaciones en residuos de serina y prolina presentes en estas regiones y las modificaciones de lisinas adyacentes a estos dominios están implicadas en la localización subcelular de Snail1, así como en su estabilidad y actividad transcripcional (102).

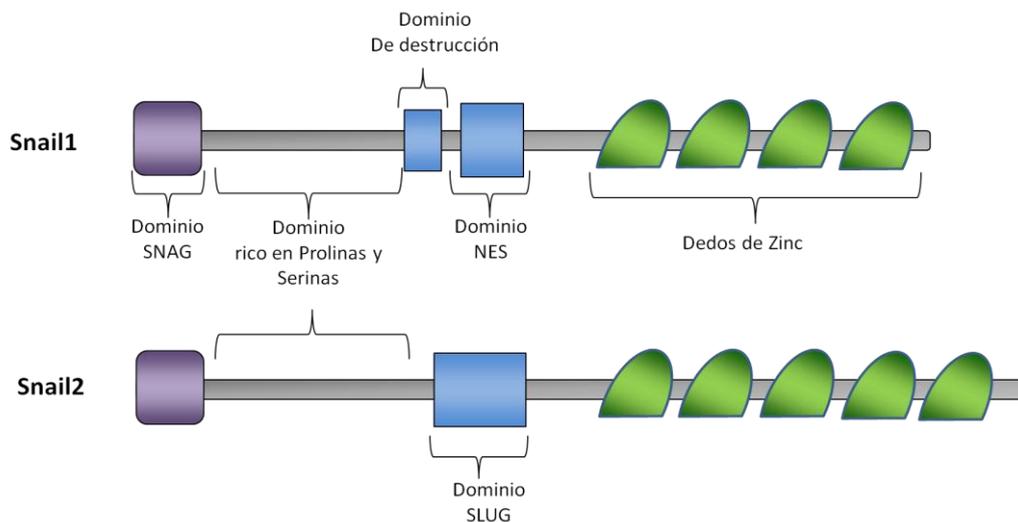


Figura 14. Estructura de Snail1 y Snail2. En el extremo C-terminal se localizan los dedos de zinc, los cuales reconocen las cajas E del promotor diana. En este caso, mientras que Snail1 contiene 4 dedos de zinc, Snail2 presenta 5 dominios de este tipo. La región central de Snail2 (Slug) contiene un solo dominio mientras que la de Snail1 contiene un dominio de exportación nuclear (NES) y un dominio de destrucción. Las regiones ricas en prolina y serina están presentes en las dos proteínas y sus modificaciones están implicadas en la estabilidad y localización subcelular. El extremo N-terminal presenta el dominio SNAG, el cual está conservado en ambas proteínas y es importante para la interacción con otros factores represores. Adaptado de Peinado *et al.*, 2007 (102).

La regulación de Snail puede darse a dos niveles, transcripcional y postranscripcional. A nivel postranscripcional, Snail1 es una proteína altamente inestable con una vida media de alrededor de 25 min ya que está doblemente regulada a través de su estabilidad y de su localización subcelular. GSK3- β es la quinasa encargada de regular los niveles de Snail1 mediante fosforilaciones de residuos de serina en el motivo I, el cual pertenece al dominio de destrucción, y en el motivo II, adyacente al dominio NES (103). Estas fosforilaciones participan de manera distinta en la estabilidad de Snail1; así, mediante análisis comparativos entre la forma silvestre de Snail1 y mutantes con alteraciones en los diferentes residuos de serina, se ha propuesto un modelo en el que moléculas de GSK3- β nucleares fosforilan a Snail1 en el motivo II, promoviendo su exportación al citoplasma, mientras que las moléculas de GSK3- β citoplasmáticas fosforilan el sitio I induciendo el reconocimiento por el complejo ubiquitin ligasa β -TRCP y la consecuente degradación de Snail1 (104) (figura 15).

Por otra parte, recientemente, se ha descrito que el miembro de la familia de las lisil oxidadasas LOXL2 (*Lysil Oxidase Like 2*) es capaz de oxidar las lisinas K98 y K137 de Snail1. Estas oxidaciones previenen la degradación de Snail1, ya que provocan cambios conformacionales que le protegen de la fosforilación mediada por GSK3- β (figura 15) (105, 106). Asimismo, se ha descubierto un nuevo mecanismo, relevante en la EMT inducida por hipoxia, que regula la estabilidad proteica de Snail1 independiente de GSK3- β , a través de la actividad de la ubiquitin

ligasa Fblx14, la cual promueve la ubiquitinación y posterior degradación de Snail1 vía proteosomal. En este sentido, los residuos K98, K137 y K146 son importantes para el reconocimiento y la degradación mediados Fblx14 (107).

Además, la localización subcelular de Snail1, también está regulada por fosforilaciones en el dominio C-terminal. Así, la quinasa activada por p21, PAK1, fosforila a Snail1 en la S246 favoreciendo su localización nuclear y por tanto su actividad transcripcional (108). Igualmente, se han descrito nuevos residuos susceptibles de fosforilación en el dominio N-terminal que afectan a la estabilidad de Snail1 como la S11 y S92 (109).

Por otra parte, también se ha observado la regulación de la expresión de Snail a nivel transcripcional. En este caso se ha demostrado que NF- κ B regula positivamente el promotor de Snail (64) y que TGF β aumenta la expresión de Snail1 por unión directa de los factores de transcripción Smad con el promotor de Snail1 (110).

Por otro lado, un gran número de vías de señalización convergen en la regulación de Snail1 tanto a nivel transcripcional como postranscripcional incluyendo las vías de Wnt, TGF β , PI3K, Ras-RAF-MEK-ERK, ILK, NF- κ B y Notch. En este sentido, la actividad de GSK3- β es el punto de convergencia de muchas de estas vías, de manera que muchas de ellas estabilizan los niveles de Snail1 a través de la inhibición de esta quinasa (110).

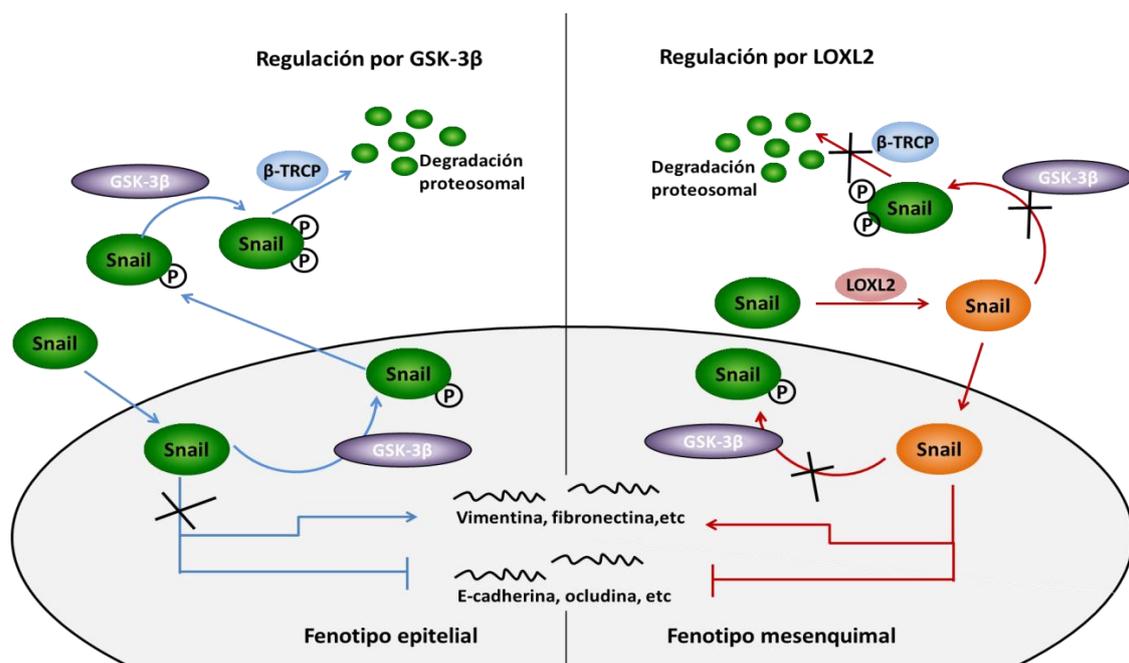


Figura 15. Regulación de Snail1 por GSK3- β y LOXL2. En el panel de la izquierda, las líneas azules indican las vías responsables de la degradación de Snail1 mediada por GSK3- β . A nivel nuclear GSK3- β fosforila a Snail1 produciendo su exportación al citoplasma, impidiendo su actividad transcripcional y, por tanto, manteniendo un fenotipo epitelial. En el citoplasma, Snail1 es de nuevo fosforilado por moléculas de GSK3- β citoplasmáticas marcándolo para su degradación proteosomal. A la derecha, las líneas rojas indican la regulación por LOXL2. Esta proteína oxida a Snail1, protegiéndolo de las fosforilaciones mediadas por GSK3- β , e impidiendo su exportación nuclear y su degradación proteosomal. La acumulación de Snail1 en el núcleo induce la represión de genes epiteliales y la expresión de genes mesenquimales dando lugar a un fenotipo mesenquimal. Adaptado de Schlessinger y Hall, 2004 (104) y de Peinado *et al.*, 2005 (105).

2.2. Funciones moleculares de Snail1

Una de las funciones principales de Snail1 es contribuir a la EMT mediante la represión de E-cadherina. Como se ha comentado, Snail1 puede unirse directamente a las cajas E del promotor de E-cadherina y bloquear su transcripción. Sin embargo, existen evidencias que confirman que Snail1 también puede actuar de forma indirecta, reclutando otros represores como ZEB1 y ZEB2 (111, 112). Además, la unión de Snail1 al promotor de E-cadherina recluta histonas desacetilasas (HDACs), las cuales contribuyen a la represión de la transcripción mediante la modificación del ADN. Por otra parte, recientemente, se han identificado nuevas proteínas que interaccionan con Snail1 como Ajuba, la cual recluta la metiltransferasa PRMT5, contribuyendo así a la represión transcripcional de E-cadherina (113).

Sin embargo, la EMT inducida por Snail1 no puede ser considerada únicamente como consecuencia de la inhibición de E-cadherina, ya que la expresión de E-cadherina no es suficiente para revertir el fenotipo mesenquimal y, además, los efectos de Snail1, se han detectado incluso en células con bajos niveles de E-cadherina (114).

En este sentido, Snail1 también reprime la transcripción de otros genes epiteliales como desmoplaquina, citoqueratina-18, Muc1, Claudinas y Ocludinas así como la de factores nucleares como el receptor de vitamina D (VDR) y HNF-1 α (96, 102). Además, Snail1 también estimula la transcripción de genes mesenquimales como fibronectina (115), vitronectina, vimentina, MMPs (98) (116), y factores de transcripción como LEF1 y ZEB1 (111).

Por otra parte, Snail1 regula la GTPasa RhoB, lo que relaciona a Snail1 con la motilidad celular, ya que RhoB está involucrada en la reorganización del citoesqueleto (98).

Finalmente, Snail1 también afecta a otros procesos celulares aparte de la EMT (figura 16). Se ha observado que la expresión de Snail1 frena la proliferación celular a través de la represión del gen de la ciclina D2 y al aumento del inhibidor del ciclo celular p21 (117). Asimismo, Snail1 aumenta la resistencia a la muerte celular reprimiendo la expresión de genes proapoptóticos como PTEN, Bid y p53. Por último, Snail1 es capaz de inducir inmunosupresión a través del aumento de citoquinas supresoras de la respuesta inmune (118).

2.3. Implicación en cáncer

La expresión de Snail1 se ha relacionado con la migración y agresividad tumoral. Por una parte, se ha encontrado sobreexpresado en células endoteliales, células epiteliales de carcinoma de mama, de piel, de hepatocarcinomas, de cánceres de cabeza y cuello y de cáncer colorectal (116, 119-121). Esta sobreexpresión está asociada a la represión de E-cadherina y a un aumento de la invasión y capacidad metastática (122). Esto se ha demostrado también mediante el silenciamiento de la expresión de Snail1, la cual disminuye la invasión tumoral (123). Además, Snail1 favorece la progresión tumoral no solo induciendo la migración celular a través de la EMT, sino regulando la supervivencia celular y proporcionando a las células la capacidad de evadir la muerte celular (figura 16).

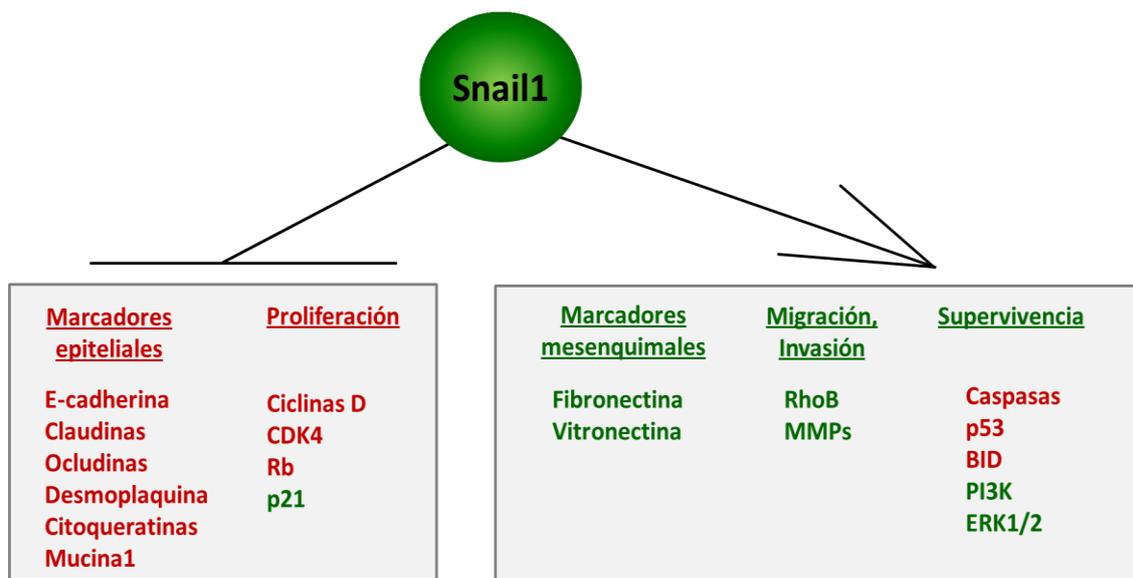


Figura 16. Procesos y genes regulados por Snail1. Snail1 reprime la expresión de marcadores epiteliales y promueve la de marcadores mesenquimales. También regula la migración y la invasión y disminuye la proliferación pero favorece la supervivencia. Los procesos y genes mostrados en rojo son inhibidos por Snail1, mientras que los indicados en verde son inducidos por Snail1. No todos los genes están regulados directamente por Snail1. Adaptado de Barallo-Gimeno y Nieto, 2005 (98).

IV. LA VÍA RAF-MEK-ERK

La vía RAF-MEK-ERK es una de las cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, *Mitogen Activated Protein Kinases*), las cuales participan en una gran cantidad de procesos celulares como proliferación, diferenciación, apoptosis, metabolismo y migración celular (124). En mamíferos las MAPKs constan fundamentalmente de tres familias: las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2, *Extracellular Signal-Regulated protein Kinases*), las proteínas quinasas del extremo N-terminal de c-Jun (JNKs, *c-Jun N-terminal Kinases*) y las p38 MAPKs. Además, existen otras tres familias de MAPKs, las ERK3/4, la ERK5 y la ERK7, cuyas funciones no se conocen en detalle (124). Todas las MAPKs están organizadas en módulos de 3 quinasas que actúan secuencialmente: una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), una MAPK quinasa (MAPKK) y una MAPK (figura 17).

Las MAPKs se activan por hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, e incluso a través del estrés ambiental producido por radiaciones, choques osmóticos y/o daño isquémico que pueden actuar sobre receptores tirosina quinasa (RTKs, *tyrosine kinase receptors*), receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, *G Protein-Coupled Receptor*), receptores de citoquinas y receptores serina/treonina quinasa. Tras el estímulo se produce la activación de una GTPasa monomérica que induce la cascada de fosforilaciones de las MAPKs. En primer lugar se activan las serina/treonina quinasas MAPKKKs a través de fosforilación, las cuales a su vez fosforilan y activan a la MAPKK. A continuación, las MAPKKs fosforilan a las MAPKs en un residuo de treonina y en otro de tirosina en el motivo TXY, activándolas. Así, las MAPKs activas fosforilan diferentes proteínas citosólicas o se translocan al núcleo, donde pueden fosforilar numerosos sustratos implicados en diversas funciones (124-126).

En concreto, la señalización a través de la vía Ras-RAF-MEK-ERK se inicia con la activación de receptores del tipo RTKs o bien GPCRs (figura 17). Esta señal se transmite a través de proteínas adaptadoras a la proteína G monomérica Ras que, a continuación, produce el reclutamiento a la membrana plasmática y posterior activación de RAF (MAPKKK), la cual a su vez se une y activa a la quinasa de especificidad dual MEK (MAPK-ERK Kinase, MAPKK). Esta última, fosforila y activa a ERK (MAPK) en un dominio TEY del segmento de activación. Por último, ERK puede regular numerosos sustratos implicados en proliferación, diferenciación, migración y apoptosis (figura 17).

En cuanto a las proteínas Ras, existen tres genes (*N-ras*, *H-ras* y *K-ras*) que dan lugar a cuatro proteínas (N-RAS, H-RAS, K-RAS4A y K-Ras4B) localizadas fundamentalmente en la cara interna de la membrana plasmática (127). En el estado inactivo estas proteínas se encuentran unidas a GDP y cuando se activan se produce un intercambio de GDP por GTP mediado por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs, *Guanine nucleotide Exchange factor*). Una vez que Ras ejerce su acción, la proteína Ras-GTP es inactivada rápidamente mediante la hidrólisis del GTP a GDP por la propia actividad GTPasa intrínseca de Ras y por la acción de proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs, *GTPase-Activating Proteins*).

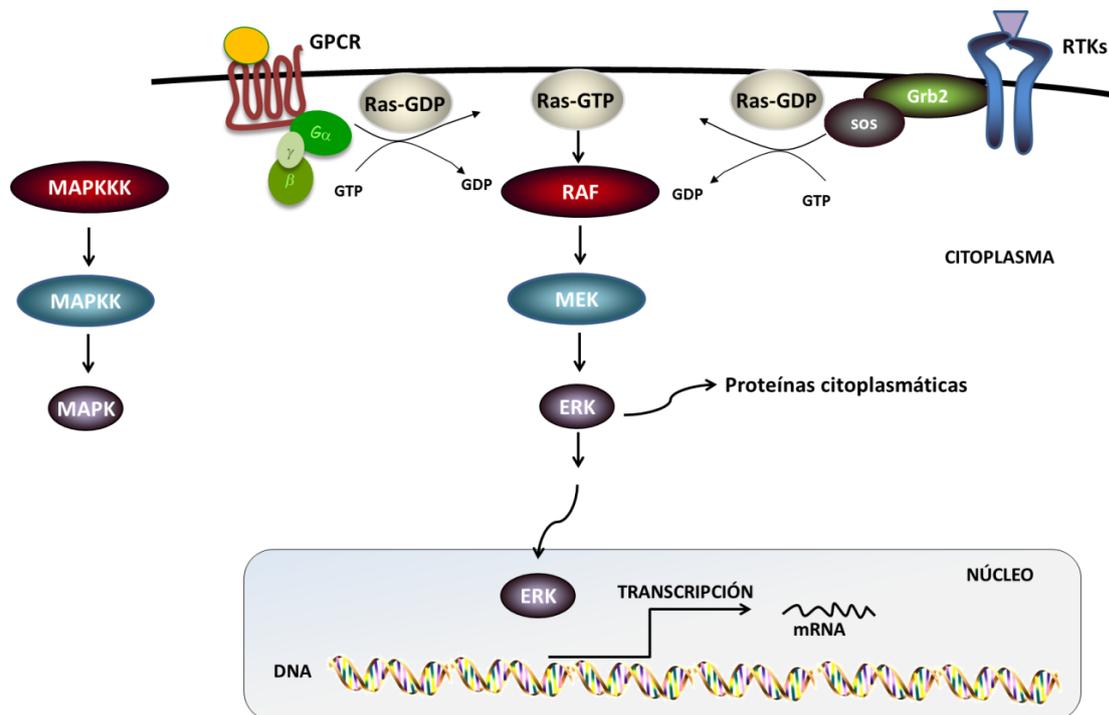


Figura 17. Vía de señalización Ras-RAF-MEK-ERK. Tras la estimulación de los receptores por señales extracelulares se produce la activación de Ras, la cual inicia la cascada de señalización que continúa con la activación de RAF, MEK y ERK. ERK puede activar proteínas citosólicas o bien translocarse al núcleo, donde regula múltiples factores de transcripción. La gran diversidad de sustratos de ERK hace que esta vía esté implicada en multitud de procesos celulares como supervivencia, apoptosis, diferenciación y migración.

Por su parte, las proteínas efectoras de Ras son las serina/treonina quinasa RAF, las cuales se unen a Ras-GTP y fosforilan a MEK. Debido a la importancia de estas proteínas en el presente trabajo, tanto su activación, como su implicación en la tumorigénesis se describirán más en detalle en el siguiente apartado de esta memoria.

Respecto a las proteínas MEK, existen dos isoformas, MEK1 (44kDa) y MEK2 (45kDa) activadas por las proteínas RAF. Estas proteínas, para activarse, han de fosforilarse en dos residuos de serina presentes en el segmento de activación (S218 y S222 en el caso de MEK1, y los correspondientes en MEK2). Además, MEK1/2 poseen una secuencia rica en prolina necesaria para la especificidad en el reconocimiento y la unión de las proteínas RAF (128).

Existen dos proteínas ERK diferentes: ERK1 (o p44) y ERK2 (o p42) codificadas por los genes MAPK3 y MAPK1 respectivamente. Una vez que MEK se encuentra activa, es capaz de activar a ERK mediante fosforilación de un residuo de treonina y otro de tirosina en el motivo TEY del lazo de activación (T202/Y204 en ERK1 y T185/Y187 en ERK2). Ambas proteínas tienen actividad serina/treonina quinasa y, una vez activas, pueden fosforilar más de 150 sustratos entre proteínas nucleares y citosólicas.

ERK1/2 regulan un amplio espectro de funciones celulares. Por ejemplo, inducen proliferación a través de la fosforilación de los factores de transcripción c-myc y c-jun. Además, a través de

la fosforilación del factor de transcripción AP-1 aumentan la expresión de ciclina D1 que, a su vez, favorece la progresión del ciclo celular. ERK1/2 también tienen una función antiapoptótica a través de la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-XL y la represión de proteínas proapoptóticas como Bim. Asimismo, promueven la migración celular regulando las señales mediadas por la GTPasa Rho, fosforilando la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK, *Myosin Light-Chain Kinase*) y regulando la formación de contactos focales (124).

Por otra parte, la desregulación de la vía Ras-RAF-MEK-ERK juega un papel fundamental en cáncer, donde se ha observado que su actividad está aumentada en un 30% de los cánceres humanos. En este sentido se han encontrado mutaciones en Ras en aproximadamente un 30% de tumores y de B-RAF en aproximadamente un 10% de tumores.

V. PROTEÍNAS RAF

Las proteínas RAF forman parte de una familia de serina/treonina quinasas compuesta por tres miembros, A-RAF, B-RAF y C-RAF. Desde su descubrimiento en los años 80, únicamente se consideraron importantes por su posición en la vía de Ras-RAF-MEK-ERK como efectores de Ras. Sin embargo, este concepto cambió cuando se descubrió que la isoforma B-RAF estaba mutada frecuentemente en varios tipos de cánceres humanos señalándola como oncogén (129).

1. ESTRUCTURA Y REGULACIÓN

A-RAF es la más pequeña de las tres isoformas (aproximadamente 68 kDa), seguida de C-RAF (72-74 kDa). B-RAF es la más grande de las tres y sufre *splicing* alternativo, lo que da lugar a varias proteínas que oscilan entre 75 y 100 kDa (130, 131). Las tres isoformas presentan un alto grado de homología y comparten tres regiones altamente conservadas (CR1, CR2 y CR3) (figura 18). CR1 y CR2 forman parte de la subunidad reguladora en el extremo N-terminal y la región CR3 forma parte de la subunidad catalítica en el extremo C-terminal, siendo esta última la que presenta mayor grado de homología en las tres isoformas. En la región CR1 se encuentran los dominios RBD (*Ras Binding Domain*) y CRD (*Cystein Rich Domain*), importantes para la activación mediada por Ras. En la región CR2, rica en residuos de serina y treonina, se encuentran algunos aminoácidos importantes para su regulación por fosforilación. Por último, en la región CR3 se encuentran el segmento de activación y el lazo catalítico. Además, junto al extremo N-terminal de CR3 está la Región Negativa (NR), con sitios de fosforilación necesarios para su activación.

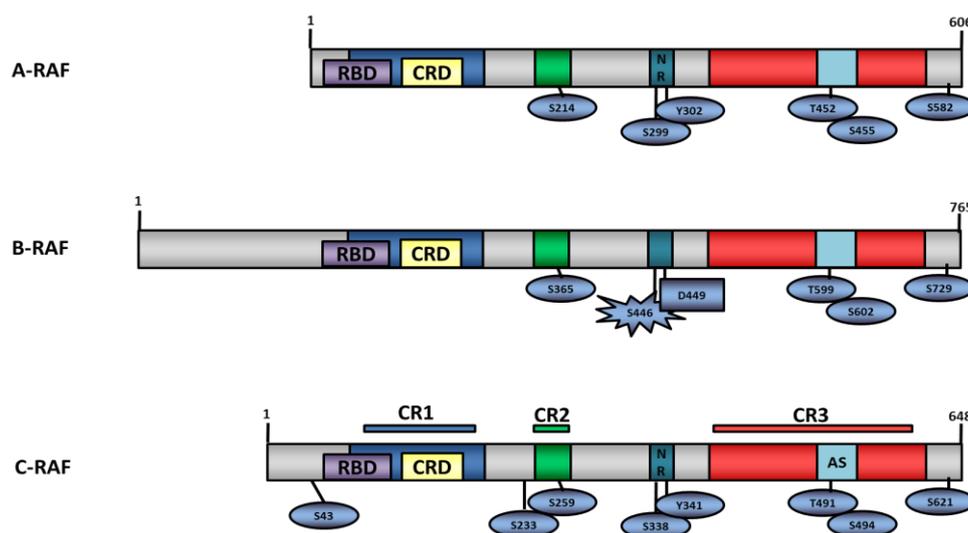


Figura 18. Estructura de las proteínas RAF. Las tres isoformas de RAF, A-RAF, B-RAF y C-RAF comparten tres regiones conservadas: CR1 (azul), CR2 (verde) y CR3 (rojo). Los aminoácidos presentes en la figura son los más importantes para la regulación por fosforilación. CR1 y CR2 contienen el dominio de unión a Ras (RBD) y un dominio rico en cisteínas (CRD), importantes para el reclutamiento a la membrana mediado por Ras. CR3 contiene el dominio catalítico donde se encuentra el segmento de activación (AS, *Activation Segment*). La región negativa (NR, *Negative Region*) se encuentra entre la región CR2 y CR3.

El conocimiento de la estructura de las proteínas RAF, permitió establecer un modelo de regulación que comprende múltiples pasos, entre ellos el reclutamiento a la membrana por parte de Ras, dimerización u oligomerización, unión a otras proteínas y lípidos, cambios conformacionales y fosforilaciones (132).

1.1. Unión a Ras. Reclutamiento a la membrana

La activación de Ras en la cara interna de la membrana plasmática provoca el reclutamiento de RAF a la membrana a través de su unión al dominio RBD y CRD. Aunque este primer paso es esencial, no es suficiente para la activación de RAF (132), ya que la capacidad Ras de unirse a RAF también está regulada por las proteínas adaptadoras 14-3-3 (133). En su estado inactivo en el citosol las proteínas 14-3-3 se unen a C-RAF en la S259 fosforilada, de tal forma que se origina un impedimento estérico para la unión de Ras (134, 135). Se ha descrito que Ras es capaz de romper la interacción entre las proteínas RAF y 14-3-3 *in vitro* (136, 137), aunque *in vivo*, necesita la colaboración de la fosfatasa PP2A, que se encarga de desfosforilar la S259 (en C-RAF), permitiendo la unión de Ras a RAF (138-140) (figura 19).

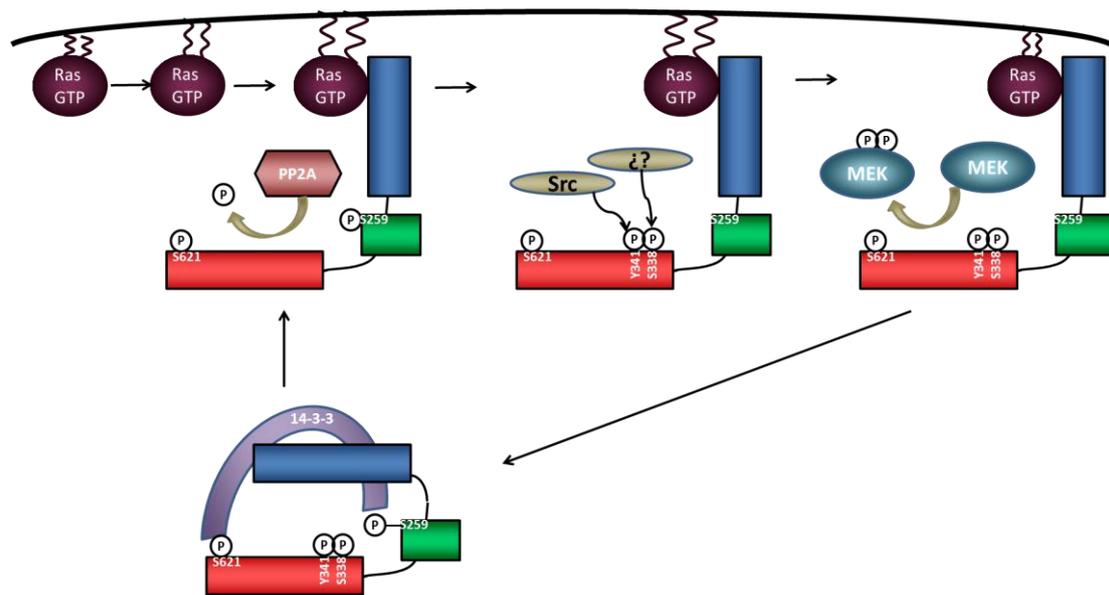
1.2. Fosforilación y activación

Una vez que las proteínas RAF son reclutadas a la membrana plasmática por su unión a Ras, sufren un cambio conformacional que permite la fosforilación en numerosos residuos para aumentar su actividad. Aunque las tres isoformas de RAF poseen un alto grado de homología, existen diferencias notables a nivel de su regulación por fosforilaciones. Todos los residuos susceptibles de fosforilación de C-RAF están conservados en A-RAF, lo que explica que la activación de ambas isoformas se lleve a cabo por mecanismos similares (132). En cambio, en B-RAF, sólo algunos de ellos están conservados y regulados de forma similar. Por ello, para explicar las diferencias con B-RAF se recurre únicamente a la comparación entre C-RAF y B-RAF.

En primer lugar, las fosforilaciones en los residuos T491 y S494 en C-RAF y los correspondientes en B-RAF (T599 y S602), localizados en el segmento de activación (figura 18), son eventos cruciales para la activación de ambas proteínas, ya que se ha observado, que su sustitución por aminoácidos no fosforilables inhiben la actividad de ambas proteínas (141, 142).

Por otra parte, los residuos S233, S259 y S621 de C-RAF fosforilados interaccionan con la proteínas 14-3-3 dando lugar a una conformación cerrada, inaccesible para Ras y por tanto inactiva (figura 19) (143). Los tres residuos son fosforilados por PKA (132), pero la S259 también puede fosforilarse por AKT (144). Mientras que para la activación de C-RAF es necesaria la desfosforilación de la S259 por parte de PP2A (140), la S621 permanece fosforilada en la conformación activa, lo que ha sugerido que la unión de 14-3-3 a este último residuo favorece la dimerización de C-RAF (145) y protección frente a la degradación proteosomal (146). En B-RAF, los residuos correspondientes a la S259 y S621 de C-RAF (S365 y S729) están conservados; la S365 también media la unión con las proteínas 14-3-3 mientras que la S729 no está implicada en la inactivación de B-RAF.

A) MODELO DE ACTIVACIÓN C-RAF



B) MODELO DE ACTIVACIÓN B-RAF

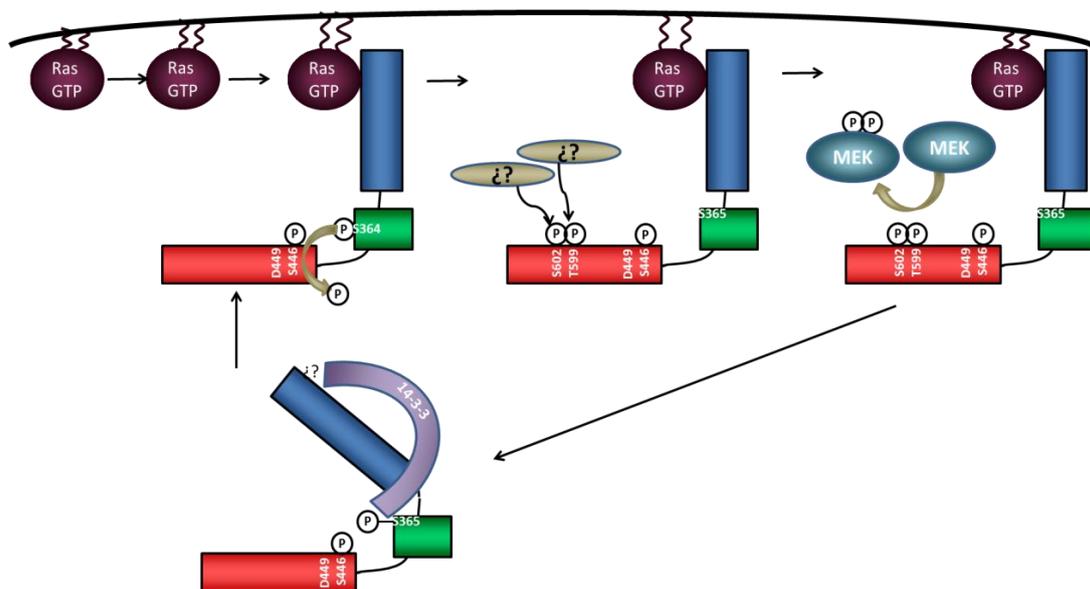


Figura 19. Modelos de activación de C-RAF y B-RAF. A) En ausencia de estímulo las proteínas 14-3-3 mantienen la conformación inactiva de C-RAF a través de la unión a la S259 y la S621 fosforiladas. En presencia de estímulo, Ras adopta su conformación activa y se une a C-RAF translocándola a la membrana plasmática. La fosfatasa PP2A desfosforila la S259 impidiendo la interacción con 14-3-3. Finalmente, la fosforilación de la Y341 y la S338 producen la completa activación de C-RAF. B) Al igual que C-RAF, las proteínas 14-3-3 forman un complejo con B-RAF en el citosol, sin embargo B-RAF posee una conformación más abierta debido a la carga negativa del D449 y a la fosforilación constitutiva de la S446. En presencia de estímulo, Ras-GTP se une a B-RAF produciendo su translocación a la membrana plasmática. La fosfatasa PP2A desfosforila la S364 y finalmente la fosforilación de la S602 y de la T599 producen la completa activación de B-RAF. Modificado de Mercer y Pritchard, 2003 (127).

Asimismo, las fosforilaciones que se dan en la NR de C-RAF son esenciales para comprender las diferencias en la regulación entre C-RAF y B-RAF (figura 19). Para que C-RAF se active es necesario que se fosforilen la S338 y la Y341. La fosforilación de la Y341 está mediada por quinasas de la familia Src, en cambio, se desconoce la quinasa que fosforila a la S338 (132). En este sentido, se propuso que las proteínas PAKs (*p21-activated kinase*) eran las encargadas de fosforilar a C-RAF en la S338 de forma dependiente de Rac/Cdc42 y PI3K (147); sin embargo, ésto solo ha demostrado ser cierto *in vitro* (148-150). En el caso de B-RAF, el residuo correspondiente a la Y341 está sustituido por un ácido aspártico (D449) y, además, la S446 (S338 en C-RAF) está constitutivamente fosforilada. Por este motivo la región negativa de B-RAF, en su estado inactivo, produce un desplazamiento de la proteína 14-3-3 manteniendo una conformación más abierta que la de C-RAF y la hace más accesible para la unión del RBD con Ras y el reclutamiento a la membrana (127). Todo esto hace que B-RAF posea una mayor actividad basal que C-RAF, ya que, mientras que C-RAF necesita la unión a Ras para translocarse a la membrana y la posterior fosforilación de la región NR, B-RAF únicamente requiere el reclutamiento a la membrana por Ras, que además está favorecido. Así, se ha propuesto que estas diferencias sean las responsables de que existan mutaciones oncogénicas de B-RAF, mientras que no se han encontrado mutaciones en C-RAF, ya que un simple cambio en un aminoácido puede aumentar su actividad quinasa, proporcionando a las células una oportunidad de progresar a un estado cancerígeno. En cambio, C-RAF y A-RAF requieren más eventos para activarse, por lo que aun teniendo lugar mutaciones puntuales, éstas no supondrían una ventaja adaptativa para las células que condujera a su transformación (132).

El conocimiento de la regulación de B-RAF aumentó con la resolución del cristal del dominio quinasa llevada a cabo por Wan *et al.* en el año 2004 (146) (figura 20A). Se observó que este dominio tiene una estructura típica de las quinasas con un lóbulo pequeño separado de otro grande por una hendidura o bolsillo catalítico. Sin embargo, a diferencia de otras quinasas, presenta una interacción entre el lazo rico en glicina (aminoácidos 459-471), responsable de la unión a ATP, y el segmento de activación (aminoácidos 578-623). Esta interacción permite a B-RAF adoptar una conformación inactiva y explica que la fosforilación de la T599 y la S602 sean tan importantes para su activación, ya que los grupos fosfato desestabilizaban esa interacción dejando libre el bolsillo catalítico para la entrada del ATP y la consiguiente fosforilación de sus sustratos (figura 20A)(132).

1.3. Activación de las proteínas RAF por dimerización

Además de tener funciones propias, los miembros de la familia RAF pueden regular la activación de la vía MEK-ERK a través de la formación de homodímeros y heterodímeros. En este sentido, se ha observado que, en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento y a la activación de Ras, C-RAF y B-RAF forman heterodímeros cuya actividad quinasa sobre MEK es más alta que la de los respectivos monómeros u homodímeros (145). El modelo propuesto describe que en condiciones basales B-RAF posee una conformación “cerrada” impidiendo la interacción con C-RAF. Cuando B-RAF es activado, bien por un estímulo a través de Ras o por mutaciones en el segmento de activación, adopta una conformación “abierta” permitiendo la interacción con C-RAF. De esta forma B-RAF activa a C-RAF y éste transmite la señal a MEK y ERK (151). La consecuencia más importante de este modelo de activación es que

B-RAF puede mediar respuestas celulares a través de C-RAF, lo que supone una mayor flexibilidad en la regulación de la vía MEK-ERK y un nuevo mecanismo de B-RAF para transmitir las señales tumorogénicas. En este sentido, en la última década se han identificado algunas funciones de C-RAF a través de efectores distintos a MEK y ERK. Entre estos efectores se encuentran proteínas implicadas en el proceso de apoptosis como BAD, ASK-1 y MST-2, proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular como retinoblastoma (Rb) y Cdc25, proteínas implicadas en la reorganización del citoesqueleto como Vimentina, Rok- α y keratina 8, y proteínas implicadas en la supervivencia celular como BAG1 y NF- κ B (152). Todo esto implica que B-RAF podría regular también estos procesos a través de C-RAF de una forma independiente a la activación de MEK-ERK.

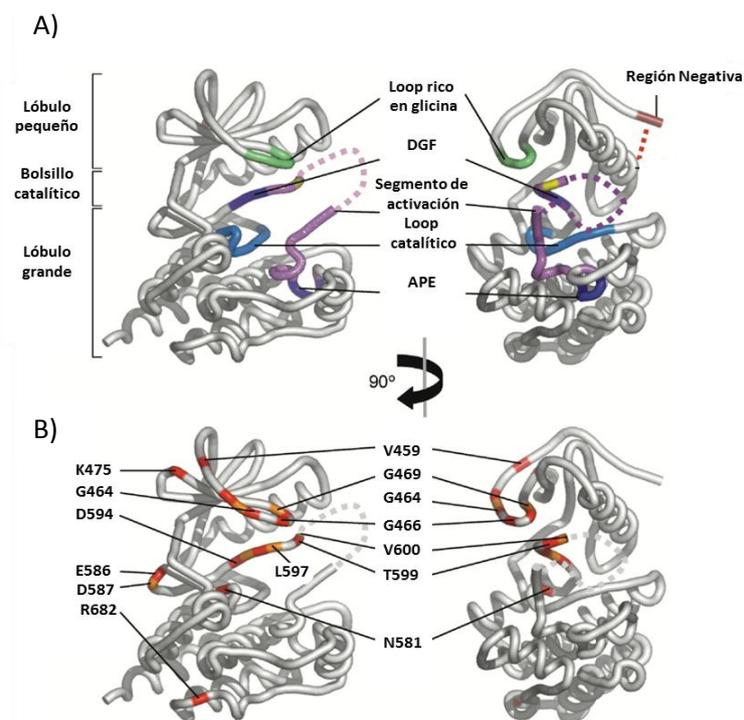


Figura 20. Estructura del dominio quinasa de B-RAF. A) Se indican el lóbulo pequeño, el lóbulo grande y el bolsillo catalítico. La interacción entre la región negativa (marrón), el D448 y la R506 se representa por la línea discontinua roja. El lazo rico en glicina en verde, el lazo catalítico en azul y el segmento de activación en lila. La T599 se representa en amarillo. B) Mutaciones de B-RAF en cáncer. La misma representación que en A) pero incluyendo los residuos mutados coloreados alternativamente para mayor claridad. Modificado de Garnett y Marais, 2004 (153).

2. PAPEL DE ^{V600E}B-RAF EN CÁNCER

Como se ha comentado anteriormente, se han encontrado alrededor de 100 mutaciones en el gen de B-RAF en aproximadamente un 10% de cánceres humanos (129). Sin embargo las mutaciones de C-RAF en cáncer son raras y sólo aparecen con una frecuencia de 1%, y no se han encontrado mutaciones en A-RAF. El mayor porcentaje de mutaciones se ha encontrado en melanomas, donde la prevalencia es de alrededor de un 60%, y en cáncer de tiroides, donde se han encontrado en aproximadamente un 50% de los casos (154). Asimismo, se han encontrado mutaciones en B-RAF en el 5-20% de cánceres colorectales, en el 30-40% de cánceres de ovario y en menor porcentaje (1-3 %) en otros tipos de cáncer. De todas las

mutaciones encontradas en B-RAF, la mayoría de ellas son mutaciones activadoras y se encuentran situadas alrededor del lazo rico en glicina y del segmento de activación (figura 20B). De éstas, la sustitución de una valina por un ácido glutámico en la posición 600 es la más frecuente, representando el 90% de las mutaciones encontradas de B-RAF. Esta mutación proviene del cambio de una timidina por una adenosina en el nucleótido 1799, que da lugar a un mutante constitutivamente activo denominado ^{V600E}B-RAF (129). Así, el mutante ^{V600E}B-RAF es capaz de estimular constitutivamente la actividad de ERK y se ha demostrado que su actividad quinasa *in vitro* es 500 veces mayor que la de B-RAF silvestre (^{WT}B-RAF) (146). Además, también se han encontrado otras mutaciones menos frecuentes en el lazo rico en glicina (GXGXXG). La estructura de B-RAF también explica cómo las mutaciones encontradas en B-RAF aumentan su actividad quinasa, ya que la mayoría de estas mutaciones desestabilizan la interacción entre el lazo rico en glicina y el segmento de activación (figura 20B), permitiendo a B-RAF permanecer constantemente en un estado activado. Por otra parte, también existen mutaciones activadoras en otras regiones de la molécula que no afectan a la interacción entre el residuo rico en glicina con el segmento de activación. Posiblemente, estos residuos estén implicados en las interacciones intramoleculares entre el extremo N-terminal y el dominio catalítico que mantienen a B-RAF en una conformación inactiva, o incluso participen en interacciones con proteínas inhibitorias (figura 20B) (132). Por último, sorprendentemente, algunos de los mutantes encontrados en B-RAF como ^{D594V}B-RAF poseen una actividad quinasa menor que la de ^{WT}B-RAF y, sin embargo, son capaces de activar MEK-ERK de forma independiente de Ras. Una posible explicación es que estos mutantes adoptan la conformación activa, pero no son capaces de fosforilar MEK porque las mutaciones que tienen producen un impedimento estérico. Sin embargo, éstos son capaces de formar heterodímeros con C-RAF, activando a esta última, de forma que C-RAF se encarga de transmitir la señal a MEK-ERK (146, 151).

En cuanto a los tumores tiroideos, la mutación ^{V600E}B-RAF ocurre exclusivamente en PTCs y ATCs, donde está presente con una frecuencia de un 44% y de un 24% respectivamente (155). Además, se han encontrado otro tipo de alteraciones genéticas, como la translocación AKAP9-B-RAF (156), la delección ^{V600E+K601del}B-RAF (157, 158) y las inserciones, ^{V599ins}B-RAF (159) y ^{V600D+FGLAT601-605ins}B-RAF (158).

2.1. Efectos de ^{V600E}B-RAF sobre la tumorigénesis

Las mutaciones en B-RAF se dan en etapas tempranas de PTCs y melanomas, ya que se han encontrado tanto en microPTCs (160), como en nevus melanocíticos (161), ambos considerados como precursores de PTCs y melanomas respectivamente. Además, los efectos de la mutación de B-RAF en cáncer son muy variados e incluyen alteraciones en la proliferación, supervivencia, migración e invasión celular.

En cuanto a la proliferación, se ha observado que ^{V600E}B-RAF regula algunos componentes del ciclo celular produciendo una proliferación incontrolada. Por una parte, ^{V600E}B-RAF induce la hiperfosforilación de retinoblastoma (Rb), lo que da lugar a la liberación del factor de transcripción E2F, y a un aumento de la expresión de Ciclina D1, promoviendo el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (figura 21) (162). Además, ^{V600E}B-RAF disminuye los niveles de p27, un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), que produce la parada del ciclo celular en la fase G1 (figura 21). Por otra parte, el silenciamiento de la expresión de B-RAF

o inhibidores selectivos de V^{600E} B-RAF disminuyen la proliferación de células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo* (127), en algunos casos a través de la disminución de los niveles de Ciclina D1 (163).

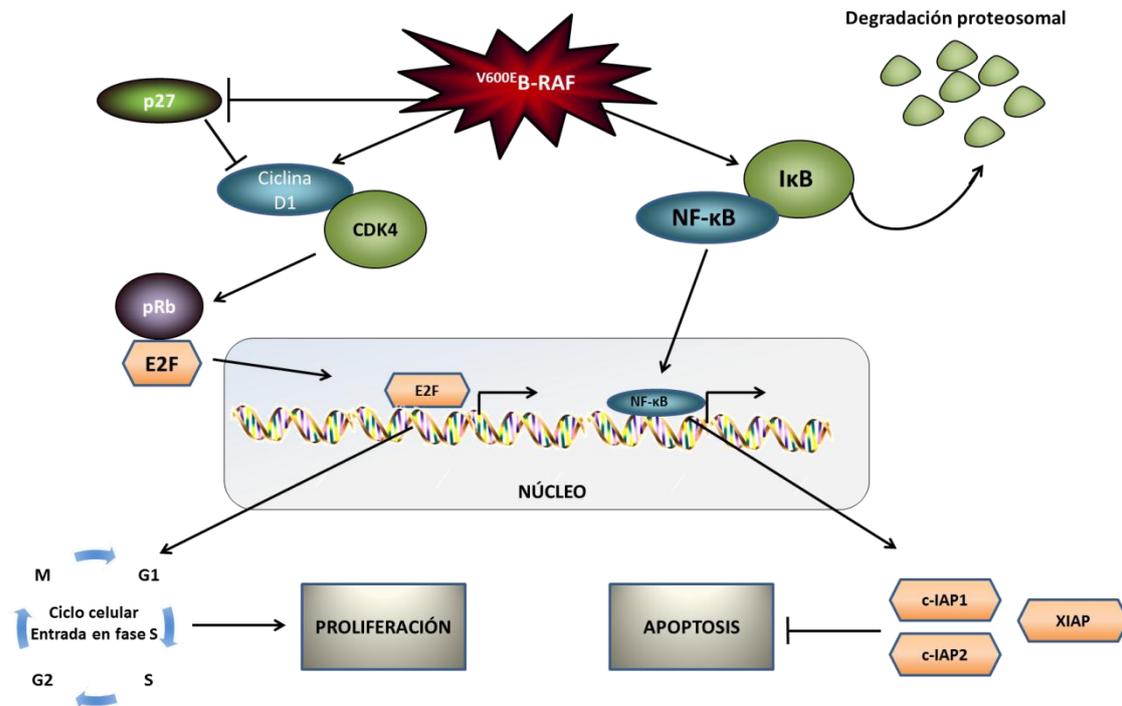


Figura 21. Efecto de V^{600E} B-RAF sobre la tumorigénesis. V^{600E} B-RAF promueve la proliferación celular a través de la disminución de los niveles de p27 y el aumento de los niveles de Ciclina D1. Estos procesos dan lugar a la liberación del factor de transcripción E2F y a la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Por otra parte, V^{600E} B-RAF regula la supervivencia celular a través de la degradación de IκB, aumentando así la actividad transcripcional de NF-κB. NF-κB induce la expresión de proteínas antiapoptóticas como XIAP, c-IAP1 y c-IAP2.

Además de su papel en la proliferación celular, al mutante V^{600E} B-RAF se le ha asignado una función antiapoptótica. Así, células de melanoma y cáncer colorrectal con V^{600E} B-RAF sufren arresto del ciclo en G1 y apoptosis al silenciar la expresión de B-RAF o inhibir la vía MEK-ERK (164, 165). Sin embargo, en células tumorales tiroideas, la inhibición de V^{600E} B-RAF conlleva una parada del ciclo celular en fase G1 con el consiguiente descenso de la proliferación, pero sin producir apoptosis (163, 166), lo que sugiere la existencia de posibles mutaciones secundarias a V^{600E} B-RAF capaces de mantener la supervivencia celular en ausencia del mismo. En este sentido, una publicación reciente de nuestro grupo demuestra la participación de la vía PI3K-AKT en la protección frente a la apoptosis inducida por el silenciamiento de B-RAF (167). Por otra parte, la hiperactivación de la vía Ras-RAF-MEK-ERK se ha relacionado con un aumento de la actividad de NF-κB (168). Así, en algunas líneas de cáncer de tiroides, sobre todo en líneas derivadas de ATCs que expresan el mutante V^{600E} B-RAF, se ha observado una actividad transcripcional de NF-κB aumentada y ésta se ha relacionado con efectos antiapoptóticos (figura 21). Además, la sobreexpresión de V^{600E} B-RAF en líneas derivadas de FTC, induce la activación de la vía de NF-κB e incrementa la expresión de genes antiapoptóticos regulados por este factor de transcripción como c-IAP-1, c-IAP-1 y XIAP (figura 21)(169).

Por otra parte, ^{V600E}B-RAF también parece regular la senescencia. En este sentido, es frecuente la presencia de los marcadores de senescencia p53 o p16 en PTCs y nevus benignos, mientras que se han encontrado mutaciones que los inactivan en cánceres tiroideos poco diferenciados como ATCs y en melanomas (170, 171). Además, se ha observado que células epiteliales de pulmón con ^{V600E}B-RAF no progresan a adenocarcinoma a menos que se inhiba la expresión de p53 o de p16 (172). Por otra parte, se han descrito mecanismos para evitar la senescencia inducida por ^{V600E}B-RAF mediante la disminución de su actividad quinasa a través de la activación de AKT3, la sobreexpresión de c-myc y la disminución de la expresión de IGFBP7 (173-175).

2.2. Efectos de ^{V600E}B-RAF sobre la progresión tumoral

Además de inducir proliferación y supervivencia, ^{V600E}B-RAF también desempeña un papel importante en la invasión tumoral y en las interacciones con el estroma, en la inducción de la angiogénesis y en la creación de un microambiente inmunológico adecuado para el desarrollo tumoral. ^{V600E}B-RAF aumenta la expresión de varias proteínas que regulan la migración celular, tales como Rdn3, PlexinB1 o Minerva/FAM129B, favoreciendo el anclaje y la metástasis de células de melanoma (176-179).

En cuanto al cáncer de tiroides en particular, en el año 2005, Knauf J.A *et al.*, mediante mutagénesis dirigida en ratones transgénicos, demostraron la capacidad de ^{V600E}B-RAF de producir tumores en la glándula tiroides (180). Estos tumores, inicialmente PTCs, evolucionaron a tumores menos diferenciados y mostraron una mayor capacidad de invadir los vasos sanguíneos, los ganglios linfáticos y los tejidos adyacentes. Por otra parte, la inhibición de ^{V600E}B-RAF disminuye la proliferación, la migración y la invasión de células tiroideas tanto *in vitro* como *in vivo* (181-183). Todos estos resultados confirman que ^{V600E}B-RAF es importante no sólo para el inicio de la tumorigénesis, sino que también es fundamental para el desarrollo del tumor y la progresión del cáncer de tiroides.

Es importante resaltar que las tres alteraciones genéticas que activan la vía Ras-RAF-MEK-ERK en PTCs, incluyendo el gen RET/PTC, las mutaciones en el gen Ras y el mutante ^{V600E}B-RAF, son excluyentes entre sí (19, 155, 184-186), lo que indica que cada una de ellas por separado, puede ser suficiente para inducir tumorigénesis. Sin embargo, los tumores con ^{V600E}B-RAF son más agresivos y tienen mayor índice de recurrencia que los que contienen las otras dos mutaciones (187). Este hecho, se ha relacionado con la inestabilidad genética producida por ^{V600E}B-RAF frente a la ausencia de la misma en tumores con RET/PTC (188), indicando que ^{V600E}B-RAF induce mutaciones secundarias implicadas en el desarrollo del tumor que son determinantes para adquirir una mayor agresividad. Asimismo, se ha demostrado un patrón de expresión de genes distintos en tirocitos de rata con las mutaciones RET/PTC o ^{V600E}B-RAF (187). Por otra parte, estudios clinicopatológicos en pacientes con tumores tiroideos portadores de ^{V600E}B-RAF o mutaciones en Ras mostraron que aquellos que contienen el mutante ^{V600E}B-RAF están asociados a un mayor riesgo de padecer metástasis en ganglios linfáticos y tejidos extratiroidales, y presentan estadios más avanzados del cáncer (160). En la figura 22 se resumen los mecanismos principales por los que ^{V600E}B-RAF favorece la progresión

tumoral. En comparación con RET/PTC y Ras, ^{V600E}B-RAF se ha asociado con una mayor expresión del gen c-Met (189), el cual también se ha relacionado con un aumento de la agresividad tumoral y metástasis en nódulos linfáticos de PTCs, coincidiendo con los síntomas clinicopatológicos producidos por ^{V600E}B-RAF (190).

Por otra parte, la presencia de ^{V600E}B-RAF en PTCs se ha asociado con la sobreexpresión de varias moléculas que actúan como promotoras tumorales. Algunos ejemplos son; el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF, el cual ha demostrado tener un papel fundamental en la angiogénesis (191), y las metaloproteasas MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 y MMP13 (169, 187), implicadas en el aumento de la invasión celular, en algunos casos a través de un mecanismo dependiente de la activación de NF-κB e independiente de MEK-ERK (169). Además, en estudios recientes también se ha relacionado a ^{V600E}B-RAF con la expresión de genes involucrados en la composición y regulación de la MEC. Así, en tumores tiroideos con ^{V600E}B-RAF se ha detectado la sobreexpresión de Trombospondina-1 (TSP-1), TGFβ-1, fibronectina, CD44, catepsina-B y catepsina-S, respecto a muestras de tejido tiroideo normal con ^{WT}B-RAF (183). Asimismo, en un modelo animal de tumorigénesis inducida por ^{V600E}B-RAF se ha observado el aumento de los componentes de la MEC colágeno y vimentina, así como la disminución de las proteínas implicadas en las uniones intercelulares claudinas y E-cadherina (192). Este modelo, permite reproducir los cambios producidos en el paso de un cáncer tiroideo diferenciado a uno poco diferenciado a través de la transición epitelio-mesénquima, indicando que ^{V600E}B-RAF puede participar en este proceso.

Otro mecanismo de regulación de la tumorigénesis tiroidea por ^{V600E}B-RAF es a través de la inhibición de la expresión de genes por metilación (193). En este sentido, el inhibidor tisular de MMP3 (TIMP3), la proteína quinasa asociada a muerte (DAPK) y el receptor β2 del ácido retinoico (RARβ2) son ejemplos de genes cuya metilación se ha asociado a la expresión de ^{V600E}B-RAF en PTCs. Asimismo, este silenciamiento se ha asociado a la progresión del cáncer tiroideo y a una mayor agresividad del mismo (194).

Por último, la progresión del cáncer de tiroides conlleva la desdiferenciación de las células tumorales, lo que disminuye la respuesta terapéutica a los tratamientos radioterápicos con yodo radiactivo. Esta pérdida de diferenciación se ha asociado con la falta de expresión de moléculas que regulan el metabolismo tiroideo como el TSHR, NIS, TPO, Tg y pendrina (195-199). Así, se ha observado que la expresión de ^{V600E}B-RAF en tirocitos de rata disminuye la expresión de TPO, NIS, Tg y pendrina y que la inhibición de la actividad de ^{V600E}B-RAF recupera la expresión de estos genes tiroideos (200-203). En este sentido, se ha propuesto la participación de ^{V600E}B-RAF en la metilación del promotor de NIS o de factores de transcripción que regulan su expresión como Pax8 y TTF1 (21). A su vez, apoyando estos resultados, estudios recientes *in vivo*, muestran que la inhibición de ^{V600E}B-RAF restablece la capacidad de captar yodo de las células tumorales, y recupera la susceptibilidad de estas células a las dosis terapéuticas de la radioterapia (204).

En resumen, de todos estos estudios se puede deducir que los efectos moleculares mediados por ^{V600E}B-RAF son responsables de la iniciación y la progresión del cáncer tiroideo, de una mayor agresividad, y además, que estos efectos no son reemplazables por otras mutaciones que también activen la vía Ras-RAF-MEK-ERK.

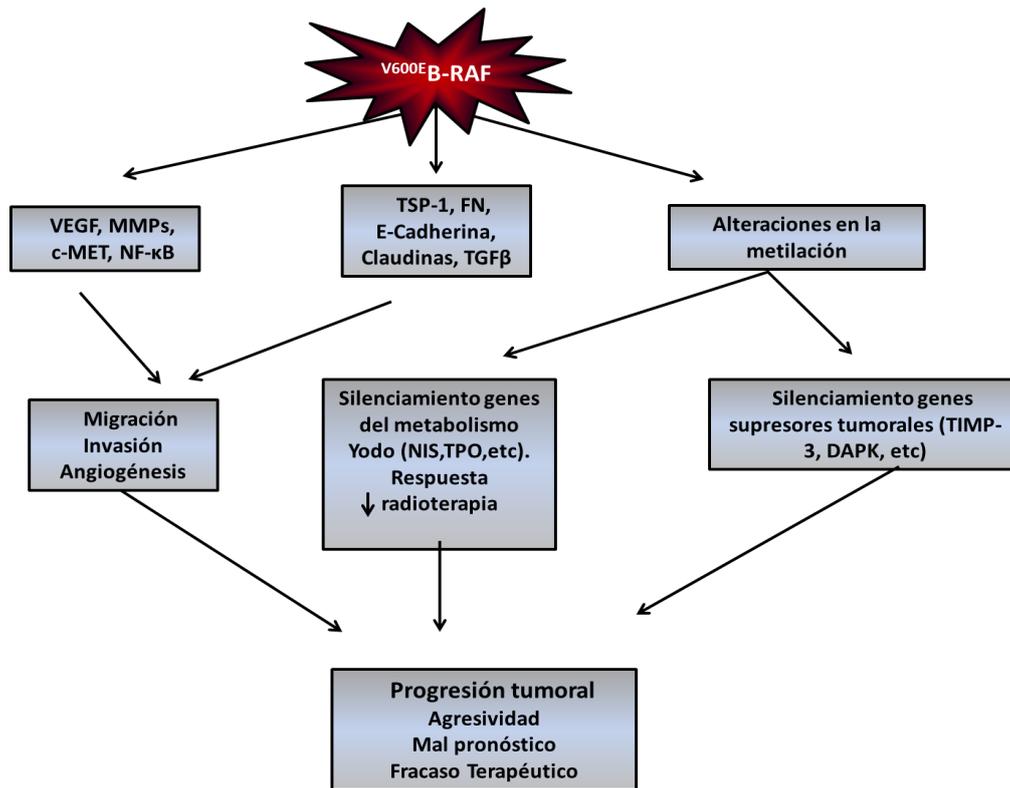


Figura 22. Mecanismos moleculares mediados por $V600E$ B-RAF implicados en la progresión del cáncer tiroideo. Se indica la regulación de proteínas implicadas en la migración e invasión celular y el silenciamiento de genes reguladores del metabolismo del yodo y de genes supresores tumorales producidos por alteraciones en la metilación.

2.3. Efectos paradójicos de los inhibidores de $V600E$ B-RAF

Debido a la implicación de $V600E$ B-RAF en la progresión del cáncer se han realizado muchos estudios para investigar la utilidad del mutante $V600E$ B-RAF como diana terapéutica. Por ello, un gran número de moléculas inhibitoras de $V600E$ B-RAF han sido desarrolladas durante la última década. Algunos de estos compuestos ya han tenido resultados positivos en ensayos clínicos en pacientes de melanoma, sin embargo, se ha observado que algunos de los pacientes tratados con estos inhibidores desarrollan lesiones de la piel asociadas a hiperproliferación, llegando en algunos casos a producirse carcinomas de células escamosas (205). Estos efectos paradójicos se han interpretado recientemente al observar que estos compuestos, en ciertas condiciones celulares, son capaces de producir la dimerización entre las distintas isoformas de las proteínas RAF. En este sentido, Heidorn *et al.* observaron que, en células con K-Ras mutado, el inhibidor selectivo de B-RAF 885-A se une a WT B-RAF y promueve la formación de heterodímeros B-RAF/C-RAF, activando este último y aumentando la actividad de la vía MEK-ERK (206). Asimismo, estos autores demuestran que mutantes de B-RAF catalíticamente inactivos se comportan de la misma manera, uniéndose a C-RAF, activando MEK-ERK e induciendo melanomas en ratones transgénicos.

Por otra parte, el estudio de Hatzivassiliou *et al.* muestra como los inhibidores GDC-0879 y PLX4720 inhiben la actividad de $V600E$ B-RAF, pero también activan la vía RAF-MEK-ERK en

células con Ras mutado y ^{WT}B-RAF (207), a través de la formación de dímeros B-RAF/C-RAF, B-RAF/A-RAF y C-RAF/C-RAF. Por último, también se ha demostrado que estos inhibidores no solo activan MEK-ERK en célula tumorales con mutaciones en Ras, sino que también lo hacen en células en la que la vía Ras-RAF-MEK-ERK está hiperactivada por otros oncogenes como HER2 (208).

Aunque los mecanismos precisos por los que los distintos inhibidores activan la vía RAF-MEK-ERK pueden variar, estos tres estudios demuestran que la inducción de ERK en respuesta a los inhibidores es dependiente de la actividad de Ras y de la transactivación de C-RAF producida por la subunidad unida a la droga (figura 23). Estos descubrimientos han ayudado a explicar los efectos secundarios producidos por estos inhibidores en pacientes con melanoma y ponen de manifiesto la importancia de seleccionar a los pacientes para una terapia determinada en función de las mutaciones que contengan sus células tumorales.

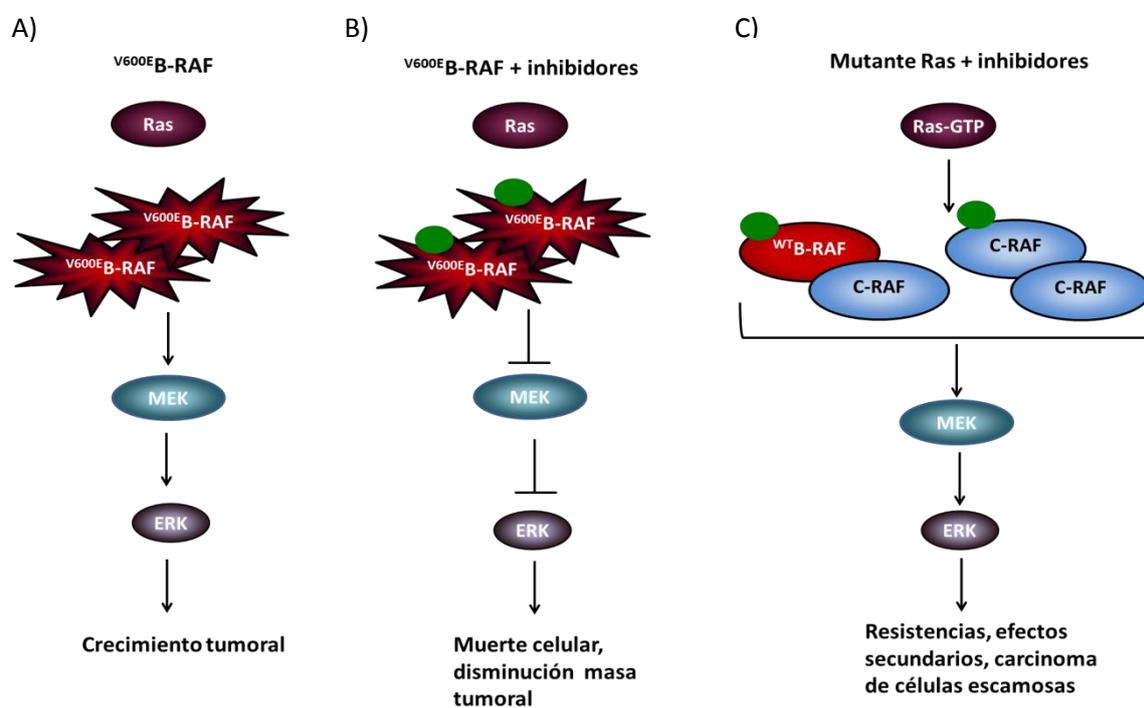


Figura 23. Efectos de los inhibidores de ^{V600E}B-RAF en función de la presencia de mutaciones en Ras o B-RAF. A) En células con el mutante ^{V600E}B-RAF la hiperactivación de la vía RAF-MEK-ERK promueve el crecimiento tumoral. B) En células tumorales con ^{V600E}B-RAF el tratamiento con inhibidores selectivos del mutante (esferas verdes) inhibe la vía y revierte el crecimiento tumoral. C) En células con ^{WT}B-RAF y mutaciones en la proteína Ras, los inhibidores producen la formación de dímeros B-RAF/C-RAF o C-RAF/C-RAF que, junto con Ras mutado, causan una hiperactivación de ERK que resulta en efectos secundarios como la aparición de carcinomas de células escamosas. Adaptado de Cichowski and Jänne, 2010 (209).

VI. TGFβ

La superfamilia de TGFβ en humanos está formada por más de 30 factores que se pueden dividir en 2 grupos. En el primero de ellos se incluyen las activinas, nodal, lefty, miostatina y TGFβ, mientras que el segundo grupo lo constituyen las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factores de crecimiento y diferenciación (GDFs), y la hormona anti-Mülleriana (AMH). La mayoría de los miembros de esta superfamilia poseen distintas isoformas. En el caso de TGFβ, existen 3 isoformas: TGFβ1, TGFβ2, y TGFβ3, de las cuales TGFβ1 es la que posee una función más ampliamente conocida (210). Estas tres citoquinas se expresan en la mayoría de tipos celulares y se sintetizan en forma de dímeros inactivos conocidos como TGFβ latente (figura 24). Posteriormente, estos dímeros son secretados a la MEC, donde son procesados por proteínas de la familia de las convertasas, transformándolos en moléculas activas y así poder ejercer sus múltiples funciones fisiológicas (211). Entre estas funciones se encuentran la regulación de la respuesta inmune, el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis y la inducción de la EMT. El hecho de que TGFβ esté involucrada en todos estos procesos celulares hace que alteraciones en su regulación sean responsables de procesos patológicos, como enfermedades cardíacas, la fibrosis, el síndrome de Marfan y el cáncer.

1. SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR TGFβ

Las moléculas de TGFβ activadas actúan como ligandos y señalizan a través de receptores serina/treonina quinasa. Estos receptores forman un complejo heterotetramérico compuesto por una pareja de receptores tipo I y otra pareja de receptores tipo II (figura 24). Se conocen 7 receptores tipo I (TβR-I) (ALK1-7) y 5 receptores de tipo II (ActR-IIa, ActR-IIb, BMPRII, AMHRII y TβR-II), los cuales se combinan unos con otros dependiendo del tipo de ligando que se una. En el caso de TGFβ1, la señalización se lleva a cabo a través de ALK-5 y TβR-II.

1.1. Vía TGFβ-Smads

La vía fundamental de señalización por TGFβ es a través de los factores transcripcionales Smads (figura 24). La unión de TGFβ a los receptores tipo I y tipo II, provoca la dimerización de éstos. A continuación el receptor tipo II, el cual se encuentra constitutivamente activado, fosforila al receptor tipo I en una región adyacente al dominio quinasa denominada motivo GS (-TTSGSGSG-). Esta fosforilación desestabiliza la interacción inhibitoria entre el dominio GS y la proteína FKBP12, permitiendo la liberación de la misma. A continuación, el receptor TβRI activado se une a los factores de transcripción Smad y los fosforila en su región C-terminal, activándolos (212).

En humanos existen cinco miembros de la familia Smads, de los cuales sólo cinco actúan como sustratos del receptor TβRI: Smad1, 2, 3, 5 y 8.; éstas son conocidas como Smads reguladas por el receptor o R-Smads. De todas ellas, sólo Smad2 y 3 median la señalización por TGFβ. Por otra parte, Smad4 es conocida como Co-Smad e interacciona con las R-Smads formando complejos que actúan como factores de transcripción. Finalmente, las Smads inhibitorias Smad6 y 7 actúan como reguladores negativos de la señalización y se describen con mayor detalle más adelante.

La fosforilación de las R-Smads2/3 crea un sitio de unión para Smad4. Este complejo transloca al núcleo donde regula la transcripción de numerosos genes, uniéndose directamente al ADN o a otros factores de transcripción (figura 24) (213). Adicionalmente, estos complejos transcripcionales pueden reclutar coactivadores o correpresores. Hasta el momento se desconoce si esta asociación se produce en el citoplasma y el complejo se transloca al núcleo, o bien se translocan por separado e interactúan en el núcleo. En cualquier caso, la variedad de combinaciones existentes hace que TGF β pueda activar o reprimir cientos de genes simultáneamente y, por tanto, regular las múltiples respuestas celulares (214).

Estructuralmente, las proteínas Smads están compuestas por dos dominios globulares unidos por una región de enlace (*linker region*). Las R-Smads y Smad4 comparten 2 dominios homólogos, MH1 y MH2 (*Mad homology domain 1 y 2*). El dominio MH1 se localiza en la región N-terminal y es responsable de la unión al ADN, mientras que la región C-terminal contiene el dominio MH2, el cual media las interacciones con otras proteínas (213). La región de enlace es más variable y es una región fundamental para la regulación de la señalización y para la localización subcelular, ya que puede interactuar con proteínas reguladoras y ser fosforilada por moléculas procedentes de otras vías de señalización (215-217).

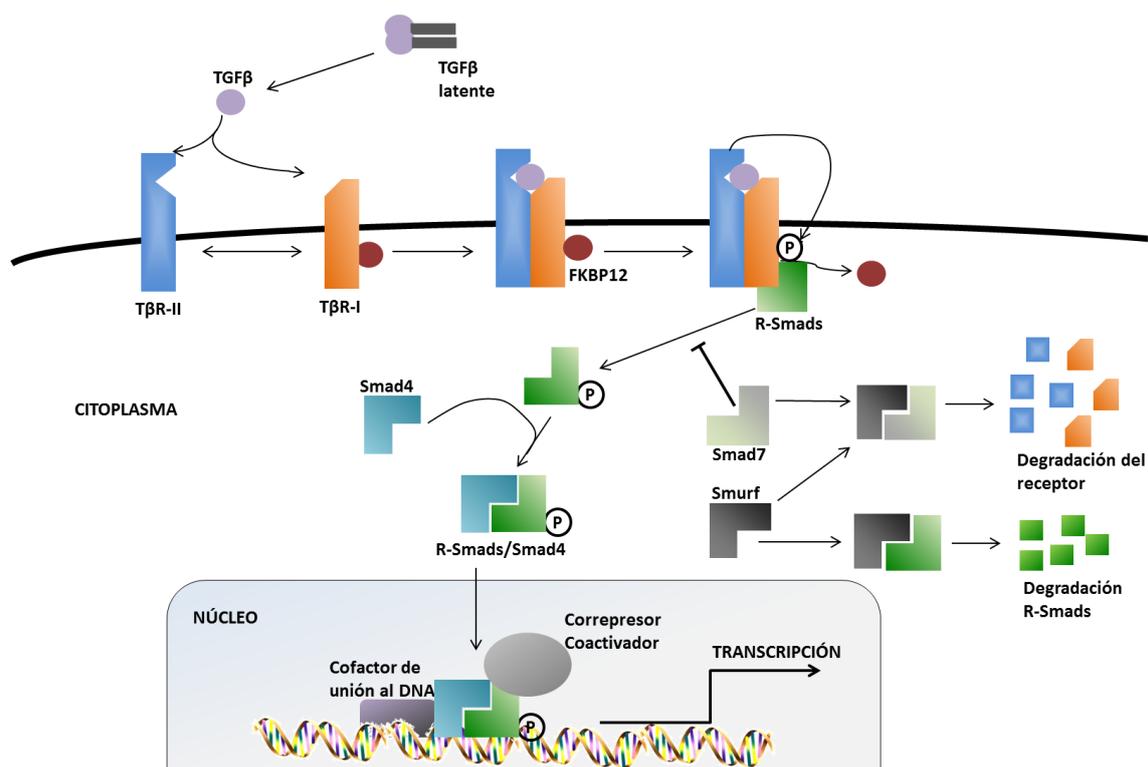


Figura 24. Vía canónica de señalización de TGF β . El TGF β activo se une a sus receptores de membrana (T β R-I y T β R-II) produciendo su dimerización y facilitando la fosforilación de T β R-I mediada por T β R-II. Esta fosforilación libera la proteína FKBP12 de su unión con T β R-I dejando el dominio GS disponible para la incorporación de las R-Smads (Smad2/3). A continuación, el T β R-I fosforila a las R-Smads en su región C-terminal produciendo su activación, la formación del complejo R-Smad/Smad4 y su acumulación en el núcleo. Finalmente, el complejo R-Smad/Smad4 regula la transcripción de diversos genes. La señalización del TGF β puede ser inhibida por Smad7, bien compitiendo con las R-Smads por su unión al receptor, o bien uniéndose a Smurf y produciendo la degradación del receptor. Smurf también se une a las R-Smads e induce su degradación proteosomal.

Por otra parte, la vía TGF β -Smads puede regularse negativamente a varios niveles. En primer lugar, Smad7, que forma parte del grupo de proteínas inhibitorias I-Smads, regula la señalización a través de dos mecanismos distintos. Por una parte, se puede unir a los receptores activados de TGF β compitiendo con las R-Smads (218) y, por otra, promueve la ubiquitinación y posterior degradación del complejo del receptor de TGF β mediante la asociación con la ubiquitin ligasa Smurf2 (figura 24) (219). Otro mecanismo de regulación negativa es el mediado por las ubiquitin ligasas Smurfs (figura 24); estas proteínas interactúan con las R-Smads a través de un dominio específico en la región de enlace denominado motivo PY (PPXY), induciendo su ubiquitinación y posterior degradación proteosomal (220). En el caso particular de Smad4, ésta no contiene el motivo PY por lo que no es una diana directa de las Smurfs y, sin embargo, sí puede ser degradada indirectamente a través de su unión a las R-Smads (221).

Por otra parte, la actividad de las R-Smads también se puede regular por fosforilaciones distintas de la del dominio C-terminal mediada por el receptor. En este sentido, la región de enlace contiene múltiples residuos de serina y treonina susceptibles de fosforilarse por otras quinasas. Así, se ha observado que ERK1/2 puede fosforilar algunos residuos de Smad1, 2 y 3, disminuyendo la cantidad de estas proteínas en el núcleo y, por tanto, reduciendo su actividad transcripcional (216). De igual manera, la actividad de Smad2 puede reducirse a través de fosforilaciones producidas por CaMKII (*Calcium-calmodulin-dependent protein kinase-II*) y la de Smad3 por las quinasas dependientes de ciclina CDK2 y CDK4 (222, 223).

A todos estos efectos debe sumarse que las distintas combinaciones de Smad cooperan con distintas vías de señalización. Por ejemplo, TGF β inhibe la expresión de las proteínas Id a través de la asociación de Smad3/Smad4 con el factor de transcripción ATF3, el cual se induce por JNK y p38 (224). Por otra parte, AKT interactúa con Smad3 impidiendo su activación e inhibiendo su actividad transcripcional (225). Asimismo, altos niveles de AKT activo inhiben la interacción de los factores FoxO con los complejos Smad impidiendo la transcripción de los inhibidores del ciclo celular p15 y p21 (226). Otro ejemplo es la cooperación que se da entre Wnt y TGF β , por la cual Smad4 aumenta los niveles nucleares de β -catenina y de los factores de transcripción TCF/LEF en respuesta a Wnt (227). Por último, la señalización de TGF β se puede contrarrestar por otras vías de señalización como JAK/STAT y NF- κ B, las cuales aumentan la expresión de Smad7 en respuesta a interferón- γ y TNF α respectivamente (228, 229).

1.2. Vías independientes de Smads

Por otra parte, la variedad de respuestas mediadas por TGF β es aún más compleja si incluimos las vías de señalización que pueden activarse a través de esta citoquina sin necesidad de la activación de las proteínas Smads. En este sentido podemos describir varias vías independientes de la activación de Smads (figura 25):

Activación de la vía Ras-RAF-MEK-ERK

El reclutamiento y la activación de tirosinas quinasas, a través de las fosforilaciones en los receptores de TGF β , es uno de los mecanismos para activar la señalización inducida por TGF β independiente de Smads. Aunque los receptores tipo I y tipo II de TGF β sean serina/treonina quinasas, también pueden fosforilarse en residuos de tirosinas. Así, el receptor T β R-II puede fosforilarse por Src en la Y284 (230), creando un sitio de unión para las proteínas adaptadoras Grb2 o Shc, las cuales conectan con la vía Ras-RAF-MEK-ERK a través de SOS. Asimismo, el T β R-I puede ser fosforilado tras la estimulación con TGF β y fosforilar a ShcA, promoviendo la formación de los complejos ShcA-Grb2-SOS y activando la vía Ras-RAF-MEK-ERK (231) (figura 25). Estos resultados se han confirmado en células epiteliales, de carcinoma de mama y en fibroblastos, donde se ha observado una rápida activación de ERK en respuesta a TGF β (232-234). En este sentido, se ha observado que la activación de ERK es importante para la inducción de la EMT, una de las funciones biológicas más importantes de TGF β . De hecho, tanto dominantes negativos de ShcA como el silenciamiento de Grb2, bloquean por completo la migración y la invasión inducida por TGF β en células de cáncer de mama (235, 236), poniendo de manifiesto la importancia de la vía Ras-RAF-MEK-ERK en la progresión tumoral mediada por TGF β .

Activación de JNK y p38

Probablemente las vías independientes de Smads mejor caracterizadas son las de las MAPKs JNK y p38 (figura 25). TGF β activa JNK y p38 a través de la activación de MKK4 y MKK3/6 respectivamente por un mecanismo independiente de Smads (237, 238). Esto se ha demostrado porque la inactivación de Smad3 y 4 o la expresión de un mutante del T β R-I que carece del sitio de unión a R-Smads, siguen mostrando la activación de JNK y p38 (239, 240). Asimismo, la activación de MKK4 y MKK3/6 por TGF β se produce a través de la quinasa activada por TGF β TAK1, la cual a su vez es activada por la interacción de la proteína adaptadora TRAF6 con los receptores T β R-I y T β R-II. Los efectos más importantes de la vía TRAF6-TAK1-JNK/p38 son la inducción de la apoptosis, la reorganización del citoesqueleto y el aumento de la EMT mediados por TGF β (226).

Activación de las GTPasas Rho

También se ha demostrado que TGF β regula la reorganización del citoesqueleto y la motilidad celular a través de la activación de Rho, Rac y Cdc42. La mayoría de los estudios se han centrado en la activación de RhoA (241) (figura 25) y tanto su regulación como su implicación en la EMT se describen más adelante. Respecto a Cdc42, se ha observado que TGF β la activa y que ésta activa su proteína efectora PAK2 en ausencia de actividad de Smads (242).

Activación de la vía PI3K-AKT

TGF β también participa en la vía de PI3K a través de varios mecanismos. Por una parte, T β R-II interacciona con la subunidad reguladora de PI3K p85. Asimismo, se ha observado que la actividad quinasa de los receptores T β R-I y T β R-II es necesaria para la activación de PI3K por

TGF β (243, 244). Además, TGF β aumenta la fosforilación de la vía dependiente de PI3K AKT-mTOR- p70S6K (figura 25) (244, 245).

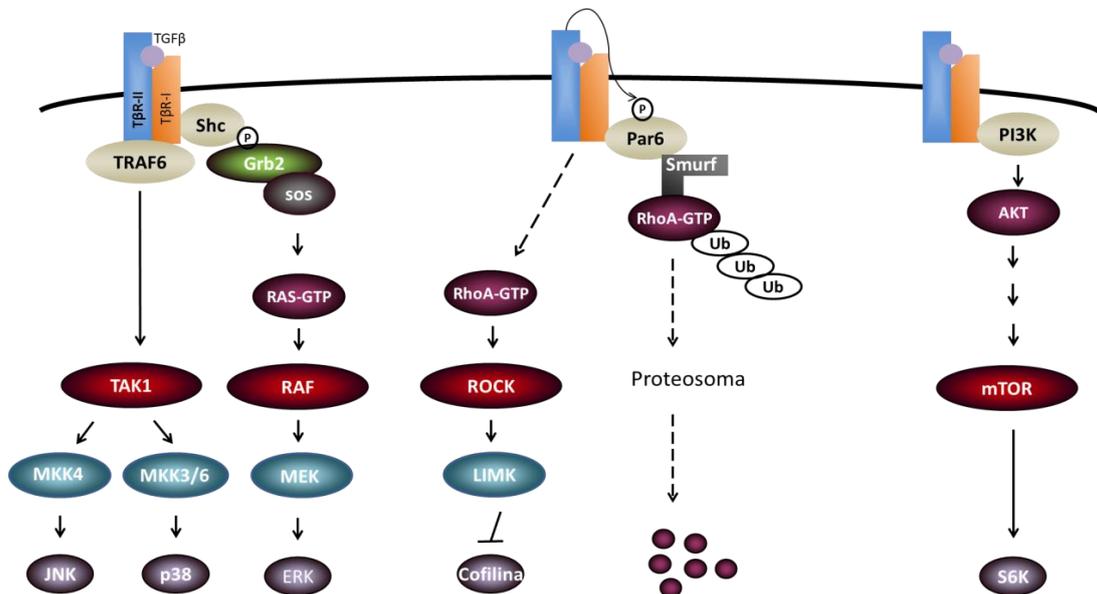


Figura 25. Vías de señalización activadas por TGF β independientes de Smads. TGF β activa las MAPKs JNK, p38 a través de TRAF6-TAK1. Además, también activa ERK a través de la interacción entre T β R-I y Shc. La regulación de RhoA puede darse a través de la inducción de su actividad o de su degradación en las uniones adherentes. TGF β también estimula la vía de PI3K dando lugar a la activación de AKT-mTOR-S6K. Adaptado de Xu et al., 2009 (71)

2. PAPEL DE TGF β EN CÁNCER

El papel de TGF β en cáncer ha sido motivo de debate y de controversia en numerosos estudios. El término del que deriva, factor de crecimiento transformante, fue establecido en 1985 por la capacidad de este tipo de péptidos de transformar fibroblastos normales en células con un fenotipo y un comportamiento maligno (246). Sin embargo, esta supuesta función tumorigénica no era compatible con la expresión ubicua de TGF β en tejidos normales y años después se descubría que TGF β también inhibe el crecimiento celular en muchos tipos celulares, incluyendo células epiteliales y linfáticas, de las cuales derivan la mayoría de los cánceres humanos. Además, otras evidencias apoyaban que moléculas efectoras de TGF β también participan en la inhibición de la proliferación en las primeras etapas del cáncer. Por ejemplo, los receptores de TGF β , T β R-I y T β R-II, y Smad4 se encuentran inactivos en varios tipos de tumores (247) y Smad2 y Smad4 se encuentran comúnmente mutados en carcinomas de páncreas y colon, dando lugar a la inactivación de la vía canónica de TGF β . Por tanto, todos estos datos indicaban que TGF β actúa como un supresor tumoral (248).

Sin embargo, hoy en día numerosos estudios demuestran que TGF β también promueve el desarrollo tumoral en estadios avanzados del cáncer y tiene un papel fundamental en la metástasis. De acuerdo con esto, el aumento de expresión de TGF β se relaciona con el

desarrollo tumoral en varios tipos de carcinomas y con la formación de metástasis linfáticas (247, 249-252).

Por último, también se ha observado que dependiendo del origen tumoral hay diferentes alteraciones genéticas que conllevan a la supresión de la vía de TGF β o, por el contrario, a un aumento de la expresión de TGF β asociada a un incremento de marcadores de progresión tumoral.

Por todo esto, se ha propuesto que TGF β posee un papel dual en cáncer que depende tanto del estadio y el contexto tumoral como del tipo celular.

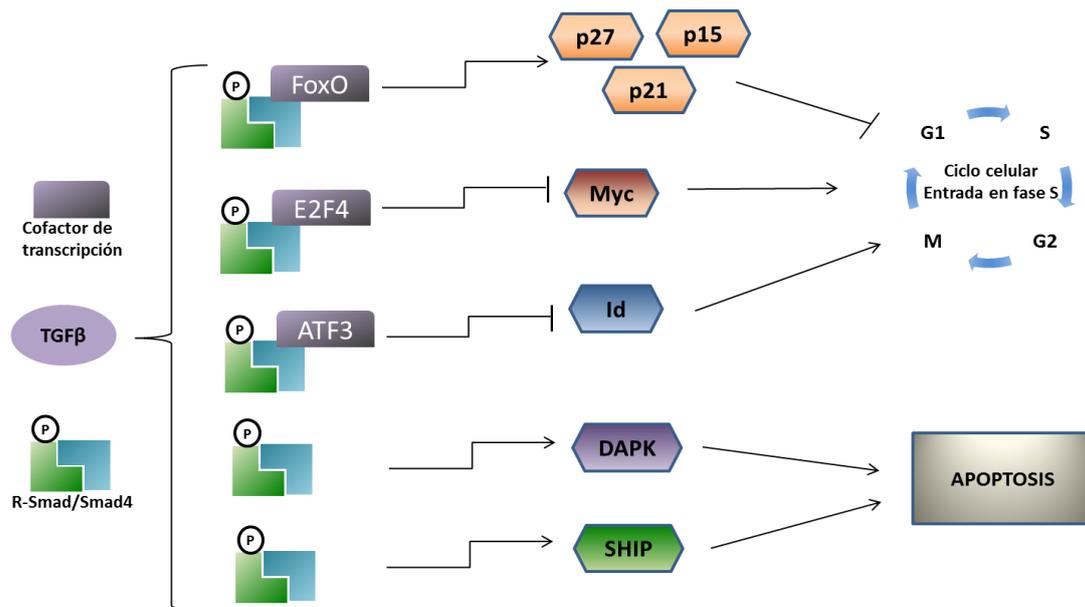


Figura 26. Efectos de TGF β sobre la proliferación y supervivencia. TGF β produce parada del ciclo celular y apoptosis a través de las proteínas Smads. Los cofactores transcripcionales que se unen al complejo R-Smads/Smad4 determinan tanto la selectividad del gen como el efecto represor o activador.

2.1. Papel de TGF β como supresor tumoral

En estadios tempranos del desarrollo tumoral, el TGF β ha demostrado ser un potente supresor tumoral a través de sus efectos antiproliferativos y proapoptóticos.

Los efectos antiproliferativos del TGF β se han observado en varios tipos de tumores, por ejemplo, la pérdida de T β R-II favorece la transformación a carcinoma de pólipos intestinales inducidos por inactivación del supresor tumoral APC (*Adenomatous polyposis coli*) (253), así como la aparición de lesiones pancreáticas iniciadas por K-Ras (254). Asimismo, la expresión de T β R-I en células de mama transformadas retrasa la formación del tumor (255).

Los efectos antiproliferativos de TGF β dependen en gran parte de la parada del ciclo celular en la fase G1. TGF β induce la expresión de inhibidores de CDKs como p21, p15 y p27 (256-258), e inhibe la de c-Myc, factor de transcripción que promueve la proliferación y la de las proteínas Id1, 2 y 3, las cuales previenen la diferenciación (figura 26) (224). TGF β regula la expresión de todos estos genes a través de su vía canónica dependiente de Smads, ya que en el caso de los inhibidores de CDKs, se ha observado que las Smads se asocian con el factor de transcripción

FoxO para reprimir su expresión (259). Respecto a c-Myc y las proteínas Id, las Smads se unen a los factores E2F4 y ATF3 respectivamente, inhibiendo su expresión (260).

Por otra parte, TGF β se ha relacionado con la regulación de la apoptosis. Así, se ha observado que TGF β puede suprimir o inducir la apoptosis. En cuanto a la inducción de la apoptosis, un ejemplo es la sobreexpresión de la proteína quinasa asociada a muerte, DAPK (*Death Associated Protein Kinase*), observada en células de hepatocarcinoma estimuladas con TGF β (figura 26) (261). Por otra parte, Smad regula la expresión de la fosfatasa SHIP, la cual inhibe las señales de supervivencia mediadas por AKT (figura 26) (262). Además, las proteínas ARTS (*Apoptosis Related protein in the TGF β Signalling pathway*) y la proteína adaptadora DAXX también están implicadas en las señales apoptóticas de TGF β , así como cambios en la expresión, localización, y activación de las proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl2 y de las caspasas (263).

2.2. Papel de TGF β en la progresión tumoral

En general, en fases avanzadas del cáncer el papel de TGF β como supresor tumoral desaparece y predominan sus efectos inductores de la progresión tumoral. Este efecto inductor de tumores se ha demostrado utilizando dominantes negativos de T β R-II o anticuerpos neutralizantes de TGF β , observándose una disminución de la latencia del tumor primario, la inhibición de la capacidad invasiva de líneas células tumorales *in vitro* y su capacidad metastática *in vivo* (255, 264, 265). Además, la sobreexpresión de TGF β o T β RI activado inhiben la formación de tumores benignos pero aumentan capacidad metastática de células tumorales de alto grado (210). Por otra parte, también se ha visto que las células tumorales secretan más TGF β que células normales. Así, tumores mamarios, hepatocarcinomas, carcinomas de pulmón y próstata sobreproducen TGF β y este aumento se correlaciona con un aumento del grado de malignidad, invasividad y potencial metastático (266).

Las principales funciones por las que TGF β favorece la progresión tumoral son a través de su papel en la evasión de la respuesta inmune, la angiogénesis y la EMT (210).

En cuanto a su papel en la respuesta inmune, se conoce que TGF β es el inmunosupresor fisiológico más potente en mamíferos. En este sentido, se ha observado que en muchos tumores se produce un aumento de la secreción de TGF β que permite al tumor la utilización de esta citoquina para alterar el microambiente y regular la respuesta inmune (210, 267). De este modo, TGF β puede actuar inhibiendo la expresión de factores citotóxicos liberados por linfocitos T en respuesta a una señal antigénica (268).

Por otra parte, estudios en modelos animales han implicado a TGF β en el proceso de la angiogénesis (269-271) Así, TGF β induce la expresión de los factores proangiogénicos VEGF y CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) a través de las proteínas Smads (272, 273). Además, TGF β regula la expresión, secreción y actividad de MMP-2 y MMP-9 y reduce la expresión del inhibidor de proteasas TIMP (274), todos ellos mecanismo que conllevan el aumento de la migración de células endoteliales requerido para la formación de nuevos vasos.

Por último, una de las funciones más importantes de TGF β en la progresión tumoral es la inducción de la EMT, favoreciendo la migración y la invasión de las células tumorales.

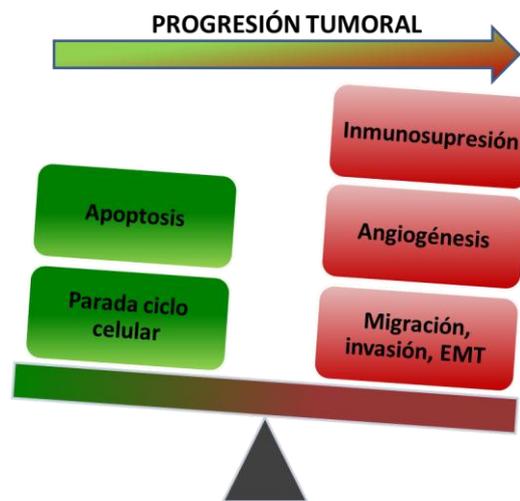


Figura 27. Efectos de TGFβ sobre la progresión tumoral. TGFβ posee un papel dual. En estadios tempranos inhibe la proliferación induciendo apoptosis y parada del ciclo celular. A medida que el tumor progresa los efectos antiproliferativos se pierden y TGFβ induce el desarrollo tumoral a través de la inmunosupresión, angiogénesis y favoreciendo la migración, la invasión y la EMT.

2.3 Papel de TGFβ en la EMT

El efecto inductor de TGFβ sobre la EMT se observó por primera vez en cultivos celulares tratados con TGFβ, donde las células epiteliales cambiaban de una forma cuboidal a una más alargada. Además, estos cambios morfológicos van asociados a una disminución de la expresión de marcadores epiteliales y un aumento de la expresión de marcadores mesenquimales, acompañados de una mayor motilidad celular. Algunos mecanismos por los que TGFβ da lugar a una mayor invasión y capacidad metastática de las células tumorales son a través de la inhibición de la expresión de E-cadherina y al aumento de la expresión de genes mesenquimales como Snail, Vimentina o Fibronectina (75). Además, TGFβ también aumenta la expresión de integrinas asociadas a la invasión como $\alpha_3\beta_1$ y proteasas de la matriz extracelular (275, 276). Muchos de estos efectos son indicativos de la inducción de la EMT y, en este sentido, se ha demostrado que dominantes negativos de TβR-I o TβR-II revierten la EMT en células de cáncer de colon, de mama y en modelos *in vivo* de cáncer de piel y mama (277-279).

TGFβ puede inducir la EMT a través de mecanismos dependientes e independientes de Smads (figura 28). La participación de las Smad en la EMT se ha demostrado porque tanto la eliminación de Smad3/Smad4, como la sobreexpresión de Smad7, inhiben completamente este proceso (280). En este sentido, quizás el mecanismo más conocido por el que TGFβ induce la EMT sea el aumento de la expresión del factor de transcripción Snail a través de la interacción de Smads con el factor de transcripción HMGA2 (*High Mobility Group A2*) (281, 282). Además, TGFβ también regula la expresión de los factores ZEB y reprime la expresión de las proteínas Id, permitiendo la activación de los factores E12/E47 (283, 284). Todos estos efectos

convergen en la represión de E-cadherina, cuya regulación e implicación en la EMT se describió anteriormente.

Asimismo, TGF β también puede regular la EMT a través de la activación de ERK, de las GTPasas Rho y de PI3K, por un mecanismo independiente de la activación de Smads.

En cuanto a la relación entre la vía Ras-RAF-MEK-ERK y TGF β en la EMT y la tumorigénesis, varios estudios han relacionado el aumento de la actividad de esta vía con la EMT mediada por TGF β . En este sentido, la inhibición farmacológica de MEK, la inhibición de la expresión de H-Ras oncogénico o la expresión de un dominante negativo de RAF restauran los efectos antitumorales de TGF β (281, 285). Por otra parte, en células de carcinoma de páncreas la inducción de Snail1 por TGF β únicamente se produce en presencia del mutante ^{V12G}K-Ras (286) y se ha demostrado que en células de carcinoma de colon, que sobreexpresan K-Ras mutado, TGF β aumenta la agresividad de estas células (287). Además, estudios *in vivo* han demostrado que la sobreexpresión de Smad2 aumenta la metástasis en células con Ras activado (288). Otro hecho importante es que la vía de Ras induce un gran aumento de la secreción de TGF β y una acumulación de Smads en el núcleo en células de carcinoma, lo que aumenta la tumorigénesis y la metástasis (289, 290).

Por otra parte, como se ha comentado anteriormente, TGF β también activa RhoA (figura 25), regulando la polimerización de actina (71), la formación de fibras de estrés y la destrucción de las uniones adherentes, todos ellos procesos necesarios para llevar a cabo la migración celular característica de la EMT. La activación de Rho se produce por la unión de TGF β al T β R-II en las uniones adherentes (241); este receptor fosforila a Par6 permitiendo su interacción con Smurf1, lo que da lugar a la degradación de RhoA vía proteosomal (291). Así, se ha demostrado que la activación de Rho por TGF β es necesaria para la transformación eficiente de fibroblastos por ^{V12}Ras y ^{V600E}B-RAF (292).

Otras vías importantes como la de PI3K/AKT y la de Wnt también están implicadas en la EMT inducida por TGF β . En este sentido, inhibidores de PI3K y de AKT impiden la disminución de E-cadherina inducida por TGF β , así como la migración y la invasión celular (71). Respecto a la vía de Wnt, los mecanismos de cooperación entre esta vía y la de TGF β se han atribuido a la formación de complejos transcripcionales entre las Smads y los factores transcripcionales TCF/LEF, de forma que estos complejos se unen al promotor de E-cadherina, reprimiendo su expresión, y aumentando la expresión de los marcadores mesenquimales Vimentina y Fibronectina (293).

Finalmente, varios estudios han relacionado la EMT inducida por TGF β con la expresión y la actividad de FAK, Src e ILK. En el caso de FAK, se ha observado que TGF β aumenta las fosforilaciones de los residuos Y577, Y861 y Y925 en células hepáticas y que este aumento, es dependiente de la actividad de Src (294). Además, los marcadores mesenquimales inducidos por TGF β , Fibronectina y MMP-9, disminuyen en presencia de dominantes negativos de FAK y de un inhibidor de Src. Adicionalmente, FAK y Src influyen en la localización y degradación de E-cadherina mediada por TGF β (294).

Respecto a ILK, se ha observado que TGF β aumenta su expresión en células renales de una manera dependiente de Smads y que un dominante negativo de ILK sin actividad quinasa, bloquea la EMT inducida por TGF β (53). Por último, el incremento de Fibronectina producido en la EMT se ha asociado con un aumento de la secreción de TGF β dependiente de ILK, por lo que es posible que TGF β e ILK formen un ciclo de regulación positiva (295).

En cuanto al papel de TGF β en tiroides, se demostró la producción, la secreción de TGF β y la expresión de receptores específicos de TGF β , en células tiroideas normales y tumorales. Además, se ha demostrado que TGF β suprime la expresión de genes específicos de tiroides en tirocitos de rata, lo que conduce a una desdiferenciación de estas células, transformándolas en células con un fenotipo de características similares al de células tumorales tiroideas (296). En este sentido, también se ha demostrado, mediante ensayos de expresión génica con “microarrays”, una sobreexpresión de genes de la vía de TGF β en regiones invasivas de estos tumores respecto a regiones centrales del tumor primario (297), lo que indica que esta citoquina puede ser responsable de la EMT en este tipo de células.

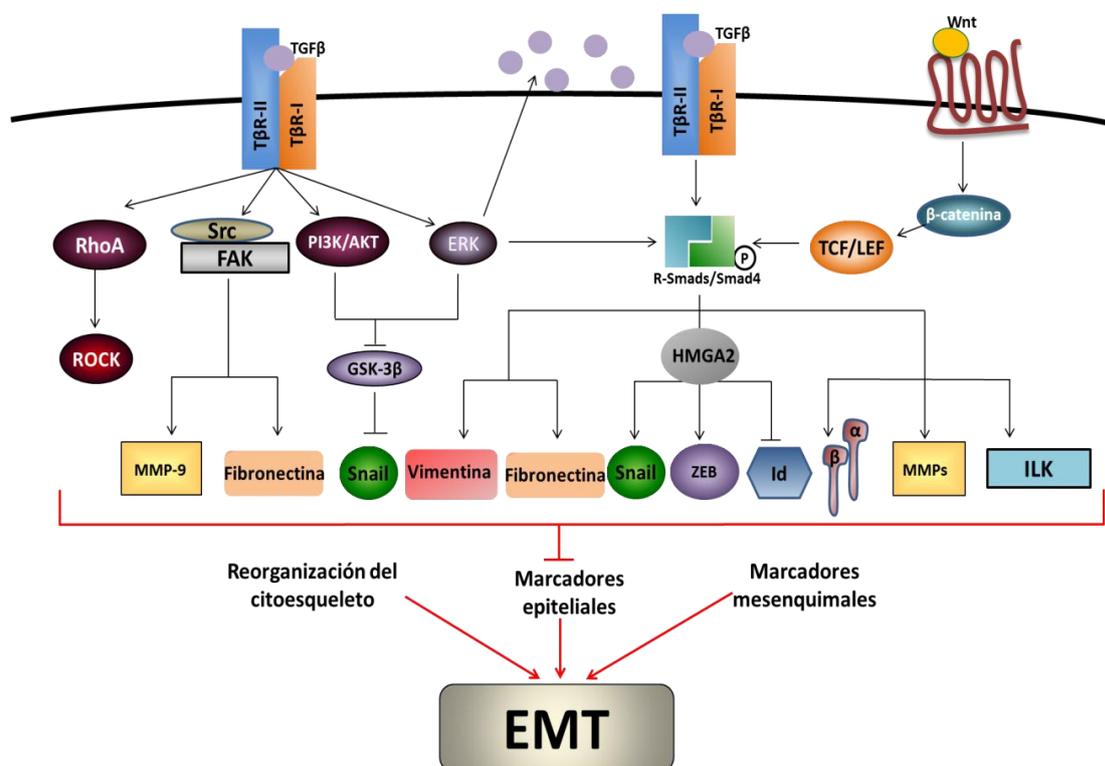


Figura 28. Mecanismos mediados por TGF β en la inducción de la EMT. TGF β puede inducir la EMT a través de múltiples mecanismos dependientes e independientes de Smads. Todos ellos dan lugar a una inhibición de marcadores epiteliales y a un aumento de marcadores mesenquimales, acompañados por un incremento de la migración celular y una mayor capacidad de invadir tejidos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cáncer de tiroides es la patología endocrina más frecuente en los países desarrollados. Estadíos tempranos de este tipo de cáncer responden muy bien a las terapias convencionales de radioterapia y ablación tiroidea. Sin embargo, un porcentaje de pacientes muere como consecuencia de la metástasis producida por la propagación tumoral a sitios distales. Por ello, es fundamental estudiar los mecanismos moleculares implicados en este proceso y descubrir nuevas dianas terapéuticas.

Nuestro grupo lleva años interesado en el papel del oncogén ^{V600E}B-RAF y la vía de MEK-ERK en los procesos implicados en el desarrollo tumoral, tales como la proliferación y la supervivencia celular. ^{V600E}B-RAF se expresa en numerosos tipos de cáncer y, particularmente, está presente en un porcentaje muy elevado de tumores tiroideos. En este tipo de tumores también se han encontrado otras alteraciones que, al igual que el mutante ^{V600E}B-RAF, conducen a una hiperactivación de la vía Ras-RAF-MEK-ERK. Sin embargo, los tumores tiroideos que poseen la mutación ^{V600E}B-RAF se han asociado con una mayor agresividad, recurrencia y un peor pronóstico que el resto, sugiriendo mecanismos alternativos a la activación de ERK por los que ^{V600E}B-RAF promueve la progresión tumoral y conduce a una mayor agresividad tumoral. En este sentido, se desconocen muchos de los mecanismos moleculares mediados por ^{V600E}B-RAF asociados a los procesos responsables de la progresión tumoral, tales como la migración y la invasión celular.

Por otra parte, el TGFβ es una citoquina multifuncional que también se ha asociado a la progresión tumoral y a una mayor capacidad de producir metástasis. Así, el TGFβ aumenta el fenotipo migratorio e invasivo de las células tumorales, mayoritariamente, a través de su capacidad de inducir el proceso de la transición epitelio-mesénquima (EMT).

Por todo esto, dada la importancia de descubrir nuevos sustratos y rutas de señalización reguladas por ^{V600E}B-RAF, junto con el hecho de que los efectos de TGFβ no se conozcan en detalle en células tumorales tiroideas hizo que, en este trabajo nos planteáramos los siguientes objetivos:

1. Determinar el papel de ^{V600E}B-RAF en los procesos de migración e invasión celular en células tumorales tiroideas.
2. Estudiar el papel de ^{V600E}B-RAF en la EMT y los mecanismos moleculares regulados por este oncogén.
3. Analizar el papel de TGFβ en la EMT, así como sus efectos sobre la migración y la invasión celular.
4. Estudiar la relación entre ^{V600E}B-RAF y TGFβ, e identificar nuevos mecanismos reguladores de la progresión tumoral asociados a estas dos proteínas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

Cultivos celulares

- Los medios de cultivo, el suero fetal bovino (FBS), el piruvato sódico, los antibióticos, el PBS y la solución de Tripsina-EDTA se obtuvieron de Gibco-Invitrogen.
- Los frascos y placas de cultivo de plástico estériles fueron de dos marcas comerciales: Nunc™ Brad Products y Falcon Becton Dickinson Labware.

Tratamientos celulares

En la Tabla 1 se especifican los diferentes compuestos usados en los tratamientos celulares en este estudio, así como la concentración final a la que se usaron, la casa comercial que los suministró y las dianas moleculares de los mismos.

Tabla 1. Compuestos utilizados

Compuesto	Concentración de uso	Casa comercial	Diana molecular
PLX4720	5 μ M	Axon Medchem	^{V600E} B-RAF
U0126	10 μ M	Promega	MEK
SB431542	10 μ M	SIGMA	ALK-4, -5, -7
SU6656	10 μ M	SIGMA	Src
TGF β	5ng/mL	R&D SYSTEMS	T β R-II

Transfecciones transitorias: siRNA y vectores de expresión

- Las transfecciones transitorias se realizaron utilizando *Lipofectamine™ Transfection Reagent* y medio Opti-MEM de Gibco-Invitrogen.
- Los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de ARN de interferencia (*siRNA*) para silenciar B-RAF, FAK (PTK2), ILK así como el control de transfección (*scrambled o sc*) fueron suministrados por Ambion (Applera Hispania).

Las secuencias utilizadas fueron:

- B-RAF: 5'-CAGUCUACAAGGGAAAGUGtt-3' y su complementaria.
- Snail1: 5-GAAUGUCCUGCUCCACAAtt-3' y su complementaria.
- FAK (PTK2): 5'-GGGAGAAGUAUGAGCUUGCtt-3' y su complementaria.
- ILK: 5'-GGGCAAUGACAUUGUCGUGtt-3' y su complementaria.
- Control de la transfección, sc (*scrambled*): se utilizó un oligo con la secuencia de B-RAF desordenada y su complementaria.

- El oligonucleótido utilizado para el silenciamiento de Snail1 (Silencer® Select Pre-Designed & Validated siRNA) fue adquirido de Invitrogen.
- El plásmido pcDNA3-Snail que contienen la secuencia correspondiente al gen de Snail1 fue generosamente cedido por la Dra. Amparo Cano (Instituto de Investigaciones Biomédicas IIB, CSIC-UAM, Madrid).

Transfecciones estables. Transducción con lentivirus

- Para las transfecciones estables se utilizaron los vectores pGL12, pMD2.G y psPAX2, cedidos amablemente por la Dra. Benilde Jiménez (IIB, CSIC-UAM, Madrid).
- El vector genómico lentiviral FG12V contiene una región de clonaje, la secuencia del gen de la proteína fluorescente verde (GFP) y un gen de resistencia a *Zeocina*.
- El vector pMD2.G contiene los genes de la envuelta del virus.
- El vector psPAX2 contiene los genes virales de empaquetamiento.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Casa comercial	Concentración	Peso Molecular (kDa)	Especie
B-RAF	Santa Cruz	1:500	89	Ratón
β -tubulina	SIGMA	1:5000	55	Ratón
p-ERK	SIGMA	1:2500	44/42	Ratón
ERK-2	Santa Cruz	1:1000	44/42	Ratón
HA	SIGMA	1:500	Proteína interés	Ratón
Snail1	Cell Signalling	1:500	29	Conejo
E-cadherina	BD Transduction	1:2500	120	Ratón
p-Smad2	Cell Signalling	1:500	52,6	Conejo
Smad2/3	BD Transduction	1:1000	58	Ratón
Vimentina	Santa Cruz	1:500	57	Ratón
Fibronectina	Santa Cruz	1:1000	220	Conejo
ILK	Cell Signalling	1:500	51	Conejo
p-FAK(Y397; Y576;Y577; Y861; Y407)	Biosource	1:1000	125	Conejo
FAK	BD Transduction	1:1000	125	Ratón
Src	Cell Signalling	1:1000	60	Conejo

Preparación de extractos celulares y determinación de proteínas

- Los inhibidores de proteasas y fosfatasa benzamidina, pepstatina, leupeptina, aprotinina, PMSF, NaF, Na₃VO₄ así como la albúmina sérica bovina (BSA) se obtuvieron de SIGMA.
- El reactivo de Bradford *Protein Assay* se adquirió de BIO-RAD.

Inmunodetección de proteínas: *western blot*

- La solución de acrilamida al 40% para realizar los geles de electroforesis se obtuvo de los laboratorios Condalab, con la proporción 29:1 Acrilamida: Bisacrilamida.
- Los marcadores de peso molecular y el resto de reactivos y materiales necesarios para la electroforesis de proteínas se adquirieron de BIO-RAD.
- Las membranas de PVDF, el sistema *ECL* y las películas fotográficas *Hyperfilm* fueron proporcionadas por GE Healthcare.
- La detección de las proteínas se realizó mediante el uso de los anticuerpos primarios específicos que se detallan en la tabla 2 y los anticuerpos secundarios anti-ratón (SIGMA) y anti-conejo (Dako Citomation) conjugados con peroxidasa (HRP, *Horseradish Peroxidase*), a una concentración 1:10000 y 1:5000 respectivamente.
- Para los ensayos de inmunoprecipitación se utilizó Proteína G-Sefarosa de SIGMA.

Secuenciación

- La reacción de amplificación se llevó a cabo mediante el kit *Inmolase DNA Polymerase* de Bioline.
- Los cebadores específicos fueron obtenidos comercialmente de Invitrogen y su secuencia se detalla en la tabla 3.

Tabla 3. Cebadores utilizados en secuenciación

Gen de Interés	Cebador izquierdo	Cebador derecho
B-RAF	5'-AAC ACA TTT CAA GCC CCA AA- 3'	5'-AGC ATC TCA GGG CCA AAA AT-3'

- La purificación del ADN se realizó con el kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* de GE Healthcare.
- La reacción de secuenciación se realizó con el kit de Applied Biosystems *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*.
- El secuenciador utilizado fue el *3130 Genetic Analyzer* de Applied Biosystems.

Extracción de ARN y retrotranscripción

- La extracción y aislamiento del ARN total se realizó con el reactivo comercial *Trizol Reagent* de Gibco-Invitrogen.
- La reacción de retrotranscripción se desarrolló con el kit de Invitrogen *RT-PCR system*.

PCR a tiempo real

- Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en la mezcla optimizada *Fast Start Taqman Probe Master* de Roche, que contiene Taq-polimerasa, dNTPs y MgCl₂.
- Las sondas de hidrólisis comerciales fueron sondas *taqman* de la *Universal ProbeLibrary Set, Human* de Roche.
- Los cebadores específicos fueron obtenidos comercialmente de Invitrogen. Las secuencias específicas de cada sonda y de los cebadores utilizados para cada gen se detallan en la tabla 4.
- El termociclador utilizado fue *7500 Fast Real Time PCR System* de Applied Biosystem.

Tabla 4. Sondas de hibridación y cebadores utilizados

Gen de Interés	Sonda Taqman	Cebador izquierdo	Cebador derecho
GAPDH	5'-CTG GGG CT-3'	5'-TCC ACT GGC GTC TTC ACC-3'	5'-GGC AGA GAT GAT GAC CCT TTT-3'
E-cadherina	5'-CCA GGA GG-3'	5'- GAA TGA CAA CAA GCC CGA AT-3'	5'-GAC CTC CAT CAC AGA GGT TCC-3'
ILK	5'-GCA GCC AG-3'	5'-TAA TGA ACC GTG GGG GAT GA-3'	5'-TGC CTT GTA CTG CAA TAG CTT C-3'
Snail	5'-CTT CCA GC-3'	5'-GCT GCA GGA CTC TAA TCC AGA-3'	5'-ATC TCC GGA GGT GGG ATG-3'

Detección de TGFβ mediante inmunoensayo

- Para la determinación de la cantidad de TGFβ1 en el medio de cultivo se utilizó el kit *TGF-β1 Emax ImmunoAssay System* de Promega.

Ensayos de Migración e Invasión

- El Colágeno I se obtuvo de SIGMA.
- Las cámaras transwells utilizadas *Corning HTS Transwell-24 well permeable support, pore size 8 μm, polycarbonate membrane* se adquirieron de SIGMA.
- Los pocillos con matriz extracelular adherida a su superficie *Matrigel Invasión Chambers, 8μm* se obtuvieron de Becton Dickinson and Company (BD).

Ensayo de viabilidad celular

- El reactivo *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-(2,5-diphenyltetrazolium) bromide* ó MTT y el dimetil sulfóxido (DMSO) se obtuvieron de SIGMA y de PANREAC respectivamente.

Análisis del contenido celular de ADN por marcaje con yoduro de propidio

- El yoduro de propidio y la ribonucleasa A se obtuvieron de SIGMA.

El resto de los reactivos y productos utilizados (sales, solventes orgánicos, bases y ácidos inorgánicos, detergentes, etc.) fueron de la máxima pureza disponible y se obtuvieron de distintas casas comerciales (Merck, SIGMA, Roche, Panreac, Bio-Rad).

2. MÉTODOS

2.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo.

Para la realización de este trabajo se utilizaron tres líneas celulares de cáncer de tiroides, todas ellas derivadas de células foliculares. A continuación se describen las características de dichas líneas celulares.

- **WRO:** Línea de Carcinoma Folicular Tiroideo que contiene la proteína B-RAF silvestre (^{WT} B-RAF). Fue cedida por el Dr. Alfredo Fusco (*Università degli Studi di Napoli "Federico II"*, Napoles, Italia).
- **8505C:** Línea de Carcinoma Anaplásico Tiroideo que contiene la forma oncogénica de la proteína B-RAF, ^{V600E}B-RAF. Fue cedida por el Dr. Máximo Santoro (*Università degli Studi di Napoli "Federico II"*, Napoles, Italia).
- **BHT101:** Línea de Carcinoma Anaplásico Tiroideo que contiene la forma oncogénica de la proteína B-RAF, ^{V600E}B-RAF. Fue cedida por el Dr. Máximo Santoro (*Università degli Studi di Napoli "Federico II"*, Napoles, Italia).

Las tres líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1 mM piruvato sódico y 1% de antibióticos (Penicilina, Estreptomocina, Fungizona). Los cultivos se mantuvieron en frascos de 75 cm² a 37 °C, con atmósfera húmeda y 5% de CO₂, en un incubador *Forma Scientific*.

La división de los cultivos se realizó cada 3 ó 4 días. Tras alcanzar la confluencia, las células se lavaron con PBS y se despegaron de la superficie de los frascos de mantenimiento mediante la incubación a 37 °C con una solución de tripsina-EDTA (0,5 g/L de tripsina y 0,2 g/L de EDTA en PBS) durante aproximadamente 5min, dependiendo de la línea celular. La tripsina existente en la suspensión celular se neutralizó con medio completo (10% FBS). Las células se contaron utilizando un hemocitómetro y un microscopio de contraste de fases *Leica DMIL*. Para su mantenimiento, las células se sembraron en nuevos frascos de cultivo a una densidad aproximada entre 700 y 1200 células/cm², según la línea celular. Para los distintos experimentos las células se sembraron en placas de 6, 12, o 24 pocillos o en placas p100, aproximadamente 16 horas antes de comenzar el tratamiento correspondiente. La densidad celular y el tiempo de cada tratamiento dependieron del experimento que se realizó, por lo que se especifican posteriormente en cada tipo de ensayo.

2.2. Transfecciones transitorias: siRNA y vectores de expresión.

Como norma general en todas las transfecciones transitorias, el día anterior a la transfección se sembraron 250.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos con un volumen final de 2mL por pocillo.

Transfección de ARN pequeños de interferencia (siRNA).

Las células se transfectaron con ARN de doble cadena (siRNA) específico para cada proteína. Para ello, se diluyeron 100 pmoles de siRNA en medio Opti-MEM hasta un volumen final de 100 μ L y en otro tubo 4 μ L de Lipofectamina se llevaron hasta un volumen de 100 μ L en el mismo medio. A continuación se mezclaron ambas soluciones y se incubaron 20min a temperatura ambiente. Durante este tiempo las células se lavaron 2 veces con PBS y las células se mantuvieron en por 800 μ L de Opti-MEM. Posteriormente, se añadieron a este medio los 200 μ L de la mezcla de siRNA y Lipofectamina. En el caso de las células WRO y 8505C, éstas se incubaron durante 6 horas y posteriormente se retiró el medio de la transfección, se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron en medio de cultivo durante 72h. En el caso de las células BHT101, transcurridas las 6h de incubación se suplementaron con 1mL de medio al 10% FBS y al día siguiente se procedió de igual manera que con las otras líneas celulares. Transcurridas 72 h desde la transfección se realizaron los análisis correspondientes a cada experimento. Como control de la eficacia de la transfección, en cada experimento, se analizaron los niveles de expresión de la proteína diana.

Transfección de vectores de expresión.

Mediante esta técnica se sobreexpresó en las células la proteína exógena Snail1. Se transfectó 1 μ g de pcDNA de Snail1, mientras que en los controles se transfectaron 1 μ g de plásmido vacío (Plink). Para ello, se preparó la mezcla de ADN plasmídico en 16 μ L de Opti-MEM. Por otra parte, 4 μ L de Lipofectamina se diluyeron en 16 μ L de Opti-MEM. Ambas soluciones se mezclaron y se incubaron 20 min a temperatura ambiente. Durante ese tiempo las células se lavaron 2 veces con PBS y se mantuvieron en 800 μ L de Opti-MEM. Transcurridos los 20 min de incubación se añadieron 168 μ L de Opti-MEM a la mezcla y los 200 μ L totales se adicionaron a las células, las cuales se incubaron durante 6h a 37°C. Pasado ese periodo de tiempo se reemplazó el medio de transfección por el medio de cultivo habitual. El efecto de la sobreexpresión se analizó a las 48 o 72h post-transfección dependiendo del experimento.

2.3. Transfecciones estables. Transducción con lentivirus

Producción y purificación de vectores lentivirales que expresen ^{V600E}B-RAF

Para la producción de lentivirus, se obtuvieron los vectores necesarios de la compañía Addgene. Una vez purificados de bacterias se procedió, usando los procedimientos estándar

de clonaje, a la introducción de el gen que codifica para ^{V600E}B-RAF unido al epítipo HA en el vector genómico viral pFG12.

Transfecciones para la producción de virus en células 293T

La línea celular 293T se transfectó utilizando fosfato cálcico. Para la transfección se sembraron 7×10^6 células 293T, en placas de p100, 24 horas antes de la transfección. Previamente a la transfección el medio de cultivo se sustituyó por medio completo DMEM sin antibióticos y suplementados con 10% de FBS y se procedió a realizar la transfección. Para ello, se preparó una mezcla de los plásmidos pMD2.G, psPAX2 y pFG12. A continuación, se procedió a realizar la transfección añadiendo al medio de cultivo los precipitados de fosfato cálcico-ADN formados por la mezcla de agua, CaCl_2 2M, ADN y HBS (NaCl 1.6% (p/v), Hepes 1.2%(p/v) y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.026% (p/v)) en un volumen final 2,5 ml. El tiempo de incubación de las células con los precipitados fue 16 horas. Posteriormente se sustituyó este medio por medio completo normal. El tercer y cuarto día se procedió a la recolecta del sobrenadante donde se encuentran los virus formados y se sustituyó por medio completo fresco. Finalmente se procedió a la titulación de las partículas virales.

Transducción de células WRO

Las células WRO se infectaron con lentivirus control (FG12 Mock) o con lentivirus que contenían el gen que codifica para ^{V600E}B-RAF (FG12-^{V600E}B-RAF o FG12 VE).

Las células WRO se sembraron en 8 frascos de $12,5\text{cm}^2$ a una confluencia de 11000 células/ cm^2 16 h antes de la infección. El día después se realizaron distintas diluciones de los lentivirus para conseguir distintas multiplicidades de infección (MOI), calculadas según el título de las suspensiones lentivirales. Posteriormente se retiró el medio de cultivo de las células y se realizaron diferentes infecciones con los lentivirus que expresaban o no ^{V600E}B-RAF. A las 8 h de la infección se cambió el medio de las células y se mantuvieron en DMEM 10% FBS con Zeocina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ incubándolas a 37°C y 5% CO_2 . Las células se seleccionaron con este antibiótico durante dos semanas antes de ser utilizadas.

- Título suspensión lentivirus FG12 Mock: $6,7 \times 10^6$ TU/mL
- Título suspensión lentivirus FG12-^{V600E}B-RAF: $6,7 \times 10^6$ TU/mL
- MOI utilizadas: Para FG12 Mock 60; 30; 20 y 10 y para FG12-^{V600E}B-RAF 15; 7,5 y 5.

2.4. Preparación de extractos celulares totales y determinación de la concentración de proteínas

Una vez terminados los tratamientos correspondientes, las células se lavaron 2 veces con PBS frío y se mantuvieron en hielo durante todo el proceso de extracción. Los extractos de proteínas procedentes de cada pocillo se prepararon mediante la adición de tampón de extracción y dilución en proporción 1:4. La composición de dichos tampones fue la siguiente:

- Tampón de extracción: 20 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 5% (v/v) de glicerol, 1,5 M KCl, 1% (v/v) Tritón X-100, 0,3% (v/v) β -mercaptoetanol, 5 mM NaF, 0,2 mM Na_3VO_4 , 50 μM fenil-

metil-sulfonil fluoruro (PMSF), 1 mM benzamidina, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml pepstatina A y 5 µg/ml aprotinina.

- Tampón de dilución: 20 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 10% (v/v) glicerol, 1% (v/v) Tritón X-100, 0,3% β-mercaptoetanol, 5 mM NaF, 0,2 mM Na₃VO₄, 50 µM PMSF, 1 mM benzamidina, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml pepstatina A y 5 µg/ml aprotinina.

Los experimentos se realizaron generalmente en placas de 6 pocillos a los que se añadieron 40 µl de tampón de extracción; posteriormente, se levantaron las células con la ayuda de un raspador de plástico y, a continuación, se añadieron 160 µl de tampón de dilución a dichos extractos celulares. Éstos, se incubaron 10 min en hielo y se centrifugaron a 16000 x g (Centrífuga 5415R Eppendorf) durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se pasó a otro tubo y se guardó a -80°C hasta su utilización.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford siguiendo el protocolo descrito por el proveedor y utilizando albúmina de suero bovino (BSA) para construir la curva patrón.

2.5. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas a membrana de PVDF (Western blot)

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de un 8%, 10 o 12%, dependiendo del tamaño de la proteína de interés, en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE), en presencia de tampón 25 mM Tris base pH 8.3, 190 mM glicina y 0,1% SDS. Las muestras para la electroforesis se prepararon añadiendo 1/4 parte del volumen total, de tampón de carga 4X (0,25 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0,5% β-mercaptoetanol, 20% glicerol y azul de bromofenol) e hirviéndolas 5 min a 96 °C. Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF mediante transferencia en húmedo durante 75 min a un amperaje constante de 400 mA. Se utilizó un tampón de transferencia que contenía 25 mM Tris base pH 8.3, 190 mM glicina, 0,01% SDS y 20% de metanol. Al finalizar la transferencia, la membrana se tiñó con el colorante Rojo Ponceau (0,5% Rojo Ponceau, 5% ácido acético) para comprobar que las proteínas se habían transferido correctamente.

2.6. Inmunodetección de proteínas

Después de la transferencia y con el objetivo de bloquear los sitios de unión inespecíficos, las membranas se incubaron con una solución bloqueo compuesta de TTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1% Tween 20) y 5% leche desnatada ó 5% de BSA (para la detección de proteínas fosforiladas) durante una hora a temperatura ambiente. La inmunodetección se llevó a cabo incubando la membrana durante dos horas a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente en solución de bloqueo. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min con TTBS y las membranas se incubaron una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario específico, conjugado con peroxidasa de rábano diluido en 1% de leche o BSA en TTBS. Por último, se realizaron 3 lavados de 10min con TTBS y las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema de ECL en películas fotográficas de alta resolución.

2.7. Rehibridación de las membranas

En el caso de tener que detectar otra proteína diferente en la misma membrana, se utilizó una solución ácida para eliminar los anticuerpos anteriores (2% SDS, 50 mM Glicina, pH 2.2) con la que se separaron los anticuerpos primarios y secundarios de la membrana correspondiente. La extracción de los anticuerpos (*stripping*) se llevó a cabo durante 15min a T^a ambiente y, a continuación, se realizaron 3 lavados de 10min con TTBS. La membrana se rehibridó con los nuevos anticuerpos específicos y se repitió el proceso del apartado 2.6.

2.8. Inmunoprecipitación (IP)

Para la realización de estos experimentos se sembraron 1×10^6 células en placas p100. Una vez adquirida la confluencia celular y tras los tratamientos oportunos se extrajo la proteína total mediante la adición de 300 μ L de tampón de lisis de inmunoprecipitación (IP) (50mM Tris base, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 50 μ M fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF), 1 mM benzamidina, 5 μ g/ml leupeptina, 5 μ g/ml pepstatina A y 5 μ g/ml aprotinina. pH 7,5). Posteriormente, se levantaron las células y se determinó la cantidad de proteínas como se expone en el apartado 2.4.

Previamente al comienzo de la IP se lavó la proteína G-Sefarosa (35 μ L por muestra) dos veces con tampón de lavado (este tampón se preparó igual que el Tampón de lisis IP con la excepción de que no se añadió Tritón X-100). Con el fin de evitar uniones inespecíficas, a continuación se añadió 1 mg de proteína total a 25 μ L de proteína G-Sefarosa y la mezcla se mantuvo en rotación durante 1h a 4^oC. Posteriormente el sobrenadante (muestra) se separó de la proteína G-Sefarosa mediante centrifugación a 1500 x g a 4^oC. A continuación la muestra se incubó con 3 μ g de anticuerpo específico en rotación durante toda la noche a 4^oC. Finalizado este periodo, se adicionó proteína G-Sefarosa (35 μ L por muestra), dejándo la mezcla nuevamente en rotación durante 2h a 4^oC. A continuación, la proteína G-sefarosa unida al complejo antígeno-anticuerpo se separó del sobrenadante mediante centrifugación a 1500 x g durante 1 min. El precipitado se lavó 3 veces con tampón de lavado y, finalmente, se añadió 35 μ L de tampón de carga 2x. Tras hervir la muestra durante 10min a 95^oC, ésta se cargó en un gel de poliacrilamida para proceder a la inmunodetección de proteínas.

2.9. Inmunofluorescencia

Otra de las técnicas utilizadas para la detección de proteínas, así como para determinar su localización subcelular fue la inmunofluorescencia. Para ello, se utilizaron anticuerpos específicos contra las proteínas de interés y anticuerpos secundarios conjugados con moléculas fluorescentes. Se sembraron 250.000 células en placas de 6 pocillos y tras los diferentes tratamientos las células se fijaron con para-formaldehido al 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo con PBS, se bloqueó con BSA al 1% durante 30min a 37^oC. Después, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario (1:100) en BSA 1% en PBS 4 h a temperatura ambiente. A continuación las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con un

anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Alexa-488 o Alexa-633 (1:2000) también diluido en BSA 1 durante 1 hora a 37°C. Las muestras se montaron en portaobjetos con líquido de montaje que contenía DAPI (4',6-Diamidino-2-fenil indol), para teñir también los núcleos celulares. Finalmente, las preparaciones se dejaron secar durante 2 h a temperatura ambiente en ausencia de luz, y se analizaron mediante un microscopio confocal *Leica TCS-SP5*.

2.10. Secuenciación

Mediante esta técnica se detectó la secuencia correspondiente a un fragmento del gen de B-RAF que incluye la mutación T1799A. Esta técnica se llevo a cabo en tres etapas: extracción de ADN, PCR, y purificación del ADN a partir del gel de agarosa.

Extracción de ADN

En primer lugar, el ADN se extrajo partiendo de un flask de 75 cm² de cada línea celular. Para ello, las células se resuspendieron en 5mL de un tampón compuesto por 50 mM Tris pH 8,8; 100 mM NaCl; 5mM EDTA y 1% SDS al que se añadió 0,1 mg/mL de proteinasa K y se incubaron toda la noche a 37°C. A continuación se añadió 1,5M NaCl y tras mezclarlo enérgicamente se centrifugó a 4.000 x g durante 15 min. El sobrenadante se mezcló en una proporción 1:1 con isopropanol y posteriormente se centrifugó a 4.000 x g durante 5 min. Posteriormente, el precipitado obtenido se resuspendió en 1mL de etanol al 70%, se centrifugó a 4.000 x g durante 5 min y el precipitado de ADN se lavó 3 veces con etanol al 70%. Finalmente, el ADN se resuspendió en 50 µL de tampón TE (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA), se midió la concentración y se llevó a una concentración final de 20 ng/µL.

PCR

Se amplificaron 20 ng de ADN junto con una mezcla de reacción que contenía Tampón de reacción 10x (200 µM dNTPs; 1,5 mM Cl₂Mg; 0,4 µM cebadores específicos (tabla 3) y 0,03 µg/µL Taq polimerasa). Esta mezcla de reacción se llevó hasta 25 µL con agua miliQ y se sometió a PCR con un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C durante 7min, seguido de 35 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales constó de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58 °C, y 30 segundos a 72°C.

Purificación del ADN

El producto de la amplificación se separó en un gel de agarosa al 1,5% a un voltaje constante de 120V. A continuación, el ADN se purificó del gel mediante el kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* de GE Healthcare según instrucciones del fabricante. Finalmente, se sometieron las muestras a la reacción de secuenciación y posteriormente, se analizaron las secuencias mediante el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

2.11. Extracción de ARN y retrotranscripción

Para el aislamiento del ARN total se utilizó el reactivo *Trizol* (Gibco) siguiendo el método descrito por el fabricante.

Una vez aislado y cuantificado el ARN se procedió a la retrotranscripción del mismo. La reacción se llevó a cabo en 20 μ L totales. Inicialmente se preparó una mezcla compuesta por cebadores específicos de unión a la cola poli-A del mRNA (2,5 μ M Oligo DT), desoxirribonucleótidos (1 mM dNTP) y el volumen de ARN correspondiente a 4 μ g del mismo. Esta mezcla se llevó a un volumen de 12 μ L con agua libre de RNAasas y fue sometida a calentamiento durante 5 min a 65°C con el fin de evitar la formación de estructuras secundarias en el ácido nucleico aislado. Durante este proceso se preparó la mezcla de reacción formada por 1 x tampón de síntesis (5mM DTT, 2 U/ μ l inhibidor de RNAasa, 0,75 U/ μ l enzima retrotranscriptasa y agua libre de RNAasas). Se añadieron 8 μ L de la mezcla de reacción y los 20 μ L totales se incubaron a 50°C durante 60 min. Terminada la reacción se añadió 0,1 U/ μ l RNasaH y se incubó 20 min a 37°C. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización.

2.12. PCR a tiempo real (Q-PCR)

El producto de la retrotranscripción fue sometido a amplificación mediante PCR a tiempo real. El volumen final de reacción fue 20 μ L, de los cuales 15 μ L fueron de mezcla de reacción (1x *Fast Start Taqman Probe Master*, 0,25 μ M Sonda Taqman, 1 μ M cebadores) y 5 μ L de cDNA.

La amplificación se realizó con un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 10min, seguido de 40 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales constó de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 62°C. Finalmente, se llevó a cabo una cuantificación relativa del producto de la amplificación del cDNA utilizando el método del $\Delta\Delta$ Ct.

2.13. Detección de la cantidad de TGF- β 1 mediante inmunoensayo

Mediante estos ensayos se determinó la concentración de TGF- β 1 activo en el medio. Para ello, se sembraron 250.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se incubaron hasta alcanzar una confluencia del 90%. Una vez hechos los tratamientos oportunos, el medio se cambió por 0,75 mL de DMEM sin suero y se incubaron durante 24h. El procedimiento para realizar estos experimentos fue el indicado por el fabricante.

2.14. Ensayos de migración “cierre de herida”

Este ensayo permite determinar y comparar la migración celular en distintas condiciones a través del cierre de una herida artificial efectuada sobre la superficie celular. Se sembraron 250.000 células en placas de 6 pocillos y se incubaron hasta que alcanzaron una confluencia del 85-90%. Posteriormente, se hizo la “herida” en la superficie celular con una punta de micropipeta de 200 μ L, se lavó 3 veces para retirar las células levantadas y se fotografiaron las células a tiempo 0. A continuación, las células se incubaron en medio libre de suero y, tras los tratamientos correspondientes, se tomaron fotografías de la “herida” a diferentes tiempos.

2.15. Ensayos de Migración en cámaras *transwells*

Las cámaras *transwell* constan de dos compartimentos: uno superior (inserto), cuya base es una membrana de policarbonato con poros de 8 μm que se recubrió con colágeno tipo I (CGI) para favorecer la adhesión celular y la activación de los mecanismos responsables de la motilidad celular, y otro inferior, donde se añadió medio DMEM al 10% FBS. El CGI se utilizó a una concentración final de 0,1 mg/mL en ácido acético 0,1 N y se añadieron 50 μL de esta solución a cada *transwell*. Posteriormente, los *transwells* se incubaron a 37°C sin humedad durante 24h.

Para estos ensayos se sembraron 250.000 células en placas de 6 pocillos y tras los tratamientos oportunos se levantaron con 200 μL de tripsina. Esta última se neutralizó con 1 mL de DMEM al 10% FBS y posteriormente las células se centrifugaron a 1.500 x g durante 5 min. A continuación, las células se resuspendieron en 2 mL de DMEM libre de FBS y se contaron con el hemocitómetro. En el compartimento superior se añadieron 200 μL con 25.000 células y en el inferior se añadieron 600 μL de DMEM 10% FBS como factor quimioatrayente. Las células se incubaron a 37 °C durante 24 h. Tras ese tiempo, las células se fijaron con 10% ácido tricloroacético (TCA) durante 15min a temperatura ambiente y, posteriormente, se tiñeron con una solución compuesta por 0,5% cristal violeta en 25% de metanol durante 1 h a temperatura ambiente. Las células de la cara superior, que no atravesaron la membrana, se eliminaron con un bastoncillo de algodón mientras que las células de la cara inferior, que migraron, se fotografiaron (al menos 3 campos) para proceder a su cuantificación. Además, una vez fotografiadas, las células se despegaron con 30% ácido acético y se leyó la absorbancia a 595nm. Al analizar los datos se comprobó que las absorbancias eran proporcionales a los valores obtenidos en el recuento celular.

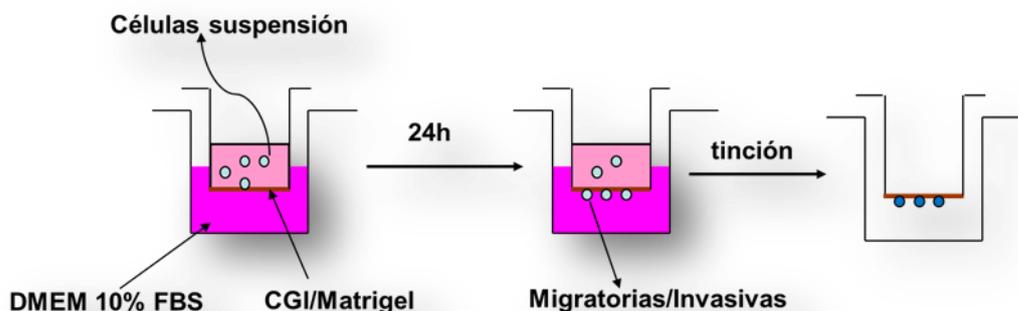


Figura 29. Ensayos de migración e invasión. Representación de las cámaras *transwell* tratadas con CGI para los ensayos de migración y las cámaras con *matrigel* en el caso de los ensayos de invasión. A las 24h de incubación las células que atravesaron el inserto se tiñeron con cristal violeta, se fotografiaron y se cuantificaron.

2.16. Ensayos de Invasión

Para este tipo de ensayos se utilizaron insertos similares a las cámaras *transwells*, pero con la diferencia de que la membrana está formada por una matriz artificial fabricada con componentes de la matriz extracelular (*Matrigel*). Estos insertos se atemperaron añadiendo DMEM libre de suero e incubándolos a 37°C durante al menos 1h antes de añadir las células. El resto de condiciones fueron las mismas que en el apartado 2.14.

2.17. Ensayo de incorporación de [³H]-timidina

Este método se utilizó para determinar el nivel de síntesis de ADN de las células tras distintos tratamientos. Para ello, se sembraron 250.000 células en placas de 6 pocillos. 24h después se realizaron los tratamientos correspondientes y durante las 4 últimas horas de tratamiento las células se incubaron en medio con 0,4 $\mu\text{Ci/mL}$ de [³H]-timidina. Pasado ese tiempo se retiró este medio, las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5% en PBS, durante 15min a 4°C. A continuación, se retiró el TCA, las células se lavaron con metanol y se dejaron secar al aire durante al menos 30 min. Por último, las células se solubilizaron en 0,5 mL de una solución 0,1 M NaOH y SDS 1%. A los extractos celulares se les añadió 2,2 mL de líquido de centelleo Optiphase Hisafe 3 y se midieron las desintegraciones por minuto (d.p.m.) en un contador de centelleo líquido tipo β (*Guardian 1414 de Wallac, Turku, Finland*). Los resultados se expresaron como porcentaje de síntesis de ADN respecto al control.

2.18. Ensayo de viabilidad celular

Esta técnica nos permitió medir la viabilidad celular tras los diferentes tratamientos a través de la capacidad celular de metabolizar el reactivo MTT a nivel mitocondrial.

Una vez finalizado el tratamiento correspondiente, las células se incubaron en presencia de 0,5 mg/mL de MTT a 37°C durante 3h. Posteriormente, se aspiró el medio y se añadieron 100 μL de DMSO hasta solubilizar el precipitado obtenido. Por último, se leyó la absorbancia a 570 y 630 nm, la cual es directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo celular.

2.19. Análisis del contenido celular de ADN por marcaje con yoduro de propidio

Mediante esta técnica se determinó el porcentaje de células con bajo contenido en ADN, indicativo de apoptosis, mediante el uso de un citómetro de flujo *Beckton Dickinson FACScalibur* (BD Biosciences), equipado con un láser de $\lambda_{\text{excitación}}$: 488nm. Los resultados obtenidos fueron analizados posteriormente con el programa *Cyflowlogic v. 1.2.1*.

Para determinar el contenido celular de ADN, una vez terminado el tratamiento correspondiente se recogió en un vial el medio de las placas de cultivo que contenía las células en suspensión. A continuación, las células adheridas a la placa se levantaron por incubación con tripsina y se añadieron al tubo que contenía el medio con las células en suspensión. Los tubos se centrifugaron a 390 x g y 4°C durante 5min y los precipitados obtenidos se lavaron con PBS frío. A continuación, las células se fijaron con 80% de etanol frío a -20°C durante al menos 16h. Transcurrido ese tiempo las células se lavaron con PBS frío y se incubaron en una solución de PBS con 0,1 mg/mL de RNasa A y 5 $\mu\text{g/mL}$ de yoduro de Propidio a 37°C durante 30min. A continuación las células se adquirieron en un citómetro de flujo y se determinó la fluorescencia emitida a 585/42 nm. Se consideraron células apoptóticas aquellas que tuvieron un contenido de ADN inferior al de la fase G1.

2.20. Análisis de los datos

Para el análisis estadístico de los resultados se realizó una comparación de medias con la prueba t de student para dos muestras suponiendo varianzas desiguales con el programa Microsoft Office Excel 2010. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor p fue inferior a 0,05.

RESULTADOS

Para el estudio del papel de B-RAF en la carcinogénesis tiroidea, nosotros utilizamos tres líneas celulares derivadas de tumores tiroideos humanos, previamente descritas en el apartado de Materiales y Métodos. Estas líneas celulares son: las células WRO, derivadas de un carcinoma folicular tiroideo (FTC), que poseen la proteína B-RAF silvestre (^{WT}B-RAF), y las líneas celulares 8505C y BHT101, ambas derivadas de carcinomas anaplásicos tiroideos (ATC), que contienen el mutante ^{V600E}B-RAF.

Sin embargo, antes de comenzar la exposición de los resultados obtenidos en esta Tesis, es importante resaltar que, a finales del año 2008, el laboratorio del Dr. Haugen publicó un artículo en el que se demostraba que muchas de las líneas celulares tiroideas utilizadas en estudios de cáncer de tiroides durante los últimos 20 años habían sido erróneamente identificadas (298). Muchas de estas líneas celulares en realidad provenían del mismo tipo celular y, además, la mayor parte de ellas no tenían un origen tiroideo, sino que procedían de otros tipos de tumores como melanoma, mama o colon. Además, en este trabajo se menciona la existencia de dos líneas celulares denominadas WRO, una de ellas portadora del mutante ^{V600E}B-RAF y otra de ellas sin él.

Por esta razón, antes de empezar nuestro estudio, comprobamos en nuestras líneas celulares la ausencia o presencia de la mutación T1799A en el exón 15 del gen de B-RAF, que da lugar al mutante ^{V600E}B-RAF objeto de estudio.

Nuestros análisis de secuenciación confirmaron los resultados obtenidos en el artículo mencionado, ya que la línea celular WRO no es portadora del mutante ^{V600E}B-RAF, mientras que las líneas 8505C y BHT101 sí lo son (figura 30).

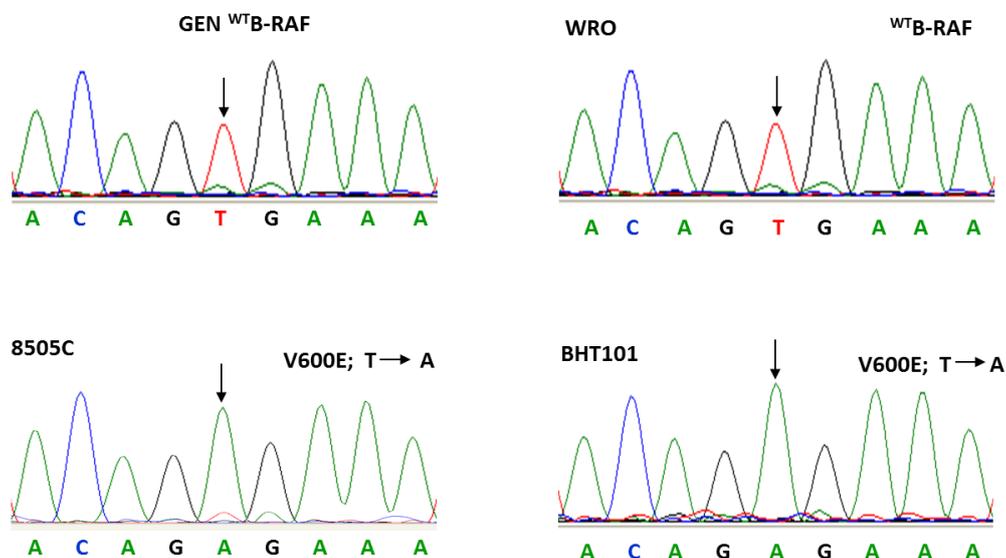


Figura 30. Presencia de la mutación V600E de B-RAF en las líneas celulares estudiadas. El DNA genómico de las líneas celulares WRO, 8505C y BHT101 se purificó y posteriormente se amplificó la región correspondiente al exón 15 del gen de B-RAF mediante PCR. A continuación, el DNA amplificado se secuenció y se analizó mediante el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*. La figura muestra los espectros correspondientes al fragmento de la secuencia amplificada donde se encuentra la mutación T1799A.

Además, examinamos detenidamente las características morfológicas de las distintas líneas celulares (figura 31). Así, observamos que las células WRO son células de gran tamaño y con morfología cuboidal característica de los folículos tiroideos, mientras que las células 8505C son células más desdiferenciadas que las anteriores, con morfología muy similar a fibroblastos y

presentan prolongaciones citoplasmáticas. Además, estas células, aun estando a un nivel de confluencia alto, carecen de contactos intercelulares, dando lugar a una estructura en forma de malla con numerosos espacios intercelulares. Por otra parte, las células BHT101 son células con una morfología poligonal, más pequeñas que las WRO y con propiedades similares a células epiteliales, tienen un crecimiento en grupos y forman asociaciones muy estrechas entre sí. Además, cabe destacar la capacidad que poseen de desprenderse fácilmente de la superficie de cultivo.

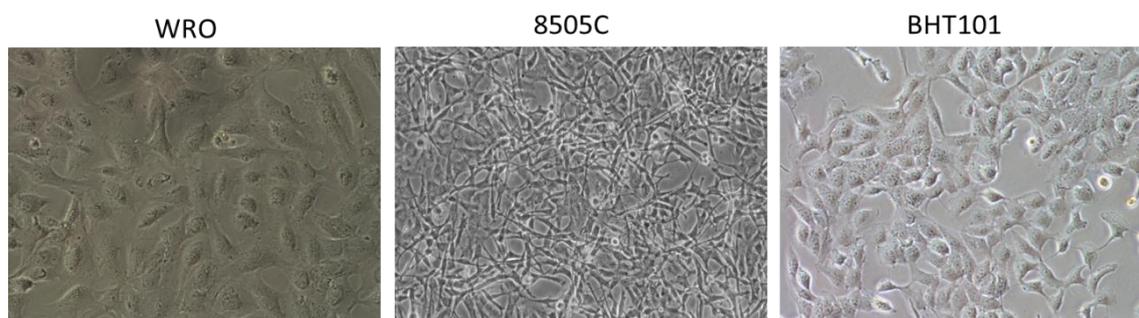


Figura 31. Morfología de las líneas celulares WRO, 8505C y BHT101. Las células WRO, 8505C y BHT101 se sembraron en placas de 6 pocillos y se incubaron en medio suplementado con 10% FBS. 48h después se fotografiaron en un microscopio óptico de contraste de fases a un aumento de 10X.

1. PAPEL DE V^{600E} B-RAF EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE TIROIDES

1.1. Implicación de V^{600E} B-RAF en los procesos de migración e invasión

Dos de los procesos en los que B-RAF parece tener un papel importante durante la progresión tumoral son la migración e invasión celular. Por ello, en primer lugar, analizamos el efecto de la presencia de la forma oncogénica V^{600E} B-RAF sobre estos procesos en las células tumorales tiroideas. Para ello, utilizamos las células WRO, portadoras de la proteína WT B-RAF y células 8505C y BHT101, que contienen el mutante V^{600E} B-RAF, en las cuales inhibimos la expresión de B-RAF con RNAs pequeños de interferencia (siRNA) específicos para esta proteína. Como control de nuestros experimentos realizamos análisis de la expresión de B-RAF en las tres líneas celulares mediante *western blot* y observamos que, tras la transfección con un oligo de siRNA específico, se produce una inhibición casi completa de la expresión de B-RAF en las células WRO, 8505C y BHT101 (figura 32A).

A continuación, analizamos la migración e invasión celular tras inhibir la expresión de B-RAF (figura 32B y C). Los resultados obtenidos muestran que la falta de B-RAF causó una disminución significativa de la migración, y la invasión celular, respecto a las células transfectadas con un oligo control (sc). El siB-RAF produjo una disminución de la migración celular de un 25% en el caso de las células WRO y 8505C y de un 45% en las células BHT101 (figura 32B). Respecto a la invasión celular, el silenciamiento de B-RAF provocó una disminución de aproximadamente el 30% en las tres líneas celulares; sin embargo, estas diferencias solo resultaron significativas en las células 8505C y BHT101 (figura 32C). Las imágenes de la figura 32D muestran un ejemplo de la disminución de la migración y de la invasión celular producida por el siBRAF en las células 8505C.

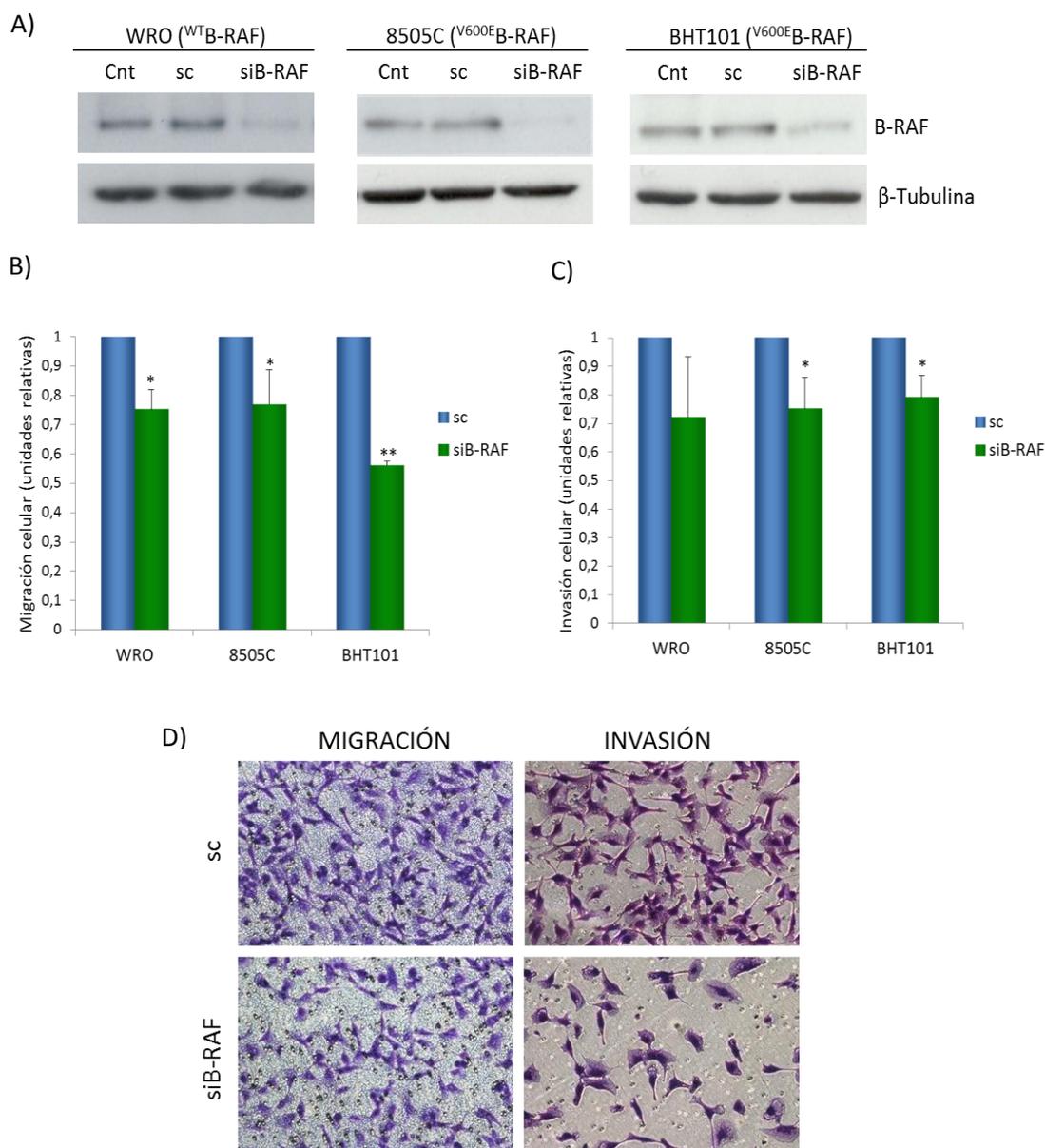


Figura 32 . El mutante ^{V600E}B-RAF participa en los procesos de migración e invasión celular. Las células WRO, 8505C y BHT101 se transfectaron con un siRNA control (sc) o con un siRNA específico para B-RAF (siB-RAF). A) 72 horas después se prepararon los correspondientes extractos celulares y se determinaron los niveles de B-RAF mediante *western blot*. Como control de carga se utilizó β -Tubulina. B) y C) 48h después de la transfección las células se tripsinizaron, se resuspendieron en medio libre de FBS y se sembraron en cámaras *transwells* o pocillos con *matrigel* para realizar los ensayos de migración (B) e invasión (C), respectivamente. Las células se incubaron durante 24h y posteriormente se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y finalmente se fotografiaron 3 campos de cada condición para proceder a su recuento. D) Imágenes de las células 8505C transfectadas con sc o con siBRAF fotografiadas a las 24h de la incubación en las cámaras *transwell* o en los pocillos con *matrigel*. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm ESM de tres experimentos realizados por duplicado. *0,05>p; **0,01>p>0,001

Numerosos estudios han relacionado la activación de las proteínas ERKs con una mayor capacidad invasiva de distintos tipos de cáncer y, varios de ellos en particular, con el cáncer de tiroides (290, 299). Además, la activación de ERK depende de C-RAF o B-RAF, según el tipo celular. Por ello, comprobamos si la activación de ERK1/2 en nuestras células estaba mediada

por ^{V600E}B-RAF y si la vía MEK-ERK estaba implicada en la migración e invasión celular. En primer lugar inhibimos la expresión de B-RAF con siRNA y determinamos los niveles de fosforilación de ERK mediante *western blot*. Los datos mostrados en la figura 33A indican que las tres líneas celulares analizadas, WRO, 8505C y BHT101 poseen una fosforilación constitutiva de ERK y ésta es dependiente de ^{V600E}B-RAF, ya que tras eliminar la expresión de B-RAF observamos una inhibición muy significativa de la fosforilación de ERK en las tres líneas celulares, siendo ésta más acusada en el caso de las células 8505C y BHT101. A continuación, determinamos los niveles de fosforilación de ERK1/2 utilizando dos inhibidores de la cascada, el inhibidor selectivo de ^{V600E}B-RAF, PLX4720, y el inhibidor de MEK, U0126. Como se muestra en la figura 33B, en las células 8505C y BHT101 la fosforilación de ERK se anula casi por completo con ambos inhibidores, mientras que en las células WRO la fosforilación solo se anula al tratar con U0126.

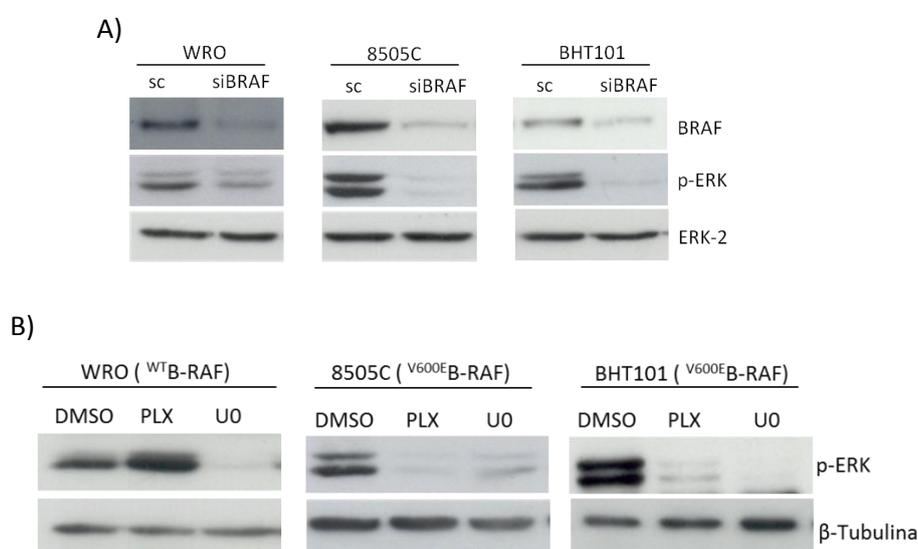


Figura 33. La activación de ERK es dependiente de la vía ^{V600E}B-RAF-MEK. A) Las células WRO, 8505C y BHT101 se transfectaron con un siRNA control (sc) o con un siRNA para B-RAF (siB-RAF). 72 h después se prepararon extractos celulares y se determinaron los niveles de B-RAF, p-ERK y ERK-2 mediante *western blot*. B) Las líneas celulares WRO, 8505C y BHT101 se incubaron con medio suplementado con 10% FBS y se trataron durante 24h con DMSO, 5 μM PLX4720 (PLX) o 10 μM U0126 (UO). A continuación se prepararon extractos celulares y se detectaron los niveles de p-ERK mediante *western blot*. Los niveles de β-Tubulina se utilizaron como control de carga. Los datos muestran un experimento representativo realizado tres veces con resultados similares.

A continuación, antes de observar los efectos de la inhibición de ^{V600E}B-RAF y de MEK sobre la migración y la invasión celular, quisimos comprobar los efectos que producían los inhibidores PLX4720 y U0126 sobre la proliferación y la supervivencia celular en nuestras líneas celulares. De esta manera, sabríamos si estos procesos podrían interferir en los resultados de migración e invasión celular.

En primer lugar, analizamos la proliferación celular mediante ensayos de incorporación de ³H-tritiada en nuestras células tratadas y sin tratar con PLX4720 o U0126. Los datos de la figura 34A muestran como el tratamiento con PLX4720 disminuye la proliferación en las tres líneas celulares, siendo ésta más acusada en las células BHT101. Sin embargo, el tratamiento con U0126 sólo inhibió la proliferación de las líneas 8505C y BHT101, pero no de las células WRO (figura 34B).

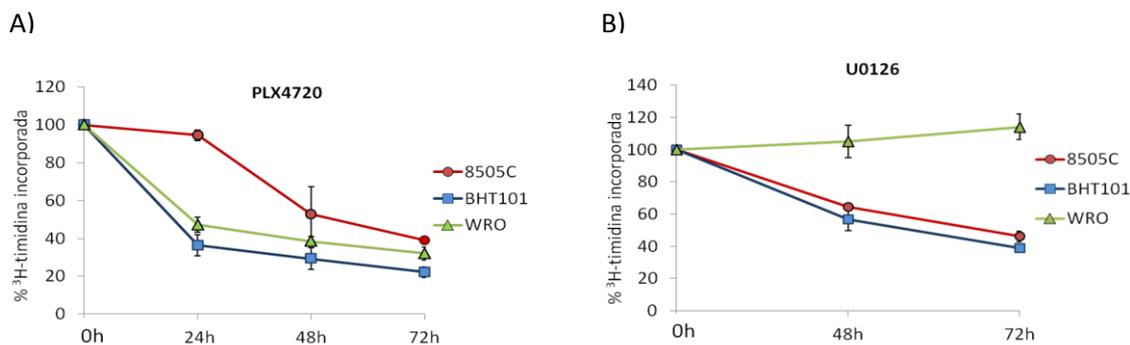


Figura 34. Los inhibidores PLX4720 y U0126 disminuyen la proliferación celular. Las células 8505C y BHT101 se sembraron en placas de 12 pocillos y se incubaron en ausencia o presencia de 5 μ M PLX4720 durante 24, 48 y 72h o con 10 μ M U0126 durante 48 y 72h. A continuación se realizaron ensayos de incorporación de timidina tritiada. Los datos representados corresponden a la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Posteriormente, analizamos los efectos de estos dos inhibidores sobre la viabilidad celular mediante ensayos de MTT y vimos que el tratamiento con PLX4720 disminuyó el porcentaje de células viables a las 24h en las células 8505C y en las BHT101, mientras que no afectó a las células WRO (figura 35A). Por otra parte, el tratamiento con U0126 únicamente afectó a las células BHT101 reduciendo la viabilidad de una manera muy similar a la proliferación celular (figura 35B).

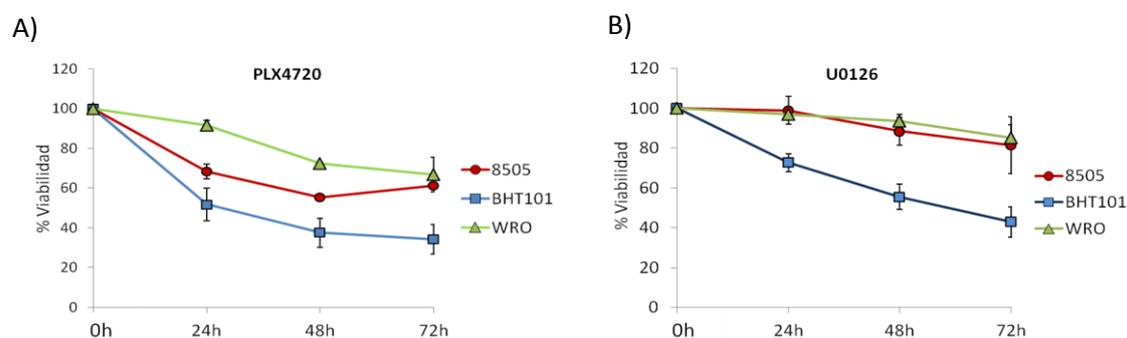


Figura 35. Los inhibidores PLX4720 y U0126 afectan a la viabilidad celular. Las células 8505C y BHT101 se sembraron en placas de 12 pocillos y se incubaron en ausencia o presencia de 5 μ M PLX4720 o 10 μ M U0126 durante 24, 48 y 72h. Posteriormente, las células se incubaron durante 3h en presencia de 0,5 mg/mL MTT. Finalmente se solubilizó el precipitado con 1mL de DMSO y se leyó la absorbancia a 570-630nm. Los datos representados corresponden a la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Después del estudio de la proliferación y de la viabilidad celular, analizamos los efectos de los inhibidores PLX4720 y U0126 sobre la apoptosis celular. Para ello, medimos el porcentaje de células con bajo contenido en ADN, indicativo de apoptosis, mediante citometría de flujo. En la figura 36 se muestra como en las tres líneas celulares los tratamientos a 24h no produjeron un aumento significativo en la muerte celular. En cambio, el tratamiento de las células 8505C y BHT101 con PLX4720 durante 48h sí incrementó el número de células con bajo contenido en ADN respecto a su control (figura 36A), indicando un posible efecto apoptótico de este inhibidor a más largo plazo.

En resumen, estos datos muestran que aunque la sensibilidad a los tratamientos con PLX4720 y U0126 difiere según el tipo celular, en general, producen una disminución de la proliferación

celular y un descenso en el número de células viables, pero en ningún caso llegan a provocar un aumento significativo de la muerte celular anterior a las 24h de tratamiento.

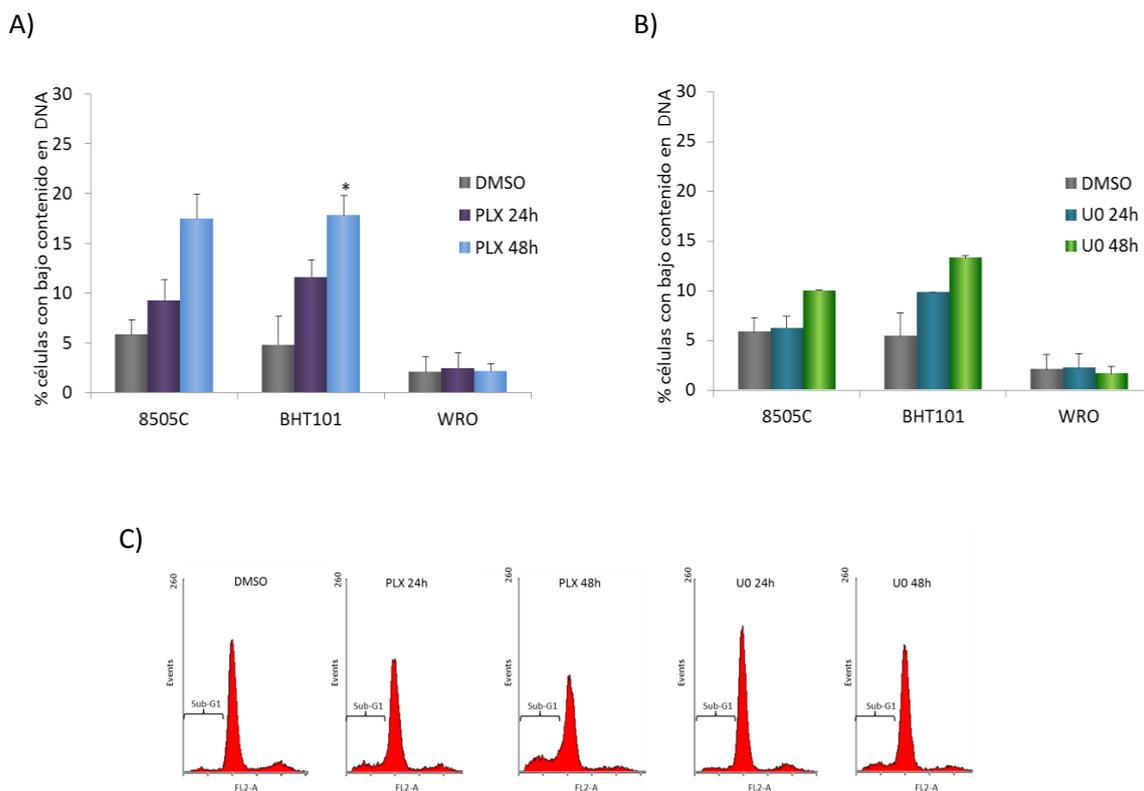


Figura 36. Los inhibidores PLX4720 y U0126 no producen apoptosis anterior a las 24h. A) y B) Las células 8505C, BHT101 y WRO, se sembraron en placas de 6 pocillos y se incubaron en ausencia o presencia de 5µM PLX4720 (A) o 10µM U0126 (B) durante 24, 48 y 72h. A continuación, se determinó el porcentaje de muerte celular mediante el análisis de la población sub-G1 hipoploide por citometría de flujo. Los datos representados corresponden a la media ± ESM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. C) Histogramas representativos del ciclo celular por marcaje con yoduro de propidio en células 8505C tratadas al igual que en A) y B).

Una vez visto que los inhibidores PLX4720 y U0126 no producían muerte celular anterior a las 24h, estudiamos el efecto de la inhibición de ^{V600E}B-RAF y de MEK sobre la migración e invasión celular. Al igual que ocurría con los niveles de fosforilación de ERK, en las células 8505C y BHT101 el PLX4720 y el U0126 redujeron la migración celular aproximadamente un 40% respecto a las células control, mientras que en las células WRO sólo se observó una disminución en las células tratadas con U0126 (figura 37A). Asimismo, el tratamiento con ambos inhibidores también disminuyó la invasión celular un 60% en las células 8505C y un 50% en las células BHT101. En cambio, en las células WRO no observamos diferencias en la invasión entre las células control y las células tratadas con los inhibidores (figura 37B).

En resumen, estos resultados indican que, en células portadoras del mutante ^{V600E}B-RAF, éste es el responsable de la activación de ERK y regula los procesos de migración e invasión celular a través de la vía MEK/ERK. Sin embargo, el hecho de que el silenciamiento de B-RAF y la inhibición de MEK disminuyan la migración de las células WRO con ^{WT}B-RAF indica que la vía B-RAF-MEK-ERK también participa en la migración celular en este tipo celular, no siendo así en el caso de la invasión celular, la cual requiere el mutante ^{V600E}B-RAF para llevarse a cabo correctamente.

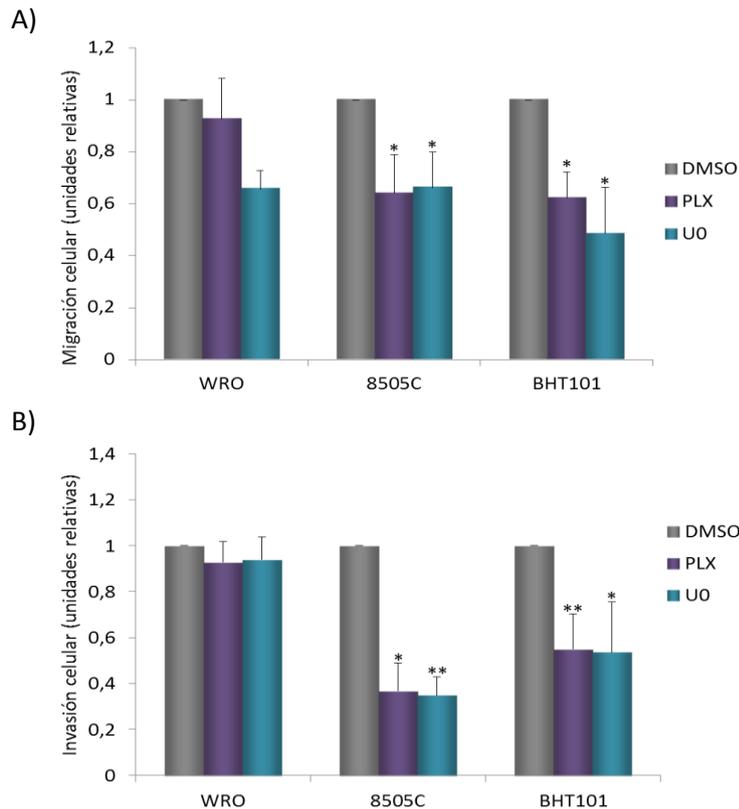


Figura 37. La inhibición de la actividad de V^{600E} B-RAF disminuye la migración y la invasión celular. Las células WRO, 8505C y BHT101 se trataron con 5 μ M PLX472 o 10 μ M U0126 durante 48h. Posteriormente, se sembraron en cámaras *transwells* o pocillos con *matrigel* para realizar los ensayos de migración (A) e invasión (B) respectivamente. Las células se incubaron durante 24h y posteriormente se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y finalmente se fotografiaron 3 campos de cada condición para proceder a su recuento. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm ESM de tres experimentos realizados por duplicado. *0,05>p; **0,01>p>0,001

Posteriormente, para confirmar la participación de V^{600E} B-RAF en los procesos de migración e invasión celular, desarrollamos un modelo en el que sobreexpresamos la proteína V^{600E} B-RAF en las células WRO. Para ello, mediante infección con lentivirus, creamos dos líneas celulares estables de células WRO que expresan el vector lentiviral FG12 vacío (WRO Mock) o el mismo vector con el gen que codifica para V^{600E} B-RAF unido al epítipo HA (WRO VE).

En la figura 38A se observa la sobreexpresión de V^{600E} B-RAF en las células WRO VE a distintas multiplicidades de infección (MOI) y como esta sobreexpresión da lugar a un aumento en la fosforilación de ERK frente a la fosforilación basal encontrada en las células transfectadas con el vector vacío. Además, las células infectadas se identificaron detectando la coexpresión de la proteína fluorescente verde GFP mediante microscopia de fluorescencia observándose un cambio morfológico muy acusado en las células WRO VE respecto a las células WRO Mock, ya que las primeras adquirieron un fenotipo mesenquimal caracterizado por una forma más alargada, similar a fibroblastos y con menos contactos intercelulares (figura 38B).

Por otra parte, al analizar la migración e invasión en ambas líneas celulares se observó como las células WRO VE migraron e invadieron un 35% y un 40% más respectivamente que las células WRO Mock (figura 38C y D).

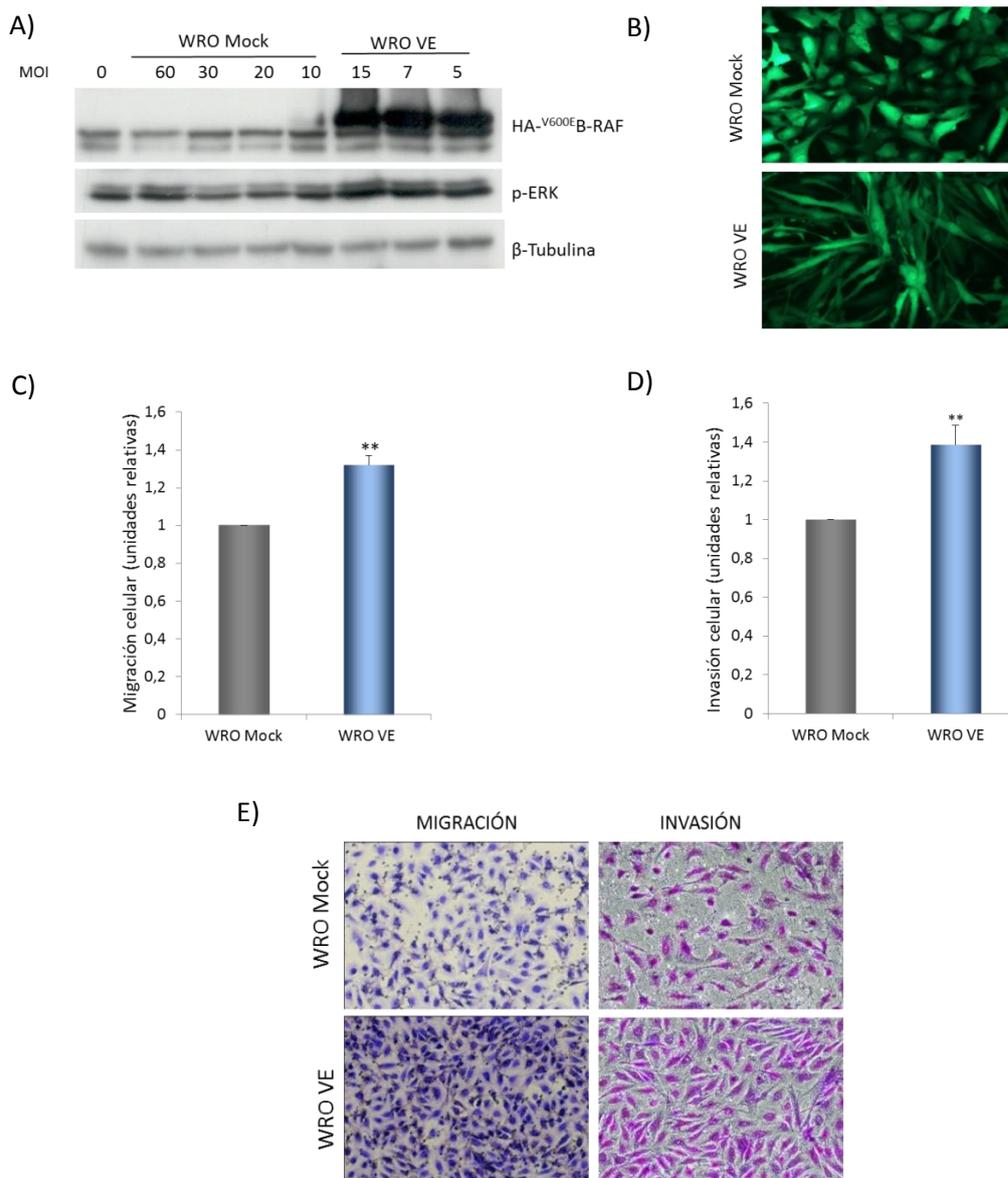


Figura 38. La sobreexpresión de V^{600E} B-RAF aumenta la migración y la invasión celular. Las células WRO se infectaron con lentivirus que no expresan V^{600E} B-RAF (FG12-WRO Mock) o con lentivirus que expresan V^{600E} B-RAF unido al epítipo HA (FG12-WRO VE). A) Las células transducidas a diferentes multiplicidades de infección (MOI) se cultivaron en medio con 10% de FBS. Se prepararon extractos celulares y mediante *western blot* se detectaron las proteínas HA- V^{600E} B-RAF y p-ERK. Los niveles de β -Tubulina se usaron como control de carga. B) La infección lentiviral se comprobó mediante microscopía de fluorescencia examinando la expresión de GFP. C) y D) Las células FG12-WRO Mock infectadas con una MOI de 20 (WRO Mock) y las células FG12-WRO VE infectadas con una MOI de 5 (WRO VE) se sembraron en cámaras *transwells* o pocillos con *matrigel* para realizar los ensayos de migración (C) e invasión (D) respectivamente. Las células se incubaron durante 24h y posteriormente se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y finalmente se fotografiaron 3 campos de cada condición para proceder a su recuento. E) Imágenes de las células WRO Mock y WRO VE tras 24h de incubación en las cámaras *transwells* (migración) o en los pocillos con *matrigle* (invasión). Las fotografías se realizaron con un microscopio óptico a un aumento del 10x. Los resultados mostrados corresponden a las medias \pm ESM de tres experimentos realizados por duplicado. **0,01>p

El siguiente paso para demostrar que el aumento de la migración e invasión celular era debido a V^{600E} B-RAF fue analizar los efectos de los inhibidores PLX4720 y U0126. Como cabía esperar, el tratamiento de las células WRO VE con PLX4720 inhibió tanto el aumento de la migración como el de la invasión producido por V^{600E} B-RAF, mientras que no modificó los niveles basales

de estos procesos en las células WRO Mock (figura 39A y B). El tratamiento con el inhibidor U0126 produjo los mismos efectos que el PLX4720 sobre la migración celular, confirmando así que el aumento de la migración producido por V^{600E} B-RAF es dependiente de la vía MEK-ERK (figura 39A). Sin embargo, este inhibidor no produjo una disminución significativa de la invasión en las células WRO respecto a las células control (figura 39B).

A)

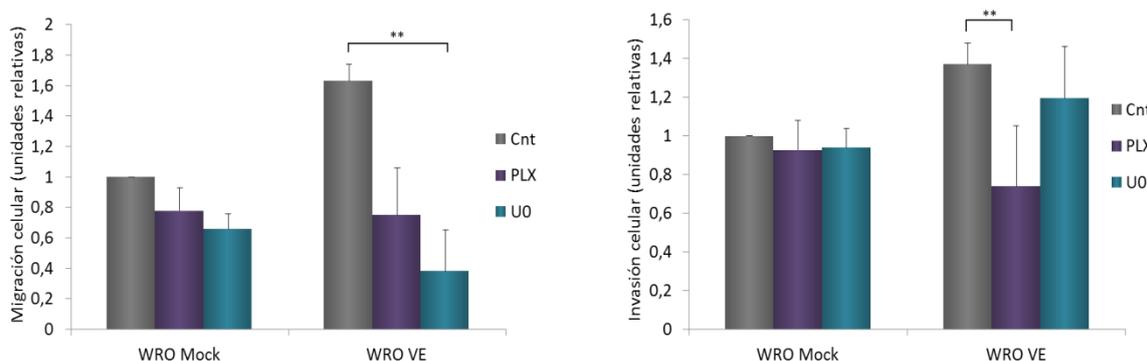


Figura 39. V^{600E} B-RAF aumenta la migración y la invasión celular. Las células WRO Mock y WRO VE se incubaron en medio suplementado con 10% FBS y se trataron con los inhibidores PLX4720 ($5\mu\text{M}$) o U0126 ($10\mu\text{M}$). Pasadas 24h, las células se tripsinizaron, se resuspendieron con medio libre de FBS y se sembraron en cámaras *transwells* o pocillos con *matrigel* para realizar los ensayos de migración (A) e invasión (B) respectivamente. Las células se incubaron durante 24h y posteriormente se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y finalmente se fotografiaron 3 campos de cada condición para proceder a su recuento. Los resultados mostrados corresponden a las medias \pm ESM de tres experimentos realizados por duplicado. $**0,01 > p$

Todos estos datos, nos permiten afirmar que el mutante V^{600E} B-RAF aumenta de la migración y la invasión observado y confirman que juega un papel muy importante en la progresión del cáncer de tiroides hacia estadios tumorales más avanzados.

1.2. Mecanismos moleculares mediados por B-RAF implicados en la progresión del cáncer tiroideo

Una vez demostrada la importancia de V^{600E} B-RAF en los procesos de migración e invasión celular, estudiamos los mecanismos moleculares por los que B-RAF media estos procesos en las células tumorales tiroideas.

Como se ha comentado en la introducción de este trabajo, uno de los procesos clave para que las células del tumor primario adquieran la capacidad migratoria e invasiva es la Transición Epitelio Mesénquima (EMT). Para que este proceso tenga lugar son necesarios una serie de cambios en la regulación de ciertos genes, como Snail1 y E-cadherina. Por este motivo, estudiamos si V^{600E} B-RAF induce la EMT en las células 8505C y BHT101. Para ello, analizamos los niveles de expresión de Snail1 en nuestros modelos celulares y su regulación por V^{600E} B-RAF.

En primer lugar, analizamos mediante *western blot* el efecto del silenciamiento de B-RAF sobre los niveles de Snail1 en células 8505 y BHT101. Como se observa en la figura 40A y B, la falta de expresión de B-RAF disminuyó los niveles de Snail1 en ambos tipos celulares. Además, realizamos experimentos similares en células tratadas con los inhibidores PLX4720 y U0126 y

también observamos que ambos tratamientos disminuyeron los niveles de Snail1 frente a sus respectivos controles (figura 40C y D). Para comprobar si la disminución de Snail1 se debía a una regulación transcripcional, analizamos los niveles del ARNm de Snail1 mediante PCR a tiempo real (figura 40E y F). En este caso, a diferencia de los niveles de proteína, sólo observamos una disminución en la expresión del ARNm tras el tratamiento con PLX4720 en las células 8505C y BHT101. Sin embargo, los niveles de ARNm no se modificaron tras el tratamiento con U0126, sugiriendo que V^{600E} B-RAF tiene un doble efecto sobre Snail1, uno a nivel transcripcional independiente de MEK/ERK y otro a nivel postranscripcional dependiente de esta vía.

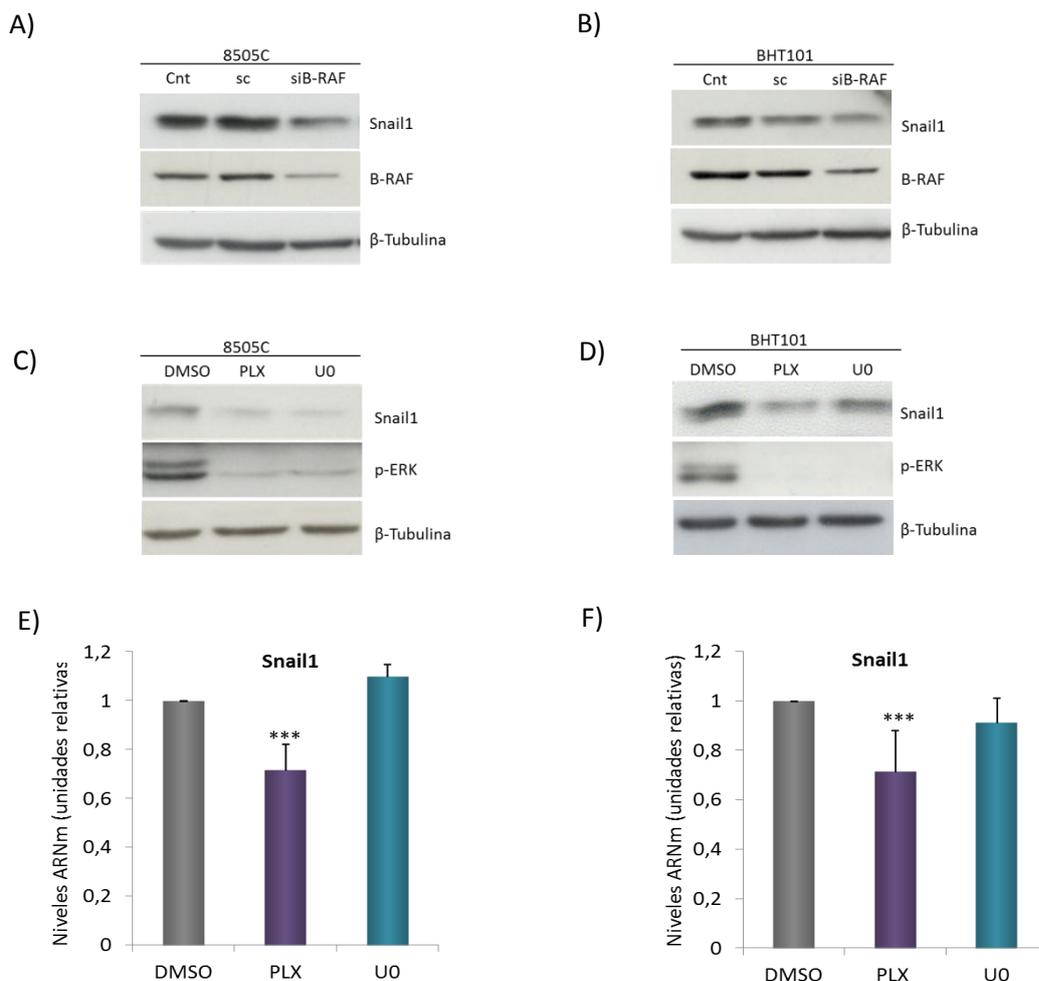
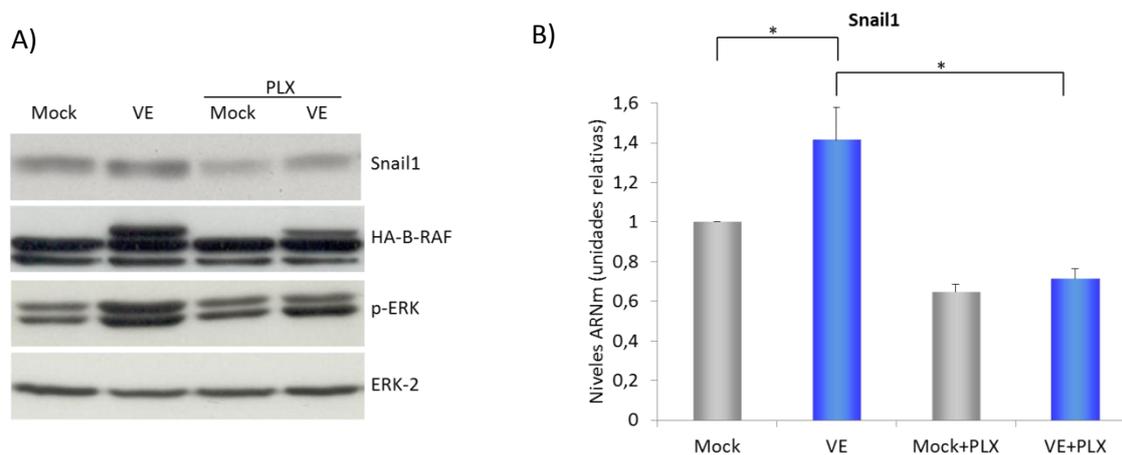


Figura 40. V^{600E} B-RAF participa en la regulación de Snail1. A) y B) Las células 8505C y las células BHT101 se transfectaron con un siRNA control (sc) o con un siRNA específico de B-RAF. 72h después se prepararon extractos celulares y se determinaron los niveles de Snail, B-RAF y β -Tubulina mediante *western blot*. C y D) Las células se trataron con DMSO, 5 μ M PLX4720 (PLX) y 10 μ M U0126 (UO) durante 24h y posteriormente se determinaron los niveles de Snail1, p-ERK y β -Tubulina mediante *western blot*. Las células 8505C (E) y BHT101 (F) se incubaron en presencia de DMSO, 5 μ M PLX4720 (PLX) o 10 μ M U0126 (UO) durante 24h. Posteriormente, se purificó el ARN total para determinar los niveles del ARNm de Snail1 mediante PCR a tiempo real. Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. Los resultados mostrados corresponden a las medias \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *** 0,001>p

A continuación, analizamos los efectos de la sobreexpresión del mutante V^{600E} B-RAF sobre los niveles de Snail1. Para ello, comparamos sus niveles de proteína y de ARNm en las células WRO Mock y en las células WRO VE. En primer lugar, observamos que en las células WRO VE se

incrementaron los niveles de proteína de Snail1 significativamente respecto a las células WRO Mock (figura 41A). Este aumento también se observó en los niveles de ARNm de Snail1, los cuales aumentaron un 40% en las células WRO VE respecto a células WRO Mock (figura 41B). Además, el tratamiento con PLX4720 no modificó significativamente los niveles basales de Snail1 de las células WRO Mock, pero restableció los niveles de proteína y ARNm de Snail1 en las células WRO VE, devolviéndolos a sus valores basales y demostrando que el aumento de Snail1 se debía al efecto del mutante ^{V600E}B-RAF (figura 41A y B).



Figuras 41. ^{V600E}B-RAF aumenta la expresión de Snail1. Las células WRO Mock y WRO VE se incubaron en presencia o ausencia de 10 μ M PLX4720 durante 24h. A) Se prepararon extractos celulares y se determinaron los niveles de Snail1, p-ERK, HA-B-RAF y ERK-2 mediante *western blot*. B) El ARN de las células se purificó y se determinaron los niveles de ARNm correspondiente a Snail1 mediante PCR a tiempo real. Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. Los resultados mostrados corresponden a las medias \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *0,05>p

Es importante destacar que durante los tratamientos con PLX4720 y U0126 observamos cambios en la morfología celular, siendo éstos más acusados en las células 8505C. En la figura 42, se muestra como las células 8505C sufrieron un aumento de tamaño acompañado de un incremento de los contactos intercelulares tras 24h de tratamiento con estos inhibidores. Este hecho, asociado a la disminución observada de los niveles de Snail1, nos llevó a analizar si estos cambios morfológicos se correspondían con un aumento de los niveles de E-cadherina. Para ello, analizamos los niveles de E-cadherina tras el tratamiento con PLX4720 y U0126 mediante *western blot*. En la figura 43 se observa, en primer lugar, la gran diferencia entre los niveles de E-cadherina en condiciones basales de una línea celular a otra, ya que mientras que en las células 8505C no se detectó la proteína, en las células BHT101 los niveles de E-cadherina son mucho mayores. Aun así, en ambas líneas celulares, apreciamos como a las 24h de tratamiento con PLX4720 y U0126 se observa un aumento de E-cadherina, siendo éste mucho más evidente en las células 8505C. Estos resultados demuestran que la pérdida de E-cadherina es dependiente de la activación de ERK, pero a su vez, indican que la activación constitutiva de ERK no es la única condición para la pérdida de expresión de E-cadherina.

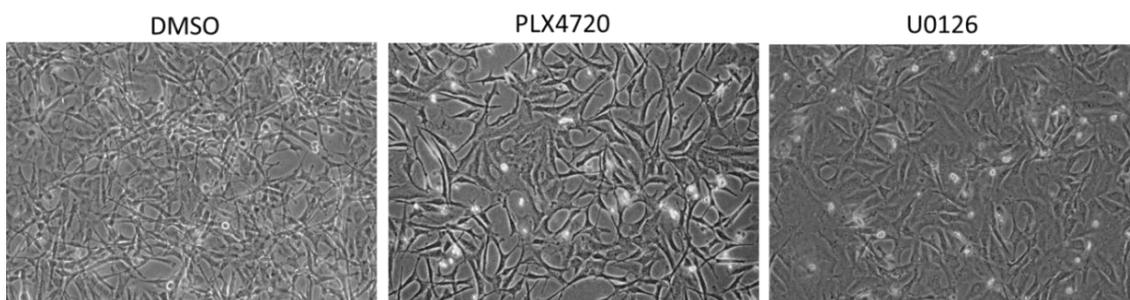


Figura 42. La inhibición de V^{600E} B-RAF y MEK producen cambios morfológicos en las células 8505C. Las células 8505C se incubaron en presencia de DMSO, 5 μ M PLX4720 (PLX) o 10 μ M U0126 (UO). 48h después se fotografiaron en un microscopio óptico de contraste de fases a un aumento de 10X.

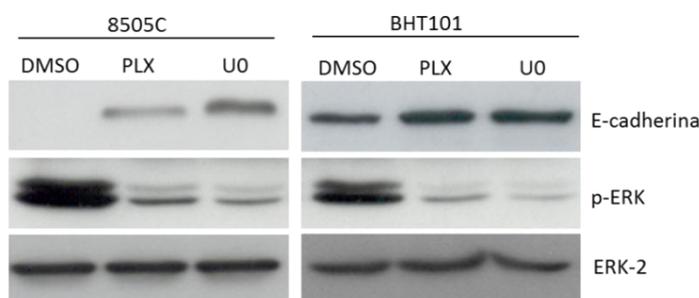


Figura 43. Los inhibidores PLX4720 y U0126 aumentan los niveles de E-Cadherina. Las células 8505C y BHT101 se incubaron con DMSO, 5 μ M PLX4720 (PLX) o 10 μ M U0126(UO) durante 24h. A continuación, se prepararon extractos totales y se determinaron los niveles de E-Cadherina, p-ERK y ERK-2 mediante *western blot*. La figura muestra un experimento representativo realizado tres veces con resultados similares.

Una vez visto que V^{600E} B-RAF estaba implicado en la regulación de los niveles de Snail1, estudiamos si Snail1 regulaba la expresión de E-cadherina en nuestras células. Para ello, inhibimos la expresión de Snail1 mediante siRNA y analizamos los niveles de ARNm de E-cadherina. Como control, comprobamos como el siRNA de Snail1 disminuía aproximadamente un 80% los niveles de ARNm de Snail1 (figura 44A) y, como esperábamos, esta disminución reducía la proteína analizada por *western blot* (figura 44B y C). Sin embargo, el silenciamiento de Snail1 únicamente aumentó los niveles de E-cadherina en las células BHT101 (figura 44C). No obstante, al analizar los niveles de ARNm de E-cadherina observamos como en las células 8505C con Snail1 silenciado se produjo un aumento aproximado de 3 veces respecto a las células control (figura 44D), demostrando así la participación de Snail1 en la regulación transcripcional de E-cadherina. Además, el ARNm de E-cadherina también aumentó alrededor de 4 veces tras el silenciamiento de Snail1 en las células BHT101. Estos datos demuestran que Snail1 regula negativamente la expresión de E-cadherina a nivel transcripcional.

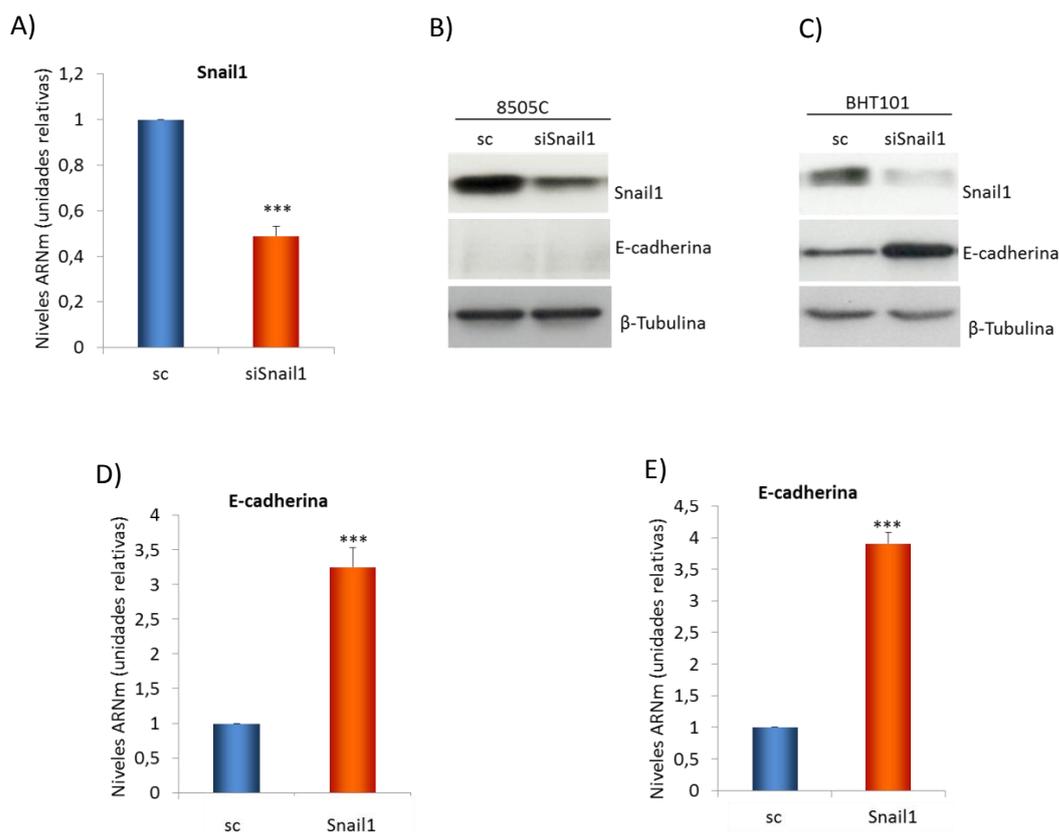


Figura 44. Snail1 regula la expresión de E-cadherina. Las células 8505C y BHT101 se transfectaron con un siRNA control (sc) o con un siRNA específico para inhibir la expresión de Snail1 (siSnail1). 72h después de la transfección, se purificó el ARN total de las células 8505 y se determinaron los niveles de ARNm de Snail1 (A) y E-cadherina (D) mediante PCR a tiempo real. Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. Por otra parte, se prepararon extractos celulares y se analizaron los niveles de E-cadherina, Snail1 y β -Tubulina de las células 8505C (B) y de las BHT101 (C) mediante *western blot*. E) 72h tras la transfección, se purificó el ARN total de las células BHT101 y se determinaron los niveles de ARNm de E-cadherina mediante PCR a tiempo real. Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. Los resultados mostrados corresponden a las medias \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. ***0,001>p

Basándonos en los resultados anteriores, para confirmar la regulación de E-cadherina a través de ^{V600E}B-RAF escogimos la línea celular 8505C, ya que la falta de E-cadherina nos permitía estudiar los mecanismos implicados en la recuperación de la expresión de la misma. Con este objetivo, medimos los niveles de ARNm de E-cadherina en células tratadas con PLX4720 y con U0126. La incubación con estos inhibidores aumentó el ARNm de E-cadherina respecto a las células control (figura 45A). Así, mientras que el PLX4720 produjo un aumento de ARNm alrededor de 5 veces, el tratamiento con U0126 incrementó los niveles aproximadamente 6 veces. Además, analizamos la expresión y localización de E-cadherina mediante microscopía de fluorescencia y también observamos un aumento en sus niveles en la periferia de las células tratadas con PLX4720 y U0126 (figura 45B).

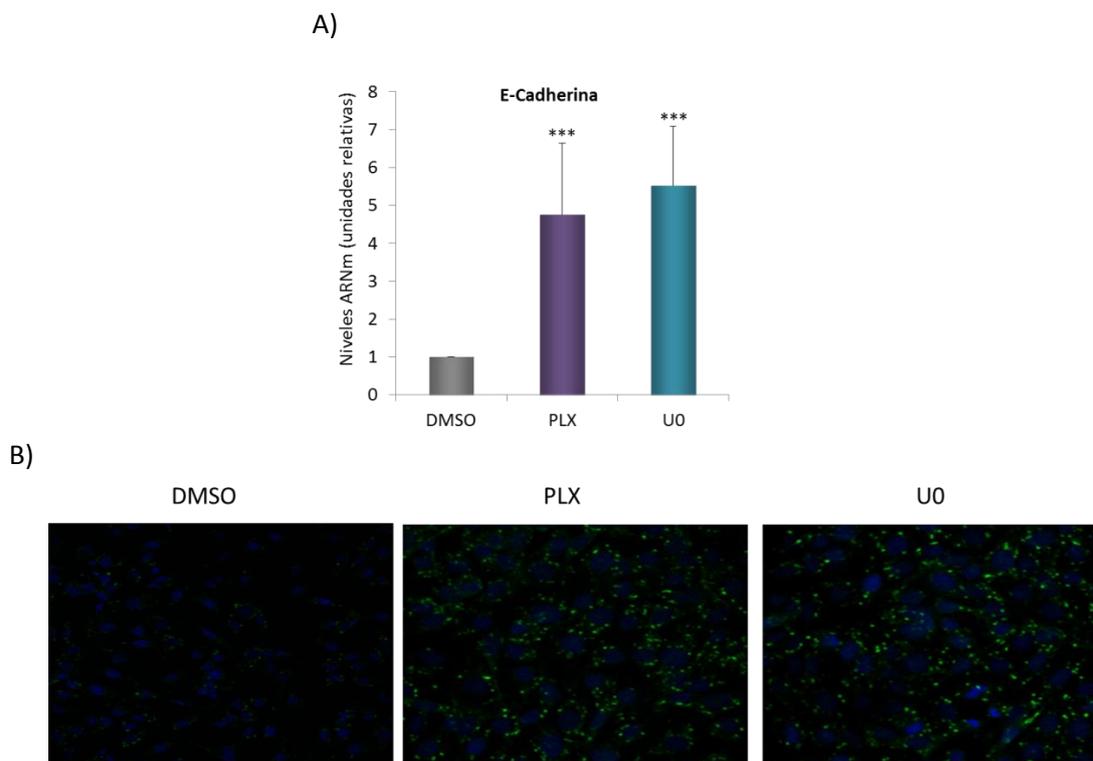


Figura 45. La inhibición de ^{V600E}B-RAF aumenta la expresión de E-cadherina en células 8505C. Las células 8505C se incubaron en presencia de DMSO, 5 μ M PLX4720 (PLX) o 10 μ M U0126 (UO) durante 24h y posteriormente se purificó el ARN total para determinar los niveles del ARNm de E-cadherina mediante PCR a tiempo real. Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. Los resultados mostrados corresponden a las medias \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. ***0,001>p. B) Tras los tratamientos correspondientes se examinaron los niveles de E-cadherina (verde) mediante inmunofluorescencia y se tiñeron los núcleos (azul) con DAPI. Las imágenes muestran un experimento representativo realizado tres veces con resultados similares.

Para corroborar los datos anteriores silenciamos B-RAF en las células 8505C y, al igual que con los inhibidores, observamos que la falta de expresión de B-RAF aumentó los niveles proteicos de E-cadherina (figura 46A). Asimismo, el ARNm aumentó unas 5 veces en las células con siB-RAF frente a sus controles (figura 46C). Además, bajo las mismas condiciones, analizamos los niveles de E-cadherina en las células BHT101. En este caso, como cabía esperar por los altos niveles basales, el aumento de E-cadherina producido por el silenciamiento de B-RAF fue menor que en las células 8505C (figura 46B) y los niveles de su ARNm aumentaron un 50% respecto a las células transfectadas con el oligo control (sc) (figura 46D).

Por último, sabiendo que la expresión de E-cadherina depende de Snail1, quisimos estudiar si B-RAF regulaba los niveles de E-cadherina a través de Snail1. Para ello, sobreexpresamos Snail1 en nuestras células y las tratamos con PLX4720 y U0126. Por una parte, observamos que la sobreexpresión de Snail1 reducía los niveles basales de E-cadherina en las células BHT101 (figura 47A) y, por otra, vimos como la sobreexpresión de Snail1 revirtió el aumento de E-cadherina producido por los inhibidores en las células 8505C (figura 47B), indicando que ^{V600E}B-RAF reprime la expresión de E-cadherina a través del aumento de la expresión de Snail1.

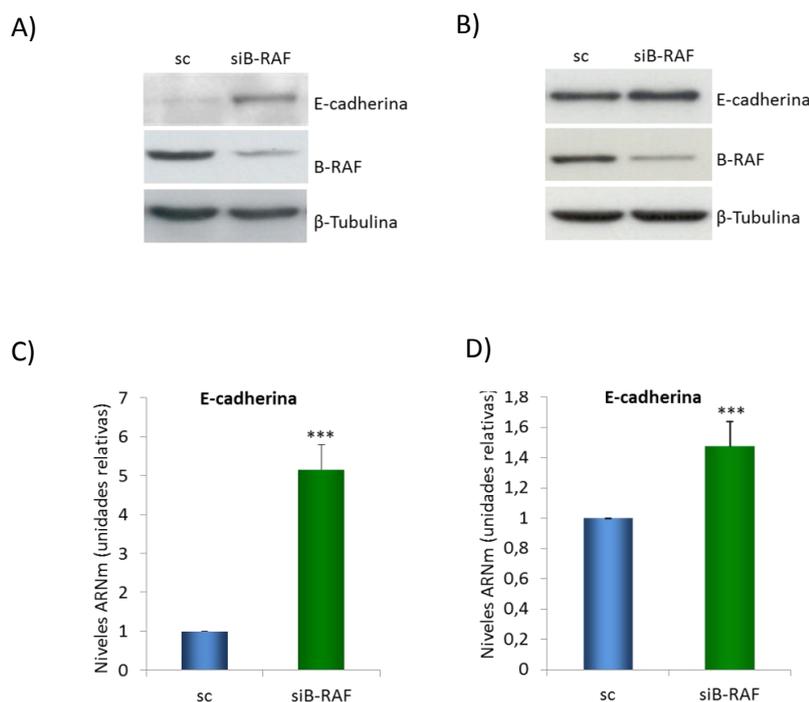


Figura 46. La ausencia de ^{V600E}B-RAF aumenta la expresión de E-Cadherina. Las células 8505C (A y C) y BHT101 (B y D) se transfectaron con un siRNA control (sc) o con un siRNA específico para B-RAF. A) y B) 72h después se prepararon extractos celulares y se determinaron los niveles de E-cadherina, B-RAF y β -Tubulina mediante *western blot*. C) y D) 72h después de la transfección se aisló el ARN total y se examinaron los niveles del ARNm de E-Cadherina mediante PCR a tiempo real. Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. Los resultados mostrados corresponden a las medias \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. ***0,001>p

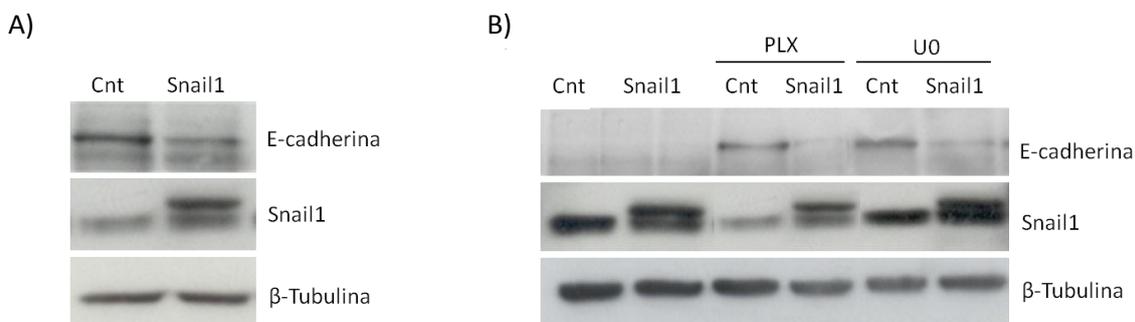


Figura 47. ^{V600E}B-RAF regula la expresión de E-cadherina a través de Snail1. Las células BHT101 (A) y 8505C (B) se transfectaron con un plásmido control (Cnt) o con un plásmido con el gen de Snail1 (Snail1). 48h después las células 8505C (B) se trataron con 5 μ M PLX4720 o 10 μ M U0126 durante 24h. Posteriormente, se prepararon extractos celulares y se analizaron los niveles de E-Cadherina y Snail1 mediante *western blot*. La membrana se rehibridó con un anticuerpo específico contra β -Tubulina que se utilizó como control de carga. Las figuras corresponden a un experimento representativo realizado 3 veces con resultados similares.

Durante los experimentos en los que sobreexpresamos Snail1 observamos unos cambios morfológicos muy acusados en las células BHT101, en los que se apreciaron células con una forma similar a fibroblastos, formación de protusiones celulares y una disminución considerable en las uniones intercelulares (figura 48). Dado que estos cambios morfológicos, junto con la disminución de E-cadherina observada anteriormente (figura 47A), se

correspondían con las alteraciones propias de la EMT, analizamos los efectos de la sobreexpresión de Snail1 sobre la migración y la invasión celular. En la figura 49A y B, se puede observar como la sobreexpresión de Snail1 aumentó la migración y la invasión celular en ambas líneas celulares. En concreto, la migración celular aumentó un 80% en el caso de las células 8505C y un 50% en las BHT101, respecto a sus correspondientes controles (figura 49A). En cuanto a la invasión, la expresión de Snail1 también la aumentó aproximadamente un 40% en las células 8505C y un 20% en las BHT101 (figura 49B), confirmando así el papel de Snail1 como inductor de la progresión tumoral.

En resumen, todos los datos expuestos hasta ahora indican que V^{600E} B-RAF promueve la migración y la invasión celular, regulando la EMT a través del aumento de la expresión Snail1 y la consecuente represión de E-cadherina. Además, hemos demostrado el papel de Snail1 en la migración e invasión celular, lo que nos permite afirmar que uno de los mecanismos por los que V^{600E} B-RAF favorece ambos procesos es a través de la regulación de Snail1.

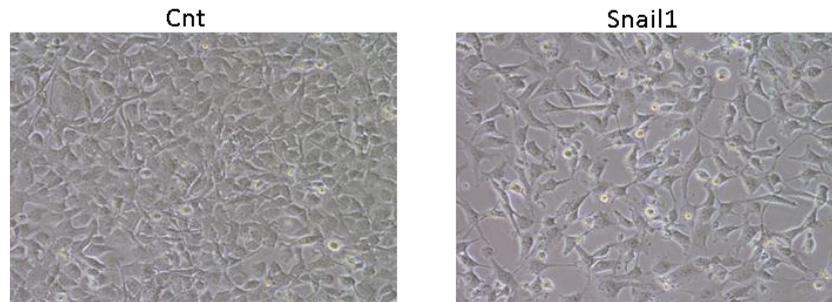


Figura 48. Snail1 induce cambios morfológicos característicos de la EMT. Las células BHT101 se transfectaron con un plásmido control (Cnt) y con el plásmido con el gen de Snail1 (Snail1). Pasadas 48h se tomaron fotografías mediante un microscopio óptico de contraste de fases a un aumento de 10X.

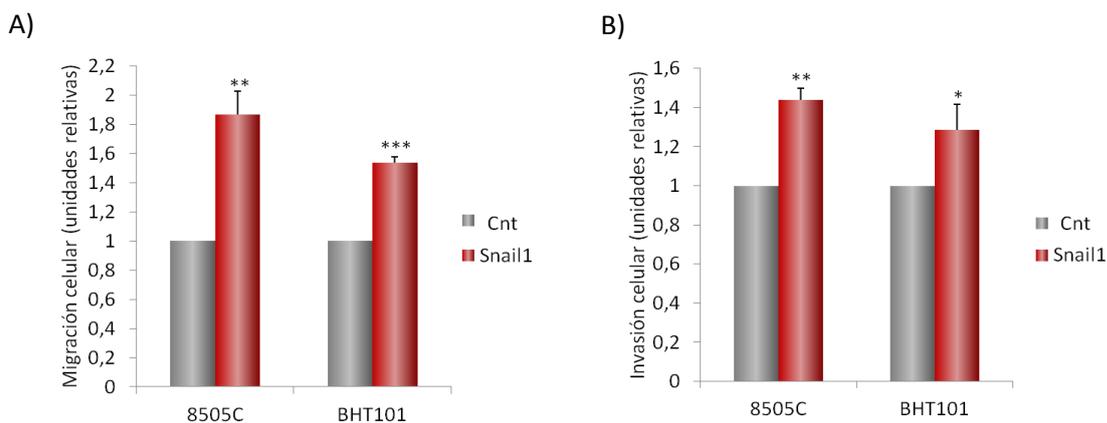


Figura 49. Snail1 aumenta la migración y la invasión celular. Las células 8505C y BHT101 se transfectaron con un plásmido control (Cnt) o con el plásmido con el gen de Snail1 (Snail1). Pasadas 48h, las células se tripsinizaron, se resuspendieron con medio libre de FBS y se sembraron en cámaras *transwells* o pocillos con *matrigel* para realizar los ensayos de migración (A) e invasión (B) respectivamente. Las células se incubaron durante 24h y posteriormente se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y finalmente se fotografiaron 3 campos de cada condición para proceder a su recuento. Los resultados mostrados corresponden a las medias \pm ESM de tres experimentos realizados por duplicado. *0,05>p; **0,01>p; ***0,001>p

2. PAPEL DE TGF β EN EL CÁNCER DE TIROIDES

Numerosos estudios han demostrado que el factor de crecimiento transformante tipo β (TGF β) también juega un papel muy importante en la EMT y que está implicado en la migración e invasión celular a través de la regulación de Snail1 y E-cadherina. Por ello, para conocer si el aumento de la EMT provocado por ^{V600E}B-RAF tenía lugar a través de TGF β , nos planteamos estudiar si existía alguna relación entre ellos.

2.1. Efecto del TGF β sobre proliferación y supervivencia celular

En primer lugar, dado que TGF β es una citoquina multifuncional que posee un papel dual y opuesto dependiendo del contexto celular, ya que, por una parte, TGF β inhibe la proliferación e induce apoptosis en la mayoría de tipos celulares y, por otra, favorece la invasividad y el desarrollo de metástasis en etapas avanzadas de varios tipos de tumores (210), determinamos los efectos de TGF β sobre la proliferación y la muerte celular en nuestras líneas celulares. Para ello, analizamos la síntesis de ADN, mediante ensayos de incorporación de 3H-timidina, en las células 8505C, BHT101, WRO Mock y WRO VE tratadas con esta citoquina durante 24, 48 y 72h. Los resultados obtenidos demuestran que TGF β no tuvo ningún efecto sobre la síntesis de ADN respecto a las células control sin tratar (figura 50A). A continuación, estudiamos el papel de TGF β sobre la viabilidad celular. Para ello, medimos la actividad mitocondrial de nuestras células mediante ensayos de MTT. Como se muestra en la figura 50B, el tratamiento con TGF β a distintos tiempos tampoco afectó al porcentaje de células viables respecto a las células control en ninguna de las líneas celulares estudiadas.

Por último, determinamos el porcentaje de células con un contenido de ADN sub-G1 hipoploide, indicativo de apoptosis, mediante citometría de flujo, en células tratadas con TGF β . Los resultados obtenidos fueron similares a los observados en los ensayos de MTT; el tratamiento con TGF β durante 24h y 48h no indujo muerte celular en ninguna de las líneas celulares (figura 50C). Estos resultados demuestran, que en células tumorales tiroideas, el TGF β no afecta a la proliferación celular y tampoco tiene los efectos proapoptóticos que se le atribuyen en determinados tipos celulares.

2.2. Implicación de TGF β en la EMT

Una vez comprobado que TGF β no afectaba a la proliferación celular y tampoco tenía efectos proapoptóticos en nuestras líneas celulares, analizamos sus efectos sobre la EMT.

En primer lugar, mediante microscopía óptica, analizamos la morfología celular tras el tratamiento con TGF β , observando cambios en el fenotipo celular (figura 51). El tratamiento con esta citoquina produjo un aumento de prolongaciones citoplasmáticas y una reducción de contactos intercelulares, característicos de la EMT. Estos cambios sólo se observaron en las células BHT101, ya que como se comentó anteriormente son las únicas que crecen formando agrupaciones, mientras que el resto crecen de una forma aislada.

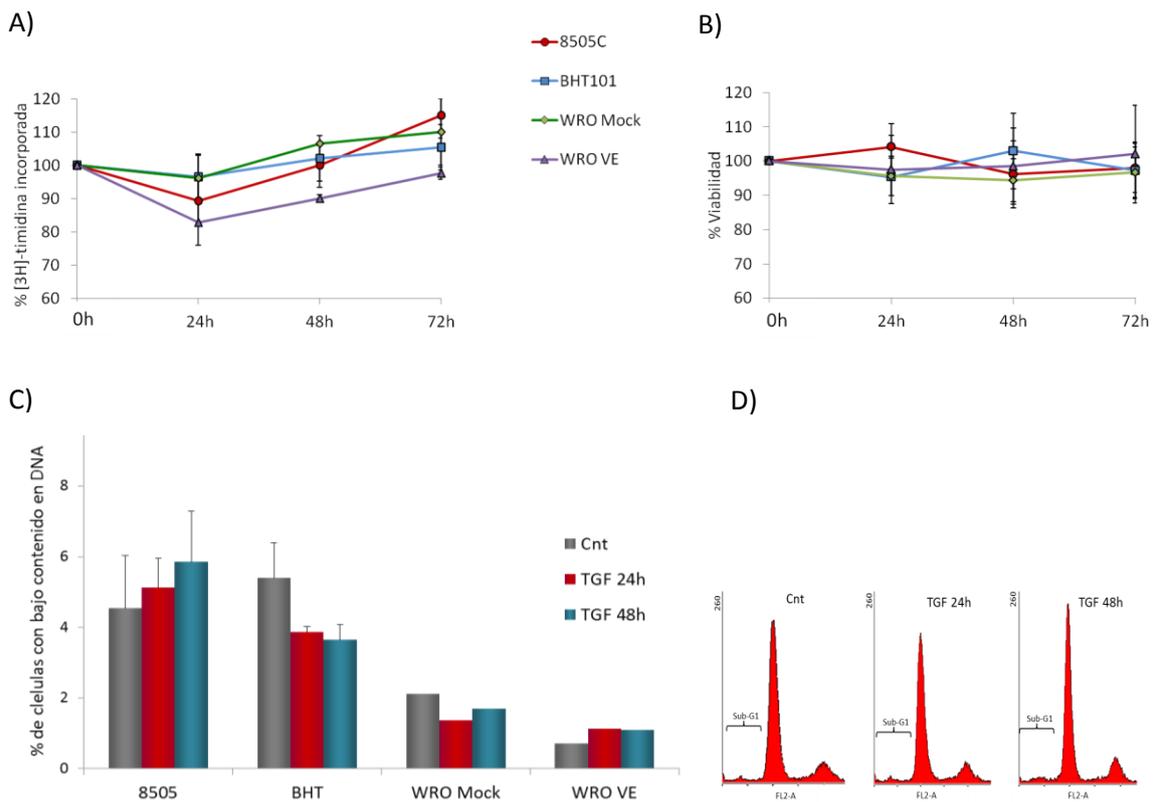


Figura 50. El tratamiento con TGFβ no afecta a la proliferación celular y no produce apoptosis. A) y B) Las células 8505C, BHT101, WRO Mock y WRO VE se sembraron en placas de 12 pocillos y se incubaron en ausencia o presencia de 5 ng/mL TGFβ durante 24, 48 y 72h. A continuación, se realizaron ensayos de incorporación de timidina tritiada (A) y de viabilidad celular mediante MTT (B). Los datos fueron relativizados frente a las células controles sin tratar. C) Las células 8505C, BHT101, WRO Mock y WRO VE se sembraron en placas de 6 pocillos y se incubaron en ausencia o presencia de TGFβ durante 24 y 48h. A continuación, se determinó el porcentaje de muerte celular mediante el análisis de la población sub-G1 hipoploide por citometría de flujo. Los datos representados corresponden a la media ± ESM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. D) Histogramas representativos del ciclo celular por marcaje con ioduro de propidio en las células 8505C.

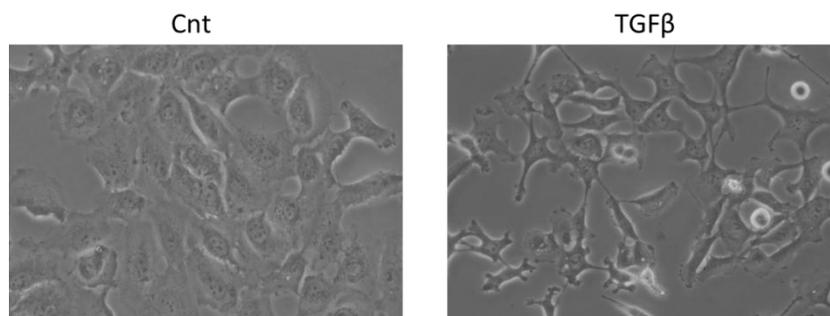


Figura 51. TGFβ produce cambios morfológicos característicos de la EMT en las células BHT101. Las células BHT101 se sembraron en placas de 6 pocillos y se incubaron en medio suplementado con 10% FBS, en ausencia o presencia de 5ng/mL TGFβ. 48h después se fotografiaron en un microscopio óptico de contraste de fases a un aumento de 10x.

A continuación, estudiamos si los cambios morfológicos producidos por el TGFβ se traducían en alteraciones en la expresión de Snail1 y E-cadherina en las líneas celulares portadoras del mutante ^{V600E}B-RAF, 8505C y BHT101. Como control de la actividad de TGFβ determinamos los niveles de fosforilación de Smad2 mediante *western blot* y observamos que el TGFβ activaba

este factor de transcripción a las 24h de tratamiento (figuras 52A y C). Además, el TGF β también produjo un aumento considerable en los niveles de Snail1 en ambas líneas celulares (figuras 52A y C). Para determinar el efecto del TGF β sobre E-cadherina, puesto que los niveles de esta proteína en las células 8505C eran indetectables, usamos únicamente la línea celular BHT101. En estas células observamos que el TGF β producía una notable disminución en la expresión de E-cadherina frente a las células no tratadas (figura 52C). Estos datos, los corroboramos con el estudio de los niveles de ARNm de ambas proteínas. Como se representa en las figuras 52B y E, el tratamiento con TGF β provocó un aumento de los niveles de ARNm de Snail1 de aproximadamente 5 veces con respecto a las células control en ambas líneas celulares. Por otra parte, el mismo tratamiento disminuyó los niveles de E-cadherina en un 80% en células BHT101 frente a las células sin tratar (figura 52D). Finalmente, mediante análisis por microscopía de fluorescencia, confirmamos estos datos, ya que observamos el efecto contrapuesto que ejerce el TGF β sobre Snail1 y E-cadherina en ambas líneas celulares (figura 53). Estos datos, demuestran que TGF β puede inducir la EMT en células tumorales tiroideas a través de la regulación de Snail1 y E-cadherina.

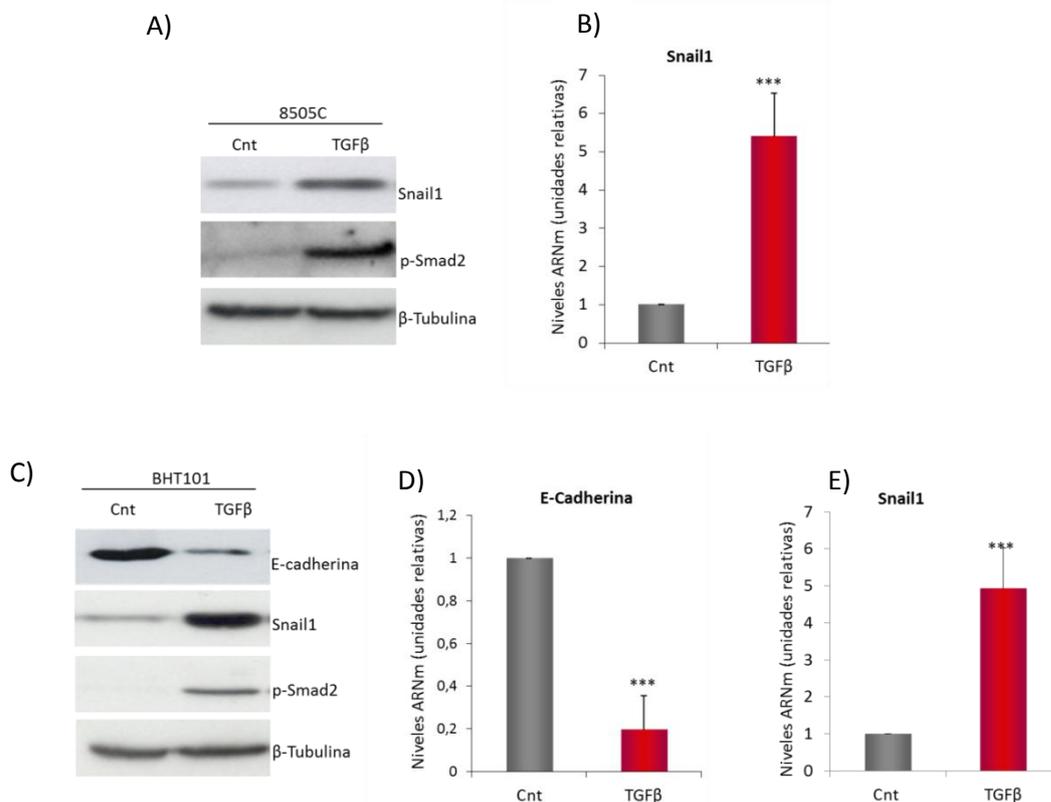


Figura 52. TGF β aumenta Snail1 e inhibe E-cadherina. Las células 8505C y las células BHT101 se incubaron en medio suplementado con 10% FBS en presencia o ausencia de 5ng/mL TGF β . A) y C) Tras 24h de tratamiento, se preparon extractos totales de las células 8505 (A) y de las células BHT101 (C) y posteriormente se detectaron los niveles de E-cadherina, Snail1, p-Smad2 y β -Tubulina mediante *western blot*. Los datos corresponden a un experimento representativo realizado 3 veces con resultados similares. B), D) y E) Tras 24h de tratamiento se aisló el ARN total de las células 8505C (B) y de las células BHT101 (D) y E) y se analizaron los niveles de ARNm de E-cadherina y Snail1 mediante PCR a tiempo real. Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. Los resultados mostrados corresponden a las medias \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *** 0,001>p

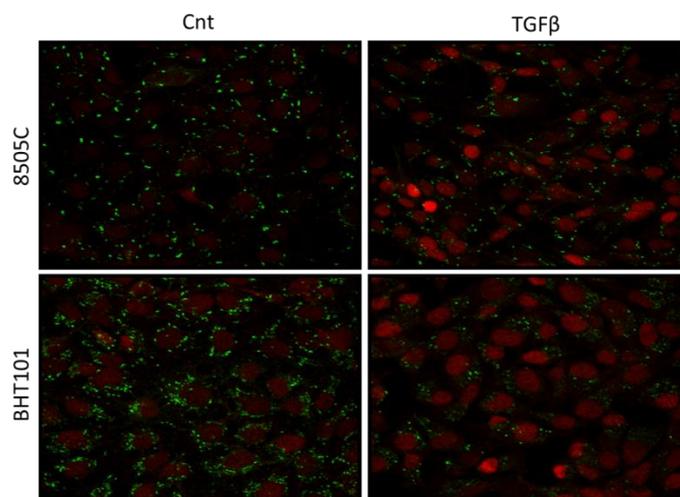


Figura 53. El aumento de Snail1 por TGFβ es paralelo a la disminución de E-cadherina. Las células 8505C y BHT101 se incubaron con 5 ng/mL TGFβ durante 24h. A continuación, se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron con un anticuerpo anti Snail1 (rojo) y con otro anti E-cadherina (verde). Posteriormente se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios marcados con un fluoróforo según se describe en el apartado Materiales y Métodos. Finalmente, las células se analizaron en el microscopio confocal de fluorescencia.

Dado que previamente habíamos demostrado que ^{V600E}B-RAF disminuye los niveles de E-cadherina a través de la expresión de Snail1, también quisimos comprobar que la disminución de E-cadherina observada por el tratamiento con TGFβ se debía a un aumento de la expresión de Snail1. Para ello, determinamos los niveles de E-cadherina en las células BHT101 transfectadas con un siRNA específico para Snail1 y posteriormente incubadas sin o con TGFβ. Como habíamos demostrado anteriormente, el silenciamiento de Snail1 aumenta la expresión de E-cadherina pero, además, revierte la disminución producida por TGFβ (figura 54A). Este resultado se confirmó con el estudio de los niveles del ARNm de E-cadherina. La figura 54B muestra como los resultados observados mediante PCR a tiempo real se reproducen respecto a los observados en el *western blot*, por lo que podemos afirmar que el TGFβ también regula la expresión de E-cadherina a través de Snail1.

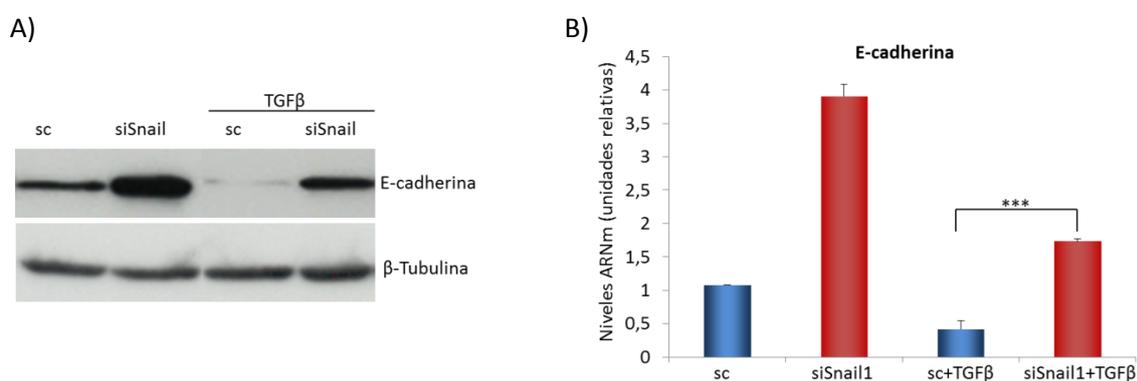


Figura 54: TGFβ regula la expresión de E-cadherina a través de Snail1. Las células BHT101 se transfectaron con un siRNA control (sc) o con siRNA específico para Snail1. Pasadas 48h se trató a las células con 5ng/mL TGFβ durante 24h. A) Se prepararon extractos celulares y se analizaron los niveles de E-cadherina mediante *western blot*. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo realizado 3 veces con resultados similares. B) Se aisló el ARN total y se analizaron los niveles de ARNm de E-Cadherina mediante PCR a tiempo real. Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. Los resultados mostrados corresponden a las medias ± ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *** 0,001>p

Posteriormente, para verificar la participación de TGF β en la EMT, analizamos la expresión de otros marcadores mesenquimales como son la fibronectina y la vimentina. En la figura 54, se observa una diferencia notable en la expresión de vimentina entre las células 8505C y BHT101 en condiciones basales, ya que mientras que las células 8505C presentan unos niveles muy altos, las células BHT101 tienen unos niveles muy bajos, indicativos del fenotipo más epitelial de estas últimas. Por otra parte, el tratamiento con TGF β no modificó la expresión de esta proteína en ninguna de las dos líneas celulares. Sin embargo, la cantidad de Fibronectina sí se vio afectada por TGF β , ya que su presencia aumentó considerablemente la expresión de fibronectina en ambas líneas celulares (figura 55). Estos datos confirman que TGF β induce la EMT en las células 8505C y BHT101.

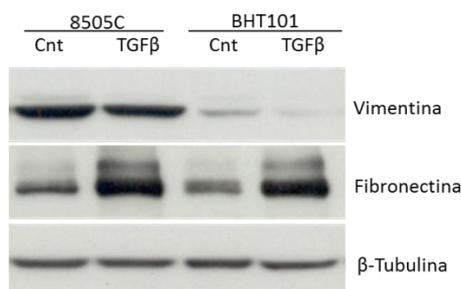


Figura 55. TGF β aumenta los niveles Fibronectina en células 8505C y BHT101. Las células 8505C y las células BHT101 se incubaron en presencia o ausencia de 5ng/mL TGF β . Tras 24h de tratamiento, se prepararon extractos totales de ambos tipos celulares y se detectaron los niveles de Vimentina, Fibronectina y β -Tubulina mediante *western blot*. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo realizado 3 veces con resultados similares.

2.3. Efecto de TGF β sobre la migración celular

A continuación, analizamos si los efectos producidos por el tratamiento con TGF β sobre las proteínas implicadas en la EMT se correspondían con variaciones en la capacidad migratoria e invasiva de las células 8505C y BHT101. Para ello, estimulamos las células con TGF β y analizamos la migración y la invasión celular. El tratamiento con TGF β provocó un aumento en la migración de aproximadamente un 40% en las células 8505C y del 30% en las células BHT101, frente a las respectivas células control sin tratar (figura 56A y B), mientras que la invasión no se modificó en ninguno de los tipos celulares (datos no mostrados). Asimismo, confirmamos este resultado en células 8505C mediante el ensayo de migración en dos dimensiones "cierre de herida", donde observamos que tras 16 horas de incubación con TGF β disminuyó la anchura de la misma, indicando un aumento de la migración celular (figura 56C). Por último, comprobamos el efecto del TGF β sobre la migración de las células WRO Mock y WRO VE. El tratamiento con TGF β no aumentó ni la migración ni la invasión en células WRO Mock y, únicamente, aumentó la migración en las células WRO VE (figura 57), indicando una posible cooperación entre TGF β y V^{600E} B-RAF en el aumento de la migración celular.

En resumen, todos estos datos demuestran que TGF β favorece el desarrollo tumoral, induciendo la EMT, a través del aumento de expresión de marcadores mesenquimales como Snail1 y Fibronectina y la represión de marcadores epiteliales como E-cadherina, lo que se

traduce en un aumento de la migración celular. Por último, también hemos mostrado una posible cooperación entre TGFβ y ^{V600E}B-RAF en la inducción de la migración celular.

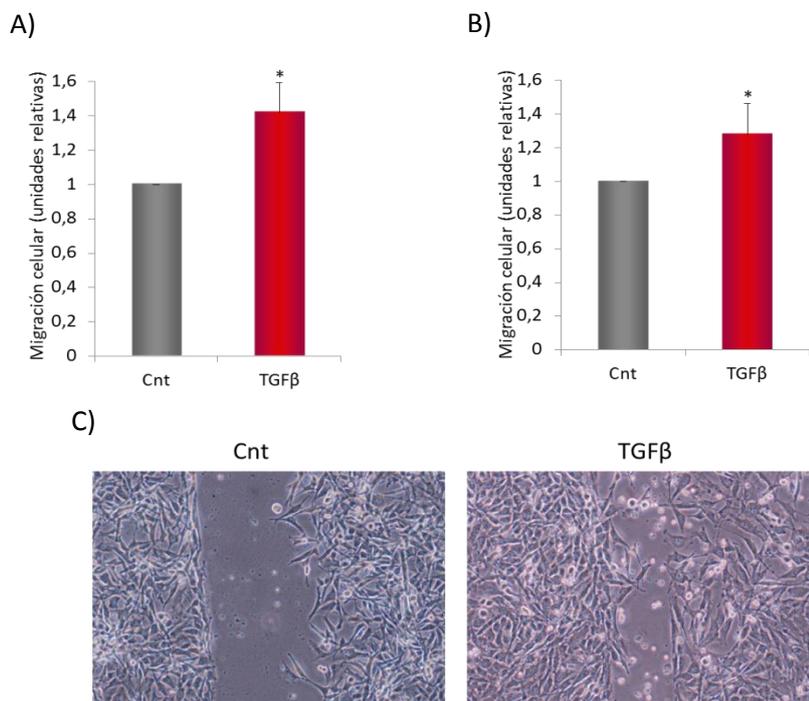


Figura 56. TGFβ aumenta la migración en las células 8505C y BHT101. A) y B) Las células 8505C (A) y BHT101 (B) se incubaron durante 24h en presencia o ausencia de 5 ng/mL TGFβ. Posteriormente las células se tripsinizaron, se resuspendieron con medio libre de FBS y se sembraron en cámaras *transwells*. Las células se incubaron durante 24h y posteriormente se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y finalmente se fotografiaron 3 campos de cada condición para proceder a su recuento. Los resultados mostrados corresponden a las medias ± ESM de tres experimentos realizados por duplicado. *0,05>p C) Las células 8505C se sembraron en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 85-90%. A continuación, se cambio el medio al 10% FBS por medio libre de suero y se raspó la superficie celular con una punta de pipeta. Las fotografías se realizaron 16h después y muestran un experimento representativo realizado 3 veces con resultados similares.

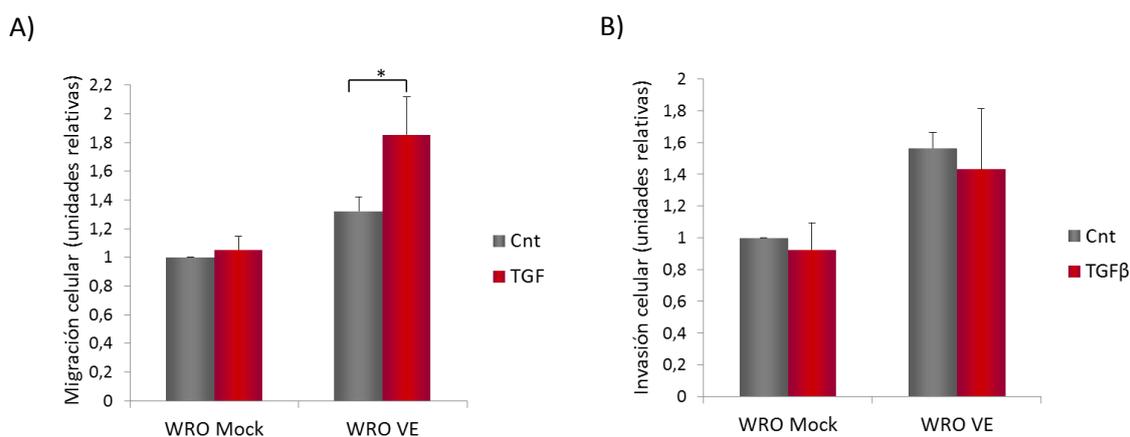


Figura 57 . TGFβ únicamente aumenta la migración en las células con WRO VE. Las células WRO Mock y WRO VE se incubaron en presencia o ausencia de 5 ng/mL TGFβ durante 24h. Posteriormente las células se tripsinizaron, se resuspendieron con medio libre de FBS y se sembraron en cámaras *transwells* o pocillos con *matrigel* para realizar los ensayos de migración (A) e invasión (B) respectivamente. Las células se incubaron durante 24h y posteriormente se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y finalmente se fotografiaron 3 campos de cada condición para proceder a su recuento. Los resultados mostrados corresponden a las medias ± ESM de tres experimentos realizados por duplicado. *0,05>p

3. IMPLICACIÓN DE LA SECRECIÓN DE TGF β MEDIADA POR ^{V600E}B-RAF EN EL CÁNCER DE TIROIDES

Hasta el momento hemos demostrado que ^{V600E}B-RAF y TGF β , favorecen la progresión tumoral mediante la inducción de la EMT y el aumento de la migración celular. Además, también hemos observado una posible relación entre ellos. Por ello, a continuación estudiamos la posibilidad de que ^{V600E}B-RAF estuviera regulando los niveles de TGF β secretados al medio y que de esta manera modulara la migración celular.

3.1 Niveles de TGF β en las líneas WRO, 8505C y BHT101

En primer lugar, comprobamos si existían diferencias entre los niveles de TGF β secretados por las células que expresan ^{WT}B-RAF y los niveles de TGF β secretados por las células que expresan el mutante ^{V600E}B-RAF. Para ello, incubamos las células WRO, 8505C y BHT101 en ausencia de suero y, posteriormente, analizamos la concentración de TGF β acumulada en el medio de cultivo durante 24h mediante inmunoensayo. Como se observa en la figura 58, los niveles de TGF β secretados por las células 8505C y BHT101 (^{V600E}B-RAF) son alrededor de 6 veces más altos que los niveles correspondientes a las células WRO (^{WT}B-RAF), lo que sugiere una relación entre la expresión de ^{V600E}B-RAF y la secreción de TGF β .

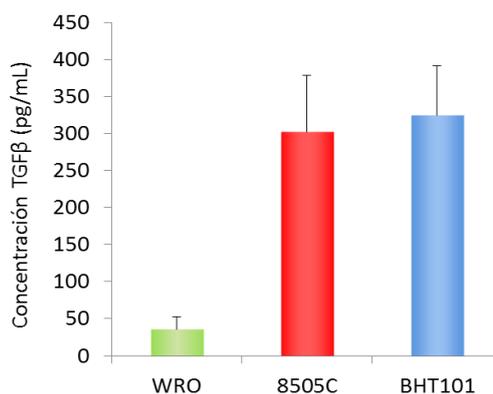


Figura 58. Las células con ^{V600E}B-RAF (8505C y BHT101) secretan mayor cantidad de TGF β que las células que expresan ^{WT}B-RAF (WRO). Las células WRO, 8505C y BHT101 se incubaron durante 24h en medio libre de FBS. Posteriormente se recogieron los sobrenadantes y se realizó la detección de los niveles de TGF β activo mediante ELISA. Los niveles de TGF β fueron normalizados con los valores de proteína total y relativizados frente al control. Los resultados mostrados corresponden a las medias \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

3.2. Papel de ^{V600E}B-RAF en la secreción de TGF β

Para analizar si ^{V600E}B-RAF estaba implicado en la secreción de TGF β , estudiamos el efecto de la inhibición de B-RAF sobre la secreción de TGF β en las líneas celulares 8505C y BHT101. En la figura 59A observamos que el silenciamiento de B-RAF en ambas líneas celulares disminuyó los niveles de TGF β activo secretado al medio aproximadamente un 30% respecto a las células transfectadas con un oligo control (sc). Por otra parte, la incubación con los inhibidores PLX4720 y U0126 también disminuyó significativamente los niveles de TGF β secretados en ambas líneas celulares entre un 30-50% (figura 59B).

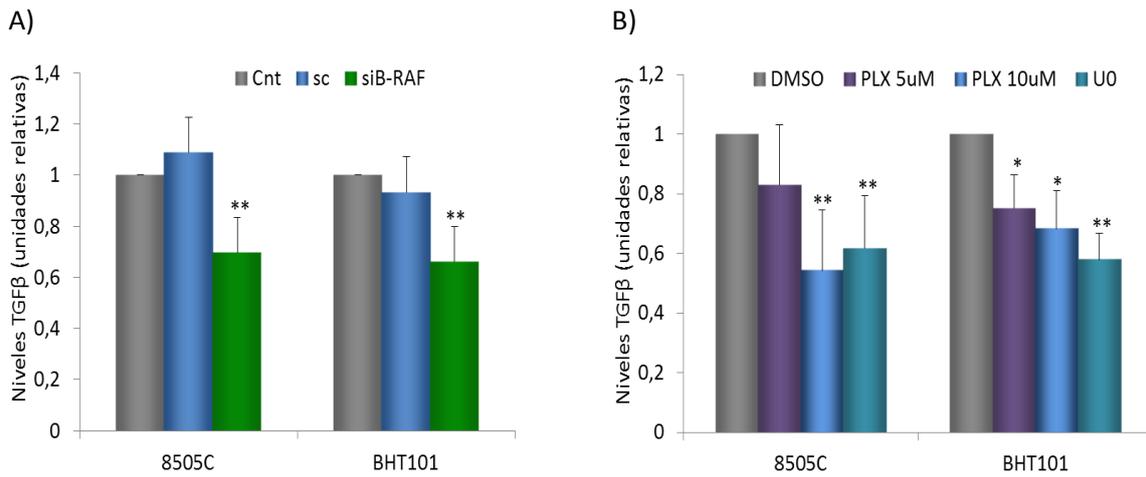


Figura 59. La inhibición de ^{V600E}B-RAF en células 8505C y BHT101 reduce la secreción de TGFβ activo. A) Las células 8505C y BHT101 se transfectaron con un siRNA control (sc) o con un siRNA específico para B-RAF (siB-RAF). Pasadas 48h las células se incubaron en medio libre de FBS durante 24h y a continuación se recogieron los sobrenadantes para realizar la detección de TGFβ activo mediante ELISA. Los niveles de TGFβ fueron normalizados con los valores de proteína total y relativizados frente al control. *0,05>p; **0,01>p>0,001 frente a sc. B) Las células se incubaron durante 24h en medio libre de FBS en presencia o ausencia de DMSO, 5μM PLX4720, 10μM PLX4720 o 10 μM de U0126. Posteriormente se recogieron los sobrenadantes y se realizó la detección de los niveles de TGFβ activo mediante ELISA. Los niveles de TGFβ fueron normalizados con los valores de proteína total y relativizados frente al control. *0,05>p; **0,01>p>0,001. Los resultados mostrados corresponden a las medias ± ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado

Por último, para confirmar que ^{V600E}B-RAF producía un aumento de la secreción de TGFβ, realizamos experimentos similares en las células WRO Mock y WRO VE (figura 60). Los datos obtenidos demostraron que las células WRO VE secretaban aproximadamente el doble de TGFβ al medio que las células control WRO Mock. Además, observamos que los tratamientos con PLX4720 o U0126 no modificaron los niveles de TGFβ secretados por las células WRO control, mientras que en las células WRO VE ambos inhibidores revirtieron el aumento de TGFβ producido por la sobreexpresión de ^{V600E}B-RAF (figura 60).

Estos resultados demuestran que ^{V600E}B-RAF aumenta la secreción de TGFβ a través de la vía MEK-ERK en las células tumorales tiroideas.

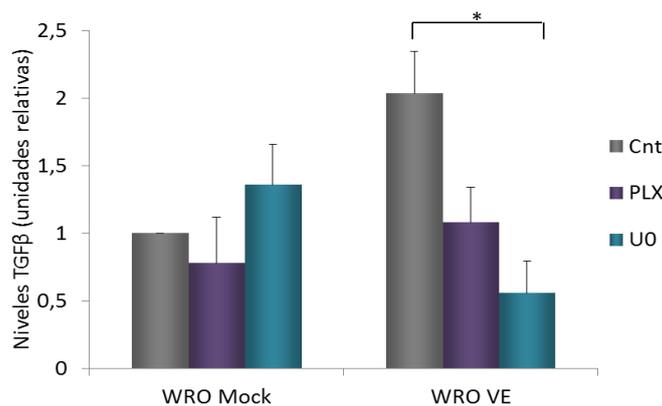


Figura 60: ^{V600E}B-RAF aumenta los niveles de TGFβ activo a través de MEK-ERK. Las células WRO Mock y WRO VE se incubaron con medio libre de suero durante 24h, en presencia o ausencia de DMSO, 10μM PLX4720 o 10 μM U0126. Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes y se realizó la detección de los niveles de TGFβ activo mediante ELISA. Los niveles de TGFβ fueron normalizados con los valores de proteína total y relativizados frente a las células control sin tratar. Los resultados mostrados corresponden a las medias ± ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *0,05>p

4. COOPERACIÓN ENTRE ^{V600E}B-RAF Y TGFβ EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE TIROIDES

Una vez observado que ^{V600E}B-RAF aumentaba la secreción de TGFβ, estudiamos si este aumento tenía algún efecto sobre la migración e invasión celular. Para ello, determinamos estos procesos en las células WRO Mock y WRO VE tratadas con el inhibidor del receptor tipo I de TGFβ SB-431542. En la figura 61A observamos como dicho inhibidor bloqueó el aumento de fosforilación de Smad2 producido por TGFβ. Por otra parte, observamos que el tratamiento de las células WRO VE con SB-431542 no produjo diferencias significativas ni en la migración (figura 61B) ni en la invasión celular (figura 61C) respecto a las células WRO VE sin tratar.

A partir de estos resultados, podemos afirmar que el aumento de los niveles de TGFβ producido por el mutante ^{V600E}B-RAF no es el mecanismo principal por el que este oncogén induce los procesos de migración e invasión celular en estas células. Sin embargo, nuestros datos indicaban una relación entre los efectos de TGFβ y ^{V600E}B-RAF, por lo que nos planteamos estudiar si ^{V600E}B-RAF estaba mediando de algún modo la señalización y los efectos de TGFβ.

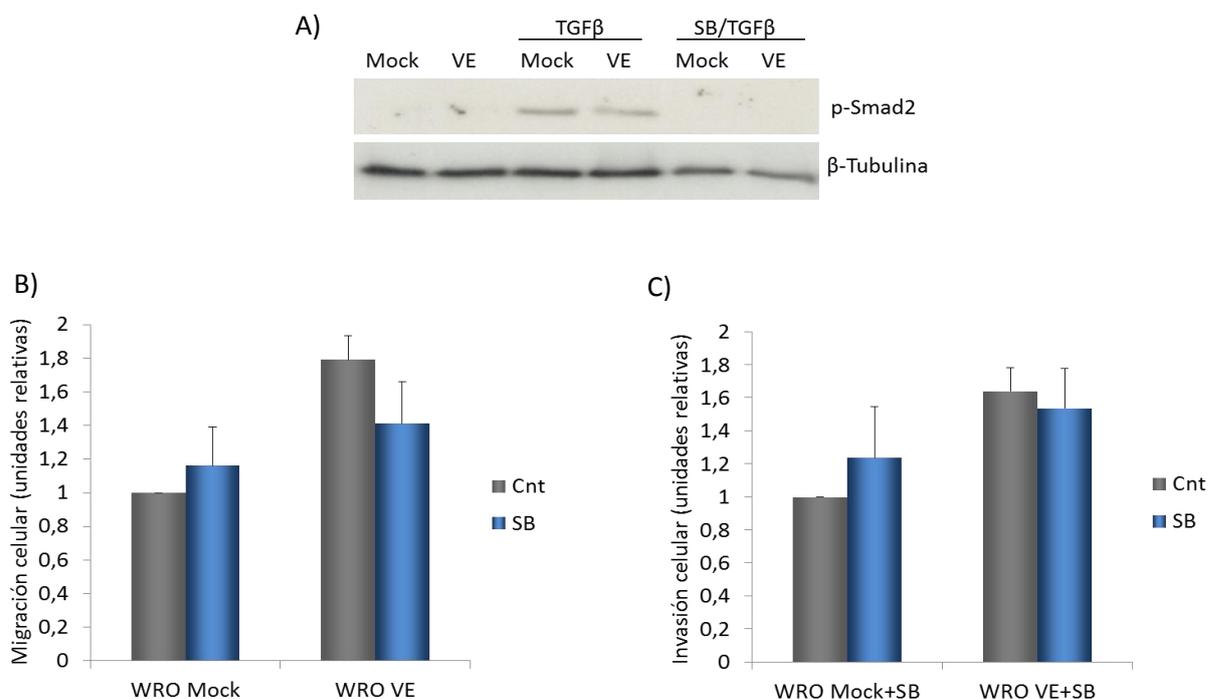


Figura 61: ^{V600E}B-RAF no aumenta ni la migración ni la invasión a través de la secreción de TGFβ. Las células WRO Mock y WRO VE se incubaron en presencia o ausencia de 10 μM SB-431542 y 1h más tarde se trataron con 5ng/mL TGFβ durante 24h. A) Se realizaron extractos celulares y se detectaron los niveles de p-Smad2 y β-tubulina mediante *western blot*. B) y C) Las células se tripsinizaron, se resuspendieron con medio libre de FBS y se sembraron en cámaras *transwells* o pocillos con *matrigel* para analizar la migración (B) y la invasión (C) celular respectivamente. Las células se incubaron durante 24h y posteriormente se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y finalmente se fotografiaron 3 campos de cada condición para proceder a su recuento. Los resultados mostrados corresponden a las medias ± ESM de tres experimentos realizados por duplicado.

4.1. Papel de ^{V600E}B-RAF en la regulación de E-cadherina y Snail1 mediada por TGFβ

A continuación, estudiamos si ^{V600E}B-RAF influía en los efectos de TGFβ sobre la regulación de Snail1 y E-cadherina. Para ello, en primer lugar, determinamos los niveles de estas proteínas mediante *western blot* en células control o tratadas con TGFβ, en las que previamente inhibimos la expresión de B-RAF con siRNA. Como control de la actividad de TGFβ determinamos los niveles de fosforilación de Smad2. Como cabía esperar, los niveles de Smad2 fosforilado aumentaron tras el tratamiento de TGFβ en ambas líneas celulares (figura 62A y B). Sin embargo, al inhibir la expresión de B-RAF observamos diferencias entre ambas líneas celulares, mientras que en las células 8505C el silenciamiento de B-RAF no modificó los niveles de fosforilación de Smad2 frente a sus controles (figura 62A), en las células BHT101 vimos como la inhibición de la expresión de B-RAF causó una disminución de la fosforilación de Smad2 inducida por TGFβ (figura 62B). Por otro lado, los datos obtenidos muestran que la inhibición de la expresión B-RAF disminuyó los niveles basales de Snail1 en las dos líneas celulares de una forma similar a como habíamos demostrado anteriormente usando el inhibidor PLX4720 (figura 62A y B). Además, observamos que el silenciamiento de B-RAF revirtió el aumento de Snail1 inducido por TGFβ (figura 62A y B). Por otra parte, en las células BHT101 el efecto del silenciamiento de B-RAF sobre Snail1 se corresponde con un aumento de los niveles basales de E-cadherina, y además revirtió la inhibición de su expresión producida por TGFβ (figura 62B). En el caso de las células 8505C, también se observa como el silenciamiento de B-RAF aumentó los niveles de E-cadherina; sin embargo, al no expresar E-cadherina basalmente, los efectos de TGFβ sobre esta proteína no se pudieron determinar (figura 62A).

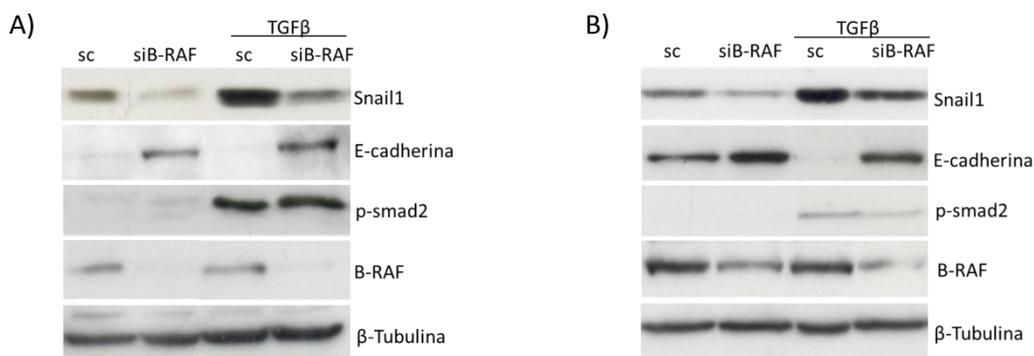


Figura 62: ^{V600E}B-RAF participa en la EMT inducida por TGFβ. Las células 8505C (A) y BHT101 (B) se transfectaron con siRNA control (sc) o con siRNA de B-RAF (siB-RAF). Pasadas 48h se trataron con 5ng/mL TGFβ durante 24h. Posteriormente, se realizaron extractos celulares y se detectaron los niveles de Snai1, E-cadherina, p-Smad2, B-RAF y β-Tubulina mediante *western blot*. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo realizado 3 veces con resultados similares.

A continuación, analizamos si estos efectos se correspondían con variaciones en los niveles de ARNm de Snail1 y de E-cadherina en ambos tipos celulares (figura 63). En las figuras 63A y B podemos observar como en ambas líneas celulares, al igual que habíamos observado con los niveles de proteína, el silenciamiento de B-RAF disminuyó el aumento del ARNm de Snail1 producido por TGFβ (figura 63A y B). Sin embargo, el silenciamiento de B-RAF únicamente

E-cadherina en las células sin estimular y en las células estimuladas con TGFβ (figura 64A). Finalmente, al igual que ocurría con el silenciamiento de B-RAF en este tipo celular, ninguno de los inhibidores redujo el aumento de la fosforilación de Smad2 producido por TGFβ (figura 64A). En cuanto a los niveles basales de ARNm de Snail1, únicamente el inhibidor PLX4720 produjo una disminución de éstos; sin embargo, ambos inhibidores disminuyeron el aumento de ARNm producido por TGFβ (figura 64B). Por otra parte, observamos como la inhibición de ^{V600E}B-RAF o MEK aumentó los niveles de E-cadherina en condiciones basales y en células tratadas con TGFβ (figura 64C).

Todos estos datos muestran que TGFβ aumenta la expresión de Snail1 e inhibe la expresión de E-cadherina a través de un mecanismo dependiente de la vía B-RAF/MEK/ERK.

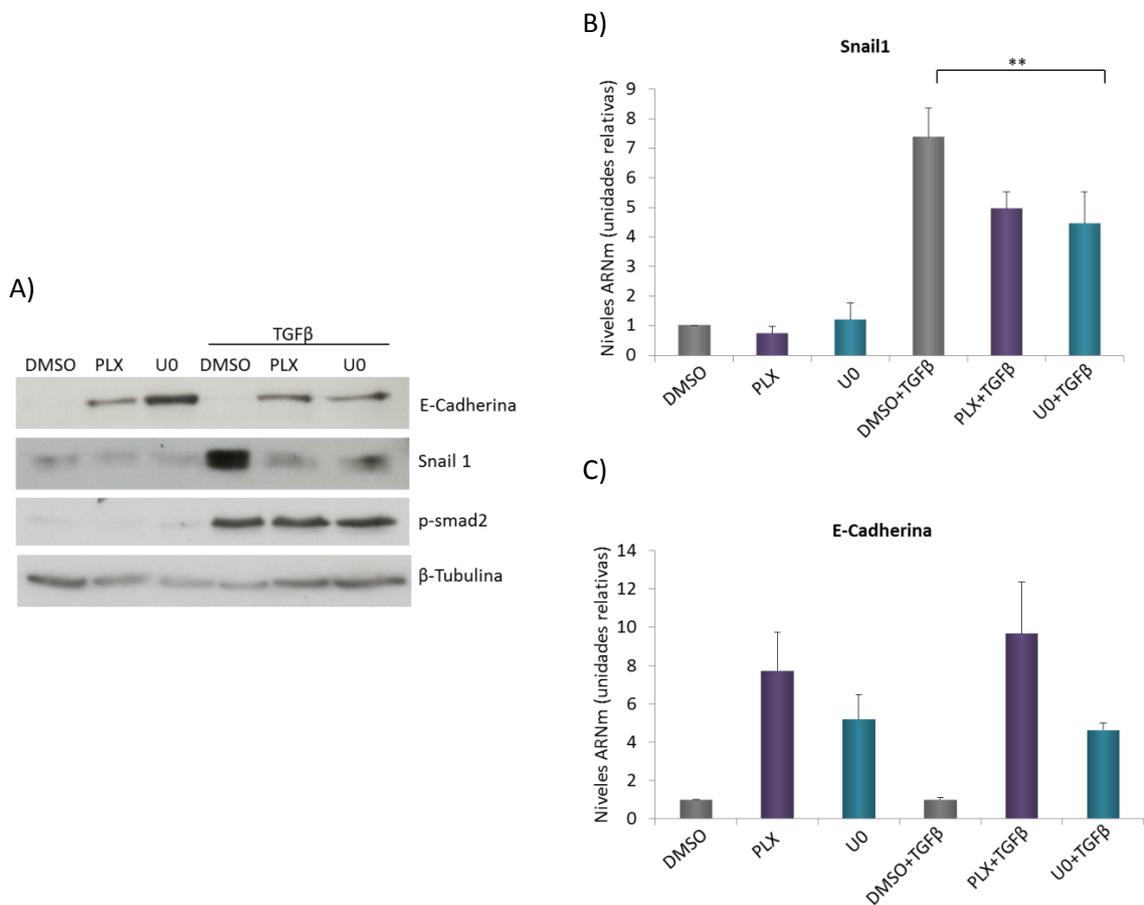


Figura 64. Los inhibidores PLX4720 y U0126 inhiben la señalización mediada por TGFβ. Las células 8505C se incubaron en presencia o ausencia de 5μM PLX4720 o 10μM U0126 y 1h más tarde se estimularon con 5ng/mL TGFβ durante 24h. A) Se prepararon extractos celulares y se determinaron los niveles de las proteínas indicadas mediante *western blot*. B) y C) Pasadas 24h se aisló el ARN total y se analizaron los niveles de ARNm de E-cadherina (B) y Snail1 (C) mediante PCR a tiempo real. Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. Los resultados mostrados corresponden a las medias ± ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **0,01>p

4.2. Papel de ^{V600E}B-RAF en el aumento de la migración celular mediada por TGFβ

Dado que el TGFβ aumenta la migración celular y, además, que la vía ^{V600E}B-RAF-MEK-ERK es necesaria para la señalización mediada por TGFβ, el siguiente objetivo que nos planteamos fue analizar el efecto de la inhibición de ^{V600E}B-RAF sobre la migración celular inducida por TGFβ. Para ello, realizamos ensayos de migración celular en células pretratadas con PLX4720 o U0126 e incubadas con TGFβ. Como esperábamos, el tratamiento con ambos inhibidores disminuyó la migración en condiciones basales y el TGFβ la aumentó en ambas líneas celulares respecto a las células control; además, este aumento se revirtió en células pretratadas con PLX4720 o U0126 y posteriormente estimuladas con esta citoquina (figuras 65A y B).

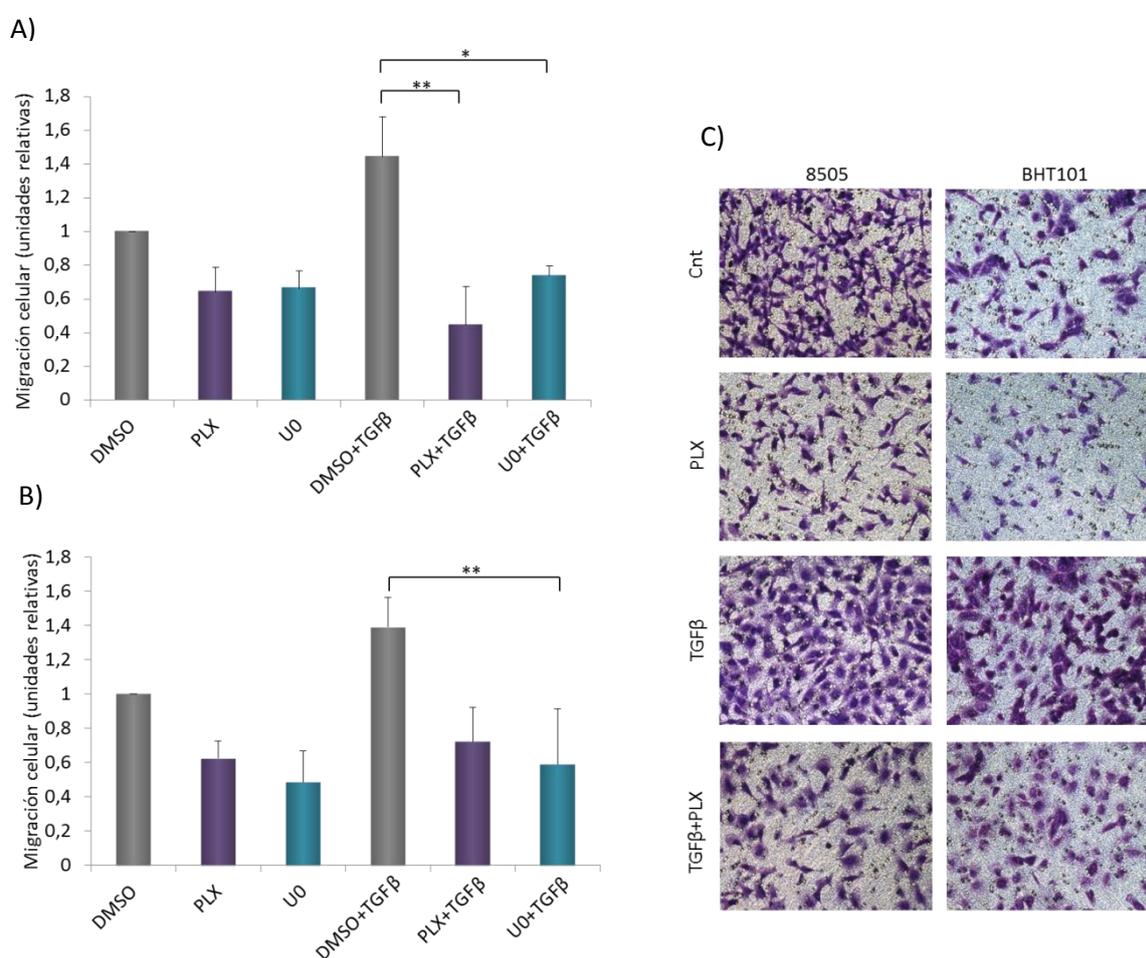


Figura 65. ^{V600E}B-RAF es necesario para el aumento de la migración celular inducido por TGFβ. Las células 8505C (A) y las células BHT101 (B) se trataron con 5μM PLX4720 o 10μM U0126 y una hora más tarde se estimularon con 5ng/mL TGFβ durante 24h. Posteriormente, las células se tripsinizaron, se resuspendieron con medio libre de FBS y se sembraron en cámaras *transwells* en ausencia o presencia de los inhibidores y TGFβ. Las células se incubaron durante 24h y posteriormente se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y finalmente se fotografiaron 3 campos de cada condición para proceder a su recuento. Los resultados mostrados corresponden a las medias ± ESM de tres experimentos realizados por duplicado. * 0.05>p; ** 0,01>p. C) Imágenes de las células que han migrado durante 24h con los distintos tratamientos. Las fotografías son representativas de 3 campos por experimento y de 3 experimentos independientes.

Por último, analizamos si este efecto se reproducía en las células WRO Mock y WRO VE. En este caso, observamos que el aumento de la migración de las células WRO VE producido por TGF β fue bloqueado por el PLX4720 (figura 66), demostrando así, la necesidad por parte de las células de cáncer de tiroides, de contener la mutación V^{600E} B-RAF para que TGF β pueda aumentar la migración celular.

Todos estos datos demuestran que existe una cooperación entre TGF β y la vía RAF-MEK-ERK donde TGF β requiere a V^{600E} B-RAF para inducir la EMT y favorecer la migración celular en células derivadas de carcinoma tiroideo.

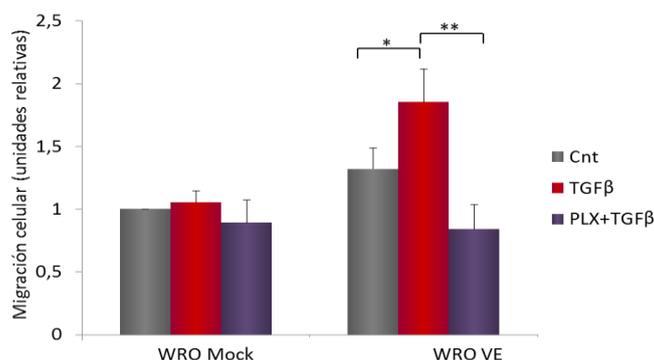


Figura 66. TGF β aumenta la migración de células con V^{600E} B-RAF. Las células WRO Mock y WRO VE se incubaron en ausencia o presencia de 5 μ M PLX4720 y una hora más tarde se estimularon con 5ng/mL TGF β durante 24h. Posteriormente, las células se tripsinizaron, se resuspendieron con medio libre de FBS y se sembraron en cámaras *transwells* en ausencia o presencia del inhibidor y TGF β . Las células se incubaron durante 24h y posteriormente se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y finalmente se fotografiaron 3 campos de cada condición para proceder a su recuento. Los resultados mostrados corresponden a las medias \pm ESM de tres experimentos realizados por duplicado. * 0.05>p; **0,01>p

5. PAPEL DE V^{600E} B-RAF y TGF β EN LA REGULACIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA MIGRACIÓN CELULAR

Una vez demostrado que TGF β regula la EMT y la migración de las células tumorales tiroideas a través de V^{600E} B-RAF, el siguiente objetivo que nos planteamos fue estudiar si alguna de las proteínas que pueden participar en estos procesos ejerce su acción a través de TGF β y/o V^{600E} B-RAF.

5.1. Papel de ILK en la EMT regulada por V^{600E} B-RAF y TGF β

Una de las proteínas que más se ha relacionado con la progresión del cáncer y con la EMT en los últimos 10 años es la Quinasa Ligada a Integrinas (ILK). Además, esta quinasa regula los niveles de Snail1. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue estudiar si V^{600E} B-RAF y/o TGF β podían regular Snail1 y, por tanto E-cadherina, a través de ILK.

En primer lugar, determinamos el efecto de TGF β sobre los niveles de expresión de ILK mediante *western blot* y PCR a tiempo real. Los resultados que obtuvimos demuestran que el tratamiento con TGF β de las células 8505C y BHT101, aumentó los niveles de proteína de ILK respecto a las células control sin tratar (figura 67A y C). Además, este resultado se confirmó

analizando los niveles de ARNm, donde observamos que el TGF β también produjo un incremento de 3 veces en la expresión de ILK (figura 67B y D).

A continuación, estudiamos si el aumento de ILK también estaba mediado por ^{V600E}B-RAF. Para ello, determinamos los niveles de ILK mediante *western blot* y PCR a tiempo real en las células 8505C y BHT101 incubadas sin o con TGF β , en ausencia o presencia del inhibidor PLX4720. En las figuras 68A y B se muestra como el tratamiento con PLX4720 disminuyó los niveles basales de ILK y revirtió el aumento de ILK producido por TGF β . Sin embargo, sorprendentemente, al analizar los niveles basales del ARNm de ILK no observamos una disminución tras el tratamiento con PLX4720 (figura 68C y D), indicando una posible regulación postraduccional de ILK mediada por la actividad de ^{V600E}B-RAF. Sin embargo, sí observamos que el PLX4720 revirtió el aumento de ILK producido por TGF β en las células 8505C (figura 68C), mientras que no tuvo ningún efecto en el aumento producido por TGF β en las células BHT101 (figura 68D).

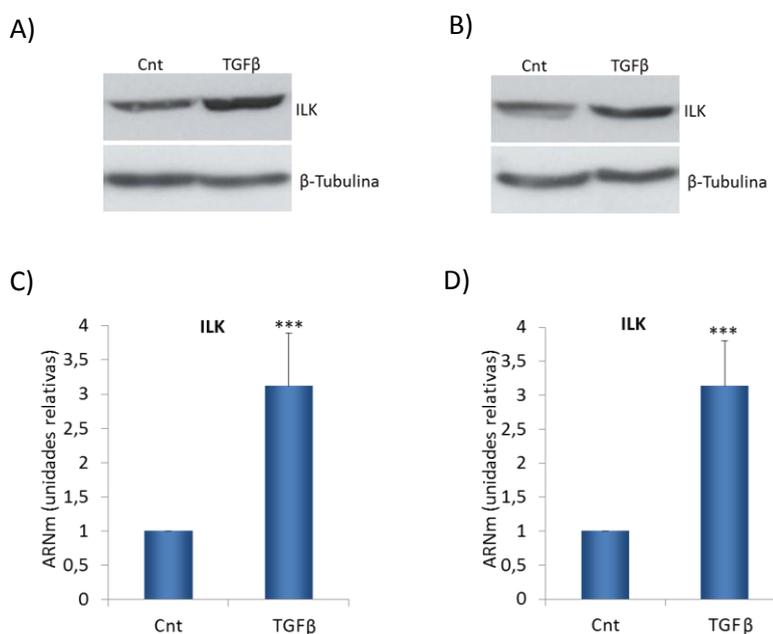


Figura 67. TGF β aumenta la expresión de ILK. A) y B) Las células 8505C (A) y las células BHT101 (B) se incubaron en presencia o ausencia de 5ng/mL TGF β durante 24h. A continuación, se prepararon extractos celulares y se detectaron los niveles de ILK y β -Tubulina mediante *western blot*. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo realizado 3 veces con resultados similares. C) y D) Tras 24h de tratamiento, se aisló el ARN total de las células 8505C (C) y las células BHT101 (D) y se analizaron los niveles de ARNm de ILK mediante PCR a tiempo real. Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. Los resultados mostrados corresponden a las medias \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *** 0,001 > p

A continuación, para analizar si ILK participaba en la EMT inducida por TGF β , estudiamos si TGF β regulaba los niveles de Snail1 y E-cadherina a través de ILK. Para ello, silenciamos ILK mediante siRNA en las células 8505C y BHT101 y posteriormente las incubamos con o sin TGF β . Los resultados mostrados en la figura 68A y B demuestran que la inhibición de la expresión de ILK (silILK) no modificó los niveles de Snail1 y E-cadherina, en ausencia o en presencia de TGF β . Por otra parte, también analizamos los niveles de la fosforilación de la Serina 9 de GSK3- β y observamos que ésta se encuentra constitutivamente fosforilada en ambos tipos celulares indicando que el silenciamiento de la expresión de ILK y el tratamiento con TGF β no modifican esta fosforilación (figura 69A y B). Este hecho demuestra que otra u otras quinasas son

responsables de esta fosforilación y que otros mecanismos distintos de ILK y GSK3-β regulan los niveles de Snail1 en estas células.

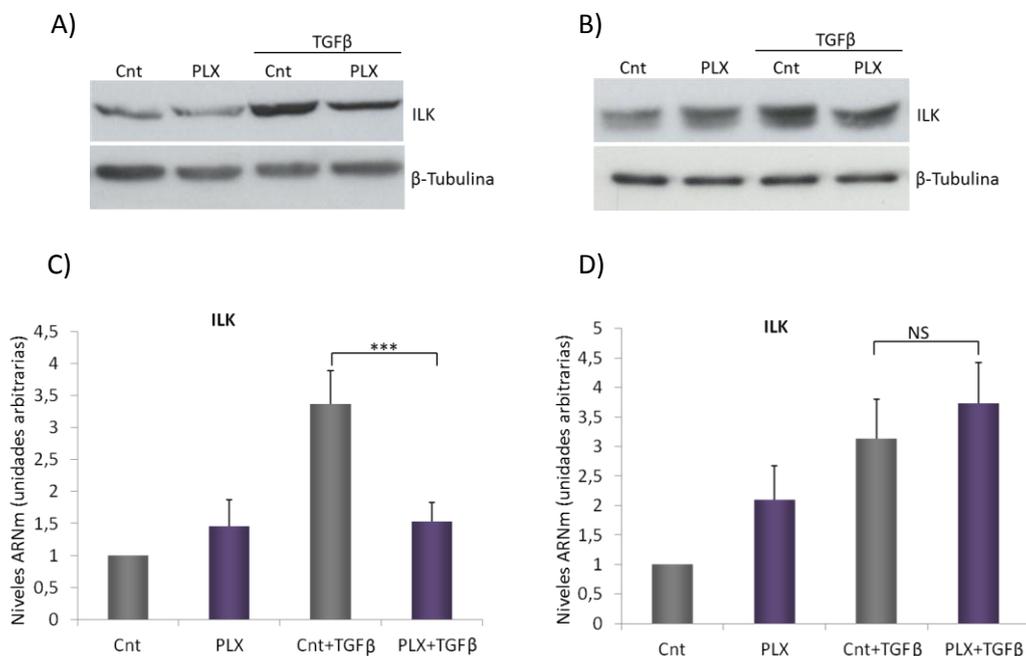


Figura 68. ^{V600E}B-RAF regula el aumento de ILK producido por TGFβ. Las células 8505C (A y C) BHT101 (B y D) se trataron con 5μM PLX4720 y 1h después se estimularon con TGFβ durante 24h. A) y B) Pasadas 24h de tratamiento, se preparon extractos de las células 8505C (A) y de BHT101 (B) y posteriormente se detectaron los niveles de ILK y β-Tubulina mediante *western blot*. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo realizado 3 veces con resultados similares. C) y D) 24h después del tratamiento con TGFβ se aisló el ARN total de las células 8505C (A) y de BHT101 (B) y se analizaron los niveles de ARNm de ILK mediante PCR a tiempo real. Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. Los resultados mostrados corresponden a las medias ± ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *** 0,001>p ; NS: No significativo

En resumen, estos resultados indican que TGFβ necesita ^{V600E}B-RAF para aumentar los niveles de ILK, pero esta vía no influye en la regulación de Snail1 y E-Cadherina en las células tumorales tiroideas.

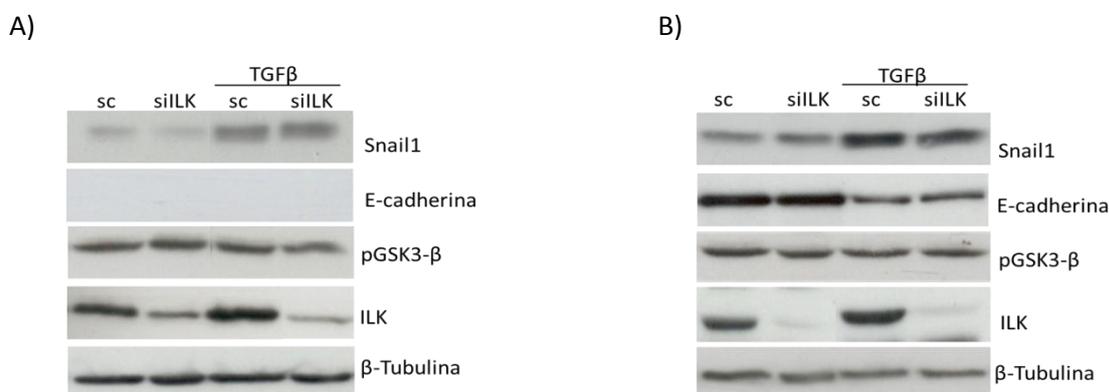


Figura 69. TGFβ no regula la EMT a través de ILK. Las células 8505C (A) BHT101 (B) se transfectaron con un siRNA control (sc) o con un siRNA específico para ILK (siILK) y 48h después se incubaron en presencia o ausencia de 5ng/mL TGFβ. Pasadas 24h de tratamiento, se preparon extractos celulares y posteriormente se detectaron los niveles de Snail1, E-cadherina, pGSK3-β (S9), ILK y β-Tubulina mediante *western blot*. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo realizado 3 veces con resultados similares.

5.2. Papel de FAK y Src en la EMT regulada por ^{V600E}B-RAF y TGFβ

Otra de las proteínas principales presentes en los complejos y las adhesiones focales implicada en la regulación de la motilidad celular es la Quinasa de Adhesión Focal (FAK) (33). Existen estudios en otros tipos celulares que han relacionado a FAK con la inducción de la EMT producida por TGFβ (294) y se ha observado que FAK es necesaria para la expresión de ciertos marcadores mesenquimales regulados por esta citoquina. Por ello, estudiamos la posibilidad de que TGFβ estuviera ejerciendo algunos de sus efectos sobre la EMT a través de FAK y que ^{V600E}B-RAF estuviera implicada en este mecanismo.

En primer lugar, analizamos si TGFβ regulaba la fosforilación y activación de FAK en las células tumorales tiroideas. Para ello, tratamos las células 8505C y BHT101 con TGFβ durante 24, 48 y 72h y analizamos las fosforilaciones más relevantes que regulan la actividad de FAK. Los resultados mostrados en la figura 70 indican que el residuo Y397 se encuentra constitutivamente fosforilado en estas células y que TGFβ no produce ninguna modificación en el estado de esta fosforilación. Sin embargo, el tratamiento con TGFβ provocó un aumento en las fosforilaciones de los residuos Y576, Y577, Y861 y Y407 a las 24h y este aumento se mantuvo durante al menos 72h (figura 70).

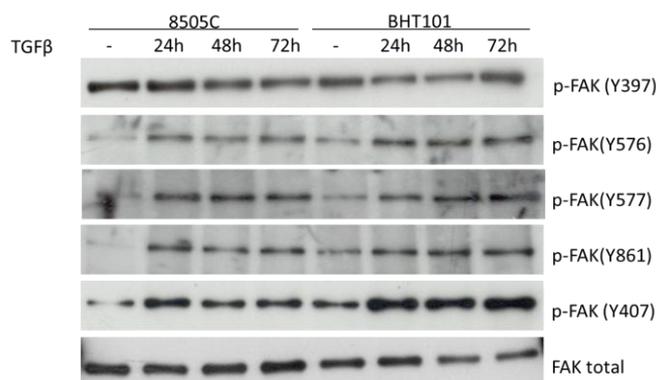


Figura 70. TGFβ aumenta la fosforilación de las tirosinas Y576, Y577, Y861 y Y407 de FAK. Las células 8505C y BHT101 se trataron con 5ng/mL TGFβ durante 24, 48 y 72h. Posteriormente, se prepararon los extractos celulares. Finalmente, se inmunoprecipitó FAK total y se analizaron los niveles de FAK fosforilado (p-FAK) en los residuos de tirosina 397, 576, 577, 861 y 407 mediante *western blot*, utilizándose como control de carga FAK total. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo realizado 3 veces con resultados similares.

Una vez visto que TGFβ aumentaba la fosforilación de FAK, estudiamos si también estaba regulando la EMT a través de FAK en las células 8505C y BHT101. Para ello, inhibimos la expresión de FAK mediante siRNA y analizamos los efectos sobre Snail1. En la figura 71 se muestra que el silenciamiento de FAK disminuyó la expresión de Snail1 en condiciones basales. Además, la falta de expresión de FAK revirtió el aumento producido por TGFβ (figura 71), de la misma manera que lo hacía el silenciamiento de B-RAF (ver figura 62). Por otra parte, también observamos que los efectos de FAK sobre Snail1 se correspondían con un bloqueo en el aumento de migración celular inducido por TGFβ (figura 72), demostrando así, que FAK es otra de las proteínas fundamentales en la progresión del cáncer tiroideo mediado por TGFβ.

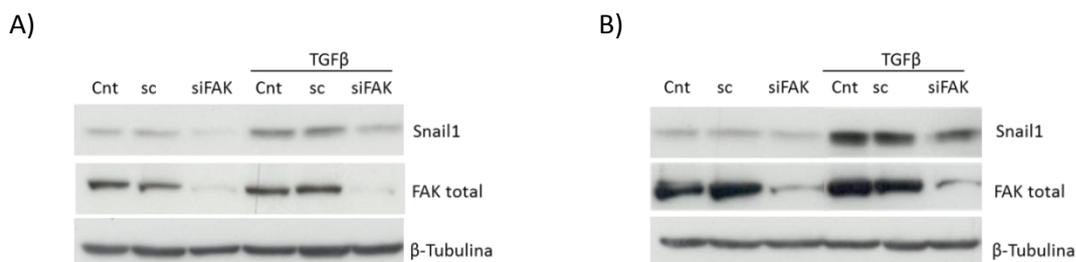


Figura 71. TGFβ aumenta Snail1 a través de FAK. Las células 8505C y BHT101 se transfectaron con siRNA control (sc) o con siRNA de FAK (siFAK). Pasadas 48h se trataron con 5ng/mL TGFβ durante 24h. A continuación, se prepararon extractos los celulares y se determinaron los niveles de Snail1, FAK y β-Tubulina mediante *western blot*. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo realizado 3 veces con resultados similares.

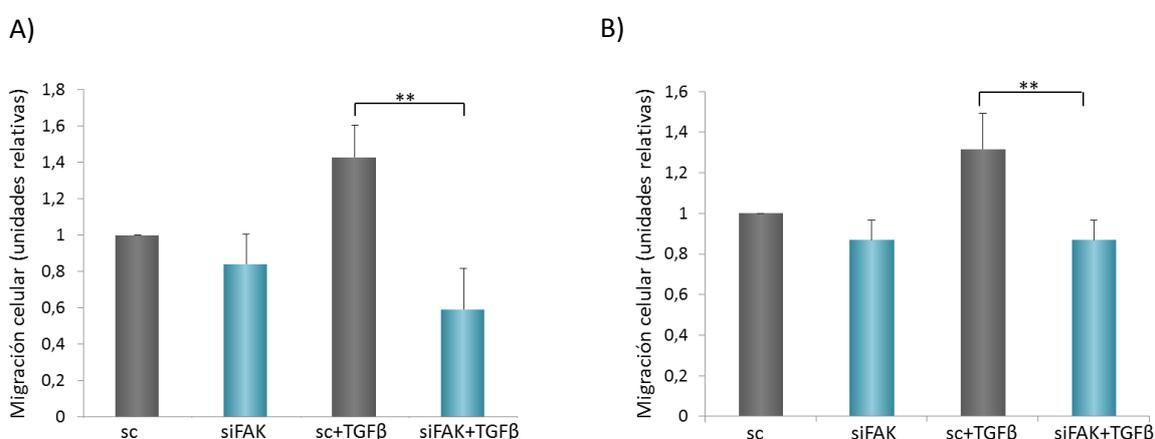


Figura 72. FAK es necesario para el aumento de la migración celular inducido por TGFβ. Las células 8505C (A) y BHT101 (B) se transfectaron con un siRNA control (sc) o con un siRNA específico para FAK (siFAK). 24h después se trataron con 5ng/mL TGFβ durante otras 24h. A continuación, las células se tripsinizaron, se resuspendieron con medio libre de FBS y se sembraron en cámaras *transwells* en ausencia o presencia de TGFβ. Las células se incubaron durante 24h y posteriormente se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y finalmente se fotografiaron 3 campos de cada condición para proceder a su recuento. Los resultados mostrados corresponden a las medias ± ESM de tres experimentos realizados por duplicado. **0,01>p

Una de las proteínas que median la activación de FAK es la tirosina quinasa Src. Se ha demostrado que tras la fosforilación de la Y397, Src se asocia con FAK y posteriormente fosforila los residuos de tirosina Y576 y Y577. Por esta razón, estudiamos si Src participaba en la EMT producida por TGFβ. Para ello, inhibimos la actividad de Src con el inhibidor específico SU6656 en presencia o ausencia de TGFβ y determinamos los niveles de proteína de Snail1 y E-cadherina en nuestras líneas celulares. La inhibición de Src con SU6656 inhibió los niveles de Snail1 en condiciones basales tanto en las células 8505C como en las células BHT101 (figuras 73A y B). Además, la inhibición de Src también disminuyó el aumento de Snail1 producido por el tratamiento con TGFβ en ambas líneas celulares (figuras 73A y B). No obstante, sorprendentemente, observamos que la inhibición de Src únicamente aumentó los niveles basales de E-cadherina e impidió la disminución de E-cadherina producida por TGFβ en las células BHT101, indicando la participación de FAK-Src en la EMT inducida por TGFβ (figura 73B). Sin embargo, en las células 8505C, la inhibición de Src en células tratadas con TGFβ no produjo variaciones en los niveles de E-cadherina (figuras 73A).

Debido a las diferencias observadas entre las dos líneas celulares, nos planteamos analizar si en las células 8505C el tratamiento con TGF β inducía la interacción entre FAK y Src y, de esta manera, poder explicar porqué no había ningún efecto sobre E-cadherina en estas células. Para ello, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación en las células 8505C y vimos que Src estaba interaccionando con FAK en condiciones basales y que la estimulación con TGF β aumentaba esta asociación significativamente (figura 73C), sugiriendo que la regulación de Snail1 y la migración celular por TGF β -Src-FAK es independiente de la regulación de E-cadherina en este tipo celular.

Finalmente, para confirmar estos resultados, analizamos los niveles de ARNm de Snail1 y de E-cadherina mediante PCR a tiempo real (figuras 74A-D). En las figuras 74A y B observamos que la inhibición de Src disminuyó los niveles de ARNm de Snail1 tanto en condiciones basales, como tras la estimulación con TGF β en ambas líneas celulares. Sin embargo, al igual que se observó mediante *western blot*, la inhibición de Src sólo aumentó el ARNm de E-cadherina en condiciones basales y tras la estimulación con TGF β en las células BHT101 (figura 74D).

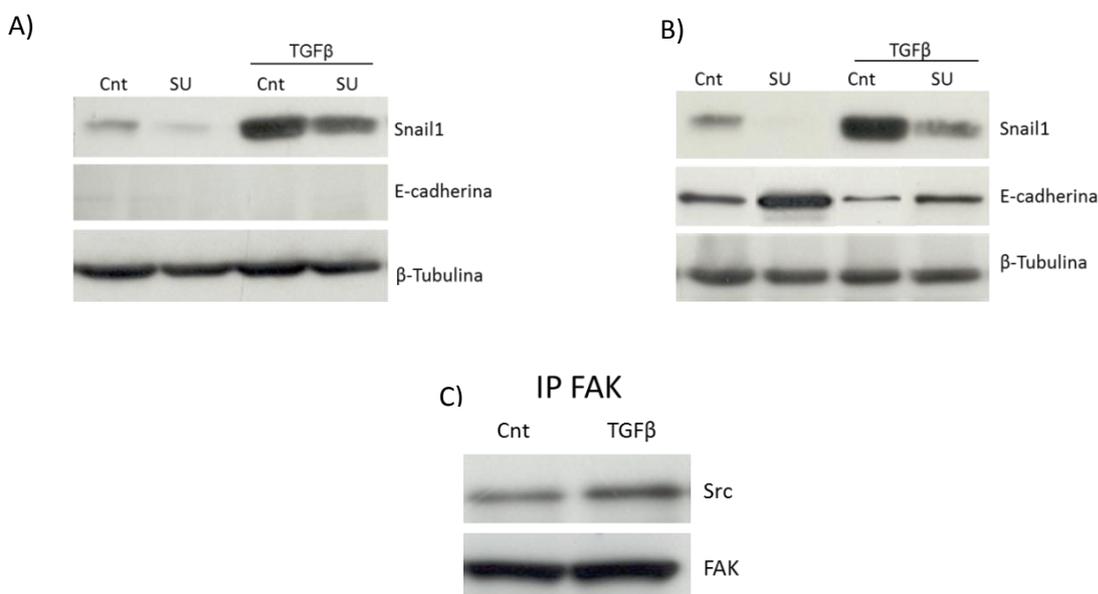


Figura 73: TGF β regula E-cadherina a través de Src en las células BH101. Las células 8505C (A) y BHT101 (B) se trataron con 10 μ M SU6656 y 1h más tarde se estimularon con 5ng/mL TGF β . A las 24h se prepararon los extractos celulares y se detectaron los niveles de Snail1, E-cadherina y β -Tubulina mediante *western blot*. C) Las células 8505C se trataron con 5ng/mL TGF β durante 48h y posteriormente se prepararon los extractos celulares. A continuación se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-FAK y los complejos fueron analizados mediante *western blot* utilizando anticuerpos frente a Src y FAK. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de 3 experimentos con resultados similares.

Para comprobar si ^{V600E}B-RAF también jugaba un papel en la activación de Src y FAK mediada por TGF β , a continuación estudiamos si este oncogén participaba en la fosforilación de FAK por TGF β . Para ello, tratamos las células con TGF β , en presencia o ausencia de PLX4720, y analizamos las fosforilaciones en las tirosinas 576 y 577 de FAK (figura 75A y B). El tratamiento con PLX4720 no modificó el estado basal de ninguna de las dos fosforilaciones y tampoco

alteró el aumento de las fosforilaciones producido por TGFβ. Estos datos nos indican que la activación de Src/FAK mediada por TGFβ es independiente de ^{V600E}B-RAF.

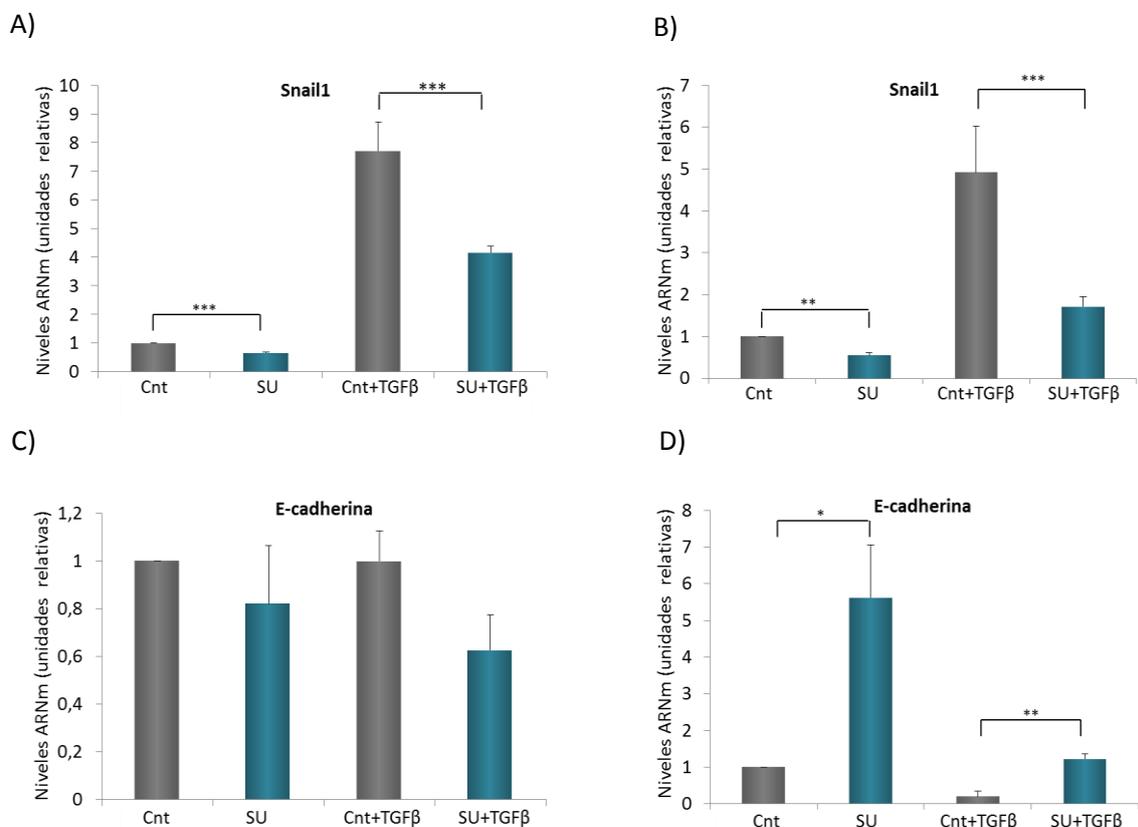


Figura 74: TGFβ regula la expresión de Snail1 a través de Src. Las células 8505C (A y C) y BHT101 (B y D) se trataron con 10 μM SU6656 y 1h más tarde se estimularon con 5ng/mL TGFβ durante 24h. Posteriormente, se aisló el ARN total de las células y se analizaron los niveles de ARNm de Snail1 y E-cadherina mediante PCR a tiempo real. Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. Los resultados mostrados corresponden a las medias ± ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * 0,05>p; ** 0,01>p; *** 0,001>p

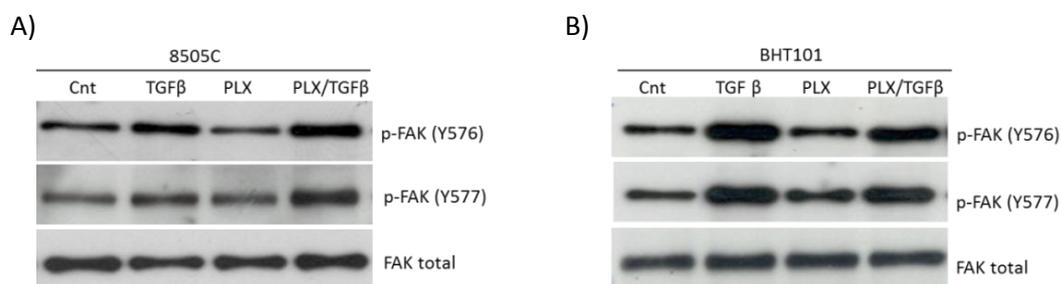


Figura 75: ^{V600E}B-RAF no afecta a la activación de FAK mediada por TGFβ. Las células 8505C (A) y BHT101 (B), se trataron con 5μM PLX4720 o 10 μM U0126 y 1h después se estimularon con TGFβ. Pasadas 24h se prepararon los extractos celulares, se inmunoprecipitó FAK total y se analizaron los niveles de las fosforilaciones Y576 y Y577 de FAK (p-FAK) mediante *western blot*. Los niveles de FAK total se utilizaron como control de carga. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo realizado 3 veces con resultados similares.

A continuación, para confirmar la hipótesis de que B-RAF y Src/FAK estaban regulando la EMT inducida por TGF β de forma independiente, analizamos los niveles de Snail1 y E-cadherina en las células 8505C en las que inhibimos de forma simultánea ^{V600E}B-RAF y Src. En la figura 76, se observa como el tratamiento conjunto con los inhibidores PLX4720 y SU6656 produjo una reducción mayor de los niveles de Snail1 que ambos tratamientos por separado, tanto en células sin estimular como en células estimuladas con TGF β . Asimismo, los niveles de E-cadherina únicamente se restablecieron con el tratamiento con PLX4720 y en ningún caso aumentaron cuando tratamos las células con SU6656. Estos datos indican que TGF β requiere a B-RAF y a Src para aumentar los niveles de Snail1, siendo estos dos mecanismos independientes entre sí. Asimismo, la fosforilación permanente de Smad2 tras el tratamiento con TGF β en presencia de los inhibidores (figura 76), sugiere que ^{V600E}B-RAF y Src/FAK regulan el aumento de Snail1 mediado por TGF β independientemente de la activación de Smad2 o a través de la vía canónica de TGF β , pero por debajo de esta proteína. Finalmente, el hecho de que la expresión de E-cadherina únicamente se recupere con PLX4720, indica que su regulación requiere de Snail1 y de otros mecanismos moleculares mediados por ^{V600E}B-RAF, al margen de los producidos por TGF β y la actividad de Src/FAK.

En conjunto, estos resultados demuestran que, en células derivadas de carcinoma anaplásico tiroideo, la EMT se regula a través de Src, FAK y ^{V600E}B-RAF, y además, indican la necesidad de la actividad de estas tres proteínas para la progresión tumoral inducida por TGF β .

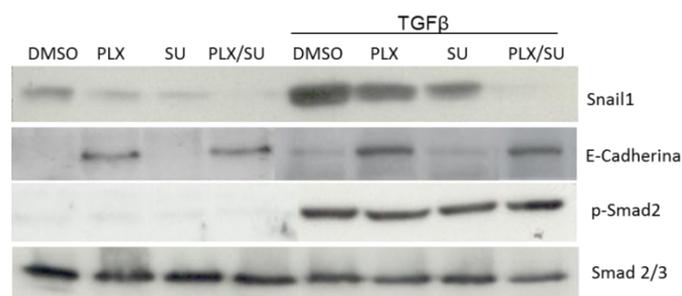


Figura 76. TGF β regula la EMT a través de ^{V600E}B-RAF y Src por un mecanismo independiente. Las células 8505C se trataron con 5 μ M PLX4720, 10 μ M SU6656 o con ambos inhibidores simultáneamente y 1h más tarde se estimularon con 5ng/mL TGF β . Pasadas 24h se prepararon los extractos celulares y se detectaron los niveles de Snail1, E-cadherina y p-Smad2 mediante *western blot*, utilizándose como control de carga Smad 2/3. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo realizado 3 veces con resultados similares.

DISCUSIÓN

El desarrollo del cáncer se caracteriza por la alteración de los mecanismos reguladores que coordinan el comportamiento normal de las células que constituyen nuestro organismo. El inicio del tumor se debe a una alteración genética que provoca la proliferación descontrolada de una única célula formando una población clonal de células tumorales. Durante la progresión del tumor ocurren mutaciones adicionales que confieren una ventaja selectiva a las células, dando lugar a una población más apta para la supervivencia, proliferación y, finalmente, para la propagación por el resto del organismo. En este sentido, el descubrimiento de la existencia de los protooncogenes en 1976 constituyó un avance fundamental en la comprensión de los mecanismos moleculares que participaban en el desarrollo tumoral (300). Los protooncogenes son genes presentes en las células normales susceptibles de adquirir mutaciones que confieren a las células una ventaja adaptativa sobre el resto. Además, son genes reguladores importantes, ya que en muchos casos codifican proteínas que forman parte de vías de señalización que controlan la proliferación y la supervivencia. B-RAF es un claro ejemplo de protooncogén y de las múltiples mutaciones que puede sufrir, la sustitución de la valina en la posición 600 por un ácido glutámico es la más frecuente. Esta mutación da lugar al oncogén V^{600E} B-RAF objeto de nuestro estudio.

El cáncer de tiroides es la segunda patología después del melanoma en la que el mutante V^{600E} B-RAF se encuentra presente con mayor frecuencia (129). Numerosos estudios han demostrado que V^{600E} B-RAF juega un papel importante en las primeras etapas del desarrollo del cáncer tiroideo y, recientemente se ha demostrado que este oncogén es, además, indispensable para el mantenimiento y la progresión del cáncer de tiroides a un carcinoma más agresivo y con peor pronóstico. A pesar de los esfuerzos, poco se conoce sobre los mecanismos moleculares mediados por V^{600E} B-RAF implicados en este aumento de agresividad tumoral. Además, debido a la identificación errónea de líneas celulares de cáncer de tiroides descrita por Schweppe *et.al* en 2008 (298), es necesario verificar de nuevo los mecanismos descritos, así como determinar las nuevas alteraciones moleculares producidas por V^{600E} B-RAF en líneas celulares con un origen tiroideo auténtico. Por ello, en este trabajo nos planteamos estudiar el papel de V^{600E} B-RAF en los mecanismos moleculares implicados en la progresión del cáncer de tiroides, en concreto, en los mecanismos relacionados con los procesos de migración e invasión celular. Para ello, utilizamos tres líneas celulares, una de ellas con la proteína W^T B-RAF y las otras dos con el mutante V^{600E} B-RAF. Este modelo, junto con el uso de diferentes estrategias metodológicas, nos ha permitido comparar los efectos producidos por una y otra proteína y, así, poder describir el papel del mutante V^{600E} B-RAF en células tumorales tiroideas.

En líneas generales, en la primera parte del trabajo demostramos que el mutante V^{600E} B-RAF causa un aumento en la migración y en la invasión celular y, a su vez, participa en la transición epitelio-mesénquima (EMT) a través del aumento de los niveles de Snail1 y de la represión de E-cadherina. Asimismo, confirmamos el efecto represor de Snail1 sobre E-cadherina y demostramos que la expresión del primero es necesaria para la represión de E-cadherina inducida por V^{600E} B-RAF. Adicionalmente, mostramos que la sobreexpresión de Snail1 favorece los procesos de migración e invasión celular, indicando un posible mecanismo por el que V^{600E} B-RAF participa en la progresión del cáncer de tiroides.

Por otra parte, mostramos que la citoquina multifuncional TGF β carece de sus efectos antiproliferativos y proapoptóticos característicos de algunos tipos y contextos celulares y, en cambio, promueve tanto la EMT, como la migración celular. Así, mostramos que en líneas tiroideas con altos niveles de E-cadherina, TGF β induce la represión de la misma a través del aumento de Snail1, demostrando su papel estimulador del desarrollo tumoral en etapas avanzadas del cáncer de tiroides.

Asimismo, demostramos que ^{V600E}B-RAF tiene un papel dual sobre los efectos de TGF β . Por una parte, aumenta los niveles de TGF β secretado al medio. Además, tanto su expresión como su actividad son necesarias para el aumento de Snail1 y la represión de E-cadherina producidos por TGF β , demostrando una cooperación entre ^{V600E}B-RAF y TGF β en la inducción de la EMT y en la migración de células tumorales tiroideas con ^{V600E}B-RAF.

Por último, observamos que el tratamiento con TGF β afecta también a las proteínas FAK e ILK, implicadas en la formación de los contactos focales. TGF β aumenta la expresión de ILK por un mecanismo dependiente de ^{V600E}B-RAF, pero este aumento no está relacionado con la mayor capacidad migratoria inducida por este oncogén y esta citoquina. Además, TGF β aumenta la interacción de FAK con Src y la fosforilación de FAK, estando ambas proteínas implicadas en la EMT inducida por TGF β . En este contexto, el papel de ^{V600E}B-RAF parece ser independiente de la actividad de FAK y de Src, poniendo de manifiesto la gran variedad de mecanismos por los que TGF β puede inducir la EMT y mostrando las diferentes alternativas existentes para inhibir la agresividad tumoral característica del ATC.

1. ^{V600E}B-RAF REGULA LA PROLIFERACIÓN Y LA APOPTOSIS EN CÉLULAS TUMORALES TIROIDEAS

Para el estudio del papel de B-RAF en la progresión del cáncer tiroideo, nosotros elegimos dos estrategias metodológicas distintas. Por una parte, la eliminación de la expresión de B-RAF mediante siRNA y, por otra, la eliminación de la actividad quinasa de B-RAF con el inhibidor específico PLX4720. Además, como muchas de las funciones atribuidas a las proteínas RAF se realizan a través de la cascada MEK/ERK, también utilizamos el inhibidor de MEK U0126.

Cuando determinamos los niveles de activación de la vía MEK/ERK, observamos que ésta se encontraba constitutivamente activa en las tres líneas celulares utilizadas, independientemente del estado de activación de B-RAF. Además, observamos que la activación de MEK es totalmente dependiente de B-RAF en células que poseen la mutación ^{V600E}B-RAF. También demostramos la selectividad del inhibidor PLX4720 sobre B-RAF oncogénico, ya que el inhibidor de MEK U0126 inhibe la fosforilación de ERK en las tres líneas celulares utilizadas, y sin embargo, el inhibidor PLX4720 únicamente inhibe la fosforilación de ERK en las células 8505C y BHT101, portadoras de la mutación ^{V600E}B-RAF. Estos resultados son similares a los publicados previamente por nuestro grupo de investigación en células tumorales de melanoma (301) y concuerdan con el complejo modelo de activación de la vía MEK/ERK a través de la formación de homodímeros y heterodímeros de C-RAF y B-RAF (145, 151, 302). Así, se ha demostrado que en células con B-RAF silvestre o con formas oncogénicas de B-RAF catalíticamente inactivas, estas proteínas forman heterodímeros con C-RAF y activan MEK a través de esta última. Sin embargo, las mutaciones activadoras de B-RAF, como

^{V600E}B-RAF, forman homodímeros y fosforilan directamente a MEK (146, 153). De hecho, recientemente se ha demostrado que el inhibidor PLX4720 puede tener efectos no deseados en determinados contextos celulares, como en células tumorales que poseen Ras oncogénico o B-RAF silvestre, dando lugar a una activación de ERK y a un aumento de la proliferación celular a través de la formación de complejos activos B-RAF/C-RAF (206-208). Este hecho hace que pacientes con melanoma desarrollen lesiones hiperproliferativas y, en algunos casos, carcinomas de células escamosas tras el tratamiento con PLX4720 u otros inhibidores análogos como PLX4032 (205).

En nuestro caso, como cabía esperar, el tratamiento de las células 8505C y BHT101 con los inhibidores PLX4720 y U0126 disminuyó la proliferación celular, indicando que, en estas células este proceso depende de ^{V600E}B-RAF a través de la activación de la vía MEK/ERK. Sin embargo, los mismos tratamientos en las células WRO produjeron efectos distintos; el tratamiento con PLX4720 también disminuyó inesperadamente la proliferación, mientras que el tratamiento con U0126 no tuvo ningún efecto. En cuanto a la disminución de la proliferación celular producida por PLX4720 en células portadoras de ^{V600E}B-RAF, estos datos coinciden con los de otros autores que demuestran que este inhibidor disminuye los niveles de ciclina D1 y aumenta los de inhibidores de CDKs como CDKN1A y CDKN1B en células tiroideas (166, 181). Nuestros datos también coinciden con trabajos anteriores en los que se ha descrito que la inhibición de MEK con U0126 disminuye la proliferación de células con ^{V600E}B-RAF, mientras que en células tumorales que contienen B-RAF o mutaciones en Ras, la inhibición de esta vía no tiene grandes efectos sobre la tasa de proliferación celular (303-305). Así, numerosos autores defienden que las células que poseen ^{V600E}B-RAF tienen mayor dependencia de MEK-ERK para la proliferación que las células que tienen la proteína B-RAF silvestre (303, 306). Esto puede ser debido a que, mientras que B-RAF oncogénico activa ERK e induce la expresión de la ciclina D1 (306), en tumores con otras mutaciones la señal de ERK puede ser prescindible para la expresión de esta ciclina y otras vías, como PI3K o RalGDS, pueden tener mayor importancia sobre la proliferación (307, 308). Nuestros datos coinciden con los publicados por Namba *et al.* y con los descritos por Liu *et al.*, en los cuales se demuestra que la inhibición de MEK en células WRO no afecta ni a la tasa de crecimiento ni a la viabilidad celular respectivamente (309, 310). Además, en estudios con líneas celulares de tiroides con ^{V600E}B-RAF también se ha observado una actividad elevada de NF-κB y se ha demostrado que la proliferación celular depende en gran medida de esta actividad (311). Por otra parte, la inhibición de la proliferación de las células WRO tratadas con PLX4720 no se corresponde con los resultados esperados; sin embargo, se han observado datos similares en las células tumorales tiroideas TPC-1, que poseen la translocación RET/PTC-1, mutaciones en PI3K y ^{WT}B-RAF (181). Hasta el momento, nosotros no conocemos si las células WRO poseen estas mutaciones, pero los resultados indican que ciertos tumores tiroideos sin mutaciones en B-RAF son sensibles al tratamiento con PLX4720 y, por ello, son necesarias más validaciones preclínicas para entender este fenómeno antes de proceder al tratamiento en humanos.

Otra de las características de las células tumorales es su resistencia a morir por apoptosis. En este sentido, nuestros datos también demuestran que la proteína oncogénica ^{V600E}B-RAF, induce supervivencia en las células tumorales tiroideas que la contienen, ya que la eliminación de su actividad tras los tratamientos con PLX4720 o la inhibición de MEK con U0126 aumentan ligeramente la muerte celular a partir de 48 horas. Nuestros resultados se ven apoyados por

estudios en los que la inhibición de la expresión de B-RAF en células tiroideas portadoras del mutante ^{V600E}B-RAF produce un ligero aumento en la muerte celular (306). Además, en células de melanoma se ha observado que PLX4720 induce apoptosis a través del aumento de la expresión y activación de la proteína proapoptótica BIM (312, 313).

2. ^{V600E}B-RAF INDUCE LA EMT Y PARTICIPA EN EL AUMENTO DE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR

Una de las características que presentan los tumores con la mutación ^{V600E}B-RAF es su mayor agresividad y potencial metastático frente a tumores que poseen otras alteraciones genéticas. En este sentido, nuestros resultados demuestran que este oncogén induce la migración y la invasión de células tumorales tiroideas. Así, la sobreexpresión de ^{V600E}B-RAF en células WRO aumenta ambos procesos celulares. Además, nuestros datos muestran que la eliminación de la expresión de B-RAF disminuye la migración celular tanto en células tiroideas que expresan el mutante ^{V600E}B-RAF, como en células con ^{WT}B-RAF, efectos que se reproducen al tratar las células con PLX4720 y U0126. Estos resultados demuestran que estos efectos son dependientes de la vía canónica RAF-MEK-ERK. Sin embargo, la invasión celular únicamente disminuye en células portadoras del mutante ^{V600E}B-RAF, indicando que este oncogén es necesario para la adquisición del fenotipo invasivo e induce sus efectos a través de MEK/ERK. Estos resultados coinciden con estudios realizados recientemente en los que se ha demostrado que tanto el silenciamiento de B-RAF, como el tratamiento con PLX4720 causan una disminución de la capacidad migratoria e invasiva de células derivadas de ATC portadoras del mutante ^{V600E}B-RAF (181, 183). Además, nuestros datos concuerdan con trabajos en los que se sobreexpresa ^{V600E}B-RAF en la línea celular de tirocitos de rata PCCL3, donde se observa un aumento en la migración celular (290, 314).

Asimismo, nuestros resultados muestran que el aumento de la migración e invasión producido por la sobreexpresión de ^{V600E}B-RAF en las células WRO se revierte con PLX4720. Sin embargo el tratamiento con U0126 únicamente restablece los niveles basales en el caso de la migración, indicando que, en estas células en concreto, ^{V600E}B-RAF regula la invasión de forma independiente de la vía MEK-ERK. Este último dato se corresponde con el trabajo realizado por Palona *et al.* en 2006, en el que sobreexpresan el mutante ^{V600E}B-RAF en células WRO y observan que el aumento de la invasión celular no es inhibido por U0126 y, en cambio, sí es revertido por un inhibidor específico de NF-κB (168). Estos autores postulan que la invasión celular inducida por ^{V600E}B-RAF podría estar mediada por un aumento de la actividad de NF-κB. Aunque no poseemos una respuesta a este respecto, el hecho de que U0126 sí inhiba la invasión en las células que expresan ^{V600E}B-RAF de forma endógena podría explicarse por la dependencia que presentan algunos tipos celulares a determinados genes para mantener su fenotipo maligno, concepto que dio lugar a la denominada “adicción al oncogén” (315). Por ello, probablemente las células que expresan ^{V600E}B-RAF de forma endógena hayan sufrido las alteraciones necesarias dependientes de su “adicción” a ^{V600E}B-RAF para favorecer la invasión celular, mientras que células en las que sobreexpresamos ^{V600E}B-RAF de forma exógena, este proceso aún no se ha producido.

A pesar de que varios estudios han relacionado la hiperactivación de la vía Ras-RAF-MEK-ERK con la inducción de la EMT, actualmente se desconocen los mecanismos moleculares por los que ^{V600E}B-RAF induce la adquisición de un fenotipo mesenquimal en células de cáncer de tiroides. En este trabajo demostramos que ^{V600E}B-RAF ejerce gran parte de sus efectos a través de Snail1.

Snail1 es una proteína muy inestable, con una regulación muy compleja a nivel transcripcional y postranscripcional. Nuestros resultados muestran, por primera vez, que ^{V600E}B-RAF regula los niveles de Snail1 en líneas celulares de cáncer de tiroides y, además, que lo hace a dos niveles: a través de un mecanismo transcripcional independiente de la vía MEK/ERK y a nivel postranscripcional, dependiente de la vía MEK/ERK. Estas conclusiones se basan en que la sobreexpresión de ^{V600E}B-RAF en células WRO con ^{WT}B-RAF aumenta los niveles de proteína y de ARNm. Además, este aumento se bloquea por el inhibidor PLX4720, confirmando así la participación del mutante ^{V600E}B-RAF en el incremento de la expresión de Snail1. Estos datos se corresponden con el trabajo de Massoumi *et al.*, en el que sobreexpresan ^{V600E}B-RAF en células de melanoma y también obtienen un incremento en los niveles totales de Snail1 (316). Sin embargo, los cambios en el ARNm difieren entre las células tratadas con PLX4720 y las tratadas con U0126 ya que la inhibición de MEK no los modifica. Este resultado indica que la regulación transcripcional por ^{V600E}B-RAF es independiente de la vía MEK-ERK. Aunque no existen datos en la literatura sobre la relación de ^{V600E}B-RAF y la expresión génica de Snail1, se ha demostrado que en células tumorales pancreáticas el oncogén ^{V12}Ras es capaz de activar la expresión de Snail1 por un mecanismo desconocido, independiente de la vía MEK/ERK. Por lo tanto, B-RAF podría inducir Snail1 por esta misma vía. En este sentido, la vía de NF-κB podría constituir un posible mecanismo por el que ^{V600E}B-RAF favorezca la expresión de Snail1, ya que se ha demostrado que este factor de transcripción regula su expresión (64). De momento, no se conoce ningún sustrato distinto de MEK a través del cual B-RAF puede ejercer sus funciones, sin embargo se ha demostrado que C-RAF modula la actividad de varios efectores independientemente de su actividad quinasa sobre MEK, como NF-κB (317, 318). Por lo tanto, dado que B-RAF puede señalar en determinadas circunstancias a través de C-RAF, este podría ser un mecanismo de actuación distinto a la vía MEK-ERK. De hecho, ^{V600E}B-RAF se ha relacionado con el aumento de actividad de NF-κB independiente de MEK-ERK en células tiroideas (168, 319). Estos datos, junto con la gran actividad de NF-κB encontrada en algunas líneas de cáncer de tiroides (320), refuerzan la hipótesis de que ^{V600E}B-RAF esté regulando la expresión de Snail1 a través de NF-κB.

Por otra parte, nuestros resultados también demuestran que ^{V600E}B-RAF regula los niveles proteicos de Snail1 a través de la vía MEK-ERK, ya que tanto la inhibición de la expresión de B-RAF, como la inhibición de su actividad con PLX4720 o el tratamiento con el inhibidor de MEK U0126 disminuyen los niveles de proteína de Snail1. En este sentido, respecto a la regulación a nivel postranscripcional, Zhou *et al.*, demostraron que el tratamiento de células de cáncer de mama con factores de crecimiento que estimulan la vía Ras-RAF-MEK-ERK produce la estabilización de Snail1 a través de la fosforilación inhibitoria de GSK3-β (103). Por tanto, el tratamiento con PLX4720 o U0126 supondría un aumento de la actividad de GSK3-β y en consecuencia, la degradación de Snail1 a nivel proteosomal. De hecho, esta teoría se ve apoyada por un estudio en el que se muestra la participación de GSK3-β en la regulación de Snail1 en líneas de tiroides (321) y por resultados preliminares no mostrados en este estudio,

los cuales indican que U0126 disminuye los niveles de la fosforilación inhibitoria de la serina 9 en GSK3- β .

La pérdida de E-cadherina en los frentes invasivos tumorales es un factor de riesgo en PTCs y se ha relacionado con una mayor agresividad de estos tumores (322). En este sentido, nosotros demostramos, por primera vez, que el mutante ^{V600E}B-RAF reprime la expresión de E-cadherina en células tumorales tiroideas ya que el silenciamiento de B-RAF o el tratamiento con los inhibidores PLX4720 y U0126 provocan una recuperación de la expresión de E-cadherina asociada con un cambio morfológico muy acusado que da lugar a un fenotipo con características epiteliales. Estas alteraciones, junto con la disminución observada de los niveles de Snail1 indican que ^{V600E}B-RAF y la vía MEK-ERK están implicados en la progresión de la EMT. Estos datos se corresponden con los obtenidos por Riesco-Eizaguirre *et al.*, en los que demuestran que la sobreexpresión de ^{V600E}B-RAF en tirocitos de rata favorece la EMT disminuyendo los niveles de E-cadherina y aumentando los niveles de los marcadores mesenquimales Fibronectina y Vimentina (290). Asimismo, en el estudio realizado por Knauf *et al.*, en un modelo animal demuestran el aumento de la expresión de genes mesenquimales en tumores inducidos por ^{V600E}B-RAF y muestran una relación directa entre la falta de E-cadherina y la pérdida de diferenciación celular (192). Por tanto, estos resultados, junto con nuestro estudio, en el que aportamos nuevos datos sobre la regulación de la EMT en células transformadas de origen humano, demuestran que ^{V600E}B-RAF es una proteína indispensable para la progresión del cáncer de tiroides a fenotipos más agresivos y con peor pronóstico.

Numerosos estudios han demostrado que Snail1 es un factor de transcripción que regula los niveles de E-cadherina reprimiendo su expresión. Nosotros demostramos que este mecanismo también se cumple en nuestro modelo celular mediante dos estrategias diferentes. Por una parte, observamos como el silenciamiento de Snail1 aumenta la expresión de E-cadherina a nivel transcripcional y, por otra, como la sobreexpresión de Snail1 en células con altos niveles de E-cadherina produce una disminución de la misma. Además, demostramos que la expresión de Snail1 se opone a la recuperación de E-cadherina inducida por los inhibidores PLX4720 y U0126, lo que indica que ^{V600E}B-RAF y la vía MEK-ERK actúan a través de Snail1 para reprimir E-cadherina.

Sin embargo, nosotros creemos que este no es el único mecanismo de regulación de E-cadherina en estas células. El hecho de que las células BHT101 posean unos niveles basales de E-cadherina tan elevados y además expresen Snail1 supone que, aunque ^{V600E}B-RAF esté favoreciendo la EMT a través de la represión de E-cadherina, ni su presencia ni la activación constitutiva de ERK son los únicos requisitos para la pérdida de E-cadherina. Además, esto sugiere que la represión de E-cadherina no depende únicamente de Snail1 y que son necesarias otras alteraciones moleculares producidas por ^{V600E}B-RAF para reprimir completamente la expresión de E-cadherina. En este sentido, se han encontrado diferencias en la expresión de E-cadherina dependiendo del estadio del tumor; mientras que la pérdida de E-cadherina se ha observado en carcinomas primarios, su reexpresión es frecuente en focos secundarios tales como las metástasis en ganglios linfáticos (84). Esto indica que la expresión de E-cadherina ha de considerarse como un proceso dinámico, regulado finamente durante la progresión tumoral y, además, explica el que las células BHT101 posean unos niveles tan altos de E-cadherina, ya que estas células fueron establecidas a partir de metástasis en ganglios linfáticos.

Por otra parte, la activación de RTKs se ha asociado al aumento de la expresión de inductores de la EMT como los represores de E-cadherina, Zeb1, Zeb2 y los factores bHLH (89), por lo que no sería de extrañar que V^{600E} B-RAF, a través de la hiperactivación de la vía MEK-ERK, regule la expresión de dichos factores de transcripción. Además, la presencia de V^{600E} B-RAF en PTC se ha asociado con la hipermetilación de genes supresores de tumores y su consiguiente represión transcripcional (323). Más concretamente, en el estudio realizado por Smith JA *et al.* se muestra como el gen de E-cadherina está metilado con mayor frecuencia en pacientes con PTC que en los pacientes controles (324). Estos datos, junto con los resultados que demuestran que la inhibición de la activación de la vía MEK-ERK da lugar a la desmetilación y a la recuperación de la expresión de algunos de los genes supresores de tumores (202), justifican la hipótesis de que probablemente V^{600E} B-RAF esté reprimiendo la expresión de E-cadherina a través de varios mecanismos a parte del aumento de Snail1.

Por último, en esta parte del trabajo demostramos que la sobreexpresión de Snail1 en líneas derivadas de ATC da lugar a un aumento de la migración y la invasión celular, acompañado de un cambio fenotípico caracterizado por una morfología mesenquimal como ocurre en queratinocitos y líneas celulares derivadas de carcinoma de células escamosas (73, 325). De acuerdo con esto, se ha observado una mayor expresión de Snail1 en tumores tiroideos que en tejido tiroideo normal, asociando este factor de transcripción con el desarrollo del cáncer de tiroides (326).

Por tanto, nuestros datos demuestran que V^{600E} B-RAF favorece la migración y la invasión celular y que estos procesos se relacionan con la inducción de la EMT a través de la expresión de Snail1 y la represión de E-cadherina.

3. TGF β INDUCE LA EMT EN CÁNCER DE TIROIDES

A pesar de que una de las funciones primarias de TGF β es inhibir la proliferación y activar el proceso de muerte celular, en muchos casos las células cancerígenas adquieren la capacidad de evadir o atenuar este tipo de respuestas mediadas por TGF β . De este modo, son capaces de transformar su señalización en efectos que favorecen la progresión tumoral y la metástasis. En este sentido, dependiendo del tipo de tumor y del estadio donde se encuentre, TGF β puede actuar como supresor o como promotor tumoral (210, 248).

Nosotros demostramos que tanto en células con el mutante V^{600E} B-RAF como en células sin él, TGF β carece de efectos antiproliferativos y proapoptóticos, indicando que estos tipos celulares han perdido la capacidad de responder a los efectos antitumorales de TGF β . Estos datos se corresponden con estudios realizados con tumores tiroideos, en los que se ha observado una pérdida de sensibilidad a las respuestas mediadas por TGF β , probablemente debidas a deficiencias en la expresión de Smad4 o a la sobreexpresión de Smad7 (327). De hecho, se ha demostrado que la sobreexpresión de estas proteínas Smad en células derivadas de PTC o en muestras de tumores foliculares y papilares humanos produce un incremento en la respuesta antiproliferativa o una atenuación de la señalización antitumoral mediada por TGF β (328, 329).

En este trabajo otro objetivo es el estudio de los procesos que participan en la progresión tumoral mediada por TGF β . Así, demostramos que el TGF β induce la EMT y la migración celular

a través de un aumento de Snail1 y de una reducción de los niveles E-cadherina, lo que conlleva cambios morfológicos acusados. Además, las variaciones en la expresión de estas dos proteínas se corresponden con cambios en los niveles de ARNm, indicando que TGF β regula su expresión a nivel transcripcional. Nuestros datos se corresponden con numerosos estudios que relacionan TGF β con la inducción de la expresión de Snail1 (71). Por una parte, se ha observado que el aumento de Snail1 tras el tratamiento con TGF β es dependiente de Smads y, más concretamente de Smad3, la cual se une al promotor del gen de Snail1 y activa su transcripción (330, 331). Sin embargo, también hay datos que demuestran que la inducción de la expresión de Snail1 se mantiene en presencia de dominantes negativos de Smad4, indicando la participación de vías independientes de Smads en el aumento de Snail1 mediado por TGF β (281, 332). En nuestro estudio, el TGF β activa su vía canónica a través del aumento en la fosforilación de Smad2. Sin embargo, resultados preliminares no mostrados en este trabajo, indican que dominantes negativos de la vía TGF β /Smads no influyen en el aumento de Snail1 producido por TGF β , apoyando así la hipótesis de la participación de las vías independientes de Smads en la inducción de la EMT.

Respecto a la regulación de la expresión de E-cadherina, nuestros datos muestran una correlación inversa entre los niveles de E-cadherina y los de Snail1 tras el tratamiento con TGF β , indicando que el mecanismo principal de TGF β para disminuir la expresión de E-cadherina es a través del aumento de Snail1. En relación con estos datos, algunos estudios muestran la participación de otros factores de transcripción como Slug, Zeb1 y Zeb2 en la represión de E-cadherina mediada por TGF β (333, 334). En nuestro caso, no podemos descartar la participación de alguno de estos factores de transcripción, ya que se ha demostrado que varios de ellos pueden asociarse a Snail1 y éste puede regular su expresión, como es el caso de Zeb1. Además, TGF β puede regular la estabilidad de Snail1 a través de un aumento de la expresión de la LOXL2, la cual impide la fosforilación de Snail1 por GSK3- β (335). En cualquier caso, nosotros podemos afirmar que en células derivadas de ATC, la presencia de Snail1 es necesaria para la disminución de E-cadherina mediada por TGF β .

Al margen de la pérdida de expresión de E-cadherina y el aumento de Snail1, otros de los marcadores que se han relacionado con el desarrollo de la EMT son la Fibronectina y la Vimentina (336). De acuerdo con esto, nuestros datos demuestran que el TGF β aumenta los niveles de Fibronectina, mientras que no modifica los niveles de Vimentina. El aumento de Fibronectina se corresponde con estudios en los que se ha observado una inducción en la expresión de la misma en los frentes invasivos de muestras tumorales de PTCs, en comparación con las zonas centrales del tumor, mientras que la expresión de Vimentina fue similar en ambas regiones (297). El hecho de que los niveles de Vimentina permanezcan constantes en ambas regiones del tumor explicaría el que su expresión fuera independiente de TGF β , ya que éste es secretado al estroma y ejercería sus efectos en las células que bordean el tumor. Además, es importante destacar la diferencia que encontramos en la expresión de Vimentina de una línea celular a otra. Estas diferencias muestran una correlación inversa entre los niveles de E-cadherina y Vimentina, observada también en otras líneas celulares (89). Así, mientras que las células con baja expresión de E-cadherina y altos niveles de Vimentina poseen un fenotipo mesenquimal, la relación inversa es típica de células con un origen epitelial. Puesto que varios estudios *in vivo* relacionan el aumento de Vimentina con la pérdida de

E-cadherina (337, 338), sería interesante estudiar en un futuro la regulación de estas dos proteínas en cáncer de tiroides y su implicación en el desarrollo tumoral.

Normalmente, los cambios morfológicos y la regulación de marcadores epiteliales y mesenquimales producidos en la EMT van acompañados de un aumento de la motilidad celular. En relación con este aspecto, en este estudio demostramos que TGF β favorece la migración celular únicamente en células portadoras del mutante ^{V600E}B-RAF, ya sea endógenamente, como en las células 8505C y BHT101, o mediante sobreexpresión en las células WRO, mientras que en células con ^{WT}B-RAF no produce ningún efecto significativo sobre este proceso. Curiosamente, cuando transfectamos el mutante ^{V600E}B-RAF en las células de WRO, el tratamiento con TGF β aumenta la migración aún más de lo que lo hace ^{V600E}B-RAF, indicando una posible cooperación entre la hiperactivación de la vía RAF-MEK-ERK con el papel de promotor tumoral de TGF β . En este sentido, varios estudios han demostrado que el entrecruzamiento entre las señales mediadas por Ras y TGF β juegan un papel destacado en procesos fisiológicos y patológicos (286, 339).

También es importante destacar que en este trabajo observamos que el TGF β no produce ningún efecto sobre la invasión celular (datos no mostrados). En este sentido, es conveniente apuntar que las líneas celulares con las que trabajamos poseen la capacidad de invadir en condiciones basales, la cual está favorecida por ^{V600E}B-RAF. En el caso de las células portadoras del oncogén ^{V600E}B-RAF, se ha demostrado que éste está implicado en la secreción de metaloproteasas de la matriz (MMPs) encargadas de degradarla (187), por lo que posiblemente, en condiciones *in vitro*, estas células no necesiten la presencia de TGF β para llevar a cabo un proceso que son capaces de realizar en ausencia de esta citoquina. Además, el hecho de que el TGF β tampoco aumente la invasión en células WRO con ^{WT}B-RAF indica que esta citoquina no es suficiente para inducir la invasión de estas células *in vitro* y que requiere de otros factores estimuladores de la invasión. Así, se ha demostrado que el ambiente tumoral es un factor clave en la invasión celular y que TGF β es capaz de favorecer la misma a través de la interacción con otros componentes celulares de los tumores. De hecho, TGF β puede estimular a los fibroblastos del estroma y/o a las células del sistema inmune para que secreten MMPs y favorecer el proceso invasivo; por lo que habría que tener en cuenta la complejidad tumoral para determinar el papel específico del TGF β sobre la invasión celular.

4. ^{V600E}B-RAF Y TGF β COOPERAN EN LA INDUCCIÓN DE LA EMT EN CÁNCER DE TIROIDES

Nuestros estudios demuestran que tanto ^{V600E}B-RAF como TGF β pueden inducir la EMT en las células tumorales tiroideas; por ello, nos planteamos la posibilidad de que ambos estuvieran colaborando en este proceso. Nuestros resultados muestran que los niveles de TGF β secretados son mucho mayores en las células 8505C y BHT101 que los producidos por la línea celular WRO. Además, también demostramos que ^{V600E}B-RAF aumenta los niveles de TGF β secretado al medio a través de la vía MEK-ERK. Nuestros resultados también muestran que el inhibidor PLX4720 es capaz de bloquear la expresión de TGF β inducida por ^{V600E}B-RAF en células tumorales. Este aumento en la producción de TGF β mediado por ^{V600E}B-RAF probablemente esté regulado a nivel transcripcional, ya que los datos aportados por Nucera *et*

al., revelan una mayor expresión del gen de TGF β en muestras tumorales de tiroides portadoras de ^{V600E}B-RAF frente a tumores con ^{WT}B-RAF (183).

Sin embargo, la inhibición del receptor de TGF β no disminuye la migración ni la invasión celular inducida por ^{V600E}B-RAF, lo que indica que este oncogén controla estos procesos a través de un mecanismo distinto al aumento de expresión de TGF β . Estos resultados se corresponden en parte con los publicados por Riesco-Eizaguirre *et al.*, en los que demuestran que la sobreexpresión de ^{V600E}B-RAF en tirocitos de rata aumenta la secreción de TGF β y que la inhibición de su acción con un inhibidor específico de su receptor disminuye parcialmente la migración e invasión celular (290). Asimismo, en este estudio demuestran que el aumento de TGF β producido por ^{V600E}B-RAF se corresponde con un aumento de la fosforilación de Smad2 y de la EMT. Estos resultados son discordantes con los nuestros, ya que nosotros no observamos ni un aumento de la fosforilación de Smad2 ni cambios en los niveles de Snail1 y E-cadherina debidos al aumento de TGF β mediado por ^{V600E}B-RAF (datos no mostrados). Esta falta de efectos se puede explicar por el hecho de que los niveles de TGF β secretados por las células tras la sobreexpresión de ^{V600E}B-RAF son del orden de 100 veces menores que los utilizados exógenamente. Además, incluso en las células que presentan mayores niveles basales de TGF β , la fosforilación de Smad2 apenas se percibe, indicando que para conseguir unos niveles elevados de TGF β , que puedan ejercer sus acciones sobre Smad y la EMT, quizá se requieran vías adicionales a las activadas por ^{V600E}B-RAF. En este sentido, se ha demostrado que para que se produzca una elevada expresión de TGF β en células de osteosarcoma murino se requiere la activación conjunta de las vías Ras-MEK-ERK y Ras-PI3K-AKT (340).

Por otra parte, el hecho de que el aumento de TGF β producido por ^{V600E}B-RAF no aumente más la migración celular, podría deberse a que, al tratarse de células transformadas con ^{V600E}B-RAF, éstas poseen una elevada capacidad de migrar en ausencia de TGF β , por lo que, como se ha comentado anteriormente, el aumento del mismo se podría utilizar para estimular células adyacentes al tumor, como las células endoteliales o células del sistema inmune, que inducen otros procesos alternativos a la migración, pero igualmente tumorigénicos como la angiogénesis o la inmunosupresión. Esta hipótesis se apoya en las observaciones que demuestran que en carcinomas tiroideos murinos poco diferenciados la expresión condicional de ^{V600E}B-RAF aumenta el número de macrófagos asociados al tumor (TAMs) (192), los cuales a su vez, son conocidos por su capacidad de producir TGF β , y se han asociado a una mayor agresividad tumoral (341).

En este estudio, sin embargo, nosotros demostramos que la EMT inducida por TGF β depende en gran medida de la señalización mediada por ^{V600E}B-RAF, ya que tanto el silenciamiento de su expresión, como la inhibición de su actividad se oponen al aumento de Snail1 y a la disminución de E-cadherina producidos por TGF β . Nosotros observamos que el inhibidor U0126 produce el mismo efecto que PLX4720, indicando la participación de la vía ^{V600E}B-RAF-MEK-ERK en la regulación de Snail1 mediada por TGF β . Sin embargo, el aumento de ARNm de Snail1 producido por TGF β no desaparece completamente tras el tratamiento con estos inhibidores (ver figura 64), por lo que no podemos descartar que el TGF β ejerza su acción sobre Snail1 y la EMT a través de otras vías de señalización independientes de B-RAF-MEK-ERK. En este caso, como se ha comentado anteriormente, TGF β puede regular la estabilidad de Snail1 a través de LOXL2, pero además podría aumentar su expresión a través de NF- κ B, como se ha observado en otros tipos celulares (241, 342). Adicionalmente, vemos como las células

8505C con bajos niveles de E-cadherina, el silenciamiento de B-RAF y el tratamiento con PLX4720 producen una recuperación de E-cadherina, incluso en presencia de TGF β , indicando que V^{600E}B-RAF reprime la expresión de E-cadherina de una forma independiente de TGF β .

Nuestros resultados se corresponden con los obtenidos por Knauf *et al.*, en los que muestran la inducción de la EMT tras el tratamiento con TGF β en cultivos primarios murinos de PTC con V^{600E}B-RAF (192). Sin embargo, estos autores no demuestran directamente que TGF β ejerza sus acciones sobre la EMT a través de V^{600E}B-RAF, sino que únicamente revelan que la inhibición de MEK, previa al tratamiento con TGF β , bloquea la actividad transcripcional mediada por esta citoquina, indicando que existe una cooperación entre V^{600E}B-RAF y TGF β dependiente de la vía MEK-ERK. En este sentido, varios estudios han relacionado el aumento de la EMT mediada por TGF β con la hiperactivación de la vía Ras-RAF-MEK-ERK (226). Por ejemplo, se ha demostrado que la combinación de EGF y TGF β induce la EMT en tirocitos de cerdo altamente diferenciados, mientras que ambos tratamientos por separado no producen variaciones de las propiedades epiteliales (343). Además, algunos estudios apoyan la hipótesis de que es necesaria una activación constitutiva de la vía Ras-RAF-MEK-ERK para que TGF β induzca la EMT. En relación con este aspecto, Horiguchi *et al.*, demostraron que la inducción de Snail1 mediada por TGF β en células de carcinoma de páncreas únicamente se lleva a cabo en presencia del mutante V^{12G}K-Ras (286). Este estudio también muestra que la inducción de la expresión de Snail1 tras el tratamiento de TGF β es independiente de la activación de MEK, resultados contrarios a los nuestros y a los publicados por Peinado *et al.*, en los que se observa un aumento de la transcripción de Snail1 en respuesta a TGF β , la cual es inhibida cuando se anula la actividad de MEK (281). La discrepancia entre estos resultados probablemente se deba a la diferente participación de las proteínas Smads, ya que en el trabajo de Horiguchi *et al.* el aumento de Snail1 producido por el TGF β es inhibido por el silenciamiento de las R-Smad y de Smad4 (286), mientras que Peinado *et al.* muestran que dominantes negativos de Smad4 no afectan al aumento de Snail1 tras el tratamiento con TGF β . Por tanto, es posible que exista un balance entre los mecanismos dependientes e independientes de Smads que regulen la expresión de Snail1 en respuesta a TGF β , y que a su vez estén determinados por la contribución de la vía Ras-RAF-MEK-ERK. En este sentido, como cabía esperar, nuestros datos muestran que TGF β aumenta la fosforilación de Smad2 en su región C-terminal. Además, vemos como la inhibición de B-RAF afecta a los niveles de fosfo-Smad2 de manera distinta según el tipo celular. Mientras que en las células BHT101, la fosforilación de Smad2 inducida por TGF β se reduce en ausencia de B-RAF, en las células 8505C los niveles Smad2 fosforilada en las mismas condiciones no se ven afectados. En relación con este aspecto, existen datos en la literatura que muestran que los efectos de la vía Ras-RAF-MEK-ERK sobre la fosforilación de Smad pueden variar según el tipo celular y el estadio tumoral. Por una parte, se ha demostrado que U0126 inhibe la fosforilación de Smad2 inducida por TGF β (192, 344) y, por otra, existen evidencias que demuestran que el aumento de fosforilación de Smad2 no se ve afectado por la actividad de MEK (285). Concretamente en cáncer de tiroides, únicamente existe un estudio con cultivos primarios de células tiroideas transformadas con V^{600E}B-RAF en el que demuestran que la inhibición de MEK, se opone al aumento de fosforilación de Smad2 producido por TGF β (192). Todo esto, junto con la gran variedad de respuestas celulares mediadas por TGF β que dependen del tipo celular, explicaría el hecho de las diferencias entre los estudios mencionados.

Por otra parte, nosotros demostramos que TGF β solo aumenta la migración celular en presencia de ^{V600E}B-RAF y, además, que la inhibición de ^{V600E}B-RAF y de MEK impiden el aumento de la migración celular producido por TGF β . En este sentido, únicamente un estudio llevado cabo en un modelo de tirocitos de rata ha mostrado resultados similares a los nuestros; estos autores demuestran la participación de ^{V600E}B-RAF en la migración celular a través del aumento de la secreción de TGF β (290). Sin embargo, nosotros demostramos, por primera vez en un modelo de cáncer de tiroides, un sinergismo entre los efectos de ^{V600E}B-RAF y de TGF β en la inducción de la migración celular, aportamos nuevos datos sobre la participación de la vía RAF-MEK-ERK en la EMT inducida por TGF β y la importancia del uso conjunto de inhibidores de ^{V600E}B-RAF y de TGF β en el tratamiento del cáncer de tiroides.

5. ^{V600E}B-RAF Y TGF β REGULAN LA EMT INDEPENDIENTEMENTE DE ILK

Uno de los procesos clave para la adquisición de un fenotipo migratorio es la regulación de los contactos focales. De esta manera, las células pueden conectar las señales extracelulares con el citoesqueleto de actina y controlar la motilidad celular. Por ello, ya que muchas de las proteínas implicadas en la formación de contactos focales se han relacionado con la EMT, en este estudio analizamos la relación entre algunas de ellas, en concreto ILK y FAK, y la inducción de la EMT mediada por ^{V600E}B-RAF y TGF β .

Respecto a ILK, varios estudios han demostrado que las células tumorales poseen altos niveles de expresión y actividad de esta proteína en comparación con células no cancerígenas. Además, a ILK se le ha asignado un papel importante en la EMT. Nuestro estudio demuestra que TGF β produce un aumento de la expresión de la proteína ILK, el cual se corresponde con un incremento de su ARNm. En este sentido, aunque hasta ahora no se ha descrito esta activación en células derivadas de carcinomas tiroideos, sí se ha demostrado en otros modelos que TGF β puede aumentar ILK a través de un mecanismo dependiente de Smads y, además, que ILK puede participar en la EMT (51, 53, 345).

Uno de los mecanismos por los que ILK regula la EMT es a través del aumento de Snail1 por un mecanismo dependiente de GSK3- β . En su estado activado, GSK3- β fosforila a Snail1 marcándolo para su posterior ubiquitinación y degradación proteosomal. Asimismo, es importante destacar que ILK puede fosforilar GSK3- β en la serina 9 induciendo su inactivación y, por tanto, aumentando Snail1. Nuestros resultados muestran que en nuestras células tumorales tiroideas GSK3- β está constitutivamente fosforilado en la serina 9 y que, ni el TGF β o la inhibición de la expresión de ILK afectan a su estado de fosforilación. Además, el silenciamiento de ILK tampoco modifica ni los niveles basales de Snail1 ni el aumento producido por TGF β , lo que demuestra que la fosforilación de GSK3- β es independiente de ILK y, por consiguiente, también lo es la regulación de Snail1. Como hemos demostrado que Snail1 es el represor transcripcional principal de E-cadherina, en consecuencia, ILK tampoco es necesaria para la regulación de E-cadherina a través de la vía GSK3- β -Snail1 en estas células. Estos resultados se ven apoyados por el hecho de que el papel de ILK sobre la inactivación de GSK3- β varía dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, la inhibición de la expresión de ILK no modifica la fosforilación de la serina 9 de GSK3- β en células embrionarias, mientras que en

macrófagos y células endoteliales los niveles de p-GSK3- β están muy reducidos (295). Otra posibilidad es que ILK no actúe como una proteína quinasa en estas células. Se ha propuesto que ILK tiene una doble función como proteína quinasa y como proteína adaptadora. Sin embargo, el papel de ILK como quinasa funcional *in vivo* está en entredicho, ya que ILK tiene un dominio quinasa atípico que carece de algunos residuos necesarios para la actividad transferasa. Además, la resolución de la estructura de su dominio catalítico demostró que ésta es incompatible con el dominio de las proteínas quinasas (346). Por otra parte, aunque se ha demostrado que la eliminación de la expresión de ILK o de su actividad mediante mutagénesis afecta a la fosforilación de GSK3- β , también se ha observado que estas mutaciones afectan a las interacciones proteína-proteína (346). Además, en el modelo murino *knock-in* que expresa ILK constitutivamente activo, el estado de fosforilación de GSK3- β no se modifica (347).

En nuestro estudio la falta de efecto de ILK sobre GSK3- β y Snail1 es paralela a la falta de efecto sobre la migración y la invasión en las células 8505C y BHT101. Sin embargo, aunque en nuestro modelo celular ILK no está implicada en la regulación de la EMT a través de Snail1 y E-cadherina, su aumento por TGF β podría estar participando en otros procesos relacionados con la progresión tumoral. Recientemente se ha observado que TGF β produce un aumento de ILK y su asociación con RICTOR (348), lo que puede dar lugar a distintos efectos tumorigénicos mediados por mTORC2. Entre los procesos mediados por ILK podría estar la angiogénesis, ya que la sobreexpresión de ILK se ha asociado con la inducción del factor proangiogénico VEGF (349). Otro de los procesos en los que podría estar implicado ILK es en la represión de marcadores de diferenciación celular. En este sentido, la represión del transportador de yodo y sodio NIS es una de las características principales en cánceres de tiroides poco diferenciados, lo que implica una mayor resistencia al tratamiento. TGF β reprime NIS en células tumorales tiroideas (290) y se ha observado que la enzima PARP-1 forma parte de un complejo transcripcional encargado de reprimir su expresión (350). Curiosamente, uno de los mecanismos por los que ILK regula la expresión de Snail1 es a través de la unión de PARP-1 con su promotor. Según nuestros resultados, ILK1 no regula la expresión de Snail1, pero puede ser que sí reprima la expresión de NIS a través PARP-1 y, por lo tanto, que TGF β esté reprimiendo la expresión de NIS a través de ILK. Por ello, aunque son necesarios más estudios, es importante tener en cuenta la importancia de valorar la combinación de fármacos inhibidores de TGF β junto con los protocolos establecidos de radioterapia en los pacientes con ATC.

Por otra parte, en este trabajo demostramos que la inhibición de ^{V600E}B-RAF se opone al aumento de la expresión de ILK inducido por TGF β , revelando un nuevo mecanismo por el que TGF β regula la expresión de esta proteína. En relación con este aspecto, la combinación de inhibidores de la vía Ras-RAF-MEK-ERK con oligos antisentido de ILK ha mostrado ser una estrategia eficaz para inhibir de forma sinérgica el crecimiento de células de glioblastoma (351), por lo que sería interesante estudiar los efectos de la cooperación entre la vía RAF-MEK-ERK y TGF β sobre la actividad de ILK, la cual podría ser importante para regular alguna de las funciones de ILK sobre proliferación o diferenciación, a través de activación de ciclina D1 o NF- κ B.

6. LA VÍA Src/FAK Y ^{V600E}B-RAF COOPERAN EN LA EMT Y LA MIGRACIÓN CELULAR MEDIADA POR TGFβ

Otra de las proteínas importantes en la formación de contactos focales que se ha relacionado con la inducción de la EMT y con la progresión tumoral es la quinasa FAK, la cual posee una función como proteína adaptadora y actividad catalítica. Además, es importante destacar que algunas células de carcinomas de tiroides presentan unos niveles anormalmente elevados de FAK y de su quinasa activadora Src, resaltando la importancia de estas dos proteínas en el desarrollo de tumores tiroideos (352). En este sentido, recientemente se ha demostrado que la inhibición de Src resulta en una disminución de la actividad de FAK, así como de la migración en células tumorales tiroideas (353).

Nuestros resultados muestran que tanto la Y397 como los residuos Y576, Y577, Y861 y Y407 están fosforilados en condiciones basales en las células 8505C y BHT101. La fosforilación constitutiva de la Y397 es un hecho característico de las células adheridas a un sustrato, ya que esta adhesión permite la interacción de FAK con las integrinas (38). Además, en estas células Src se encuentra fosforilada en la Y419, indicativa de su actividad junto con la desfosforilación de la Y530, en las dos líneas celulares (datos no mostrados). Por lo tanto, una posible actividad basal de Src elevada explicaría el hecho de que encontremos los residuos Y576, Y577, Y861 y Y407 de FAK fosforilados en condiciones basales.

Estos resultados coinciden con los observados por Schweppe *et al.*, en los que describen que Src está constitutivamente activada en líneas celulares de ATC y su inhibición produce una bajada en los niveles de fosforilación de la Y861 de FAK (353). Sin embargo, aunque FAK está fosforilada basalmente, nosotros demostramos que TGFβ aumenta los niveles de fosforilación de los residuos Y576, Y577, Y861 y Y407 y que la inhibición de la expresión de FAK disminuye los niveles basales de Snail1 y revierte el aumento de esta proteína provocado por TGFβ. Además, estos efectos se corresponden con la inhibición de la migración celular mediada por TGFβ, por lo que todo esto demuestra que TGFβ promueve la EMT y la motilidad celular a través de FAK en cáncer de tiroides. Estos datos concuerdan con los publicados por otros autores que demuestran que TGFβ es capaz de aumentar la expresión y la fosforilación de FAK en células humanas de riñón (354), en células tumorales hepáticas (294) y en células de cáncer de mama (355).

Complementariamente a estos resultados, nosotros demostramos que la inhibición de Src, tanto en ausencia como en presencia de TGFβ, produjo los mismos efectos sobre Snail1 que el silenciamiento de FAK, sugiriendo que los efectos sobre la EMT de FAK están relacionados con la activación de Src. Así, se ha demostrado que tras la estimulación con TGFβ se forma un complejo entre la integrina β3, FAK y TβR-II que posteriormente da lugar a la activación de Src (230) y que TGFβ, también puede activar Src/FAK a través de la activación del EGFR (356), por lo que sería posible que la estimulación con TGFβ produjera un incremento de la actividad quinasa de Src, y en consecuencia, un aumento de la activación de FAK. Sin embargo, aunque la activación de FAK está ligada mayoritariamente a la fosforilación por Src, también se ha demostrado que TGFβ puede activar FAK favoreciendo su función como proteína adaptadora a través de un mecanismo independiente de Src y Smad (357). Respecto al mecanismo por el que Src y FAK regulan la expresión de Snail1 en respuesta al tratamiento con TGFβ éste, podría ser a través de la activación de la vía PI3K-AKT. En este sentido, se ha observado que el TGFβ es

capaz de aumentar la actividad de AKT, la cual recupera sus niveles normales tras el silenciamiento de FAK (354), además, en fibroblastos de ratones *knock-out* que no expresan FAK se ha demostrado que FAK regula la expresión de Snail1 a través de la activación de AKT (358). En nuestro modelo, este mecanismo sería posible, ya que resultados preliminares no mostrados en esta memoria indican que la inhibición de AKT disminuye los niveles de expresión de Snail1.

Nuestros resultados demuestran que, al igual que B-RAF, Src y FAK también cooperan con TGF β en la inducción de Snail1 y en la migración celular. Sin embargo, a pesar de la disminución de Snail1 tras la inhibición de Src/FAK, sólo observamos un aumento de los niveles de E-cadherina al inhibir Src en las células BHT101. Nuestros datos son aparentemente contrarios a los publicados por otros autores que demuestran que la eliminación de la expresión FAK aumenta E-cadherina en queratinocitos, fibroblastos embrionarios murinos, y otros tipos celulares (358, 359), o que la activación de Src y FAK por TGF β bloquea la expresión de E-cadherina (294). Una explicación para esta posible contradicción sería que la presencia de ^{V600E}B-RAF en células tumorales tiroideas, no modifica el efecto de Src y FAK sobre Snail1, pero si tiene un fuerte papel represor de la expresión de E-cadherina, independiente de Snail1, que no puede ser contrarrestado por la falta de Src y FAK, al menos en las células 8505C. Sin embargo, es importante apuntar que no todos los efectos de Src son dependientes de FAK. De hecho, se ha observado que la sobreexpresión de Src constitutivamente activo puede aumentar la migración celular en ausencia de FAK (360) y se ha demostrado que puede promover la EMT a través de la vía de p38 (230), pudiendo ser ésta, junto con la vía de PI3K/AKT, una alternativa por la que Src estuvieran regulando Snail1. Esta hipótesis se ve reforzada por el aumento de actividad de p38 encontrado en muestras de tejidos de distintos tipos de tumores tiroideos (361). Esto indica que aunque Src y FAK están estrechamente relacionadas, se deben tener en cuenta sus efectos por separado a la hora de evaluar sus posibles implicaciones y son necesarios futuros estudios para esclarecer las vías de señalización mediadas por Src-FAK que están implicadas en el cáncer de tiroides.

Por tanto, nuestros resultados demuestran que TGF β no necesita únicamente a ^{V600E}B-RAF para regular Snail1 y E-cadherina, sino que también requiere a Src y FAK y, que estos mecanismos actúan de forma independiente. Esta conclusión se ve reforzada por el hecho de que la inhibición de ^{V600E}B-RAF no afecta a las fosforilaciones de FAK mediadas por TGF β y Src. Además, la inhibición conjunta de ^{V600E}B-RAF y Src, tanto en ausencia como en presencia de TGF β , produce una disminución de Snail1 aún mayor que la provocada por la inhibición de cada una de estas proteínas independientemente. Además, la inhibición de ^{V600E}B-RAF y no de Src da lugar a un aumento de la expresión de E-cadherina. Todo esto, junto con el hecho de que ninguna de estas condiciones afecta a la fosforilación de Smad2, indica que ^{V600E}B-RAF, Src y FAK participan en la regulación de Snail1 mediada por TGF β de forma independiente de Smads.

Estos resultados ponen de manifiesto la dependencia de la señalización mediada por ^{V600E}B-RAF para llevar a cabo la EMT inducida por TGF β y la consiguiente progresión tumoral del cáncer tiroideo (figura 77). Además, el hecho de que Snail1 se regule de manera independiente por B-RAF y Src/FAK muestra la importancia de valorar los efectos de Snail1 independientes de E-cadherina. Por tanto, este estudio, además de aportar nuevos datos para

comprender los mecanismos tumorigénicos mediados por V^{600E} B-RAF y TGF β , muestra la importancia de considerar la cooperación entre estas dos vías de señalización y poder actuar de forma conveniente a la hora del desarrollo de nuevos protocolos terapéuticos para frenar la progresión del cáncer de tiroides.

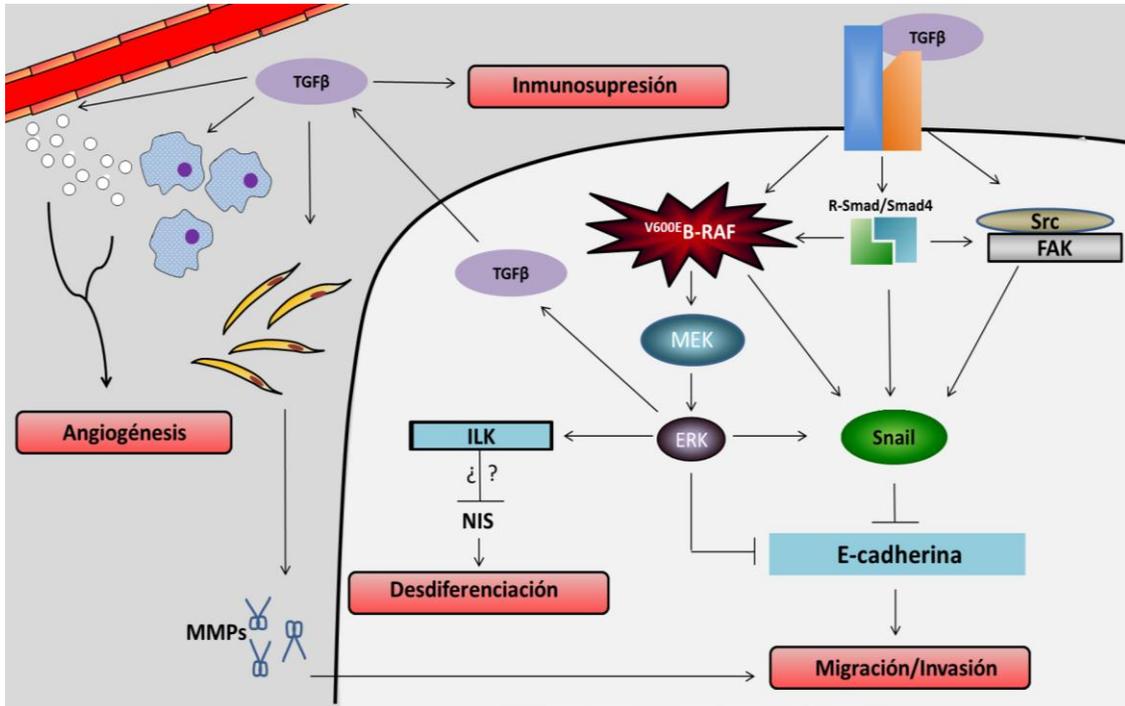


Figura 77. Mecanismos moleculares mediados por V^{600E} B-RAF en la progresión del cáncer de tiroides. En la figura se resume la implicación de V^{600E} B-RAF y su relación con TGF β en los distintos procesos celulares que regulan la progresión tumoral de células tumorales tiroideas, basándonos en los resultados obtenidos. En primer lugar, la proteína oncogénica V^{600E} B-RAF favorece la migración y la invasión celular a través del aumento de Snail1 y la consecuente represión de E-cadherina. A su vez, existe un mecanismo alternativo, mediado por MEK-ERK, por el cual V^{600E} B-RAF reprime la expresión de E-cadherina independientemente de Snail1. Además, V^{600E} B-RAF y TGF β cooperan en la regulación de la EMT y la migración e invasión celular. V^{600E} B-RAF posee un efecto dual sobre TGF β , por una parte, regula la secreción de TGF β a la MEC, donde esta citoquina podría regular la angiogénesis, la inmunosupresión y la invasión celular a través de la estimulación de distintos tipos celulares implicados en la progresión tumoral, como las células endoteliales, macrófagos y fibroblastos. Por otra parte, V^{600E} B-RAF media el efecto de TGF β sobre la expresión de Snail1 y E-cadherina, favoreciendo la migración y la invasión celular, y favorece una posible desdiferenciación celular a través de la expresión de ILK. Finalmente, TGF β también regula la EMT a través la activación de Src y FAK por mecanismos independientes de V^{600E} B-RAF. Todos estos procesos no afectan a la activación de Smads, indicando que o bien son independientes u ocurren por debajo de la activación de estos factores de transcripción.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

1. V^{600E} B-RAF aumenta la migración e invasión celular de las células tiroideas 850C y BHT101 a través de la vía MEK-ERK.
2. V^{600E} B-RAF induce la EMT a través del aumento de Snail1 y la represión transcripcional de E-cadherina.
3. V^{600E} B-RAF aumenta Snail1 a través de dos mecanismos, uno a nivel transcripcional independiente de la activación de ERK, y otro a nivel postranscripcional dependiente de la vía MEK-ERK.
4. La sobreexpresión de Snail1 disminuye los niveles de E-cadherina, produce cambios morfológicos característicos de la EMT y favorece los procesos de migración e invasión celular.
5. V^{600E} B-RAF reprime la expresión de E-cadherina a través de mecanismos dependientes e independientes de Snail1.
- 6.- El TGF β carece de efectos antiproliferativos y proapoptóticos en las células tumorales tiroideas WRO, 8505C y BHT101
5. El TGF β promueve la EMT disminuyendo los niveles del marcador epitelial E-cadherina, y aumentando la expresión de los marcadores mesenquimales Fibronectina y Snail1. La disminución de E-cadherina por TGF β se produce a través del aumento de Snail1.
- 6.- El TGF β aumenta la migración celular, pero no la invasión de las células tumorales tiroideas.
7. V^{600E} B-RAF aumenta la secreción de TGF β a través de la vía MEK-ERK, pero este mecanismo no es el responsable del aumento de la migración e invasión celular producido por este oncogén.
8. La vía V^{600E} B-RAF-MEK-ERK coopera con el TGF β en la inducción de la EMT. El aumento de Snail1 y la disminución de E-cadherina se regulan por TGF β a través de un mecanismo dependiente V^{600E} B-RAF.
9. El TGF β aumenta la expresión de ILK de manera dependiente de V^{600E} B-RAF. ILK no contribuye a la EMT a través de la regulación de Snail1 y E-cadherina.
10. El TGF β induce la EMT y favorece la migración celular a través de la vía Src-FAK de forma independiente de V^{600E} B-RAF.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. Epub 2000/01/27.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. Epub 2011/03/08.
3. http://www.thyroidcommunity.com/global/tc_eng_hp_homepage.asp.
4. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):292-306. Epub 2006/03/25.
5. Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):367-75. Epub 2005/05/03.
6. Harach HR, Escalante DA, Day ES. Thyroid cancer and thyroiditis in Salta, Argentina: a 40-yr study in relation to iodine prophylaxis. *Endocr Pathol*. 2002;13(3):175-81. Epub 2002/11/26.
7. Kawabata W, Suzuki T, Moriya T, Fujimori K, Naganuma H, Inoue S, et al. Estrogen receptors (alpha and beta) and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 in thyroid disorders: possible in situ estrogen synthesis and actions. *Mod Pathol*. 2003;16(5):437-44. Epub 2003/05/16.
8. Lee ML, Chen GG, Vlantis AC, Tse GM, Leung BC, van Hasselt CA. Induction of thyroid papillary carcinoma cell proliferation by estrogen is associated with an altered expression of Bcl-xL. *Cancer J*. 2005;11(2):113-21. Epub 2005/06/23.
9. Lindor NM, Greene MH. The concise handbook of family cancer syndromes. Mayo Familial Cancer Program. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(14):1039-71. Epub 1998/07/22.
10. Vasko VV, Saji M. Molecular mechanisms involved in differentiated thyroid cancer invasion and metastasis. *Curr Opin Oncol*. 2007;19(1):11-7. Epub 2006/11/30.
11. Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, Troncone G, et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(2):497-508. Epub 2006/05/27.
12. Fagin JA, Mitsiades N. Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008;22(6):955-69. Epub 2008/12/02.
13. Jhiang SM. The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene*. 2000;19(49):5590-7. Epub 2000/12/15.
14. Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol*. 2008;21 Suppl 2:S37-43. Epub 2008/06/24.
15. <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/> AF.
16. Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol*. 2003;120(1):71-7. Epub 2003/07/18.

17. Hara H, Fulton N, Yashiro T, Ito K, DeGroot LJ, Kaplan EL. N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery*. 1994;116(6):1010-6. Epub 1994/12/01.
18. Kim SK, Song KH, Lim SD, Lim YC, Yoo YB, Kim JS, et al. Clinical and pathological features and the BRAF(V600E) mutation in patients with papillary thyroid carcinoma with and without concurrent Hashimoto thyroiditis. *Thyroid*. 2009;19(2):137-41. Epub 2008/11/19.
19. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63(7):1454-7. Epub 2003/04/03.
20. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci R, Martinelli M, et al. BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(5):2414-20. Epub 2004/05/06.
21. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocrine reviews*. 2007;28(7):742-62.
22. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11):5399-404. Epub 2003/11/07.
23. Smallridge RC, Marlow LA, Copland JA. Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(1):17-44. Epub 2008/11/07.
24. Takano T, Ito Y, Hirokawa M, Yoshida H, Miyauchi A. BRAF V600E mutation in anaplastic thyroid carcinomas and their accompanying differentiated carcinomas. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1549-53. Epub 2007/04/25.
25. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011;331(6024):1559-64. Epub 2011/03/26.
26. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(10):816-26. Epub 2004/10/02.
27. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003;112(4):453-65. Epub 2003/02/26.
28. Olson MF, Sahai E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26(4):273-87. Epub 2008/05/24.
29. Raftopoulos M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*. 2004;265(1):23-32. Epub 2003/12/31.
30. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):362-74. Epub 2003/05/02.
31. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 2001;294(5547):1708-12. Epub 2001/11/27.

32. Moro L, Venturino M, Bozzo C, Silengo L, Altruda F, Beguinot L, et al. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J.* 1998;17(22):6622-32. Epub 1998/11/21.
33. Gabarra-Niecko V, Schaller MD, Dunty JM. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2003;22(4):359-74. Epub 2003/07/30.
34. McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(7):505-15. Epub 2005/08/03.
35. van Nimwegen MJ, van de Water B. Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 2007;73(5):597-609. Epub 2006/09/26.
36. McLean GW, Komiyama NH, Serrels B, Asano H, Reynolds L, Conti F, et al. Specific deletion of focal adhesion kinase suppresses tumor formation and blocks malignant progression. *Genes Dev.* 2004;18(24):2998-3003. Epub 2004/12/17.
37. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(1):56-68. Epub 2005/02/03.
38. Cooper LA, Shen TL, Guan JL. Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol Cell Biol.* 2003;23(22):8030-41. Epub 2003/10/31.
39. Hanks SK, Ryzhova L, Shin NY, Brabek J. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci.* 2003;8:d982-96. Epub 2003/04/18.
40. Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1692(2-3):77-102. Epub 2004/07/13.
41. Nakamura K, Yano H, Schaefer E, Sabe H. Different modes and qualities of tyrosine phosphorylation of Fak and Pyk2 during epithelial-mesenchymal transdifferentiation and cell migration: analysis of specific phosphorylation events using site-directed antibodies. *Oncogene.* 2001;20(21):2626-35. Epub 2001/06/23.
42. Frame MC. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1602(2):114-30. Epub 2002/05/22.
43. Aleshin A, Finn RS. SRC: a century of science brought to the clinic. *Neoplasia.* 2010;12(8):599-607. Epub 2010/08/07.
44. Yeatman TJ. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(6):470-80. Epub 2004/06/02.
45. Jove R, Hanafusa H. Cell transformation by the viral src oncogene. *Annu Rev Cell Biol.* 1987;3:31-56. Epub 1987/01/01.
46. Rengifo-Cam W, Konishi A, Morishita N, Matsuoka H, Yamori T, Nada S, et al. Csk defines the ability of integrin-mediated cell adhesion and migration in human colon cancer cells:

implication for a potential role in cancer metastasis. *Oncogene*. 2004;23(1):289-97. Epub 2004/01/09.

47. Masaki T, Okada M, Tokuda M, Shiratori Y, Hatase O, Shirai M, et al. Reduced C-terminal Src kinase (Csk) activities in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1999;29(2):379-84. Epub 1999/01/27.

48. Chang JH, Gill S, Settleman J, Parsons SJ. c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. *J Cell Biol*. 1995;130(2):355-68. Epub 1995/07/01.

49. Noritake H, Miyamori H, Goto C, Seiki M, Sato H. Overexpression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 (TIMP-1) in metastatic MDCK cells transformed by v-src. *Clin Exp Metastasis*. 1999;17(2):105-10. Epub 1999/07/20.

50. Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Behrens J, et al. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol*. 2002;4(3):222-31. Epub 2002/02/12.

51. McDonald PC, Fielding AB, Dedhar S. Integrin-linked kinase--essential roles in physiology and cancer biology. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 19):3121-32. Epub 2008/09/19.

52. Hannigan G, Troussard AA, Dedhar S. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(1):51-63. Epub 2005/01/05.

53. Li Y, Yang J, Dai C, Wu C, Liu Y. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest*. 2003;112(4):503-16. Epub 2003/08/20.

54. Lee YI, Kwon YJ, Joo CK. Integrin-linked kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316(4):997-1001. Epub 2004/03/27.

55. Persad S, Attwell S, Gray V, Mawji N, Deng JT, Leung D, et al. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J Biol Chem*. 2001;276(29):27462-9. Epub 2001/04/21.

56. Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(19):11211-6. Epub 1998/09/16.

57. Persad S, Attwell S, Gray V, Delcommenne M, Troussard A, Sanghera J, et al. Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3207-12. Epub 2000/03/15.

58. Legate KR, Montanez E, Kudlacek O, Fassler R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(1):20-31. Epub 2006/02/24.

59. Novak A, Dedhar S. Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci*. 1999;56(5-6):523-37. Epub 2001/02/24.

60. Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2007;17(1):45-51. Epub 2007/01/09.
61. Troussard AA, Costello P, Yoganathan TN, Kumagai S, Roskelley CD, Dedhar S. The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). *Oncogene.* 2000;19(48):5444-52. Epub 2000/12/15.
62. Novak A, Hsu SC, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Papkoff J, Montesano R, et al. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(8):4374-9. Epub 1998/05/16.
63. Wu C, Keightley SY, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Coppolino M, Goicoechea S, et al. Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity. *J Biol Chem.* 1998;273(1):528-36. Epub 1998/02/07.
64. Barbera MJ, Puig I, Dominguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, Peiro S, et al. Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene.* 2004;23(44):7345-54. Epub 2004/08/03.
65. Filipenko NR, Attwell S, Roskelley C, Dedhar S. Integrin-linked kinase activity regulates Rac- and Cdc42-mediated actin cytoskeleton reorganization via alpha-PIX. *Oncogene.* 2005;24(38):5837-49. Epub 2005/05/18.
66. Deng JT, Van Lierop JE, Sutherland C, Walsh MP. Ca²⁺-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase. *J Biol Chem.* 2001;276(19):16365-73. Epub 2001/03/30.
67. Muranyi A, MacDonald JA, Deng JT, Wilson DP, Haystead TA, Walsh MP, et al. Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. *Biochem J.* 2002;366(Pt 1):211-6. Epub 2002/05/29.
68. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1776-84. Epub 2003/12/18.
69. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol.* 2006;172(7):973-81. Epub 2006/03/29.
70. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-8. Epub 2009/06/03.
71. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19(2):156-72. Epub 2009/01/21.
72. De Craene B, Gilbert B, Stove C, Bruyneel E, van Roy F, Berx G. The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res.* 2005;65(14):6237-44. Epub 2005/07/19.

73. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000;2(2):76-83. Epub 2000/02/03.
74. Savagner P, Yamada KM, Thiery JP. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 1997;137(6):1403-19. Epub 1997/06/16.
75. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol.* 1994;127(6 Pt 2):2021-36. Epub 1994/12/01.
76. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(2):118-32. Epub 2004/02/18.
77. Zhu W, Leber B, Andrews DW. Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J.* 2001;20(21):5999-6007. Epub 2001/11/02.
78. Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol.* 1997;139(7):1861-72. Epub 1998/02/07.
79. Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarnier S, Nagy V, et al. A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J.* 2002;21(8):1948-56. Epub 2002/04/16.
80. Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, et al. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(26):9182-7. Epub 2005/06/17.
81. Steinhilber U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, Huber O. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J Biol Chem.* 2001;276(7):4972-80. Epub 2000/11/15.
82. Gumbiner BM. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol.* 2000;148(3):399-404. Epub 2000/02/09.
83. Ferber EC, Kajita M, Wadlow A, Tobiansky L, Niessen C, Ariga H, et al. A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus. *J Biol Chem.* 2008;283(19):12691-700. Epub 2008/03/22.
84. Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):365-75. Epub 2004/09/07.
85. Vincent T, Neve EP, Johnson JR, Kukalev A, Rojo F, Albanell J, et al. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol.* 2009;11(8):943-50. Epub 2009/07/15.
86. Strathdee G. Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(5):373-9. Epub 2002/08/23.

87. Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res.* 2010;8(5):629-42. Epub 2010/05/13.
88. Kondo M, Cubillo E, Tobiume K, Shirakihara T, Fukuda N, Suzuki H, et al. A role for Id in the regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ.* 2004;11(10):1092-101. Epub 2004/06/08.
89. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(5):548-58. Epub 2005/08/16.
90. Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5(5):806-11. Epub 1993/10/01.
91. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1198(1):11-26. Epub 1994/05/27.
92. Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci.* 1999;24(2):73-6. Epub 1999/03/31.
93. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):442-54. Epub 2002/08/22.
94. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature.* 1998;392(6672):190-3. Epub 1998/03/27.
95. de Herreros AG, Peiro S, Nassour M, Savagner P. Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010;15(2):135-47. Epub 2010/05/11.
96. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(3):155-66. Epub 2002/05/08.
97. Grau Y, Carteret C, Simpson P. Mutations and Chromosomal Rearrangements Affecting the Expression of Snail, a Gene Involved in Embryonic Patterning in *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics.* 1984;108(2):347-60. Epub 1984/10/01.
98. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* 2005;132(14):3151-61. Epub 2005/06/29.
99. Knight RD, Shimeld SM. Identification of conserved C2H2 zinc-finger gene families in the Bilateria. *Genome Biol.* 2001;2(5):RESEARCH0016. Epub 2001/06/02.
100. Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol.* 2004;24(1):306-19. Epub 2003/12/16.
101. Herranz N, Pasini D, Diaz VM, Franci C, Gutierrez A, Dave N, et al. Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Mol Cell Biol.* 2008;28(15):4772-81. Epub 2008/06/04.

102. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007;7(6):415-28. Epub 2007/05/18.
103. Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, et al. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 2004;6(10):931-40. Epub 2004/09/28.
104. Schlessinger K, Hall A. GSK-3beta sets Snail's pace. *Nat Cell Biol*. 2004;6(10):913-5. Epub 2004/10/02.
105. Peinado H, Portillo F, Cano A. Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta. *Cell Cycle*. 2005;4(12):1749-52. Epub 2005/11/19.
106. Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, Csiszar K, Fong KS, Vega S, et al. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J*. 2005;24(19):3446-58. Epub 2005/08/13.
107. Vinas-Castells R, Beltran M, Valls G, Gomez I, Garcia JM, Montserrat-Sentis B, et al. The hypoxia-controlled FBXL14 ubiquitin ligase targets SNAIL1 for proteasome degradation. *J Biol Chem*. 2010;285(6):3794-805. Epub 2009/12/04.
108. Yang Z, Rayala S, Nguyen D, Vadlamudi RK, Chen S, Kumar R. Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. *Cancer Res*. 2005;65(8):3179-84. Epub 2005/04/19.
109. MacPherson MR, Molina P, Souchelnytskyi S, Wernstedt C, Martin-Perez J, Portillo F, et al. Phosphorylation of serine 11 and serine 92 as new positive regulators of human Snail1 function: potential involvement of casein kinase-2 and the cAMP-activated kinase protein kinase A. *Mol Biol Cell*. 2010;21(2):244-53. Epub 2009/11/20.
110. Wu Y, Zhou BP. Snail: More than EMT. *Cell Adh Migr*. 2010;4(2):199-203. Epub 2010/02/20.
111. Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, et al. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem*. 2002;277(42):39209-16. Epub 2002/08/06.
112. Beltran M, Puig I, Pena C, Garcia JM, Alvarez AB, Pena R, et al. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev*. 2008;22(6):756-69. Epub 2008/03/19.
113. Hou Z, Peng H, Ayyanathan K, Yan KP, Langer EM, Longmore GD, et al. The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression. *Mol Cell Biol*. 2008;28(10):3198-207. Epub 2008/03/19.
114. Solanas G, Porta-de-la-Riva M, Agusti C, Casagolda D, Sanchez-Aguilera F, Larriba MJ, et al. E-cadherin controls beta-catenin and NF-kappaB transcriptional activity in mesenchymal gene expression. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 13):2224-34. Epub 2008/06/21.
115. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions:

a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 3):499-511. Epub 2003/01/01.

116. Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, Shimonishi T, Matsuyama S, Kitahara K, et al. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2005;92(2):252-8. Epub 2005/01/26.

117. Vega S, Morales AV, Ocana OH, Valdes F, Fabregat I, Nieto MA. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 2004;18(10):1131-43. Epub 2004/05/25.

118. Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell.* 2009;15(3):195-206. Epub 2009/03/03.

119. Martin TA, Goyal A, Watkins G, Jiang WG. Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2005;12(6):488-96. Epub 2005/05/03.

120. Olmeda D, Montes A, Moreno-Bueno G, Flores JM, Portillo F, Cano A. Snai1 and Snai2 collaborate on tumor growth and metastasis properties of mouse skin carcinoma cell lines. *Oncogene.* 2008;27(34):4690-701. Epub 2008/04/15.

121. Roy HK, Smyrk TC, Koetsier J, Victor TA, Wali RK. The transcriptional repressor SNAIL is overexpressed in human colon cancer. *Dig Dis Sci.* 2005;50(1):42-6. Epub 2005/02/17.

122. Moody SE, Perez D, Pan TC, Sarkisian CJ, Portocarrero CP, Sterner CJ, et al. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell.* 2005;8(3):197-209. Epub 2005/09/20.

123. Olmeda D, Jorda M, Peinado H, Fabra A, Cano A. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene.* 2007;26(13):1862-74. Epub 2006/10/18.

124. Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2008;65(22):3525-44.

125. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 2007;26(22):3100-12.

126. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR.* 2004;68(2):320-44.

127. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. Section Title: Mammalian Pathological Biochemistry. 2003;1653(1):25-40.

128. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical journal.* 2000;351 Pt 2(Journal Article):289-305.

129. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Section Title: Mammalian Pathological Biochemistry. 2002;417(6892):949-54.

130. Barnier JV, Papin C, Eychene A, Lecoq O, Calothy G. The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. Section Title: Biochemical Genetics. 1995;270(40):23381-9.
131. Storm SM, Cleveland JL, Rapp UR. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. Section Title: Biochemical Genetics. 1990;5(3):345-51.
132. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take center stage. Section Title: General Biochemistry. 2004;5(11):875-85.
133. Tzivion G, Avruch J. 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. J Biol Chem. 2002;277(5):3061-4. Epub 2001/11/16.
134. Dhillon AS, Pollock C, Steen H, Shaw PE, Mischak H, Kolch W. Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. Section Title: Enzymes. 2002;22(10):3237-46.
135. Light Y, Paterson H, Marais R. 14-3-3 antagonizes Ras-mediated Raf-1 recruitment to the plasma membrane to maintain signaling fidelity. Section Title: General Biochemistry. 2002;22(14):4984-96.
136. Clark GJ, Drugan JK, Rossman KL, Carpenter JW, Rogers-Graham K, Fu H, et al. 14-3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. The Journal of biological chemistry. 1997;272(34):20990-3.
137. Rommel C, Radziwill G, Lovric J, Noeldeke J, Heinicke T, Jones D, et al. Activated Ras displaces 14-3-3 protein from the amino terminus of c-Raf-1. Oncogene. 1996;12(3):609-19.
138. Abraham D, Podar K, Pacher M, Kubicek M, Welzel N, Hemmings BA, et al. Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. The Journal of biological chemistry. 2000;275(29):22300-4.
139. Jaumot M, Hancock JF. Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. Oncogene. 2001;20(30):3949-58.
140. Ory S, Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD, Morrison DK. Protein Phosphatase 2A Positively Regulates Ras Signaling by Dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on Critical 14-3-3 Binding Sites. Section Title: Mammalian Biochemistry. 2003;13(16):1356-64.
141. Chong H, Lee J, Guan KL. Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. The EMBO journal. 2001;20(14):3716-27.
142. Zhang BH, Guan KL. Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. The EMBO journal. 2000;19(20):5429-39.
143. Tzivion G, Luo Z, Avruch J. A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. Section Title: Enzymes. 1998;394(6688):88-92.
144. Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). Science (New York, NY). 1999;286(5445):1741-4.

145. Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. Section Title: Mammalian Biochemistry. 2006;26(6):2262-72.
146. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Section Title: Mammalian Pathological Biochemistry. 2004;116(6):855-67.
147. Sun H, King AJ, Diaz HB, Marshall MS. Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak. *Current biology : CB*. 2000;10(5):281-4.
148. King AJ, Sun H, Diaz B, Barnard D, Miao W, Bagrodia S, et al. The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature*. 1998;396(6707):180-3.
149. Chaudhary A, King WG, Mattaliano MD, Frost JA, Diaz B, Morrison DK, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. Section Title: Mammalian Biochemistry. 2000;10(9):551-4.
150. Chiloeches A, Mason CS, Marais R. S338 phosphorylation of Raf-1 is independent of phosphatidylinositol 3-kinase and Pak3. Section Title: Mammalian Biochemistry. 2001;21(7):2423-34.
151. Garnett MJ, Rana S, Paterson H, Barford D, Marais R. Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. Section Title: Mammalian Biochemistry. 2005;20(6):963-9.
152. Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, et al. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1196-212. Epub 2007/06/09.
153. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. Section Title: Mammalian Pathological Biochemistry. 2004;6(4):313-9.
154. DeLuca AM, Srinivas A, Alani RM. BRAF kinase in melanoma development and progression. *Expert Rev Mol Med*. 2008;10:e6. Epub 2008/02/19.
155. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(2):245-62. Epub 2005/06/11.
156. Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M, Zhu Z, Nikiforova MN, et al. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest*. 2005;115(1):94-101. Epub 2005/01/05.
157. Oler G, Ebina KN, Michaluart P, Jr., Kimura ET, Cerutti J. Investigation of BRAF mutation in a series of papillary thyroid carcinoma and matched-lymph node metastasis reveals a new mutation in metastasis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;62(4):509-11. Epub 2005/04/06.
158. Hou P, Liu D, Xing M. Functional characterization of the T1799-1801del and A1799-1816ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer. *Cell Cycle*. 2007;6(3):377-9. Epub 2007/02/14.

159. Moretti S, Macchiarulo A, De Falco V, Avenia N, Barbi F, Carta C, et al. Biochemical and molecular characterization of the novel BRAF(V599Ins) mutation detected in a classic papillary thyroid carcinoma. *Oncogene*. 2006;25(30):4235-40. Epub 2006/02/28.
160. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(2):216-22. Epub 2006/01/26.
161. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*. 2003;33(1):19-20. Epub 2002/11/26.
162. Knauf JA, Fagin JA. Role of MAPK pathway oncoproteins in thyroid cancer pathogenesis and as drug targets. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(2):296-303. Epub 2009/02/24.
163. Preto A, Goncalves J, Rebocho AP, Figueiredo J, Meireles AM, Rocha AS, et al. Proliferation and survival molecules implicated in the inhibition of BRAF pathway in thyroid cancer cells harbouring different genetic mutations. *BMC Cancer*. 2009;9:387. Epub 2009/11/03.
164. Wickenden JA, Jin H, Johnson M, Gillings AS, Newson C, Austin M, et al. Colorectal cancer cells with the BRAF(V600E) mutation are addicted to the ERK1/2 pathway for growth factor-independent survival and repression of BIM. *Oncogene*. 2008;27(57):7150-61.
165. Cartlidge RA, Thomas GR, Cagnol S, Jong KA, Molton SA, Finch AJ, et al. Oncogenic BRAF(V600E) inhibits BIM expression to promote melanoma cell survival. *Pigment cell & melanoma research*. 2008;21(5):534-44.
166. Salerno P, De Falco V, Tamburrino A, Nappi TC, Vecchio G, Schweppe RE, et al. Cytostatic activity of adenosine triphosphate-competitive kinase inhibitors in BRAF mutant thyroid carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(1):450-5. Epub 2009/11/03.
167. Sanchez-Hernandez I, Baquero P, Calleros L, Chiloeches A. Dual inhibition of (V600E)BRAF and the PI3K/AKT/mTOR pathway cooperates to induce apoptosis in melanoma cells through a MEK-independent mechanism. *Cancer Lett*. 2012;314(2):244-55. Epub 2011/11/08.
168. Palona I, Namba H, Mitsutake N, Starenki D, Podtcheko A, Sedliarou I, et al. BRAFV600E promotes invasiveness of thyroid cancer cells through nuclear factor kappaB activation. *Endocrinology*. 2006;147(12):5699-707.
169. Palona I, Namba H, Mitsutake N, Starenki D, Podtcheko A, Sedliarou I, et al. BRAFV600E promotes invasiveness of thyroid cancer cells through nuclear factor kappaB activation. *Endocrinology*. 2006;147(12):5699-707. Epub 2006/09/09.
170. Gallagher SJ, Thompson JF, Indsto J, Scurr LL, Lett M, Gao BF, et al. p16INK4a expression and absence of activated B-RAF are independent predictors of chemosensitivity in melanoma tumors. *Neoplasia*. 2008;10(11):1231-9. Epub 2008/10/28.
171. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest*. 1993;91(1):179-84. Epub 1993/01/01.

172. Dankort D, Filenova E, Collado M, Serrano M, Jones K, McMahon M. A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev.* 2007;21(4):379-84. Epub 2007/02/15.
173. Cheung M, Sharma A, Madhunapantula SV, Robertson GP. Akt3 and mutant V600E B-Raf cooperate to promote early melanoma development. *Cancer research.* 2008;68(9):3429-39.
174. Zhuang D, Mannava S, Grachtchouk V, Tang WH, Patil S, Wawrzyniak JA, et al. C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. *Oncogene.* 2008;27(52):6623-34.
175. Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell.* 2008;132(3):363-74.
176. Klein RM, Spofford LS, Abel EV, Ortiz A, Aplin AE. B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Molecular biology of the cell.* 2008;19(2):498-508.
177. Argast GM, Croy CH, Coutts KL, Zhang Z, Litman E, Chan DC, et al. Plexin B1 is repressed by oncogenic B-Raf signaling and functions as a tumor suppressor in melanoma cells. *Oncogene.* 2009;28(30):2697-709.
178. Old WM, Shabb JB, Houel S, Wang H, Coutts KL, Yen CY, et al. Functional proteomics identifies targets of phosphorylation by B-Raf signaling in melanoma. *Molecular cell.* 2009;34(1):115-31.
179. Liang S, Sharma A, Peng HH, Robertson G, Dong C. Targeting mutant (V600E) B-Raf in melanoma interrupts immunoediting of leukocyte functions and melanoma extravasation. *Cancer research.* 2007;67(12):5814-20.
180. Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res.* 2005;65(10):4238-45. Epub 2005/05/19.
181. Nucera C, Nehs MA, Nagarkatti SS, Sadow PM, Mekel M, Fischer AH, et al. Targeting BRAFV600E with PLX4720 displays potent antimigratory and anti-invasive activity in preclinical models of human thyroid cancer. *Oncologist.* 2011;16(3):296-309. Epub 2011/03/01.
182. Salvatore G, De Falco V, Salerno P, Nappi TC, Pepe S, Troncone G, et al. BRAF is a therapeutic target in aggressive thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(5):1623-9. Epub 2006/03/15.
183. Nucera C, Porrello A, Antonello ZA, Mekel M, Nehs MA, Giordano TJ, et al. B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(23):10649-54. Epub 2010/05/26.
184. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene.* 2003;22(29):4578-80. Epub 2003/07/26.

185. Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini P, et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene*. 2004;23(44):7436-40. Epub 2004/07/27.
186. Carta C, Moretti S, Passeri L, Barbi F, Avenia N, Cavaliere A, et al. Genotyping of an Italian papillary thyroid carcinoma cohort revealed high prevalence of BRAF mutations, absence of RAS mutations and allowed the detection of a new mutation of BRAF oncoprotein (BRAF(V599Ins)). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64(1):105-9. Epub 2006/01/13.
187. Mesa C, Jr., Mirza M, Mitsutake N, Sartor M, Medvedovic M, Tomlinson C, et al. Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. *Cancer Res*. 2006;66(13):6521-9. Epub 2006/07/05.
188. Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C, Jr., Zhang L, Fagin JA. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Res*. 2005;65(6):2465-73. Epub 2005/03/23.
189. Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG, Misek DE, Vinco M, Sanders D, et al. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene*. 2005;24(44):6646-56. Epub 2005/07/12.
190. Nardone HC, Ziober AF, LiVolsi VA, Mandel SJ, Baloch ZW, Weber RS, et al. c-Met expression in tall cell variant papillary carcinoma of the thyroid. *Cancer*. 2003;98(7):1386-93. Epub 2003/09/26.
191. Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY, et al. Influence of the BRAF V600E mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(9):3667-70. Epub 2006/06/15.
192. Knauf JA, Sartor MA, Medvedovic M, Lundsmith E, Ryder M, Salzano M, et al. Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGFbeta signaling. *Oncogene*. 2011;30(28):3153-62. Epub 2011/03/09.
193. Xing M. Gene methylation in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology*. 2007;148(3):948-53. Epub 2006/09/02.
194. Hu S, Liu D, Tufano RP, Carson KA, Rosenbaum E, Cohen Y, et al. Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Int J Cancer*. 2006;119(10):2322-9. Epub 2006/07/22.
195. Sheils OM, Sweeney EC. TSH receptor status of thyroid neoplasms--TaqMan RT-PCR analysis of archival material. *J Pathol*. 1999;188(1):87-92. Epub 1999/07/09.
196. Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, Ain KB. Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I⁻ symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(7):2449-57. Epub 1999/07/15.

197. Lazar V, Bidart JM, Caillou B, Mahe C, Lacroix L, Filetti S, et al. Expression of the Na⁺/I⁻ symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(9):3228-34. Epub 1999/09/16.
198. Arturi F, Russo D, Bidart JM, Scarpelli D, Schlumberger M, Filetti S. Expression pattern of the pendrin and sodium/iodide symporter genes in human thyroid carcinoma cell lines and human thyroid tumors. *Eur J Endocrinol.* 2001;145(2):129-35. Epub 2001/07/17.
199. Mirebeau-Prunier D, Guyetant S, Rodien P, Franc B, Baris O, Rohmer V, et al. Decreased expression of thyrotropin receptor gene suggests a high-risk subgroup for oncocytic adenoma. *Eur J Endocrinol.* 2004;150(3):269-76. Epub 2004/03/12.
200. Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C, Jr., Zhang L, Fagin JA. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer research.* 2005;65(6):2465-73.
201. Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P. The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13(1):257-69. Epub 2006/04/08.
202. Liu D, Hu S, Hou P, Jiang D, Condouris S, Xing M. Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant. *Clin Cancer Res.* 2007;13(4):1341-9. Epub 2007/02/24.
203. Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, Morisi R, Moretti S, Bruno R, et al. BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(7):2840-3. Epub 2007/05/10.
204. Cancer: Inhibition of mutant BRAF is associated with thyroid tumor regression and restoration of radioiodine uptake in vivo. *Nat Rev Endocrinol.* 2011. Epub 2011/12/07.
205. Flaherty K, Puzanov I, Sosman J, Kim K, Ribas A, McArthur G, et al. Phase I study of PLX4032: Proof of concept for V600EBRAF mutation as a therapeutic target. *J Clin Oncol.* 2009;27(15s).
206. Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell.* 2010;140(2):209-21. Epub 2010/02/10.
207. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature.* 2010;464(7287):431-5.
208. Poulidakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature.* 2010;464(7287):427-30.
209. Cichowski K, Janne PA. Drug discovery: inhibitors that activate. *Nature.* 2010;464(7287):358-9. Epub 2010/03/20.
210. Padua D, Massague J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res.* 2009;19(1):89-102. Epub 2008/12/04.

211. Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T, et al. Latent TGF-beta structure and activation. *Nature*. 2011;474(7351):343-9. Epub 2011/06/17.
212. Huse M, Muir TW, Xu L, Chen YG, Kuriyan J, Massague J. The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol Cell*. 2001;8(3):671-82. Epub 2001/10/05.
213. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 2005;19(23):2783-810. Epub 2005/12/03.
214. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-30. Epub 2008/07/30.
215. Fuentealba LC, Eivers E, Ikeda A, Hurtado C, Kuroda H, Pera EM, et al. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell*. 2007;131(5):980-93. Epub 2007/11/30.
216. Kretschmar M, Doody J, Massague J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature*. 1997;389(6651):618-22. Epub 1997/10/23 22:33.
217. Sapkota G, Alarcon C, Spagnoli FM, Brivanlou AH, Massague J. Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Mol Cell*. 2007;25(3):441-54. Epub 2007/02/10.
218. Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell*. 1997;89(7):1165-73. Epub 1997/06/27.
219. Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell*. 2000;6(6):1365-75. Epub 2001/02/13.
220. Izzi L, Attisano L. Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene*. 2004;23(11):2071-8. Epub 2004/03/17.
221. Moren A, Imamura T, Miyazono K, Heldin CH, Moustakas A. Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases. *J Biol Chem*. 2005;280(23):22115-23. Epub 2005/04/09.
222. Wicks SJ, Lui S, Abdel-Wahab N, Mason RM, Chantry A. Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol Cell Biol*. 2000;20(21):8103-11. Epub 2000/10/12.
223. Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J, Liu F. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature*. 2004;430(6996):226-31. Epub 2004/07/09.
224. Kang Y, Chen CR, Massague J. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell*. 2003;11(4):915-26. Epub 2003/04/30.

225. Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM, Jr., Ko TC, Luo K. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2004;6(4):366-72. Epub 2004/04/24.
226. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 2009;19(1):128-39. Epub 2008/12/31.
227. Nishita M, Hashimoto MK, Ogata S, Laurent MN, Ueno N, Shibuya H, et al. Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature.* 2000;403(6771):781-5. Epub 2000/02/29.
228. Ulloa L, Doody J, Massague J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature.* 1999;397(6721):710-3. Epub 1999/03/06.
229. Bitzer M, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M, et al. A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev.* 2000;14(2):187-97. Epub 2000/02/01.
230. Galliher AJ, Schiemann WP. Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Res.* 2007;67(8):3752-8. Epub 2007/04/19.
231. Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J, et al. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J.* 2007;26(17):3957-67. Epub 2007/08/04.
232. Hartsough MT, Mulder KM. Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem.* 1995;270(13):7117-24. Epub 1995/03/31.
233. Frey RS, Mulder KM. TGFbeta regulation of mitogen-activated protein kinases in human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 1997;117(1):41-50. Epub 1997/07/15.
234. Mucsi I, Skorecki KL, Goldberg HJ. Extracellular signal-regulated kinase and the small GTP-binding protein, Rac, contribute to the effects of transforming growth factor-beta1 on gene expression. *J Biol Chem.* 1996;271(28):16567-72. Epub 1996/07/12.
235. Galliher-Beckley AJ, Schiemann WP. Grb2 binding to Tyr284 in TbetaR-II is essential for mammary tumor growth and metastasis stimulated by TGF-beta. *Carcinogenesis.* 2008;29(2):244-51. Epub 2008/01/05.
236. Northey JJ, Chmielecki J, Ngan E, Russo C, Annis MG, Muller WJ, et al. Signaling through ShcA is required for transforming growth factor beta- and Neu/ErbB-2-induced breast cancer cell motility and invasion. *Mol Cell Biol.* 2008;28(10):3162-76. Epub 2008/03/12.
237. Frey RS, Mulder KM. Involvement of extracellular signal-regulated kinase 2 and stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase activation by transforming growth factor beta in the negative growth control of breast cancer cells. *Cancer Res.* 1997;57(4):628-33. Epub 1997/02/15.

238. Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, Nishita M, Fujisawa J, Shibuya H, et al. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem.* 1999;274(38):27161-7. Epub 1999/09/10.
239. Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem.* 1999;274(52):37413-20. Epub 1999/12/22.
240. Yu L, Hebert MC, Zhang YE. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J.* 2002;21(14):3749-59. Epub 2002/07/12.
241. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 2003;425(6958):577-84. Epub 2003/10/10.
242. Wilkes MC, Murphy SJ, Garamszegi N, Leof EB. Cell-type-specific activation of PAK2 by transforming growth factor beta independent of Smad2 and Smad3. *Mol Cell Biol.* 2003;23(23):8878-89. Epub 2003/11/13.
243. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem.* 2000;275(47):36803-10. Epub 2000/09/02.
244. Lamouille S, Derynck R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J Cell Biol.* 2007;178(3):437-51. Epub 2007/07/25.
245. Wilkes MC, Mitchell H, Penheiter SG, Dore JJ, Suzuki K, Edens M, et al. Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Res.* 2005;65(22):10431-40. Epub 2005/11/17.
246. Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factors. *Cancer Surv.* 1985;4(4):683-705. Epub 1985/01/01.
247. Levy L, Hill CS. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17(1-2):41-58. Epub 2005/11/29.
248. Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(15):8621-3. Epub 2003/07/16.
249. Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y, Tsushima T, Imai T, Okumura K. Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer.* 2001;91(5):964-71. Epub 2001/03/17.
250. Saito H, Tsujitani S, Oka S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, et al. The expression of transforming growth factor-beta1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer.* 1999;86(8):1455-62. Epub 1999/10/20.

251. Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y, Kiso S, et al. High levels of transforming growth factor beta 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression. *Gastroenterology*. 1996;110(2):375-82. Epub 1996/02/01.
252. Wikstrom P, Stattin P, Franck-Lissbrant I, Damber JE, Bergh A. Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate*. 1998;37(1):19-29. Epub 1998/08/28.
253. Munoz NM, Upton M, Rojas A, Washington MK, Lin L, Chytil A, et al. Transforming growth factor beta receptor type II inactivation induces the malignant transformation of intestinal neoplasms initiated by Apc mutation. *Cancer Res*. 2006;66(20):9837-44. Epub 2006/10/19.
254. Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Fujitani Y, Fujitani S, et al. Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev*. 2006;20(22):3147-60. Epub 2006/11/23.
255. Siegel PM, Shu W, Cardiff RD, Muller WJ, Massague J. Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8430-5. Epub 2003/06/17.
256. Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5545-9. Epub 1995/06/06.
257. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. 1994;371(6494):257-61. Epub 1994/09/15.
258. Robson CN, Gnanapragasam V, Byrne RL, Collins AT, Neal DE. Transforming growth factor-beta1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium. *J Endocrinol*. 1999;160(2):257-66. Epub 1999/01/30.
259. Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massague J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell*. 2004;117(2):211-23. Epub 2004/04/16.
260. Massague J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett*. 2006;580(12):2811-20. Epub 2006/05/09.
261. Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, Chen RH. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol*. 2002;4(1):51-8. Epub 2001/12/12.
262. Valderrama-Carvajal H, Cocolakis E, Lacerte A, Lee EH, Krystal G, Ali S, et al. Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat Cell Biol*. 2002;4(12):963-9. Epub 2002/11/26.
263. Schuster N, Kriegstein K. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2002;307(1):1-14. Epub 2002/01/26.

264. Cui W, Fowles DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A, et al. TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell*. 1996;86(4):531-42. Epub 1996/08/23.
265. Tang B, Vu M, Booker T, Santner SJ, Miller FR, Anver MR, et al. TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*. 2003;112(7):1116-24. Epub 2003/10/03.
266. Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1775(1):21-62. Epub 2006/08/15.
267. Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med*. 2001;7(10):1118-22. Epub 2001/10/09.
268. Thomas DA, Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*. 2005;8(5):369-80. Epub 2005/11/16.
269. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development*. 1995;121(6):1845-54. Epub 1995/06/01.
270. Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol*. 1996;179(1):297-302. Epub 1996/10/10.
271. Larsson J, Goumans MJ, Sjostrand LJ, van Rooijen MA, Ward D, Leveen P, et al. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *EMBO J*. 2001;20(7):1663-73. Epub 2001/04/04.
272. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 2003;3(6):537-49. Epub 2003/07/05.
273. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Corbi A, Attisano L, Bernabeu C. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem*. 2001;276(42):38527-35. Epub 2001/08/04.
274. Hagedorn HG, Bachmeier BE, Nerlich AG. Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas (Review). *Int J Oncol*. 2001;18(4):669-81. Epub 2001/03/17.
275. Giannelli G, Fransvea E, Marinosci F, Bergamini C, Colucci S, Schiraldi O, et al. Transforming growth factor-beta1 triggers hepatocellular carcinoma invasiveness via alpha3beta1 integrin. *Am J Pathol*. 2002;161(1):183-93. Epub 2002/07/11.
276. Lee YH, Albig AR, Regner M, Schiemann BJ, Schiemann WP. Fibulin-5 initiates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and enhances EMT induced by TGF-beta in mammary epithelial cells via a MMP-dependent mechanism. *Carcinogenesis*. 2008;29(12):2243-51. Epub 2008/08/21.

277. Portella G, Cumming SA, Liddell J, Cui W, Ireland H, Akhurst RJ, et al. Transforming growth factor beta is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: implications for tumor invasion. *Cell Growth Differ.* 1998;9(5):393-404. Epub 1998/06/02.
278. Oft M, Heider KH, Beug H. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol.* 1998;8(23):1243-52. Epub 1998/11/21.
279. Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, ten Dijke P. TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 24):4557-68. Epub 1999/11/27.
280. Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF-beta in cancer. *J Pathol.* 2011;223(2):205-18. Epub 2010/10/20.
281. Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem.* 2003;278(23):21113-23. Epub 2003/04/01.
282. Thuault S, Tan EJ, Peinado H, Cano A, Heldin CH, Moustakas A. HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2008;283(48):33437-46. Epub 2008/10/04.
283. Miyazono K. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2009;85(8):314-23. Epub 2009/10/20.
284. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):593-601. Epub 2008/04/01.
285. Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL. Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia.* 2004;6(5):603-10. Epub 2004/11/19.
286. Horiguchi K, Shirakihara T, Nakano A, Imamura T, Miyazono K, Saitoh M. Role of Ras signaling in the induction of snail by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 2009;284(1):245-53. Epub 2008/11/18.
287. Zhang B, Halder SK, Zhang S, Datta PK. Targeting transforming growth factor-beta signaling in liver metastasis of colon cancer. *Cancer Lett.* 2009;277(1):114-20. Epub 2009/01/17.
288. Oft M, Akhurst RJ, Balmain A. Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nat Cell Biol.* 2002;4(7):487-94. Epub 2002/07/10.
289. Lehmann K, Janda E, Pierreux CE, Rytomaa M, Schulze A, McMahon M, et al. Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev.* 2000;14(20):2610-22. Epub 2000/10/21.
290. Riesco-Eizaguirre G, Rodriguez I, De la Vieja A, Costamagna E, Carrasco N, Nistal M, et al. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to

sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer research*. 2009;69(21):8317-25.

291. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science*. 2005;307(5715):1603-9. Epub 2005/03/12.

292. Fleming YM, Ferguson GJ, Spender LC, Larsson J, Karlsson S, Ozanne BW, et al. TGF-beta-mediated activation of RhoA signalling is required for efficient (V12)HaRas and (V600E)BRAF transformation. *Oncogene*. 2009;28(7):983-93. Epub 2008/12/17.

293. Nawshad A, Medici D, Liu CC, Hay ED. TGFbeta3 inhibits E-cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a Smad2-Smad4-LEF1 transcription complex. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 9):1646-53. Epub 2007/04/25.

294. Cicchini C, Laudadio I, Citarella F, Corazzari M, Steindler C, Conigliaro A, et al. TGFbeta-induced EMT requires focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Exp Cell Res*. 2008;314(1):143-52. Epub 2007/10/24.

295. Oloumi A, McPhee T, Dedhar S. Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1691(1):1-15. Epub 2004/04/01.

296. Costamagna E, Garcia B, Santisteban P. The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor-beta repression of the sodium/iodide symporter gene. *J Biol Chem*. 2004;279(5):3439-46. Epub 2003/11/19.

297. Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, Liyanarachchi S, et al. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(8):2803-8. Epub 2007/02/14.

298. Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenti U, Benezra M, Knauf JA, et al. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):4331-41. Epub 2008/08/21.

299. Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G, et al. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest*. 2005;115(4):1068-81. Epub 2005/03/12.

300. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*. 1976;260(5547):170-3. Epub 1976/03/11.

301. Sanchez-Hernandez I, Baquero P, Calleros L, Chiloeches A. Dual inhibition of (V600E)BRAF and the PI3K/AKT/mTOR pathway cooperates to induce apoptosis in melanoma cells through a MEK-independent mechanism. *Cancer Lett*. 2011. Epub 2011/11/08.

302. Weber CK, Slupsky JR, Kalmes HA, Rapp UR. Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer research*. 2001;61(9):3595-8.

303. Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature*. 2006;439(7074):358-62. Epub 2005/11/08.
304. Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, et al. V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer research*. 2004;64(7):2338-42.
305. Karasarides M, Chiloehes A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F, et al. B-RAF is a therapeutic target in melanoma. Section Title: Pharmacology. 2004;23(37):6292-8.
306. Preto A, Goncalves J, Rebocho AP, Figueiredo J, Meireles AM, Rocha AS, et al. Proliferation and survival molecules implicated in the inhibition of BRAF pathway in thyroid cancer cells harbouring different genetic mutations. *BMC cancer*. 2009;9(Journal Article):387.
307. Hamad NM, Elconin JH, Karnoub AE, Bai W, Rich JN, Abraham RT, et al. Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes & development*. 2002;16(16):2045-57.
308. Gonzalez-Garcia A, Pritchard CA, Paterson HF, Mavria G, Stamp G, Marshall CJ. RalGDS is required for tumor formation in a model of skin carcinogenesis. *Cancer cell*. 2005;7(3):219-26.
309. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(9):4393-7.
310. Liu D, Liu Z, Jiang D, Dackiw AP, Xing M. Inhibitory effects of the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor CI-1040 on the proliferation and tumor growth of thyroid cancer cells with BRAF or RAS mutations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(12):4686-95.
311. Bauerle KT, Schweppe RE, Haugen BR. Inhibition of nuclear factor-kappa B differentially affects thyroid cancer cell growth, apoptosis, and invasion. *Mol Cancer*. 2010;9:117. Epub 2010/05/25.
312. Jiang CC, Lai F, Tay KH, Croft A, Rizos H, Becker TM, et al. Apoptosis of human melanoma cells induced by inhibition of B-RAFV600E involves preferential splicing of bimS. *Cell Death Dis*. 2010;1:e69. Epub 2011/03/03.
313. Shao Y, Aplin AE. Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells. *Cancer Res*. 2010;70(16):6670-81. Epub 2010/07/22.
314. Mesa C, Jr., Mirza M, Mitsutake N, Sartor M, Medvedovic M, Tomlinson C, et al. Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. *Cancer research*. 2006;66(13):6521-9.
315. Weinstein IB, Joe AK. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006;3(8):448-57. Epub 2006/08/09.
316. Massoumi R, Kuphal S, Hellerbrand C, Haas B, Wild P, Spruss T, et al. Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma. *J Exp Med*. 2009;206(1):221-32. Epub 2009/01/07.

317. Baumann B, Weber CK, Troppmair J, Whiteside S, Israel A, Rapp UR, et al. Raf induces NF-kappaB by membrane shuttle kinase MEKK1, a signaling pathway critical for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(9):4615-20. Epub 2000/04/12.
318. Li S, Sedivy JM. Raf-1 protein kinase activates the NF-kappa B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF-kappa B-I kappa B complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(20):9247-51. Epub 1993/10/15.
319. Vale T, Ngo TT, White MA, Lipsky PE. Raf-induced transformation requires an interleukin 1 autocrine loop. *Cancer Res.* 2001;61(2):602-7. Epub 2001/02/24.
320. Pacifico F, Leonardi A. Role of NF-kappaB in thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;321(1):29-35. Epub 2009/11/03.
321. Rao AS, Kremenevskaja N, Resch J, Brabant G. Lithium stimulates proliferation in cultured thyrocytes by activating Wnt/beta-catenin signalling. *Eur J Endocrinol.* 2005;153(6):929-38. Epub 2005/12/03.
322. Liu Z, Kakudo K, Bai Y, Li Y, Ozaki T, Miyauchi A, et al. Loss of cellular polarity/cohesiveness in the invasive front of papillary thyroid carcinoma, a novel predictor for lymph node metastasis; possible morphological indicator of epithelial mesenchymal transition. *J Clin Pathol.* 2011;64(4):325-9. Epub 2011/02/08.
323. Xing M. Recent advances in molecular biology of thyroid cancer and their clinical implications. *Otolaryngol Clin North Am.* 2008;41(6):1135-46, ix. Epub 2008/12/02.
324. Smith JA, Fan CY, Zou C, Bodenner D, Kokoska MS. Methylation status of genes in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;133(10):1006-11. Epub 2007/10/17.
325. Zhu LF, Hu Y, Yang CC, Xu XH, Ning TY, Wang ZL, et al. Snail overexpression induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells. *Lab Invest.* 2012. Epub 2012/02/22.
326. Hardy RG, Vicente-Duenas C, Gonzalez-Herrero I, Anderson C, Flores T, Hughes S, et al. Snail family transcription factors are implicated in thyroid carcinogenesis. *Am J Pathol.* 2007;171(3):1037-46. Epub 2007/08/29.
327. Mincione G, Di Marcantonio MC, Tarantelli C, D'Inzeo S, Nicolussi A, Nardi F, et al. EGF and TGF-beta1 Effects on Thyroid Function. *J Thyroid Res.* 2011;2011:431718. Epub 2011/07/16.
328. D'Inzeo S, Nicolussi A, Ricci A, Mancini P, Porcellini A, Nardi F, et al. Role of reduced expression of SMAD4 in papillary thyroid carcinoma. *J Mol Endocrinol.* 2010;45(4):229-44. Epub 2010/08/06.
329. Matsuo SE, Fiore AP, Siguematu SM, Ebina KN, Friguglietti CU, Ferro MC, et al. Expression of SMAD proteins, TGF-beta/activin signaling mediators, in human thyroid tissues. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010;54(4):406-12. Epub 2010/07/14.

330. Hoot KE, Lighthall J, Han G, Lu SL, Li A, Ju W, et al. Keratinocyte-specific Smad2 ablation results in increased epithelial-mesenchymal transition during skin cancer formation and progression. *J Clin Invest*. 2008;118(8):2722-32. Epub 2008/07/12.
331. Cho HJ, Baek KE, Saika S, Jeong MJ, Yoo J. Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;353(2):337-43. Epub 2006/12/26.
332. Medici D, Hay ED, Goodenough DA. Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*. 2006;17(4):1871-9. Epub 2006/02/10.
333. Shirakihara T, Saitoh M, Miyazono K. Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta. *Mol Biol Cell*. 2007;18(9):3533-44. Epub 2007/07/07.
334. Choi J, Park SY, Joo CK. Transforming growth factor-beta1 represses E-cadherin production via slug expression in lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(6):2708-18. Epub 2007/05/26.
335. Sethi A, Mao W, Wordinger RJ, Clark AF. Transforming growth factor-beta induces extracellular matrix protein cross-linking lysyl oxidase (LOX) genes in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(8):5240-50. Epub 2011/05/07.
336. Moreno-Bueno G, Peinado H, Molina P, Olmeda D, Cubillo E, Santos V, et al. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc*. 2009;4(11):1591-613. Epub 2009/10/17.
337. Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs*. 2007;185(1-3):191-203. Epub 2007/06/26.
338. Islam S, Kim JB, Trendel J, Wheelock MJ, Johnson KR. Vimentin expression in human squamous carcinoma cells: relationship with phenotypic changes and cadherin-based cell adhesion. *J Cell Biochem*. 2000;78(1):141-50. Epub 2000/05/08.
339. Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, et al. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol*. 2002;156(2):299-313. Epub 2002/01/16.
340. Tsubaki M, Yamazoe Y, Yanae M, Satou T, Itoh T, Kaneko J, et al. Blockade of the Ras/MEK/ERK and Ras/PI3K/Akt pathways by statins reduces the expression of bFGF, HGF, and TGF-beta as angiogenic factors in mouse osteosarcoma. *Cytokine*. 2011;54(1):100-7. Epub 2011/02/05.
341. Ryder M, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Knauf JA, Fagin JA. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(4):1069-74. Epub 2008/08/23.
342. Brandl M, Seidler B, Haller F, Adamski J, Schmid RM, Saur D, et al. IKK(alpha) controls canonical TGF(ss)-SMAD signaling to regulate genes expressing SNAIL and SLUG during EMT in panc1 cells. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 24):4231-9. Epub 2010/11/18.

343. Grande M, Franzen A, Karlsson JO, Ericson LE, Heldin NE, Nilsson M. Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 22):4227-36. Epub 2002/10/12.
344. Jiang W, Zhang Y, Wu H, Zhang X, Gan H, Sun J, et al. Role of cross-talk between the Smad2 and MAPK pathways in TGF-beta1-induced collagen IV expression in mesangial cells. *Int J Mol Med.* 2010;26(4):571-6. Epub 2010/09/08.
345. Janji B, Melchior C, Vallar L, Kieffer N. Cloning of an isoform of integrin-linked kinase (ILK) that is upregulated in HT-144 melanoma cells following TGF-beta1 stimulation. *Oncogene.* 2000;19(27):3069-77. Epub 2000/06/29.
346. Hannigan GE, McDonald PC, Walsh MP, Dedhar S. Integrin-linked kinase: not so 'pseudo' after all. *Oncogene.* 2011;30(43):4375-85. Epub 2011/05/24.
347. Lange A, Wickstrom SA, Jakobson M, Zent R, Sainio K, Fassler R. Integrin-linked kinase is an adaptor with essential functions during mouse development. *Nature.* 2009;461(7266):1002-6. Epub 2009/10/16.
348. Serrano I, McDonald PC, Lock FE, Dedhar S. Role of the integrin-linked kinase (ILK)/Rictor complex in TGFbeta-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Oncogene.* 2012. Epub 2012/02/09.
349. Tan C, Cruet-Hennequart S, Troussard A, Fazli L, Costello P, Sutton K, et al. Regulation of tumor angiogenesis by integrin-linked kinase (ILK). *Cancer Cell.* 2004;5(1):79-90. Epub 2004/01/30.
350. Li W, Ain KB. Human sodium-iodide symporter (hNIS) gene expression is inhibited by a trans-active transcriptional repressor, NIS-repressor, containing PARP-1 in thyroid cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(2):383-98. Epub 2010/03/17.
351. Edwards LA, Verreault M, Thiessen B, Dragowska WH, Hu Y, Yeung JH, et al. Combined inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Ras/mitogen-activated protein kinase pathways results in synergistic effects in glioblastoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(3):645-54. Epub 2006/03/21.
352. Michailidi C, Giaginis C, Stolakis V, Alexandrou P, Klijanienko J, Delladetsima I, et al. Evaluation of FAK and Src expression in human benign and malignant thyroid lesions. *Pathol Oncol Res.* 2010;16(4):497-507. Epub 2010/04/21.
353. Schweppe RE, Kerege AA, French JD, Sharma V, Grzywa RL, Haugen BR. Inhibition of Src with AZD0530 reveals the Src-Focal Adhesion kinase complex as a novel therapeutic target in papillary and anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(6):2199-203. Epub 2009/03/19.
354. Deng B, Yang X, Liu J, He F, Zhu Z, Zhang C. Focal adhesion kinase mediates TGF-beta1-induced renal tubular epithelial-to-mesenchymal transition in vitro. *Mol Cell Biochem.* 2010;340(1-2):21-9. Epub 2010/02/24.

355. Wendt MK, Schiemann WP. Therapeutic targeting of the focal adhesion complex prevents oncogenic TGF-beta signaling and metastasis. *Breast Cancer Res.* 2009;11(5):R68. Epub 2009/09/11.
356. Wang SE, Xiang B, Zent R, Quaranta V, Pozzi A, Arteaga CL. Transforming growth factor beta induces clustering of HER2 and integrins by activating Src-focal adhesion kinase and receptor association to the cytoskeleton. *Cancer Res.* 2009;69(2):475-82. Epub 2009/01/17.
357. Hong M, Wilkes MC, Penheiter SG, Gupta SK, Edens M, Leof EB. Non-Smad transforming growth factor-beta signaling regulated by focal adhesion kinase binding the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 2011;286(20):17841-50. Epub 2011/04/02.
358. Li XY, Zhou X, Rowe RG, Hu Y, Schlaepfer DD, Ilic D, et al. Snail1 controls epithelial-mesenchymal lineage commitment in focal adhesion kinase-null embryonic cells. *J Cell Biol.* 2011;195(5):729-38. Epub 2011/11/23.
359. Alt-Holland A, Sowalsky AG, Szwec-Levin Y, Shamis Y, Hatch H, Feig LA, et al. Suppression of E-cadherin function drives the early stages of Ras-induced squamous cell carcinoma through upregulation of FAK and Src. *J Invest Dermatol.* 2011;131(11):2306-15. Epub 2011/07/01.
360. Moissoglu K, Gelman IH. v-Src rescues actin-based cytoskeletal architecture and cell motility and induces enhanced anchorage independence during oncogenic transformation of focal adhesion kinase-null fibroblasts. *J Biol Chem.* 2003;278(48):47946-59. Epub 2003/09/23.
361. Pomerance M, Quillard J, Chantoux F, Young J, Blondeau JP. High-level expression, activation, and subcellular localization of p38-MAP kinase in thyroid neoplasms. *J Pathol.* 2006;209(3):298-306. Epub 2006/04/04.

