

Universitat de Lleida

Paper de Sprouty1 en la senescència cel·lular i la supressió tumoral a la glàndula tiroide

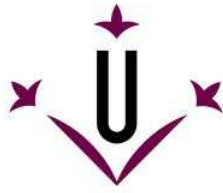
Anna Macià Armengol

Dipòsit Legal: L.1321-2013
<http://hdl.handle.net/10803/123974>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida



Universitat de Lleida

Departament de Medicina Experimental

**Paper de Sprouty1 en la senescència
cel·lular i la supressió tumoral a la
glàndula tiroide**

Anna Macià Armengol

Director: Mario Encinas Martín

Setembre 2013

Agraiments

I per fi ha arribat el dia!. Pensant-t'ho bé m'han passat volant aquest cinc anys per terres Lleidatanes, això és perquè m'ho he passat teta. I aquí assentada amb el solet i la marinada i pensant en el meu futur, em sembla que és un bon moment per començar a escriure els agraïments de la meva tesi. Segurament és la única cosa que llegirà la majoria de gent, per això ho escric amb certa pressió per no deixar-me a ningú i que tothom quedi content.

De manera general aquests cinc anys a Lleida, han estat intensos i molt agradables, he conegut a molta gent i m'he pogut fer un lloc amb un grup de gent fantàstic. La nostra feina, ja se sap que és com una muntanya russa i mai saps com serà la següent baixada i pujada. La gran majoria de dies estàs de baixada, repetint experiments, intentant entendre el perquè dels resultats i construint hipòtesis i llavors apareix una pujada, que faries la "conga" pel passadís i estàs tot el dia dient Que Guapo!. I llavors és quan entens perquè seguim somiant amb la nostra feina i en la investigació.

Començo per agrair-li al Mario, el Jefe, que vas confiar amb mi per poder formar part del teu equip i que em vas donar la oportunitat d'emprendre el camí de la recerca biomèdica. S'ha fet el grup gran i tota l'evolució ha estat genial, he pogut fer una tesi collonuda amb bons resultats i espero que bones publicacions, tot i els entrebancs que ens brinda la nostra feina. Gràcies per la teva tenacitat, les ganes d'ensenyar-me moltes coses, seguir la meva evolució i ajuntar-nos durant hores i hores per construir noves hipòtesis. Gràcies per ensenyar-me a estimar la nostra feina i que les coses són més difícils del que un es pensa però que amb esforç, constància i precisió surten. Després agrair a la meva germaneta petita del laboratori, la Marteta! Ets una gran persona, m'has ajudat en tot moment i sobretot aquest últims mesos més intensos. Gràcies per escoltar-me, emocionar-te amb mi i pels grans moments de divagacions mentals planificant grans experiments, algun dia els acabarem fent tots!. Hem fet un gran tàndem i ens hem entès des del principi a la perfecció. Gràcies per tots els moments compartits d'estabulari i al lab, i la última de transportistes de ratolins desde Barcelona! He tingut molta sort de tenir-te de companya, ets genial! Agrair també a la Myriam, per la disponibilitat d'ajudar-me en tot moment, pel teu optimisme per voler portar l'ordre i les bones pràctiques al laboratori, tot i que no sé si ho has aconseguit, ja saps que tot lo bo s'"empegue". També agrair al nou fitxatge del grup, el Charlos, el nen, que ens has fet passar molt bones estones al laboratori i ens has ensenyat a parlar to guapo.

Agrair-te molt especialment a tú, Eritja, Eritjota, Iritj, Núria, la teva energia i alegria fa que sigui fàcil estimar-te. Gràcies per ajudar-me i rebre'm amb els braços oberts des

del començament, per saber que estàs al meu costat, per acollir-me a casa teva i fer que la meva estància a Lleida hagi estat genial. També gràcies a tu lo Deivid, encara que hem estat poc temps junts, les amistats bones sempre perduren. Moltes gràcies per ajudar-me en tot, per compartir amb mi grans xerrades i mantenir l'amistat encara que visquis lluny. Agrair al Xavi, el Dolcet, el Sherpa, per donar-me un cop de mà en tot moment, pels bons consells, i les bones estones al zulillo, també per fer-me creure que les *in situs* són fàcils, encara que jo no t'he vist fer-ne mai cap ;). Gràcies Andréé per l'ajuda i les xerrades de ciència. A tu Laura, que m'has fet adonar que sóc una mica "pordiosera" i que sempre has d'estar a punt pel que pugui passar, ja aniré canviant no et preocupis. A la Cris, pel teu entusiasme i els "achuchones, oioioi" d'ànims, molta sort per la teva estada a San Francisco, disfruta i no facis pujar la mitja ;)!!

També agrair a la resta del grup d'Anatomia, la Mònica, pel teu sentit del humor i per tenir els congeladors ordenats i ser més fàcil de "trobar" les coses, a la M^a Alba que has fet augmentar el grup del rosa (Eritja cada dia estàs més fora, amb carinyo eh). Les tècnics del servei d'Anatomia per ajudar-me amb la inclusió i fer els blocs de parafina. Sobretot a la Lidia, que sempre has tingut un somriure i ganes d'ajudar-me en qualsevol moment.

Després agrair a tota la resta del grup de la xocolatera de l'Arnau, Velasco, Dolors, Santacana, Anna Novell. Que n'estàvem de bé tots allà apretats i sense llum natural. La veritat és que van ser uns grans anys, amb molt bona companyia i bones estones per xerrar. Gràcies al Manu, Sarita, Eva, Anaïs pels grans moments dinant a dalt a la quarta, pel bon rotllo i les rialles i pels "por cuánto harías.....". Els més veterans, em vaig rebre amb els braços oberts i em vaig sentir molt estimada i ben rebuda des del primer moment.

Agrair especialment a la resta del grup "zorrillas" del Arnau: Maria, Mireia, Berta Gemma Arjó, Gemma Macip, Nati i Marta, pels grans moments i les converses a l'hora d'esmorzar i dinar, pels grans sopars i festetes que hem fet. La veritat és que hem tingut grans moments de riure mentre omplíem el "Our Miseries", on ja sabem que totes les frases fan cap al mateix lloc.

També vull agrair al grup de Nefro, al Jose, Milica, Petya, Noèlia, la Martínez i especialment a la Montse, Montserrat, Ratus, la millor tècnic que un grup pot tenir. Gracies Montse, sempre estàs a punt per ajudar-me encara que vagis fins dalt de feina. Quan vaig arribar i sortíem alguns dijous fèiem competició de becaris contra tècnics, ara fa molts dies que no sortim, així que quan llegeixi la tesi ja pots començar a pensar

el dia per sortir a tope, no valen excuses. Saps que et foto canya i ho seguiré fent, sigues tu mateixa i fes el que creus, vals molt.

Agrair-te Èlia, per tenir el cor tant gran, escoltar-me i ajudar-me sempre. És que ets molt gran!. Gràcies per deixar fer-me casi meva l'habitació de convidats, per les grans rialles i xerrades i bon moments viscuts. Agrair també a les altres nenes, Cardús i Mariona, que encara que ens hem conegut més recentment, m'heu fet sortir dels moments d'escriptura de la tesi. Gràcies per deixar que comenci a empapar-me del pic hormonal, pels sopar i la festa pijama, s'ha de repetir!

Després de casi tres anys pujant i baixant de Tàrrrega a Lleida sola, finalment va sortir el Minibús. Gràcies, Núria, Marina, Anna, Astrid per la companyia i les bones estones dins del cotxe juntes.

Fora del laboratori sempre esteu el grup del Institut, gràcies Blasco, Cela, Dubois, Jordi, Julius, Laia, Marta, Pau i Xamsi, per estar sempre disposats a fer un beuret o sopar quan vinc d'escapada a Barcelona. També agrair-vos que vingueu cada any a Guimerà i que les calçotades comencin a ser trobades importants i imprescindibles. Sabeu que formem una gran família i que la nostra amistat és impagable, us enyoro.

També agrair als Gambairots, però sobretot als que viviu a Tàrrrega, per fer que em sentís molt acompanyada des del principi de venir a viure a terres de ponent. Pels grans dinars, sopar i festetes per Guimerà. I també pels que heu format part del grup de teatre Wigmar, un nou descobriment per a mi, grans moments a dalt del escenari, rialles, nervis i molt sentit del humor. No puc deixar-me els meus grans i estimats veïns, l'Astrid i l'Albert i la petita Guiomar. Gràcies per acollir-me tantes tardes a casa vostra.

Vull agrair a tota la meva família política, als meus cunyats i cunyades, la Marta, l'Antonio, la Romi i el Jordi, per deixar-me començar a fer de tieta amb els vostre fills, l'Ivan, la Gemma, l'Albert i l'Aina, que els he pogut veure créixer i que des del primer moment m'heu acollit amb els braços oberts a la vostra família i m'heu fet sentir molt estimada. Agrair especialment al Jordi, gràcies per la confiança que hem anat forjant, per totes les converses donant toms a les coses i per les discussions per veure qui té la raó al final i sempre voler portar-me la contrària, és que saps molt bé com picar-me. I evidentment agrir al Mariano i a la Magdalena, els caps de la família, que m'heu fet sentir com a casa meva i heu fet que les coses siguin molt fàcils. Magdalena ja ets coneguda a la feina pels meravellosos tapers que m'he emportat per dinar durant aquests anys. La veritat és que sou una gran família, aquests últims anys han estat durs

per vosaltres però l'empenta, l'energia, la pinya i la confiança que us teniu dona força i entusiasme a les persones que us envolten. Moltes gràcies per tot.

Després agrair als meus, els de casa, els de sempre. Gràcies Tiet per sempre preguntar com van les coses interessar-te per la meva feina i fer que el cine sigui un hobby per mi, encara que últimament el tingui una mica abandonat. A l'àvia, que quan vinc a veure't a casa em regales un bon somriure i em fa estar contenta. Gràcies Xavi, pel teu somriure, entusiasme, sempre em diuen que m'assemblo a tu i em fa feliç, la teva energia i vitalitat s'encomana. Gràcies per ensenyar-me tantes i tantes coses i per ajudar-me a créixer com a persona, no saps com trobo a faltar la cançó de cada mes. I sobretot gràcies per fer que sigui Tieta, ja tinc ganes que m'ho digui la Greta, el nou tresor de la família! I com no agrair a la Núria, la Naty, una de les persones més importants de la meva vida, sens dubte. Has estat sempre al meu costat, només mirant-nos sabem el que ens passa, hem crescut i ens hem fet grans juntes. Gràcies pels grans viatges, aficions i activitats, per venir-me a veure sempre a Tàrrega, per compartir les alegries i tristeses, per ajudar-me i confiar en mi sempre. També agrair als meu cunyats, Marta i Uri, per les bones estones amb família. I agrair molt especialment als meus pares, que m'heu recolzat des del primer moment, per renunciar a moltes coses i ajudar-me. Per creure sempre amb mi, per la comprensió i ensenyar-me tants valors. Sou un exemple a seguir i imprescindibles a la meva vida.

Finalment agrair al Xavi, el veritable culpable que fes la Tesi a Lleida. Gràcies pel teu sentit del humor, per fer-me riure sempre, per la teva racionalitat i fer-me tocar de peus a terra, per fer que cada dia estimi més Guimerà. I sobretot moltes gràcies per continuar fent camí junts.

Parlar riure i fer petons.

Així és com un nen de cinc anys va definir el que significava ser feliç a Darwin

Als meus pares,
als meus germans
i al Xavi

Resums

RESUM

Ret és un Receptor Tirosina Cinasa (RTK) que regula el desenvolupament del sistema genito-urinari i el desenvolupament del sistema nerviós perifèric. A més, les mutacions de guany de funció d'aquest receptor cursen amb el desenvolupament del Carcinoma Medul·lar de Tiroide (MTC), una neoplàsia de la glàndula tiroide que deriva de les cèl·lules C, productores de calcitonina. En mamífers, la família de Sprouty (Spry) està composta per quatre gens diferents (Spry1-4). Diferents anàlisis genètics en ratolins demostren que els gens Spry són inhibidors de la senyalització de Ret durant el desenvolupament dels ronyons i del sistema nerviós entèric. D'altra banda, alguns membres de la família de Spry s'han proposat com a possibles gens supressors de tumors en una gran varietat de patologies cancerígenes.

A la primera part del nostre treball, hem volgut estudiar si la proteïna Sprouty1 pot actuar com un gen supressor de tumors al MTC. En primer lloc hem analitzat les tiroides dels ratolins *knockout* per Spry1 i observem que desenvolupen una hiperplàsia de les cèl·lules C, una lesió precancerosa al desenvolupament del MTC. A més a més, demostrem que l'expressió de Spry1 redueix la proliferació d'una línia cel·lular derivada d'un MTC humà, la línia TT, degut a la inducció de la senescència cel·lular. Finalment, hem descobert que el promotor de Sprouty1 es troba freqüentment metilat en mostres humanes de MTC, cosa que provoca la disminució dels nivells d'expressió de Spry1 en aquest tipus de càncer.

A la segona part del nostre treball, hem observat que la pèrdua de Spry1 provoca un augment del tamany de la tiroide dels ratolins a causa d'un increment de la proliferació de les cèl·lules fol·liculars. D'altra banda, les tiroides dels ratolins *knockout* per Spry1 mostren una disminució dels marcadors de senescència cel·lular, on s'hi inclou la reducció de la secreció dels factors que activen i mantenen el fenotip secretor associat a la senescència cel·lular (SASP). Finalment, hem observat una disminució de l'activació de la via NF- κ B a la tiroide dels ratolins Spry1^{-/-}, fet que correlaciona amb la disminució de la secreció dels factors IL-6 i KC.

Com que la senescència cel·lular s'ha proposat com una potent barrera pel desenvolupament tumoral, hem volgut analitzar si la pèrdua de Spry1 pot accelerar el procés de tumorigènesi en ratolins susceptibles al desenvolupament tumoral. Els ratolins doble mutants per Pten i Spry1 mostren un augment de la incidència de tumors a la tiroide i a la glàndula adrenal si ho comparem amb els ratolins Pten^{+/-}. Tot i que la pèrdua de Sprouty1 per si sola no és suficient per promoure la formació de tumors, accelera la tumorigènesi en el context d'una haploinuficiència de Pten.

RESUMEN

Ret es un Receptor Tirosina Quinasa (RTK) que regula el desarrollo del sistema genito-urinario y del sistema nervioso periférico. Además, las mutaciones de ganancia de función de estos receptores cursan con el desarrollo del Carcinoma Medular de Tiroides (MTC), una neoplasia de la glándula tiroides que deriva de las células C, productoras de calcitonina. En los mamíferos, la familia de Sprouty (Spry) está compuesta por cuatro genes distintos (Spry1-4). Análisis genéticos en ratones demuestran que los genes Spry son inhibidores de la señalización por Ret durante el desarrollo de los riñones y del sistema nervioso entérico. Por otra parte, algunos miembros de la familia de Spry se han propuesto como posibles genes supresores de tumores de una gran variedad de patologías cancerígenas.

En la primera parte de nuestro trabajo, hemos querido estudiar si la proteína Sprouty1 puede actuar como un gen supresor de tumores del MTC. En primer lugar hemos analizado las tiroides de los ratones *knockout* para Spry1 y observamos que desarrollan una hiperplasia de las células C, una lesión precancerosa al desarrollo del MTC. Además, hemos demostrado que la expresión de Spry1 reduce la proliferación de una línea celular derivada de un MTC humano, la línea TT, por causa de la inducción de la senescencia celular. Finalmente, hemos descubierto que el promotor de Sprouty1 se encuentra frecuentemente metilado en muestras de MTC humanas, hecho que provoca la disminución de los niveles de expresión de Spry1 en este tipo de cáncer.

En la segunda parte de nuestro trabajo, hemos observado que la pérdida de Spry1 provoca un aumento del tamaño de la tiroides de los ratones a causa de un incremento de la proliferación de las células foliculares. Por otra parte, las tiroides de los ratones *knockout* para Spry1 muestran una disminución de los marcadores de senescencia celular, donde se incluye la reducción de la secreción de los factores que activan y mantienen el fenotipo secretor asociado a la senescencia celular (SASP). Finalmente, hemos observado una disminución de la activación de la vía NF- κ B a la tiroides de los ratones Spry1^{-/-}, que correlaciona con la disminución de la secreción de los factores IL-6 i KC.

La senescencia celular se ha propuesto como una potente barrera para el desarrollo tumoral, por eso hemos querido analizar si la pérdida de Spry1 puede acelerar el proceso de tumorigénesis en ratones susceptibles al desarrollo tumoral. Los ratones doble mutantes por Pten i Spry1 muestran un aumento de la incidencia de tumores a la tiroides y a la glándula adrenal si se compare con los ratones Pten^{+/-}. La pérdida de Sprouty1 por si sola no es suficiente para promover la formación de tumores, pero acelera la tumorigénesis en el contexto de una haploinuficiencia de Pten.

ABSTRACT

Ret is a Receptor Tyrosine Kinase (RTK) that regulates several aspects of the development of the genito-urinary system and the peripheral nervous system. Moreover, gain-of-function mutations of this receptor cause the development of Medullary Thyroid Carcinoma (MTC), a rare neoplasm arising from the calcitonin-producing C-cells of the thyroid gland. Sprouty (Spry) family of genes is composed of four members in mammals (Spry1-4). Genetic analyses on mice demonstrate that Spry genes are inhibitors of Ret signalling during the development of kidneys and enteric nervous system. Moreover, some Spry family members have been proposed as candidate tumour-suppressor genes in a variety of cancerous pathologies.

In the first part of our work, we wanted to elucidate whether Spry1 could act as a tumour suppressor gene in MTC. We analysed the thyroid gland of Spry1 null-mice and found that they develop C-cell hyperplasia, a precancerous lesion preceding MTC. In addition, we demonstrate that expression of Spry1 restrains proliferation of the MTC-derived cell line TT by inducing cellular senescence. Finally, we found that the Spry1 promoter is frequently methylated and its expression decreased in human MTC.

In the second part of our work, we found that Spry1 knockout mice present enlarged thyroid glands due to increased proliferation of follicular cells. Moreover, thyroids from Spry1 knockout mice show decreased markers of cellular senescence, including a reduction in secretion of factors that activate and maintain the senescence-associated secretory phenotype (SASP). Finally, we determine that a defective activation of NF- κ B signalling in Spry1 null thyroids underlie the observed effects on secretion of SASP factors IL-6 and KC.

Since cellular senescence has been proposed as a potent barrier to tumorigenesis, we wanted to assess whether loss of Spry1 could accelerate the onset of tumorigenesis in a tumour-prone mouse. Pten and Spry1 double mutant mice show increased incidence of tumours of the thyroid and adrenal glands when compared to Pten $^{+/-}$ mice. Thus, although loss of Spry1 by itself might not be sufficient to promote tumour formation, it does accelerate tumorigenesis in the context of Pten haploinsufficiency.

Índex

Índex	XXI
Abreviatures	1
Introducció	7
1. ELS GENS DE LA FAMÍLIA DE SPROUTY	9
1.1 Estructura de les proteïnes de Sprouty.....	9
1.2 Regulació de l'activitat de Sprouty	10
1.3 Mecanismes d'acció de Sprouty	12
1.4 Els gens de Sprouty com a supressors de tumors.....	15
1.5 Paper de Sprouty en el desenvolupament embrionari: fenotip dels ratolins <i>knockout</i>	17
2. EL RECEPTOR TIROSINA CINASA RET	19
2.1 Ret: gen i proteïna	19
2.2 Els lligands de la família de GDNF (GFLs)	19
2.3 Activació del receptor Ret i senyalització proximal.	21
2.4 Regulació de l'activitat de Ret	22
2.5 Mutacions del receptor Ret i patologies associades.....	23
3. EL CARCINOMA DE TIROIDE	24
3.1 La glàndula tiroide: anatomia, histologia, fisiologia i embriogènesis	24
3.2 Aspectes generals del carcinoma de tiroide.	26
3.3 Alteracions genètiques dels tumors de la glàndula tiroide.	31
4. LA SENESCÈNCIA CEL·LULAR	36
4.1 Tipus de senescència cel·lular.....	36
4.2 Processos biològics associats a la senescència cel·lular	37
4.3 Mecanismes d'inducció de la senescència cel·lular: les vies p53/ARF i pRb/p16.....	39
4.4 Marcadors cel·lulars i molecular de la senescència cel·lular	42
4.5 Fenotip secretor associat a la senescència cel·lular (SASP)	43
Objectius	47
Materials i Mètodes	51

1. Animals d'experimentació.	53
1.1 Ratolins utilitzats	53
1.2 Genotipatge dels ratolins.....	54
1.3 Extracció de sèrum de ratolí.	55
2. Cultius cel·lulars.	55
2.1 Cultiu de la línia cel·lular derivada d'un MTC (línia cel·lular TT).	55
2.2 Cultiu de la línia cel·lular HEK 293T.....	55
2.3 Cultius primaris de tiroide de ratolí.	56
3. Producció de lentivirus	57
3.1 Construccions plasmídiques: generació de vectors lentivirals de sobreexpressió de proteïnes...57	
3.2 Transducció lentiviral.....	58
4. Assajos de proliferació <i>in vitro</i>	59
4.1 Recompte cel·lular.	59
4.2 Assaig d'incorporació de Bromodeoxyuridina.	60
4.3 Assaig clonogènic.....	60
4.4 Recompte de mort apoptòtica per tinció de Hoechst.	61
5. Tumors subcutanis en ratolins SCID.	61
6. PCR en Temps Real: RT-PCR.....	61
6. 1 Extracció de RNA.....	61
6.2 Síntesi de cDNA.....	62
6.3 RT-PCR.....	62
7. Immunodetecció de proteïnes.....	63
7.1 Immunoprecipitació i Western Blot.....	63
7.2 Histologia i tincions d'immunologia.....	66
8. Anàlisi morfomètric.	68
8.1 Anàlisi del tamany de la tiroide.	68
8.2 Tamany dels fol·licles de la tiroide.....	68
9. Activitat β -galactosidasa (SA- β -Gal).....	69

10. Anàlisi de la metilació del DNA genòmic.	69
Resultats	71
1. Sprouty1 s'expressa a la glàndula tiroide de ratolí.....	73
2. El ratolí <i>knockout</i> per Sprouty1 desenvolupa hiperplàsia de les cèl·lules C.....	77
3. L'expressió de Sprouty1 redueix la proliferació de les cèl·lules derivades d'un MTC humà tant en models <i>in vitro</i> com <i>in vivo</i>	79
3.1 La sobreexpressió de Sprouty1 redueix la proliferació de les cèl·lules TT <i>in vitro</i>	81
3.2 La sobreexpressió de Sprouty1 redueix la proliferació de les cèl·lules TT <i>in vivo</i>	82
4. L'expressió de Sprouty1 no inhibeix la senyalització de Ret a les cèl·lules TT.	84
5. Sprouty1 indueix l'expressió del locus CDKN2A i activa la senescència cel·lular ...	86
6- El promotor de Sprouty1 es troba freqüentment metilat als MTC humans	88
7. Els ratolins <i>knockout</i> per Sprouty1 presenten un augment del tamany de la glàndula tiroide.	91
8. La pèrdua de Sprouty1 causa un augment de la proliferació de les cèl·lules fol·liculars de la tiroide	93
9. La supressió de Sprouty1 no indueix la fosforilació de les proteïnes MAPK ERK...	96
10. Sprouty1 activa la fosforil·lació de STAT3 a la tiroide	97
11. La pèrdua de Sprouty1 a la tiroide dels ratolins inhibeix l'expressió i la secreció d'IL-6.	100
12. La pèrdua de Sprouty1 a la tiroide dels ratolins inhibeix la secreció de KC al medi de cultiu i l'expressió de IGFBP7.	102
13. Les cèl·lules fol·liculars de la tiroide dels ratolins <i>knockout</i> per Sprouty1 mostren una disminució dels marcadors de senescència cel·lular.	105
14. Sprouty1 regula la síntesi de IL-6 i KC mitjançant l'activació de la via NF-κB.....	106
15. La pèrdua de Sprouty1 a la tiroide dels ratolins inhibeix la via NF-κB <i>in vivo</i>	109
16. La supressió gènica de Sprouty1 accelera l'aparició de tumors en animals heterozigots per Pten	112
16.1 La supressió gènica de Sprouty1 en ratolins heterozigots per Pten accelera la tumorigènesi a la GLÀNDULA TIROIDE	112

16.2 La supressió gènica de Sprouty1 en ratolins heterozigots per Pten accelera la tumorigènesi de la GLÀNDULA ADRENAL 115

Discussió 119

1. Sprouty1 com a gen supressor de tumors al Carcinoma Medul·lar de Tiroide (MTC)..... 121

2. Sprouty1 indueix el fenotip secretor associat a la senescència cel·lular (SASP) regulant l'activació de la via NF- κ B a la tiroide dels ratolins. 125

3. La deleció genètica de Sprouty1 accelera la formació de tumors en ratolins heterozigots per Pten. 132

Conclusions 139

Bibliografia 143

Annex..... 169

Abreviatures

ABREVIATURES

- ATC: Carcinoma anaplàstic de tiroide
- ARTN: Artemina
- CAKUT: Anomalies congènites del ronyó i del tracte genito-urinari
- C/EBP β : Proteïna Beta d'unió a CCAAT
- CNS: Sistema nerviós central
- CRD: Domini ric en cisteïnes
- DDR: Resposta de dany al DNA
- DTC: Carcinoma diferenciat de tiroide
- EGFR: Receptor dels factors de creixement epidèrmic
- ERK: Proteïna cinases regulades de manera extracel·lular
- FGFR: Receptor dels factors de creixement de fibroblasts
- FMTC: Carcinoma medul·lar familiar no-MEN
- FTC: Carcinoma fol·licular de la tiroide
- GDNF: Factors neurotròfic derivat de les línies cel·lulars glials
- GFL: Lligands de la família de GDNF
- GFR α : Receptors α dels lligands de la família de GDNF
- GPI: Glicofosfatidilinositol
- HSCR: Malaltia de Hirschsprung
- IGFBP: Proteïna d'unió al factor de creixement d'insulina
- I κ B α : Proteïna inhibidora I κ B
- IKK: Família de cinases serina/treonina I κ B
- IL: Interleucina
- IL-R: Receptor d'Interleucina
- KO: Knockout
- LPS: Lipopolisacàrid
- MAPK: Proteïnes cinases activades per mitògens

MEN 2A: Neoplàsia endocrina múltiple tipus 2A
MEN 2B: Neoplàsia endocrina múltiple tipus 2B
MTC: Carcinoma medul·lar de tiroide
NF- κ B: Factor de transcripció Kappa B Nuclear
NGF: Factor de creixement nerviós
NRTN: Neurturina
OIS: Senescència induïda per oncògens
PDTC: Carcinoma poc diferenciat de tiroide
PI3K: Cinasa de Fosfatidilinositol 3
PICS: Senescència induïda per Pten
PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat
PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat
PKC: Proteïna cinasa C
PLC- γ : Fosfolipasa C- γ
PNS: Sistema nerviós parasimàtic
PTC: Carcinoma papil·lar de la tiroide
PSPN: Persefina
Rb: Retinoblastoma
RBD: Domini d'unió a Raf
RET: Receptor tirosina cinasa *REarranged during Transfection*
RTK: Receptor tirosina cinasa
SA- β -GAL: Senescència associada a l'activitat β -galactosidasa
SAHF: Focus de la heterocromatina associat a la senescència cel·lular
SASP: Fenotip secretor associat a la senescència cel·lular
SCID: Immunodeficiència combinada greu
SMS: Secretoma senyalitzador de la senescència
SNS: Sistema nerviós Simpàtic
SPRY: proteïnes de la família de Sprouty

SRD: domini ric en serines

STAT: Transductor de senyals i activador de la transcripció

T3: Triiodotironina

T4: Tiroxina

Tg: Tiroglobulina

TK: Domini tirosina cinasa

TSH: Hormona estimulant de la tiroide

TRH: Hormona alliberadora de tiotropina

UB: gemma uretèrica

VEGFR: Receptor del factor de creixement endotelial vascular

WB: tècnica de Western blot o Immunoblot

WD: conducte nefrogènic o de Wolff

WDTC: Carcinomes ben diferenciats de tiroide

WT: Wild-type

Introducció

1. ELS GENS DE LA FAMÍLIA DE SPROUTY

Les proteïnes de la família de Sprouty (Spry) actuen principalment com a inhibidors de la senyalització dependent dels Receptors Tirosina Cinasa (RTK). El gen Sprouty es va descobrir inicialment en *Drosophila* (dSpry), mentre es realitzaven anàlisis de gens reguladors del desenvolupament de la tràquea (Hacohen et al., 1998) i dels ulls (Casci et al., 1999). Es va descriure que dSpry inhibia la senyalització per FGF durant el desenvolupament de la tràquea o que bloquejava la senyalització per EGF interaccionant amb Ras durant el desenvolupament dels ulls. Aquests estudis demostren que el gen dSpry és un inhibidor de la senyalització dels RTK, en concret de la via de senyalització Ras/ERK. Basant-se en les seqüències d'homologia de *dSpry*, s'han identificat ortòlegs en ratolí, humà, pollastre, peix zebra i granota (Mason et al., 2006), per tant es va començar a explorar la possible funció dels seus ortòlegs en vertebrats.

Les proteïnes de Spry en vertebrats comparteixen seqüències semblants a dSpry en el domini C-terminal ric en cisteïnes, però presenten divergències entre ells i amb dSpry en el domini N-terminal (Mason et al., 2006) (Figura 1). Existeixen poques pistes sobre la relació que pot presentar la seqüència de les proteïnes Spry i la seva acció, donat que els primers anàlisis indiquen que no existeixen motius enzimàtics ni dominis d'unió proteïna-proteïna conservats (Guy et al., 2009).

1.1 Estructura de les proteïnes de Sprouty

Les proteïnes Sprouty dels vertebrats són més petites que la seva homòloga en *Drosophila*, amb un pes molecular entre 32-35 kDa. En els mamífers, la família de Sprouty està composta per quatre membres diferents (Spry1-4) (Mason et al., 2006). Tots ells presenten un domini C-terminal, semblant al del dSpry, molt conservat i ric en cisteïnes (CRD, també anomenat domini SPRY o domini de translocació), el qual conté una regió molt conservada necessària per la unió de Raf1 (RBD, Raf1 *binding domain*) i necessària per desencadenar la homo/heterodimerització entre els membres de la mateixa família (Figura 1) (Ozaki et al., 2005). El domini N-terminal presenta més divergències, tot i que s'observa un motiu molt conservat centrat en un residu de tirosina (Y) (*c-CBL TKB motif, tyrosine-phosphorylated sequences*), per exemple la tirosina 55 (Y55) de Sprouty2, a més de presentar un domini ric en serines (SRD), poc conservat en dSpry. Gran part de les funcions inhibidores de les proteïnes de Spry es deuen a aquest residu específic de tirosina, ja que és reconegut per diverses proteïnes

adaptadores que presenten dominis amb homologies Src2 (SH2) (Guy et al., 2009; Mason et al., 2006) (Figura 1).



Figura 1: **Estructura de dSprouty i els seus homòlegs de ratolí.** Les proteïnes de la família de Sprouty presenten una regió C-terminal molt conservada amb un domini ric en serines (Spry1 Domain) que conté una domini d'unió a Raf1 (RBD). El domini N-terminal presenta divergències tot i que s'observa un petit domini conservat centrat en un residu de tirosina (Y) (Mason et al., 2006).

1.2 Regulació de l'activitat de Sprouty

Els RTK activen diverses vies de senyalització com la via Ras/RAF, la qual comporta l'activació de les proteïnes cinasa ERK1 i ERK2 (Worby et al., 1996) i com la via PI3K, provocant l'activació de la proteïna Akt. Els gens de la família de Sprouty bloquegen la fosforilació de les cinases d'aquestes vies inhibint la senyalització intracel·lular.

Una de les vies de senyalització activades pels RTK és la cascada Ras/Raf/ERK. La interacció del lligand (factor de creixement) amb el seu RTK, provoca la fosforil·lació dels residus de tirosina del domini intracel·lular permetent que molècules adaptadores (Ex: SHC i/o FRS2) puguin unir-s'hi per desencadenar la senyalització intracel·lular. En el model més ben estudiat, el complex Grb2-SOS promou l'intercanvi d'una molècula del ribonucleòtid GDP per una de GTP a la proteïna G monomèrica Ras, desencadenant la seva activació, que es tradueix en la fosforil·lació de les serina/treonina cinases de la família Raf. Aquestes, com a conseqüència fosforil·len i activen a les cinases MEK1/2; les quals fosforil·laran i l'activaran les cinases ERK1/2, que es translocaran al nucli i modularan l'activitat de diversos factors de transcripció i l'expressió d'aquells gens diana requerits per les diferents funcions biològiques (Figura 2).

D'altra banda, el complex adaptador Grb2-SOS pot reclutar a Gab1/2 i activar la via de senyalització PI3K-AKT. Gab1/2 interactua amb la subunitat p85 de l'enzim PI3K, reclutant-lo a la membrana. Un cop a la membrana, PI3K catalitza la transformació de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP2) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3) (Hawkins et al., 1992). PIP3 és reconegut pels dominis PH (*Pleckstrin Homology*) presents en diverses molècules adaptadores i efectores (Rameh et al., 1997), tal com la serina-treonina cinasa Akt o PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) (Downward, 2004).

Un cop reclutada l'Akt, és fosforil·lada per la PDK1 en la Thr308 i pel complex mTORC2 a la Ser473 (Alessi et al., 2009; Sarbassov et al., 2005). Al seu torn l'Akt fosforil·larà els residus serina i treonina de múltiples proteïnes.

Quan s'activa la cascada de senyalització Ras-ERK MAPK, la proteïna ERK fosforil·lada entra al nucli i activa la transcripció de varis gens diana, com els gens de *Sprouty*. Un cop sintetitzada la proteïna de *Sprouty* es fosforil·la el seu residu de tirosina i actua com a inhibidor gràcies al bucle de retroalimentació (*feedback*) negatiu, *Sprouty* és capaç d'aturar la cascada de senyalització de les MAPK ERK inhibint l'activació de Ras o Raf (Mason et al., 2006).

El gen de *Sprouty*, com a regulador negatiu de les vies de senyalització dels RTK, està subjecte a un estricte control a múltiples nivells, tant pel que fa a la localització cel·lular, les modificacions post-traduccionals i l'estat de fosforilació de diversos residus de serina i tirosina, que en darrer terme determinen el tipus de proteïnes amb qui interacciona. S'ha descrit que *Spry* pot interaccionar amb diverses cinases (Ex. Ras, Raf1, CK1, CK2, Dyrk1A), fosfatases (PP2A, SHP2), lligases d'ubiquitina E3 (c-Cbl, SIAH2) i altres proteïnes (Ex. CIN85, FRS2) (Guy et al., 2009).

De vegades les proteïnes de *Spry1* i *Spry2* estan constitutivament associades a la membrana plasmàtica i a la caveolina 1 gràcies al domini C-terminal ric en cisteïnes (CRD) (Cabrita and Christofori, 2008; Impagnatiello et al., 2001). La importància del tràfic de membrana de les proteïnes de *Spry* pot reflectir el fet que diverses proteïnes d'unió a *Spry* (ex. Grb2 (Hanafusa et al., 2002) i Raf1 (Sasaki et al., 2003)) estan localitzades a la membrana plasmàtica. A més a més, el moviment de *Spry* a través de la membrana plasmàtica podria controlar la quantitat i la qualitat de la seva activitat inhibidora.

D'altra banda, l'estat de fosforilació del residu de tirosina conservat al domini N-terminal, és crucial pel desenvolupament de les funcions fisiològiques de *Spry*, particularment per l'activitat inhibidora de la senyalització intracel·lular (Guy et al., 2009; Hanafusa et al., 2002). Si s'efectuen mutacions del residu de tirosina es generen dominants negatius de les proteïnes de *Sprouty*, causant el bloqueig de l'acció inhibidora d'aquestes sobre la cascada de senyalització intracel·lular. Aquest fet provoca l'activació de les ERK MAPK depenent dels factors de creixement (Hanafusa et al., 2002; Mason et al., 2004). Per altra banda, quan la lligasa d'ubiquitina E3 c-Cbl s'uneix a la tirosina fosforil·lada de *Spry*, es desencadena la ubiquitinització i

degradació d'aquest pel proteasoma, limitant també l'acció inhibidora sobre les proteïnes ERK (Guy et al., 2009).

A més a més, en els últims anys s'ha fet evident la importància del domini ric en serines a la regió N-terminal (SRD). Aquest domini es comporta a la inversa del residu de tirosina, és a dir, que en condicions basals es troba fosforil·lat. Per tal d'activar les proteïnes de Spry es necessita la fosforil·lació de la tirosina i la defosforil·lació dels residus de serina, gràcies a l'acció d'una fosfatasa anomenada PP2A (Guy et al., 2009; Lao et al., 2007). Durant aquest procés Sprouty pateix un canvi en la seva estructura terciària exposant els seus dominis SH3 de la regió C-terminal per tal d'interaccionar amb la proteïna Grb2 o altres proteïnes adaptadores. En aquest estat Spry és capaç d'inhibir la fosforilació de les MAPK ERK (Cabrita and Christofori, 2008; Guy et al., 2009)

L'estat en que es trobin les proteïnes de Sprouty dependrà tant de l'activitat relativa de les cinases i fosfatases que interaccionin (Guy et al., 2009), com del tipus de factor de creixement que interacciona amb el RTK, del membre de la família de Spry i del tipus cel·lular (Mason et al., 2004).

1.3 Mecanismes d'acció de Sprouty

Com s'ha descrit anteriorment, les proteïnes de Sprouty inhibeixen la via de senyalització Ras-ERK MAPK activada per diversos RTK. Per altra banda aquestes proteïnes no afecten la via de senyalització de les MAPK p38 ni JNK (Gross et al., 2001a; Yusoff et al., 2002). S'ha demostrat que aquesta funció inhibidora s'efectua en diferents punts de la cascada de senyalització iniciada per una gran varietat de factors de creixement, tals com FGF (*Fibroblas Growth Factor*), VEGF (*Vascular-Edothelial Growth Factor*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) NGF (*Nerve Growth Factor*), GDNF (*Glial-Derived Growth Factor*), entre d'altres (Cabrita and Christofori, 2008; Guy et al., 2003; Li et al., 2003; Mason et al., 2006).

Tot i la gran quantitat de literatura publicada sobre l'activitat de Spry, encara avui en dia no s'ha confirmat un mecanisme d'acció universal d'aquestes proteïnes. Existeix certa controvèrsia respecte el punt en el qual Sprouty bloqueja la cascada de senyalització intracel·lular de les proteïnes ERK, doncs la gran majoria d'evidències provenen d'estudis realitzats amb cultius cel·lulars i sobreexpressió gènica, suggerint de l'existència de múltiples mecanismes (Taula 1) (Figura 2).

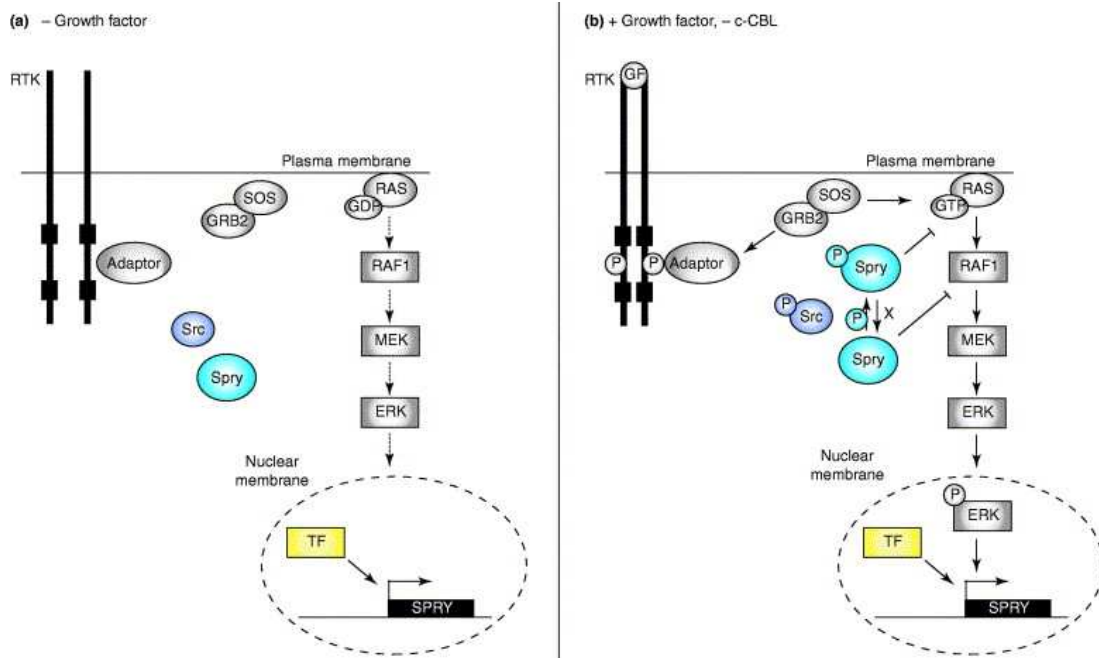
	EGF	FGF	PDGF	VEGF
Sprouty 1	↑↔	↓↔	?	↓
	Egan et al., 2002; Ozaki et al., 2005	Hanafusa et al., 2002; Yusoff et al., 2002; Ozaki et al., 2005		Impagnatiello et al., 2001; Huebert et al., 2004
Sprouty 2	↑↔	↓	↓	↓
	Fürthauer et al., 2001; Egan et al., 2002; Wong et al., 2002; Ozaki et al., 2005	Fürthauer et al., 2001; Impagnatiello et al., 2001; Yusoff et al., 2002; Ozaki et al., 2005	Kajita et al., 2007	Impagnatiello et al., 2001
Sprouty 3	?	?	?	?
Sprouty 4	↔	↓↔	?	↓
	Fürthauer et al., 2001; Sasaki et al., 2003; Ozaki et al., 2005	Fürthauer et al., 2001; Lee et al., 2001; Yusoff et al., 2002; Ozaki et al., 2005		Lee et al., 2001; Sasaki et al., 2003

Taula 1: Efectes de la sobreexpressió de les diferents isoformes de Sprouty en l'activació de les proteïnes ERK mitjançant diferents factors de creixement (Edwin et al., 2009).

S'han descrit un gran nombre de mecanismes diferents pels quals els membres de la família de Spry regulen la senyalització dels RTK. Durant el desenvolupament de la tràquea en *D. Melanogaster*, dSpry inhibeix la senyalització induïda per FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) (Hacohen et al., 1998). En canvi durant el desenvolupament de l'ull, dSpry inhibeix la senyalització induïda per EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*) per sobre de l'activació de Ras (Casici et al., 1999) mentre que en el desenvolupament de les ales i ovaris, dSpry actua per sota de Ras (Reich et al., 1999). Per altra banda la regulació de la cascada de senyalització en mamífers és més complicada. En fibroblasts de ratolí, Sprouty2 (*mSpry2*) actua després de l'activació de FGFR, per sobre de Ras (Gross et al., 2001a); mentre que en cèl·lules 293T, bloqueja tant la senyalització de FGFR com del receptor β 2 adrenèrgic a nivell de Raf (Yusoff et al., 2002). Un altre grup va determinar que hSpry4 reprimeix la senyalització dels receptors d'insulina i d'EGF a nivell de Ras o anterior (Leeksma et al., 2002) (Figura 2b). S'ha observat que en el cas de la senyalització per VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), mSpry4 interfereix en l'activació de Raf inhibint la via ERK MAPK a través de PLC γ /PKC de forma independentment de Ras i sense necessitat de presentar la tirosina fosforil·lada (Sasaki et al., 2003) (Figura 2c). Altres estudis sobre Spry1 de granota *X. Laevis* (*xSpry1*) i Spry2 de ratolí, suggereixen que actua com a antagonista de l'activació de la via ERK/MAPK induïda per FGF en base a la seva capacitat per competir amb Shp2 i FRS2 per la unió amb el complex Grb2-SOS (Hanafusa et al., 2002). Segons aquest model, la interacció Spry-Grb2 estaria mediada per la unió del domini SH2 de Grb2, al residu fosfo-Tyr55 de Spry2. No obstant altres grups van observar que la unió de Spry2 al complex Grb2-SOS era constitutiva (Gross et al., 2001b; Rubin et al., 2005) i que no era inhibida per la unió de FRS2.

Per altra banda, diversos estudis han demostrat que les proteïnes de Sprouty no presenten un efecte inhibitori sobre la cascada de senyalització Ras-ERK/MAPK induïda per EGFR, sinó que desencadenen l'efecte contrari, augmenten i prologuen l'activació de la cascada (Taula 1). Aquest efecte agonístic està estrictament regulat per la capacitat que presenten els membres de la família de Sprouty d'interaccionar amb c-Cbl (Egan et al., 2002; Hall et al., 2003; Impagnatiello et al., 2001; Rubin et al., 2003; Sasaki et al., 2003; Wong et al., 2002). En condicions normals c-Cbl promou la ubiquitinació del receptor EGFR, i la seva internalització i degradació pel proteasoma (Egan et al., 2002; Rubin et al., 2003; Waterman et al., 2002; Wong et al., 2002). Així doncs quan Sprouty (en concret Sprouty2) interacciona amb c-Cbl s'inhibeix la degradació del receptor i per tant es mantenen els nivells de EGFR i l'activació de la senyalització intracel·lular (Cabrita and Christofori, 2008; Edwin et al., 2009; Mason et al., 2006).

Els membres de la família de Sprouty són inhibidor de la senyalització dels RTK iniciada pels factors de creixement, tot i així s'ha descrit certa controvèrsia en el mecanisme d'inhibició del receptor de EGF. Per tant el mecanisme d'acció de Spry sobre la cascada de senyalització dels RTK dependrà del context i tipus cel·lular, del membre de la família de Spry, del tipus de RTK i del factor de creixement que reguli.



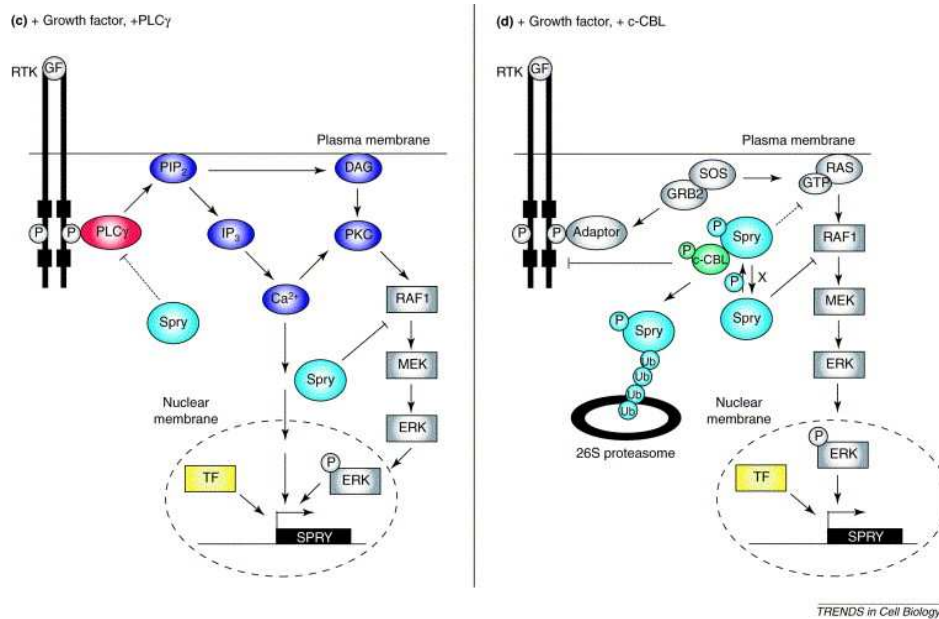


Figura 2: **Models dels mecanismes d'acció i regulació de Sprouty.** (a) En absència de lligand, el RTK i les proteïnes de la cascada de senyalització estan inactives. Per altra banda la proteïna Spry no fosforil·lada se situa al citoplasma. (b) Quan els factors de creixement (GF) s'uneixen al RTK s'activa la cascada de senyalització de les MAPK, les ERK fosforil·lades entren al nucli activant la transcripció de diversos gens com Spry. Gràcies a l'activitat cinasa de les proteïnes Src, es fosforil·la la tirosina de Spry, que inhibirà la cascada de senyalització de la via Ras/Raf. Una proteïna fosfatasa (X), potencialment Shp2, defosforil·la la proteïna de Spry, i així podrà bloquejar la cascada de senyalització via Raf1. (c) Una altra via de senyalització activada pels RTK és la cascada de senyalització iniciada per la proteïna PLCγ dependent de Ca²⁺. En aquest cas Spry pot interactuar directament amb Raf, mitjançant el domini RBD, prevenint l'activació de la via PLCγ/PKC/Raf/MAPK, independent de Ras. (d) Aquest últim model descriu que la fosforil·lació del residu de tirosina de Spry gràcies a Src, desencadena el reclutament de c-Cbl, evitant la ubiquitinització i degradació del RTK EGFR i perllongant l'activitat de senyalització intracel·lular de les MAPK ERK (Mason et al., 2006).

1.4 Els gens de Sprouty com a supressors de tumors

El fet que les proteïnes de la família de Sprouty actuïn majoritàriament com a reguladors negatius de diverses vies de senyalització intracel·lulars, ha donat lloc a que diversos grups d'investigació comencin a estudiar el rol que podrien desenvolupar aquests gens en els càncers humans. Per això no és d'estranyar que cada vegada més es publiquin resultats on es vinculi Sprouty amb patologies cancerígenes. S'ha determinat que l'expressió de Spry1 i Spry2 està disminuïda en el càncer de mama (79% i 96% respectivament) i càncer de pròstata (40% en el cas de Spry1), a més a més d'observar-ho en línies cel·lulars de melanoma (Fritzsche et al., 2006; Kwabi-Addo et al., 2004; Lo et al., 2004; McKie et al., 2005; Tsavachidou et al., 2004). Per altra banda també s'ha observat una disminució dels nivells de Sprouty2 al carcinoma d'endometri (Velasco et al., 2011), a limfomes de cèl·lules B (Frank et al., 2009) i al carcinoma hepatocel·lular (Fong et al., 2006).

Els mecanismes pel qual es disminueixen els nivells de Spry pot ser variable i específic per cada tipus de càncer. Els processos que s'observen són la hipermetilació dels promotors de Spry, la pèrdua d'heterozigositat (LOH) i també a causa de la manca d'expressió dels factors de transcripció que actuen per sobre de Spry (McKie et al., 2005). Per exemple prop del 82% dels càncers de pròstata presenten hipermetilació del promotor de Spry2 i entre un 27-40% dels casos presenten pèrdua d'heterozigositat (pèrdua d'un al·lel) d'aquest gen, exhibint l'al·lel restant de forma metilada (McKie et al., 2005). A més a més, un alt percentatge de càncers de pròstata presenten metilació del promotor de Sprouty1 amb una conseqüent aberració en la seva expressió (Kwabi-Addo et al., 2009). També s'ha observat hipermetilació del promotor de Sprouty2 en el carcinoma d'endometri (Velasco et al., 2011) i un silenciament epigenètic de Sprouty2 en els limfomes derivats de les cèl·lules B, tant en humans com en ratolins (Frank et al., 2009). Per altra banda, en el carcinoma hepatocel·lular i el càncer de mama, s'ha observat el gen Sprouty2 silenciats, però no per processos d'hipermetilació del promotor, sinó possiblement per causa d'una expressió anòmala d'algun factor de transcripció necessari per la seva expressió (Fong et al., 2006; Lo et al., 2004).

En els melanomes, on la via ERK/MAPK està sobreactivada, el mecanisme per escapar de la regulació per Spry és doble (Tsavachidou et al., 2004). En aquells melanomes en que B-raf presenta mutacions activadores, com la mutació V600E, Spry2 perd la seva capacitat d'unir-s'hi, i per tant no pot inhibir l'acció de Raf. En canvi en aquells melanomes on B-raf no està mutat, l'expressió de Spry2 està disminuïda, a través d'un mecanisme desconegut. La pèrdua d'expressió de Sprouty sembla ser un esdeveniment tardà durant la progressió del càncer. Com en el cas del càncer de pròstata on en estadis primerencs es mantenen els nivells d'expressió de Spry2 normals, mentre que en càncers metastàtics, la seva expressió es veu disminuïda (McKie et al., 2005). D'altra banda, actualment no s'han descrit mutacions puntuals de Spry amb una conseqüent inhibició de la seva funció en el desenvolupament del càncer.

Per tant, existeixen evidències que indiquen que les isoformes de Sprouty poden actuar com a supressors de tumors, ja que tenen la capacitat d'interferir en el procés de tumorigènesi, (Fong et al., 2006; Kwabi-Addo et al., 2004; Miyoshi et al., 2004), i per tant es podrien utilitzar com a possibles marcadors pel diagnòstic tumoral. Tot i així, la gran majoria de resultats són en models *in vitro*, però molt recentment s'han descrit models *in vivo* de ratolí que mostren resultats funcionals del paper de Spry en la

iniciació i sobretot la progressió del càncer de pròstata. La Dr GR. Martin i els seus col·laboradors demostren que les proteïnes Spry1 i Spry2 actuen com a supressors de tumors a la pròstata de ratolins que presenten una haploinsuficiència de Pten (Schutzman and Martin, 2012). Aquests resultats s'han corroborat recentment pel Dr HY. Leung i els seus col·laboradors, que demostren que la pèrdua de Spry2 juntament amb la pèrdua de Pten causen l'aparició de carcinoma de pròstata, ja que les cèl·lules sobrepassen un *checkpoint* necessari per la supressió tumoral (Patel et al., 2013).

1.5 Paper de Sprouty en el desenvolupament embrionari: fenotip dels ratolins *knockout*.

Les proteïnes de Sprouty s'expressen en diferents nivells en tot l'embrió durant el desenvolupament i també en els teixits adults, amb l'excepció de Sprouty3, el qual presenta una distribució més restringida ja que s'expressa només al cervell i als testicles (Leeksma et al., 2002; Minowada et al., 1999). Gràcies a les evidències observades en estudis realitzats amb ratolins *knockouts* de Spry, s'ha pogut demostrar el rol d'aquests gens durant el desenvolupament dels mamífers.

1.5.1 Sprouty1

El Dr A. Basson i els seus col·laboradors, van observar que els ratolins recent nascuts *knockout* per Sprouty1 (*Spry1*^{-/-}) desenvolupen defectes en el ronyons i en el tracte genito-urinari, semblants a un síndrome humà anomenat CAKUT (*Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract*) (Basson et al., 2005; Basson et al., 2006). Aquest fenotip apareix com a resultat dels defectes durant el desenvolupament de la gemma uretèrica (UB, *Ureteric Bud*), una estructura epitelial que es ramifica des del conducte de Wolff (WD) per iniciar la formació del ronyó. Sota la influència del mesènquima metanèfric, la gemma uretèrica s'evagina i comença a ramificar-se seguint un patró característic. Finalment, a partir de la gemma uretèric es desenvoluparan els conductes col·lectors del ronyó, mentre que la resta de la nefrona es formarà a partir del mesènquima metanèfric adjacent, degut a un procés de transició mesenquimal-a-epitelial. El factor de creixement responsable d'induir la formació de la gemma uretèrica i la conseqüent ramificació és el GDNF (Vainio and Lin, 2002). El GDNF és un factor neurotròfic secretat pel mesènquima metanèfric, el qual interacciona amb el receptor tirosina cinasa Ret, que és present al llarg del conducte de Wolff. La interacció de GDNF amb el receptor Ret promourà l'activació del desenvolupament d'una única gemma uretèrica que penetra dins del mesènquima ramificant-se.

En el mutant de *Spry1*, les cèl·lules del conducte de Wolff es tornen hipersensible al factor neurotròfic GDNF, causant l'extensió de la senyalització per GDNF al llarg del conducte (Basson et al., 2005). Per tant, els ratolins *knockout* de *Spry1* desenvolupen una gemma uretèrica molt ampla i freqüentment hi broten un gran nombre de gemmes ectòpiques desde diverses posicions del conducte de Wolff (Figura 3). Cal destacar que el fenotip del mutant de *Spry1* es rescata quan es creua amb un ratolí heterozigot per GDNF, o bé amb mutants hipomòrfics (Y1062F) o nuls de *Ret* (Figura 3) (Basson et al., 2006; Michos et al., 2010; Rozen et al., 2009) Aquests resultats ens confirmen que *Spry1* actua com a inhibidor de la senyalització de *Ret in vivo*.

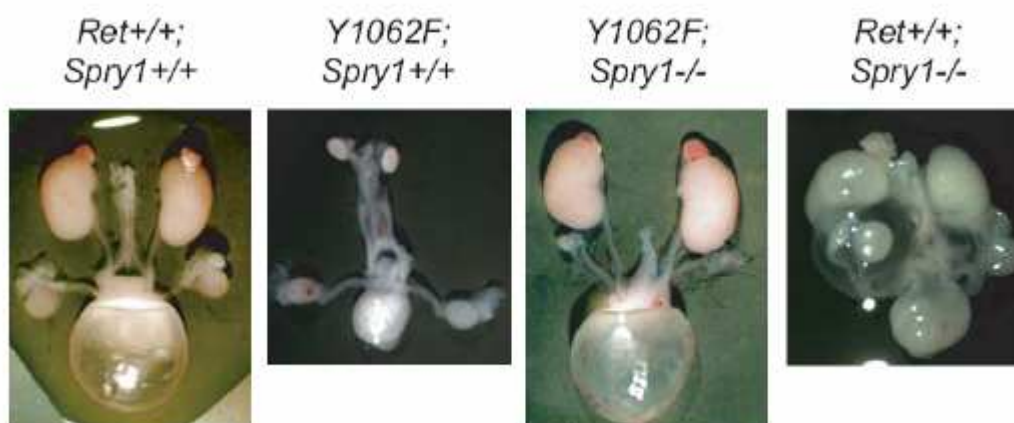


Figura 3: Els ratolins *knockout* per *Spry1* desenvolupen anomalies al tracte genito-urinari (imatge de la dreta). Imatges del tracte genito-urinari de ratolins recent nascuts dels genotips indicats. La pèrdua de *Sprouty1* rescata els defectes del fenotip renal dels ratolins que expressen la mutació hipomòrfica T1062F (Rozen et al., 2009).

1.5.2 *Sprouty2*

El Dr T. Taketomi i els seus col·laboradors, d'acord amb els resultats de K. Shim i els seus col·laboradors, van observar que els ratolins *knockout* de *Spry2* moren durant les primeres sis setmanes de vida (Shim et al., 2005; Taketomi et al., 2005). Aquests ratolins desenvolupen hiperplàsia del sistema nerviós entèric (ENS), un fenotip que afecta tot el sistema gastrointestinal caracteritzat pels defectes en la contractilitat tant del esòfag com del intestí. Les neurones entèriques d'aquests animals presenten un augment de la senyalització de ERK/MAPK i de la via PI3K/Akt en resposta a GDNF, suggerint que aquest fenotip pot desencadenar-se degut a un fenomen d'hipersensibilitat del lligand. D'altra banda quan s'administren anticossos bloquejants contra GDNF als ratolins *knockout* per *Spry2*, s'observa una disminució de la hiperplàsia del ENS, demostrant que *Sprouty2* és un inhibidor de la senyalització per GDNF durant el desenvolupament del ENS (Taketomi et al., 2005).

En resum, totes aquestes dades demostren que les proteïnes de la família de Sprouty regulen la senyalització de Ret durant el desenvolupament embrionari. Per tant reforcen la hipòtesi segons la qual Sprouty inhibeix les vies de senyalització cel·lulars induïdes pels GFLs.

2. EL RECEPTOR TIROSINA CINASA RET

2.1 Ret: gen i proteïna

El gen Ret va ser identificat per Takahashi i els seus col·laboradors l'any 1985 com un oncogen. Al transfectar les cèl·lules 3T3 amb DNA d'un limfoma humà es va descriure un nou reordenament del gen (Takahashi et al., 1985), el qual va resultar ser una recombinació entre dues seqüències de DNA no relacionades entre si. És per això que va anomenar a aquest nou gen Ret (*RE*arranged during *Transfection*) (Arighi et al., 2005).

El gen Ret codifica per un receptor tirosina cinasa transmembrana que s'expressa a les cèl·lules neuroendocrines (incloent-hi les cèl·lules C de la tiroide i les cèl·lules de la medul·la adrenal), a les neurones tant simpàtiques com parasimpàtiques, a les cèl·lules del tracte urogenital i a les cèl·lules germinals dels testicles.

La proteïna Ret està composta per tres dominis diferents (Figura 4): el domini extracel·lular, que conté quatre repeticions de caderina i una regió rica en cisteïnes necessària per la formació correcta dels enllaços disulfur intramoleculares; un domini transmembrana que és hidrofòbic i un domini intracel·lular, que conté el domini tirosina cinasa, necessari per l'activació de les vies de senyalització intracel·lular (Arighi et al., 2005; Wells and Santoro, 2009).

S'han descrit tres isoformes diferents del receptor Ret generades per *splicing* alternatiu a la regió 3' del gen. Difereixen entre elles únicament per presentar 9, 43 o 51 aminoàcids al domini C-terminal, generant doncs els receptors Ret9, Ret43 i Ret51, respectivament. Les dues isoformes majoritàries són la Ret9 i la Ret51, ja que estan molt conservades en un gran nombre d'espècies (Myers et al., 1995).

2.2 Els lligands de la família de GDNF (GFLs)

Els lligands de la família de GDNF (GFL) són factors neurotròfics sintetitzats i secretats per una gran varietat de teixits, que influeixen en el desenvolupament de diverses poblacions neuronals i en el desenvolupament del sistema genito-urinari dels animals adults (Airaksinen et al., 1999). Aquesta família de proteïnes està composta per quatre

membres diferents: GDNF, neurturina (NRTN), Artemina (ARTN) i Persefina (PSPN) (Figura 4).

Per tal que s'activi el receptor Ret, és necessari que els GFL interaccionin amb uns co-receptors anomenats GFR α (GDNF-family receptor α). Aquests co-receptors presenten uns dominis globulars rics en cisteïnes al domini extracel·lular i es troben ancorats als *lipid rafts* de la membrana plasmàtica de la cèl·lula mitjançant un grup glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Airaksinen et al., 1999). S'han descrit quatre receptors GFR α diferents, els quals interaccionen de manera específica amb els lligands GFLs per formar el complex GFL-GFR α . El lligand GDNF interacciona amb el receptor GFR α 1, NRTN amb GFR α 2, ARTN amb els GFR α 3 i el lligand PSPN activa Ret mitjançant la interacció amb el GFR α 4 (Airaksinen and Saarma, 2002). Els lligands NRTN i ARTN poden interaccionar de forma dèbil amb el co-receptor GFR α 1 i el GDNF amb el co-receptor GFR α 2 i GFR α 3. No obstant, en mamífers el lligand PSPN només es pot unir al receptor GFR α 4 (Airaksinen et al., 1999; Baloh et al., 2000; Lindahl et al., 2001; Takahashi, 2001). Aquest complex tetramèric (dímers de GFLs i GFR α), recluta dos molècules del receptor Ret, que al ajuntar-se condueix a la fosforilació creuada dels residus de tirosina del domini tirosina cinasa intracel·lular a fi de desencadenar l'activació del receptor (Airaksinen and Saarma, 2002) (Figura 4).

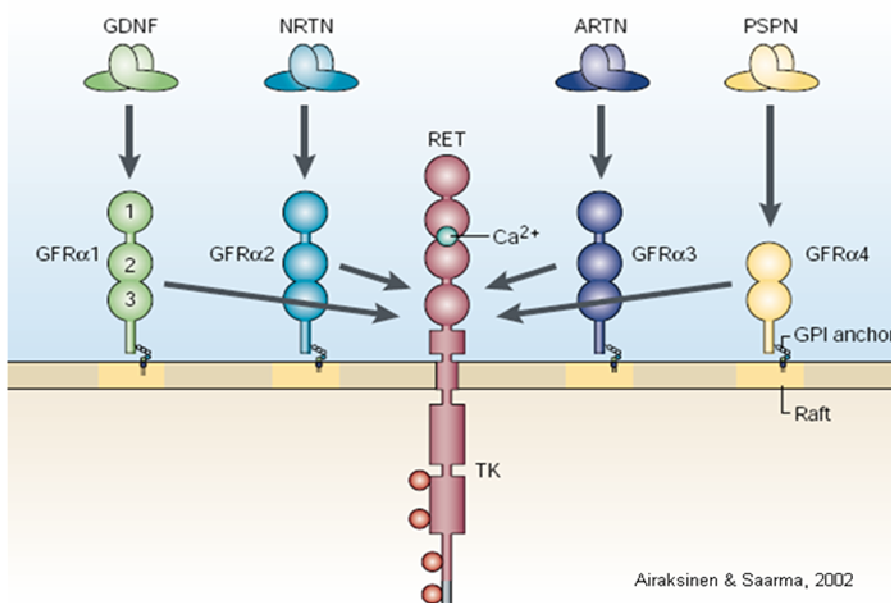


Figura 4: Estructura i interaccions dels lligands de la família de GDNF (GFLs), dels co-receptors GFR α i del receptor tirosina cinasa Ret (Airaksinen and Saarma, 2002).

2.3 Activació del receptor Ret i senyalització proximal.

Gràcies a la interacció lligand-receptor o bé per mitjà d'una activació constitutiva de les proteïnes oncogèniques de Ret, s'origina un procés d'autofosforil·lació creuada dels residus de tirosina específics del domini citoplasmàtic (Coulpier et al., 2002). Existeixen 16 residus de tirosina en el domini intracel·lular de Ret9 i dos addicionals a la isoforma llarga Ret51. S'han identificat les tirosines Tyr905, Tyr981, Tyr1015, Tyr1062 i Tyr1096 (aquesta únicament present a la isoforma Ret51), com a llocs d'unió d'una gran nombre de proteïnes citoplasmàtiques adaptadores/executores, que activaran una gran varietat de vies de senyalització intracel·lulars (Arighi et al., 2005; Wells and Santoro, 2009) (Figura 5). Un cop el receptor Ret està activat pot regular diversos processos com la supervivència, diferenciació, proliferació, migració, quimiotaxis, morfogènesi de la ramificació, creixement neurític i plasticitat sinàptica (Arighi et al., 2005).

Així, la Tyr905, present al *loop* d'activació del receptor (T-loop) interacciona amb les proteïnes Grb7/Grb10. Quan es fosforil·la aquest residu, s'estabilitza la conformació de la cinasa i facilita l'autofosforil·lació d'altres residus de tirosina del domini C-terminal (Iwashita et al., 1996). Pel que fa a la Tyr981, interacciona amb Src, el qual és essencial per la supervivència neuronal i també juga un paper en l'activació de la via AKT (Encinas et al., 2004), a més d'interaccionar amb c-Abl i SH2-B1 β (Zhang et al., 2006). La fosfolipasa C- γ (PLC- γ) interacciona amb la Tyr1015 (Borrello et al., 1996) i Grb2 s'uneix a la Tyr1096 del receptor Ret51 (Alberti et al., 1998). La Tyr1062 és un residu d'interacció d'una gran varietat de proteïnes adaptadores i efectores (*multidocking site*), com Shc, FRS2, IRS1/2, Dok1, Dok4/5, Dok6, Enigma, PKC α , i Shank3 (Figura 5). La unió de Shc, FRS2, IRS1/2 i les proteïnes Dok amb la Tyr1062 depèn de la fosforilació del residu de tirosina i es requereix dels dominis d'unió a fosfotirosines com ara els dominis PTB o SH2. En canvi les proteïnes Enigma i Shank3 s'uneixen específicament amb la Tyr1062 de Ret9, independentment del seu estat de fosforilació (Arighi et al., 2005; Takahashi, 2001).

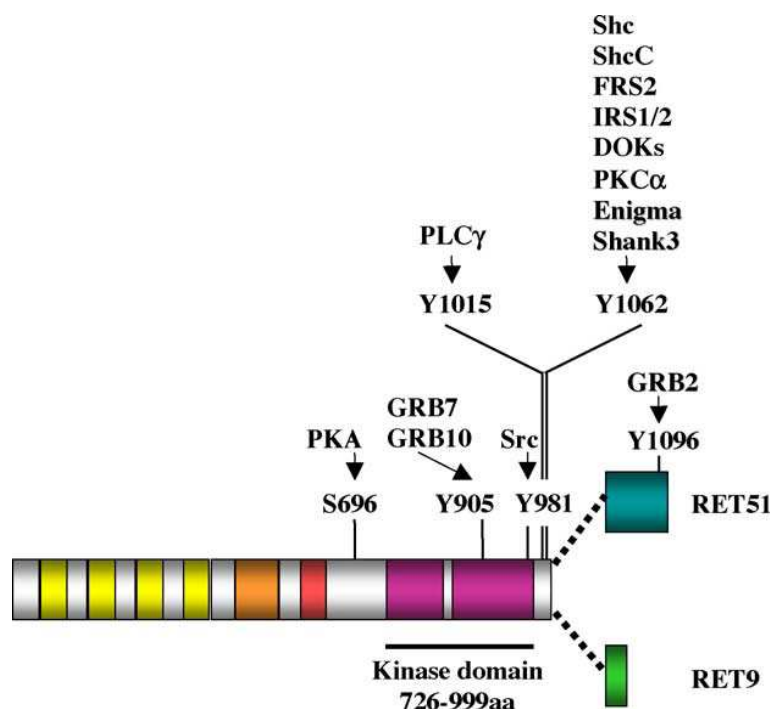


Figura 5: Proteïnes d'interacció amb les tirosines més importants del domini tirosina cinasa de Ret i les vies de senyalització intracel·lular que es desencadenen (Arighi et al., 2005).

Degut al gran nombre de proteïnes adaptadores a la Tyr1062 fosforil·lada, es ben sabut que presenta un dels papers més importants en l'activació de la senyalització intracel·lular del receptor Ret. S'ha demostrat que el ratolí *knockin* per la mutació hipomòrfica Tyr1062Phe desenvolupa un fenotip sever i molt semblant al ratolí *knockout* de Ret (Costantini and Shakya, 2006; Jain et al., 2006; Takahashi, 2001; Takahashi et al., 1985). S'han identificat almenys dos complexos proteics d'interacció amb la Tyr1062, el primer és mitjançant la proteïnes Shc, la qual conduirà a l'activació de la via Ras/ERK a través del reclutament de Grb2/Sos i el segon a través de la interacció amb Grb2/GAB que activarà la via de senyalització PI3K/Akt.

2.4 Regulació de l'activitat de Ret

L'activitat dels RTKs es troba estrictament regulada, ja que exerceixen un paper crucial en diferents processos del desenvolupament, on les senyals implicades han de tenir una intensitat i una durada adequades. Un dels mecanismes més estès per controlar la funció dels receptors RTK consisteix en la degradació d'aquests mitjançant Lligases d'Ubiquitina E3 (Haglund et al., 2003). En el cas de Ret, la degradació induïda pels lligands té lloc després de la ubiquitinització per lligases d'ubiquitina E3 com Cbl. Hi ha evidències de que la interacció Ret-Cbl no és directa sinó a través de la unió de Shc i Grb2, a diferència d'altres RTKs (Pierchala et al., 2006; Scott et al., 2005).

Per últim, existeixen mecanismes alternatius que regulen negativament el receptor Ret a través de proteïnes que inhibeixen les vies de senyalització activades per aquest. S'ha descrit que Lrig1 és capaç d'associar-se a Ret i evitar la seva relocalització als *Lipid Rafts* i per tant l'activació de la via ERK/MAPK (Ledda et al., 2008). Paral·lelament, s'ha posat de manifest la rellevància de les proteïnes de la família de Sprouty en la regulació de la senyalització per GDNF/Ret. Com ja s'ha descrit Sprouty2 està implicat en el desenvolupament del ENS *in vivo* (Taketomi et al., 2005). En canvi, Sprouty1 està involucrat en el control de la senyalització de GDNF/Ret durant l'organogènesi renal del ratolí (Basson et al., 2005; Basson et al., 2006).

2.5 Mutacions del receptor Ret i patologies associades

2.5.1 Mutacions de pèrdua de funció: Malaltia de Hirschsprung.

Les mutacions de pèrdua de funció del gen Ret, generalment estan associades a una haploinsuficiència o un efecte dominant negatiu del gen i estan relacionades amb la malaltia de Hirschsprung (HSCR) (Wells and Santoro, 2009).

La malaltia de Hirschsprung (HSCR) o aganlionosis intestinal congènita, és un trastorn causat pel fracàs en la migració de les neurones entèriques de la cresta neuronal, donant lloc a defectes en la innervació entèrica. Aquesta malaltia cursa amb l'obstrucció intestinal i restrenyiment crònic degut a l'absència dels plexes intramurals (plexes mientèric i submucós) al llarg del intestí gros (Parisi and Kapur, 2000). La gran majoria de casos de HSCR són esporàdics, però un 15-20% dels casos són familiars, seguint un patró autosòmic dominant amb una penetrància incompleta (Amiel and Lyonnet, 2001).

La majoria de les mutacions observades desencadenen una reducció dels nivells de la proteïna Ret o una pèrdua de la seva funció degut a microdeleccions, insercions i mutacions d'*splicing* (Amiel et al., 2008). Les conseqüències funcionals que s'observen en la malaltia de HSCR depenen de la posició de les mutacions en la seqüència codificant del gen (Arighi et al., 2005).

2.5.2 Mutacions de guany de funció: Carcinoma de tiroide.

S'han descrit diverses patologies que presenten mutacions al receptor Ret. Entre elles destaquem el carcinoma papil·lar de tiroide (PTC) i el carcinoma medul·lar de tiroide (MTC). Aquests tipus de càncer són causats per reordenaments cromosòmics del receptor Ret o per mutacions de guany de funció, respectivament (explicats en més detall a l'apartat 3.3) (Arighi et al., 2005; Takahashi, 2001).

3. EL CARCINOMA DE TIROIDE

3.1 La glàndula tiroide: anatomia, histologia, fisiologia i embriogènesis

La tiroide és una glàndula endocrina situada a la part anterior del coll. Està formada per dos lòbuls units per una porció estreta de teixit anomenada istme, que li dona una forma de papallona (Diéguez and Yturriaga, 2007). Aquests lòbuls presenten una gran vascularització i una abundant xarxa de vasos limfàtics, afavorint la distribució de les hormones tiroïdals a tot l'organisme.

La glàndula tiroide està situada a la part frontal del coll a l'altura de les vèrtebres C5 i T1, junt al cartílag tiroide, envoltant la tràquea fins arribar posteriorment a l'esòfag. Es troba recoberta per la musculatura pretiroïdal, el múscul platisme del coll, el teixit subcutani i la pell.

La tiroide està recoberta per una beina aponeuròtica denominada càpsula de la glàndula tiroide que ajuda a mantenir la glàndula en la seva posició. La porció més externa de la càpsula continua amb l'aponeurosi cervical i cap a darrera amb la beina carotídia. En la seva cara anterior la tiroide està recoberta per la musculatura infrahioïdal i lateralment pel múscul esternocleidomastoïdal. Per la seva cara posterior, la glàndula està fixada al cartílag tiroide i traqueal i al múscul cricofaríngic mitjançant l'engruiximent de l'aponeurosi que forma el lligament suspensori de Berry.

Des del punt de vista histològic, la glàndula tiroide està delimitada per una càpsula de teixit conjuntiu per sota de la qual, s'observa una capa interna més fina adherida al teixit glandular. A partir d'aquesta última, es generen petits tàbics de teixit conjuntiu que penetren a la glàndula i la divideixen en lòbuls incomplets (Young et al., 2006). Tenint en compte la seva estructura i funció, aquest òrgan està compost per fol·licles de mida variable (15-1000µm de diàmetre) amb una cavitat central que conté un material viscos anomenat col·loide. El col·loide està compost majoritàriament per la tiroglobulina (Tg), la proteïna precursora de les hormones tiroïdals. Aquests fol·licles estan delimitats per les cèl·lules fol·liculars organitzades com un epiteli monocapa que descansa sobre una làmina basal. Al voltant d'aquests fol·licles es troben les cèl·lules parafol·liculars o cèl·lules C (Kondo et al., 2006) (Figura 6).

Les **cèl·lules fol·liculars** constitueixen més del 95% del contingut cel·lular de la glàndula tiroide. Són cèl·lules epitelials polaritzades d'origen endodèrmic que es caracteritzen per estar especialitzades en la regulació, producció i secreció de les hormones tiroïdals, la tiroxina (T4) i la triiodotironina (T3). Per a la síntesi d'aquestes hormones es

requereix de la presència de iode i tirosina (Bianco and Larsen, 2005). Aquestes hormones s'encarreguen d'augmentar la taxa metabòlica basal, intervenir en la síntesi i degradació tant de proteïnes com de greixos i estimular el creixement i la diferenciació cel·lular, a més de ser fonamentals pel desenvolupament i el creixement fetal i neonatal (Young et al., 2006). Per altra banda, prop del 5% de les cèl·lules de la glàndula tiroide són les **cèl·lules parafol·liculars o cèl·lules C**. Són cèl·lules epitelials d'origen ectodèrmic (cresta neural), no tenen polaritat i són les productores de la calcitonina, una hormona peptídica que participa en la homeòstasi del metabolisme calci-fòsfor (Scheuba et al., 1999).

La hormona que regula la funció de la tiroide, es produeix a la hipòfisi i s'anomena hormona estimulant de la tiroide, TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*). La TSH pot incrementar o disminuir l'activitat de la tiroide mitjançant un mecanisme que depèn dels nivells de les hormones tiroïdals en sang. Quan s'allibera la TSH, s'activa la glàndula tiroide. En primer lloc la Tg del col·loide s'uneix al iode provocant que les cèl·lules fol·liculars endocitin el col·loide. Després s'activa un procés de digestió enzimàtica lisosomal que provocarà la síntesi i alliberament de les hormones T3 i T4 al torrent sanguini. L'augment dels nivells de les hormones tiroïdals en sang provoca que s'activi la retroalimentació negativa inhibint l'acció de la TSH (Figura 6). Per altra banda la secreció de la TSH a la hipòfisi, està controlada per l'hipotàlem, gràcies a l'hormona alliberadora de tirotròpina (TRH). De tal manera que el control consisteix en un mecanisme de *feedback* negatiu o retroalimentació negativa desencadenat per les pròpies hormones tiroïdals (T3 i T4) (Eng et al., 1999; Kondo et al., 2006).

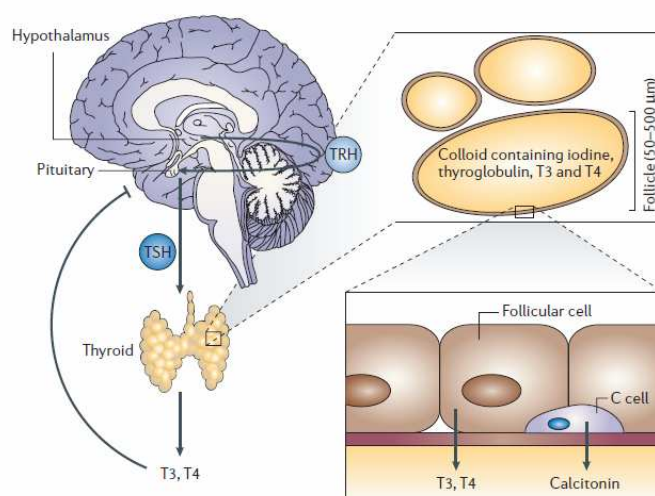


Figura 6: **Fisiologia de la glàndula tiroide**. La funció principal de la glàndula tiroide és sintetitzar, emmagatzemar i secretar les hormones tiroïdals (T3 i T4), sota el control del eix hipotàlem-hipòfisi gràcies al *feedback* negatiu desencadenat per les mateixes hormones tiroïdals (Kondo et al., 2006).

La tiroide es desenvolupa en el fetus entre la 3^a i la 5^a setmana de gestació i apareix sobre el pis faríngic a la base de la llengua. Aquest diverticle es torna bilobulat i descendeix adherit a la faringe mitjançant el conducte tiroglòs a la 4^a setmana de gestació. En les següents setmanes continua migrant fins a la base del coll, fins arribar a la seva ubicació anatòmica entre el tercer i sisè anell traqueal. Els fol·licles de la tiroide comencen a desenvolupar-se a partir de cèl·lules epitelials i aconsegueixen captar iode i produir col·loide a la 11^a setmana de gestació i ja produeixen tiroxina a la 18^a setmana. Per altra banda, les cèl·lules C tenen un altre origen embrionari, aquestes s'originen de la cresta neural del ectoderm, més específicament provenen dels cossos embrionaris ultimobranquials, els quals s'originen de la cinquena o quarta bossa faríngia, si el desenvolupament és en humans o en ratolins, respectivament (Fagman and Nilsson, 2010).

3.2 Aspectes generals del carcinoma de tiroide.

Epidemiològicament el càncer de tiroide és la patologia maligna més freqüent i amb més mortalitat dins dels càncers endocrins (Sherman, 2003). Presenta una gran variabilitat tant en la forma de manifestar-se com en la resposta al tractament i evolució, cosa que constitueix un problema des del punt de vista patològic, quirúrgic i oncològic. Tanmateix, alguns subtipus tumorals es desenvolupen com a part d'un síndrom hereditari originat per varies alteracions genètiques, fet que demostra la complexitat d'aquesta malaltia (Harach et al., 1999).

El carcinoma de tiroide pot desencadenar-se per factors tant genètics com ambientals. Així doncs, l'exposició a la radiació, el consum de iode, la regulació de factors hormonals i els antecedents familiars són factors de risc pel desenvolupament d'aquesta neoplàsia (Wartofsky, 2010; Williams et al., 1995).

D'acord amb l'origen cel·lular, podem fer una primera classificació dels tumors de la glàndula tiroide: els carcinomes originats a partir de les cèl·lules fol·liculars, que comprenen aproximadament el 95% dels càncers de tiroide i els carcinomes originats de les cèl·lules parafol·liculars, prop del 5% restant (Figura 7). Els carcinomes d'origen fol·licular es poden subdividir en carcinomes ben diferenciats (WDTC), poc diferenciats (PDTC) i en carcinomes anaplàstics o indiferenciats de la tiroide (ATC). A més a més, els WDTC engloben dos subtipus de carcinomes: el carcinoma papil·lar (PTC) i el carcinoma fol·licular (FTC) de tiroide. Finalment, els tumors d'origen parafol·liculars només inclouen un subtipus: el carcinoma medul·lar de tiroide (MTC) (DeLellis et al., 2004; DeLellis, 2006).

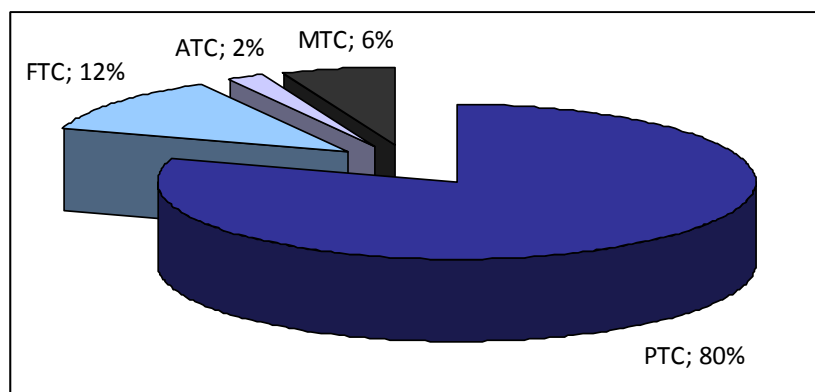


Figura 7: Representació de les freqüències d'aparició dels diferents tipus de càncer de tiroide (Giusti et al., 2010)

L'edat mitja d'aparició del càncer de tiroide varia en funció del subtipus de carcinoma, sent entre 45-50 anys pels pacients amb PTC, 50 anys en els casos que pateixen FTC i MTC, i al voltant dels 60 anys pels pacients diagnosticats d'ATC (DeLellis et al., 2004; DeLellis, 2006). Són nombrosos els estudis que demostren que el càncer de tiroide és de 2 a 4 vegades més freqüent en dones que en homes. Aquest fet es podria explicar per l'existència de diversos factors susceptibles als receptors de les hormones sexuals (Papini et al., 2002).

3.2.1 Carcinomes derivats de les cèl·lules fol·liculars:

La majoria de carcinomes de tiroide són esporàdics, només el 3-5% d'aquestes es desenvolupen de forma hereditària. Els carcinomes derivats de les cèl·lules fol·liculars es divideixen en carcinomes diferenciats, poc diferenciats o indiferenciats, basant-se en paràmetres clínics i patològics.

Els **carcinomes diferenciats de tiroide** (WDTC, *Well Differentiate Thyroid Carcinoma*), on s'hi inclou el papil·lar i el fol·liculars, representen més del 90% dels nous diagnòstics de càncer. El pronòstic per la gran majoria dels individus és excel·lent, amb un tractament que inclou cirurgia i iode radioactiu i un postoperatori que requereix de la supressió de la TSH. Desafortunadament, un petit percentatge de pacients desenvolupen recidives resistents al iode radioactiu, cosa que fa disminuir les opcions d'un nou tractament.

3.2.1.1 El **carcinoma papil·lar de tiroide** (PTC, *Papillary Thyroid Carcinoma*).

És un carcinoma epitelial maligne que mostra evidències de diferenciació cel·lular, mantenint les característiques pròpies de les cèl·lules fol·liculars, com la polaritat i la producció de tiroglobulina (DeLellis et al 2004). És el carcinoma de tiroide més freqüent, comprèn entre el 75-85% dels casos. Té un excel·lent pronòstic, amb un

índex de supervivència del 90%. L'edat mitja d'aparició del tumor és als 45 anys i la seva incidència és tres vegades més en dones que en homes (Mazzaferri and Kloos, 2001). Al voltant del 3-7% dels PTCs són familiars (Corvi et al., 2001) i presenten una forma més agressiva que les formes esporàdiques (Alsanea et al 2000). El PTC presenta un creixement lent i pot metastatitzar preferentment a la via limfàtica, degut a l'abundant xarxa de vasos limfàtics que irriguen els lòbuls de la tiroide.

Des del punt de vista histològic, el PTC és un tumor de creixement lent, ben diferenciat i freqüentment no encapsulat. El tret més característic és la presència de papil·les, formades per un eix conjuntiu revestit per cèl·lules epitelials cúbiques amb nuclis allargats i vora irregular. Altres característiques comuns són els solcs i inclusions nuclears, a més de la detecció dels cossos de psamoma (calcificacions) i les cèl·lules gegants multinucleades (DeLellis et al., 2004).

3.2.1.2 El **carcinoma fol·licular de tiroide** (FTC, *Follicular Thyroid Carcinoma*).

És un carcinoma epitelial maligne que mostra evidències de diferenciació cel·lular i que no presenta les característiques nuclears pròpies dels PTC (De Lellis et al 2004). Constitueix entre el 10-15% dels càncers de tiroide, presenta pitjor pronòstic, amb un predomini d'aparició al voltant dels 55 anys, sent molt estranya l'aparició en nens. La majoria dels tumors són encapsulats, amb una gran tendència a estendre's pel torrent sanguini i desenvolupar metàstasis, principalment als pulmons i als óssos (DeLellis, 2006; Schmid and Farid, 2006; Vasko et al., 2007).

El FTC pot originar-se a partir d'una lesió precursora benigna: l'adenoma fol·licular (FA). Ambdós patologies presenten les mateixes característiques citològiques, però la invasió capsular, la infiltració del parènquima tiroïdal veí i la invasió vascular, són criteris de malignitat pel diagnòstic diferencial (Mazzanti et al., 2004).

Des del punt de vista histològic, el FTC és un tumor invasiu, amb característiques morfològiques variables que van des de la formació d'estructures fol·liculars amb col·loide al seu interior fins a patrons de creixement sòlid o trabecular. La característica citològica més distintiva és la carència de la atípia nuclear pròpia del PTC.

3.2.1.3 El **carcinoma poc diferenciat** (PDTC, *Poor Differentiate Thyroid Carcinoma*), està definit com una neoplàsia de les cèl·lules fol·liculars amb una limitada diferenciació cel·lular. Pot aparèixer de nou o associat a un carcinoma diferenciat de tiroide pre-existent. En alguns casos s'observen metàstasis als nòduls limfàtics i a d'altres òrgans distants. Des del punt de vist histològic s'observa un patró de

creixement sòlid o trabecular amb evidències de cèl·lules mitòtiques, necrosis i invasió vascular (DeLellis, 2006).

3.2.1.4 El **carcinoma anaplàstic de tiroide** (ATC, *Anaplàstic Thyroid Carcinoma*).

És un carcinoma indiferenciat poc freqüent que es considera un dels tumors sòlids més agressius i letals que afecten als humans (Nix et al., 2006). Representa prop del 3% dels carcinomes de tiroide on acostuma a aparèixer entre els 50 i 70 anys i l'esperança de vida dels pacients després del diagnòstic és de 6 mesos. Les metàstasis apareixen en més d'un 50% dels pacients. La invasió als ganglis limfàtics cervicals s'observa freqüentment (40%), així com també a altres estructures adjacents com el múscul, la tràquea, la laringe i l'esòfag. També poden aparèixer metàstasis distals als pulmó, als ossos i al cervell.

D'acord amb la histologia, el ATC apareix total o parcialment compost per cèl·lules que han perdut la diferenciació, de manera que només és possible reconèixer el seu origen gràcies a marcadors immunohistoquímics específics, per exemple la positivitat per queratina, o bé si es mantenen les característiques estructurals pròpies d'una diferenciació epitelial prèvia (presència de desmosomes i tonofilaments) (DeLellis, 2006). Les cèl·lules poden ser gegants o fusiformes, contenint un o múltiples nuclis hiper cromàtics amb figures mitòtiques i el citoplasma sol ser eosinòfil (DeLellis et al 2004).

3.2.2 Carcinomes derivats de les cèl·lules parafol·liculars

El **carcinoma medul·lar de tiroide** (MTC, *Medullary Thyroid Carcinoma*), és l'únic tumor maligne que deriva de les cèl·lules parafol·liculars o cèl·lules C, que són les productores de la hormona anomenada calcitonina (DeLellis, 2006). Aquest tipus de tumor és poc comú i comprenen entre el 5-7% dels carcinomes de la tiroide, presentant un pitjor pronòstic que els carcinomes diferenciats (WDTC) (Negri et al., 2002). La gran majoria del MTC són esporàdics (75%), mentre que el 25% restant es desenvolupen per causes hereditàries, associats a tres síndromes autosòmics dominants: la neoplasia endocrina múltiple de tipus 2A (MEN 2A), tipus 2B (MEN 2B) i el carcinoma medul·lar familiar no-MEN (FMTC) (Nix et al., 2006; Wells and Santoro, 2009).

El pic d'incidència de la forma esporàdica dels MTC és aproximadament als 50 anys i és semblant als pacients que presenten la variant familiar (FMTC). En canvi els tumors associats al síndrom MEN2A s'observen durant l'acabament de l'adolescència o la

primera infància, mentre que els associats al MEN2B es desenvolupen principalment durant la infància (DeLellis et al., 2004). El MTC presenta un creixement tumoral lent, tot i que pot metastatitzar al fetge o als ganglis limfàtics propers durant les primeres etapes del creixement tumoral (Pinchot et al., 2009).

Des del punt de vist histològic, les cèl·lules C dels MTC freqüentment presenten un patró de creixement difús o en forma de niu, les cèl·lules són poligonals, rodones o fusiformes i totes elles positives per calcitonina. El marcatge contra calcitonina s'utilitza com un biomarcador durant el diagnòstic dels MTC i durant el seguiment postoperatori dels pacients (Ball, 2007). Els tumors esporàdic o familiars són indistingibles, tot i que les formes hereditàries estan associades a una hiperplàsia de les cèl·lules C en etapes primerenques (DeLellis, 2006).

El fenotip del malalts amb la síndrome MEN2 varia depenent de l'agressivitat del carcinoma medul·lar i l'afectació d'altres òrgans implicats, com la paratiroide o la glàndula adrenal (Taula 2).

Els pacients amb MEN2A presenten MTC, feocromocitoma (càncer a la medul·la de la glàndula adrenal) el 50% dels casos i hiperplàsia o adenoma de la paratiroide entre el 20% i el 30% dels casos. Pel que fa al MEN2B, és la variant més agressiva ja que es desenvolupa en edats primerenques i es caracteritza per desenvolupar MTC, feocromocitoma el 50% dels casos i altres anomalies durant el desenvolupament tals com ganglioneuromatosis a la mucosa intestinal i anomalies oculars i esquelètiques (*marfanoid habitus*). El FMTC es considera la variant menys agressiva i es caracteritza per presentar únicament MTC almenys a quatre membres de la mateixa família (Eng et al., 1996) (Taula 2).

Variant MEN2	Característiques fenotípiques de la malaltia
MEN2A	MTC, feocromocitoma, hiperplàsia a la paratiroide
FMTC	MTC
MEN2A o FMTC amb malaltia de Hirschprung	Igual que MEN2A o FMTC amb aganglionosis intestinal
MEN2B	MTC, feocromocitoma, ganglioneuromatosis intestinal i mucosa, malformacions oculars i <i>marfanoid habitus</i>

Taula 2: MEN2. Variants clíniques i síndromes (modificat de (Arighi et al., 2005)).

3.3 Alteracions genètiques dels tumors de la glàndula tiroide.

S'han descrit diverses alteracions genètiques involucrades en el desenvolupament de tumors a la glàndula tiroide, les hem agrupat segons el tipus de carcinoma.

3.3.1 Alteracions genètiques dels PTC.

Des del punt de vista molecular, s'han descrit quatre alteracions genètiques presents als PTC esporàdic: reordenaments cromosòmics que afecten als receptors tirosina cinasa Ret i NTRK1 (Saenko et al., 2003), i mutacions activadores dels protooncògens: *RAS* i *BRAF* (Frattini et al., 2004; Kimura et al., 2003; Melillo et al., 2005; Nikiforov and Nikiforova, 2011; Soares et al., 2003) (Taula 3). Totes aquestes alteracions activen les vies de senyalització de les MAPK ERK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Roger et al., 2010).

Els reordenaments cromosòmics RET/PTC són les alteracions més comunes en els càncers de tiroide, especialment en el tipus papil·lar. Cal tenir en compte que el receptor Ret no s'expressa a les cèl·lules fol·liculars de la tiroide de manera fisiològica.

S'han identificat fins a dotze reordenaments genètic diferents, cadascun generat per la fusió del receptor Ret amb diversos gens activadors (Ex. H4, Ria, RFG/ELE 1) provocant la dimerització i activació constitutiva de les proteïnes quimèriques, de manera independent a la unió dels lligands (Arighi et al., 2005; Santoro et al., 2002) (Figura 8).

Aquests reordenaments es caracteritzen per la fusió del domini tirosina cinasa (C-terminal) del receptor Ret amb una regió 5' (promotor) d'un gen no relacionat del mateix cromosoma 10 o d'un altre cromosoma, que s'expressa de forma ubiqua a les cèl·lules fol·liculars (Santoro et al., 2006). D'aquesta fusió s'originen oncògens quimèrics designats com a gens RET/PTC (Arighi et al., 2005; Asai et al., 2006; Nikiforov and Nikiforova, 2011).

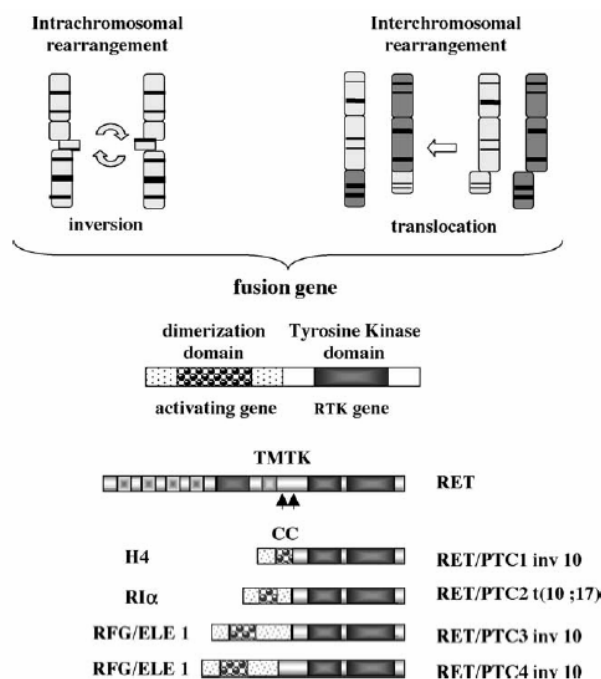


Figura 8: Els oncògens RET/PTC s'observen als carcinoma papil·lar de tiroide i s'originen mitjançant reordenaments cromosòmics del receptor Ret i diversos gens activadors. TM: domini transmembrana; TK domini tirosina cinasa; CC: dominis super-enrollats (Arighi et al., 2005).

La prevalença dels reordenaments RET/PTC varia depenent dels estudis, però la gran majoria indiquen que és entre el 20-40% dels tumors PTC esporàdics en pacients adults (Rhoden et al., 2006), tot i que depèn de la situació geogràfica, ja que en localitzacions on s'ha produït un accident nuclear, com Chernobyl, la prevalença d'aquests reordenaments cromosòmics augmenta fins al 80% (Taula 3).

S'ha descrit que existeix una correlació entre l'agressivitat del PTC en humans i el tipus de reordenament RET/PTC, ja que depenent del subtipus oncogènic que es sintetitzi es desencadenen diverses senyals mitogèniques a les cèl·lules de la tiroide (Arighi et al., 2005).

Per altra banda, s'han observat reordenaments produïts al receptor de NGF 1 (NTRK1), semblant als de Ret però s'observa amb una prevalença inferior als PTC (5-13%). L'activació d'aquest receptor també és degut a un reordenament genètic, mitjançant la fusió de l'extrem 3' del gen *NTRK1* i l'extrem 5' d'altres gens (*TPM3*, *TPR*, *TGF*) provocant la formació de variants quimèriques (Frattini et al., 2004; Kimura et al., 2003; Pierotti et al., 1995) (Taula 3).

En els carcinomes papil·lars de tiroide també s'observen mutacions activadores de Braf, les quals desencadenen una activació constitutiva de la via de senyalització MAPK-ERK, de manera independent de Ras. La mutació més freqüent és la transversió

d'una timina per una adenina en el nucleòtid 1799 de la seqüència, provocant la substitució d'una valina per un àcid glutàmic a la posició 600 (V600E). Aquesta és la mutació més freqüent als carcinomes PTC (30-65%) i també s'observa als carcinomes anaplàstics (ATC, 10-35%) (Knauf et al., 2005; Nikiforov and Nikiforova, 2011) (Taula 3).

3.3.2 Alteracions genètiques dels FTC.

Entre les alteracions moleculars del FTC, s'observen mutacions activadores del protooncogen *RAS* (codons 12, 13, 62 de K-RAS, H-RAS i N-RAS). Aquestes mutacions s'identifiquen al voltant del 45% dels FTC, aproximadament (Nikiforov and Nikiforova, 2011; Nikiforova et al., 2003). També s'han identificat als carcinomes poc diferenciats (18-50%) i als carcinomes anaplàstics (ATC, 20-60%) (DeLellis, 2006; Kimura et al., 2003) (Taula 3).

Per altra banda, als FTC també s'han observat mutacions activadores de la subunitat catalítica de la proteïna PI-3K. Aquestes mutacions generen proteïnes constitutivament actives, que provoquen la generació de PIP3 i l'activació de la cascada de senyalització, provocant l'augment de la fosforilació de la proteïna AKT i de la via mTOR (Hou et al., 2007; Roger et al., 2010) (Taula 3).

A més a més, s'han observat delecions de la proteïna Pten, una fosfatasa que actua sobre la proteïna PIP3, (Maehama and Dixon, 1998; Myers and Tonks, 1997) inhibint l'acció de la PI3K. D'aquesta manera es crea un interruptor negatiu de la via PI3K/Akt, suggerint que Pten pot presentar un rol com a supressor tumoral (Sansal and Sellers, 2004).

3.3.3 Alteracions genètiques dels ATC.

Des del punt de vista genètic, les mutacions dels gens *TP53* (p53) i *CTNNB1* (β -catenina) són les més freqüents en la carcinogènesis del ATC (Kondo et al., 2006). Tot i així, també s'observen mutacions puntuals als gen B-raf i Ras, com les que s'observen en el carcinoma PTC i FTC, respectivament. I per altra banda també observem mutacions activadores de la PI3K i delecions de Pten (Garcia-Rostan et al., 2005; Hou et al., 2007; Roger et al., 2010) (Taula 3).

	WDTC		PDTC	ATC	Referències
	PTC	FTC			
RET/PTC	20-40 %	0%	0-13 %	0%	(Pierotti et al., 1995; Rhoden et al., 2006; Santoro et al., 2006)
RTK, NTRK1	5-13 %	-	-	-	(Frattini et al., 2004; Kimura et al., 2003; Melillo et al., 2005)
BRAF	30-65 %	0%	0-13 %	10-35 %	(Knauf et al., 2005; Nikiforov and Nikiforova, 2011)
<i>H-RAS, K-RAS i N-RAS</i>	0-15 %	40-53 %	18-50 %	20-60 %	(DeLellis, 2006; Kimura et al., 2003)
PIK3CA	12-15 %	28-34 %	-	42-54 %	(Garcia-Rostan et al., 2005; Hou et al., 2007; Roger et al., 2010)
PTEN	2%	7%	-	16%	(Garcia-Rostan et al., 2005; Hou et al., 2007; Roger et al., 2010)

Taula 3: **Alteracions genètiques associades als diferents tipus de carcinomes de la tiroide derivats de les cèl·lules fol·liculars.**

3.3.4 Alteracions genètiques dels MTC.

Més dels 95% dels pacients amb MEN2A, MEN2B i FMTC, presenten mutacions de guany de funció a la línia germinal del protooncogen Ret (Asai et al., 2006), per altra banda prop del 50% dels MTC d'origen esporàdics presenten mutacions oncogèniques al receptor Ret (Cerrato et al., 2009), mentre que l'altre 50% no presenten mutacions en aquest receptor (Plaza-Menacho et al., 2006).

Les mutacions de Ret es poden dividir en dos grups: les que afecten al domini extracel·lular i les que afecten al domini intracel·lular tirosina cinasa. Les mutacions que s'observen al MEN2A són substitucions dels residus de cisteïna del domini extracel·lular situat als codons 609, 611, 618, 620 (exó 10), 630 o 634 (exó 11). La gran majoria dels pacients amb MEN2A presenten mutacions a la cisteïna 634, i és fàcil predir el desenvolupament de feocromocitoma i hiperplàsia de la paratiroide (Arighi et al., 2005).

Les mutacions observades en els casos de FMTC, són semblants a les observades en MEN2A, però estan distribuïdes més homogèniament entre les cisteïnes 609, 618 i 620 (exó 10). Per altra banda també s'han identificat altres mutacions als residus 768, 790,

791 (exó 13), 804, 844 (exó 14) o 891 (exó 15) del domini tirosina cinasa del receptor Ret en pacients que pateixen FMTC (Arighi et al., 2005).

Totes aquestes mutacions puntuals del receptor Ret són mutacions de guany de funció on el receptor esdevé un oncogen dominant. El mecanisme molecular d'activació de Ret és la homodimerització i l'activació constitutiva del receptor, independent de la unió al lligand (Asai et al., 1995). És probable que els enllaços disulfur intramolecular de les cisteïnes del domini extracel·lular del receptor desapareixen degut a les mutacions d'aquests residus, fet que provoca la formació de pont disulfur intermoleculars desencadenant una activació constitutiva del receptor (Arighi et al., 2005; Santoro et al., 2002) (Figura 9).

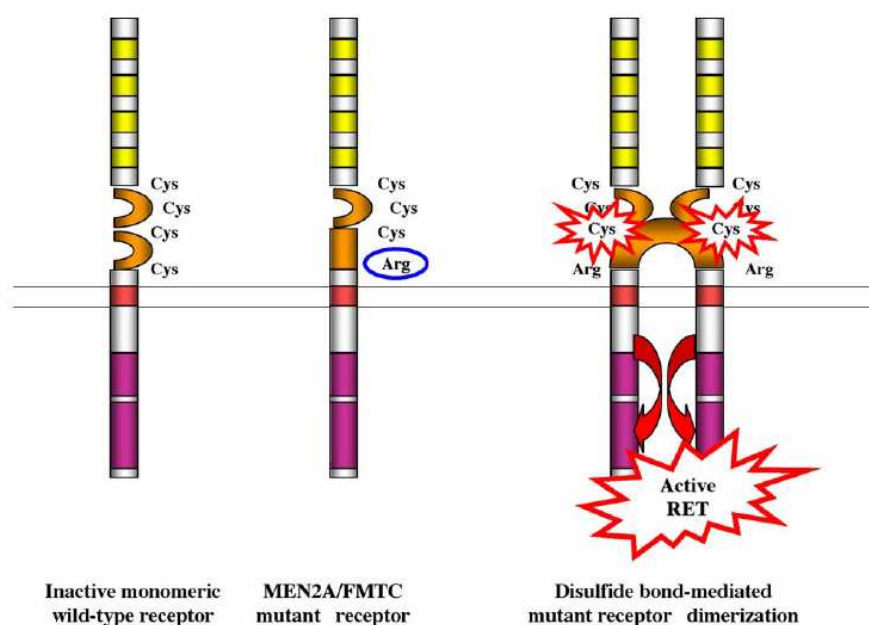


Figura 9: **Mecanismes de dimerització i activació del receptor Ret independent de lligand.** Degut a les mutacions dels residus de cisteïna del domini extracel·lular, s'efectuen enllaços disulfurs intermoleculars promovent la dimerització i activació constitutiva del receptor Ret.

Pel que fa als pacients amb MEN2B, presenten mutacions al domini intracel·lular tirosina cinasa del receptor Ret. El 95% dels casos presenten la mutació Met918Thr, mentre que el 5% restant presenten la mutació Ala883Phe (Arighi et al., 2005; Carlson et al., 1994). La mutació del residu de metionina 918 (M918T) altera la selecció específica del substrat afectant els punts d'autofosforil·lació del propi receptor Ret desencadenant l'activació de la cinasa de manera independent al lligand i sense necessitat de dimerització (Bongarzone et al., 1998; Liu et al., 1996).

És probable que el receptor Ret no actuï sol en el desenvolupament del MTC hereditari. S'han realitzat estudis amb teixits provinents de MTC i línies cel·lulars de

pacients que presenten mutacions MEN2A, on s'observen evidències de la presència d'un fenomen de trisomia 10 amb una duplicació del al·lel de Ret mutant, pèrdua de l'al·lel *wild-type* i una duplicació en tàndem de la mutació de Ret (Huang et al., 2003).

4. LA SENESCÈNCIA CEL·LULAR

4.1 Tipus de senescència cel·lular.

La senescència cel·lular es caracteritza per una aturada permanent del cicle cel·lular, la qual va ser descrita fa gairebé 50 anys, quan Hayflick i els seus col·laboradors va observar que els fibroblasts humans en cultiu presentaven una capacitat de proliferació finita. Aquesta aturada del creixement proliferatiu de les cèl·lules es va determinar com **senescència replicativa** (Hayflick, 1965). La senescència replicativa s'activa degut a una erosió al telòmers de la cèl·lula, és a dir, degut a la pèrdua gradual de DNA als extrems dels cromosomes. Tot i així, s'han observat altres factors que poden induir la senescència cel·lular com estímuls d'estrès persistents que causen dany al DNA (DDR), estrès oxidatiu, quimioterapèutics o per l'expressió de diversos gens oncogènics, que activen senyals mitogèniques induint la resposta senescent (Campisi, 2005).

El concepte de **senescència induïda per oncògens** (OIS, *oncogene-induced senescence*) va aparèixer quan el Dr M. Serrano i el seus col·laboradors van demostrar que si s'indueix la sobreexpressió o diverses mutació d'oncògens, les cèl·lules desencadenen mecanismes d'aturada del creixement cel·lular enlloc d'incrementar la seva capacitat proliferativa. (Serrano et al., 1997). La cascada de senyalització de les MAPK/ERK i en concret les formes actives de Ras, B-raf i MEK, són les vies de senyalització més establertes per tal d'activar una resposta de senescència cel·lular (Adams, 2009; Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Per altra banda el Dr PP. Pandolfi i el seus col·laboradors varen descriure la senescència induïda per Pten (PICS, *Pten Induced Cellular Senescence*), com un fenomen d'inducció de senescència on no s'observa dany al ADN (DDR) ni una hiperproliferació cel·lular, a diferència de la OIS. Aquest fenomen es pot observar tant en cèl·lules proliferatives com en cèl·lules aturades, incloent-hi les cèl·lules quiescents que esdevenen focus d'inici del tumors (Alimonti et al., 2010b). Per tal de que s'activi la senescència per PICS, es necessita que es perdin els dos al·lells de Pten, s'incrementin els nivells de p53 i s'activi la proteïna mTOR (Alimonti et al., 2010a; Alimonti et al., 2010b; Campisi, 2011).

4.2 Processos biològics associats a la senescència cel·lular

Amb el temps han sorgit dues hipòtesis per descriure la importància biològica de la senescència *in vivo*. La primera descriu la senescència cel·lular com un mecanisme beneficiós per la cèl·lula ja que activa mecanisme de supressió tumoral. La segona hipòtesi suggereix que la senescència podria tenir efectes perjudicials per les cèl·lules ja que activa processos pro-tumorals i programes d'envelliment *in vivo*. (Adams, 2009; Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Rodier and Campisi, 2011) (Figura 10).

4.2.1 La senescència i la supressió tumoral

La senescència cel·lular s'ha caracteritzat en models *in vitro* i en els últims anys s'ha observat que apareix en models murins i en tumors humans *in vivo*. S'ha postulat com un mecanisme d'oposició a la formació de tumors, associat a un estat de pre-malignitat de diversos teixits, com el teixit limfàtic, la pròstata, la pell (nevis), els pulmons, la glàndula mamària, entre d'altres (Braig et al., 2005; Chen et al., 2005; Collado et al., 2005; Dankort et al., 2007; Michaloglou et al., 2005; Sarkisian et al., 2007).

S'han publicat diversos exemples que evidencien el fet que la senescència cel·lular és un mecanisme de supressió tumoral, que depèn de dues vies de senyalització: la via encapçalada per p53 i la via de senyalització pRB/p16INK4a. S'ha descrit que mutacions inactivadores o delecions d'aquestes vies de senyalització, incrementen la susceptibilitat de desenvolupar càncer en humans i en ratolins (Chen et al., 2005; Ohtani et al., 2004; Rodier et al., 2007). Diversos estudis realitzats amb teixits humans i amb models de ratolins susceptibles a desenvolupar tumors (*cancer-prone mice*) descriuen que la senescència cel·lular és prominent en lesions cancerígenes premalignes i que desapareix quan els càncers són més agressius, tot i ser originats per aquestes lesions prèvies (Chen et al., 2005; Collado et al., 2005). També, la genotoxicitat deguda a la quimioteràpia pot induir la senescència cel·lular en algunes cèl·lules tumorals, provocant l'aturada del creixement tumoral i la seva regressió (Schmitt, 2007).

Per altra banda, s'ha descrit un fenotip secretor associat a la senescència cel·lular (SASP, *Senescence Associated Secretory Phenotype*), on les cèl·lules senescentes secreten diverses citocines pro-inflamatòries, com la IL-6, IL-8, IGFBP (*IGF binding proteins*), IL1 α entre d'altres. Aquestes proteïnes secretades poden activar mecanismes d'aturada del creixement proliferatiu de manera autocrina, per tal de mantenir la senescència cel·lular (Acosta et al., 2008; Kortlever et al., 2006; Kuilman et

al., 2008; Wajapeyee et al., 2008). Totes aquestes evidències estableixen la senescència cel·lular com un mecanisme anti-cancerígen, que constitueix una barrera per la progressió tumoral (Campisi, 2011). D'altra banda també s'ha descrit que la senescència cel·lular pot inhibir la formació de tumors no només induint una aturada del creixement cel·lular de manera persistent sinó limitant la generació de cèl·lules mare cancerígenes (Kuilman et al., 2010). S'ha descrit que si s'inhibeix la via de senyalització de p53, incrementa el ratio de divisió cel·lular provocant la inducció de la formació de cèl·lules mare pluripotents (Hanna et al., 2009). Si s'extrapola aquest fet en un model *in vivo*, es pot suggerir que les cèl·lules mare cancerígenes sorgeixen d'un procés de reprogramació cel·lular semblant (Krizhanovsky and Lowe, 2009).

4.2.2 La senescència i la progressió tumoral

Tot i el gran nombre d'exemples que evidencien la senescència com una resposta inhibidòria a la progressió del càncer, cal tenir present que el mateix estímul pot tenir un potencial per iniciar o promoure la carcinogènesis. S'ha descrit que aquesta activitat pro-cancerígena de les cèl·lules senescentes deriva de mecanismes no autònoms i paracrins (Campisi, 2011; Coppe et al., 2008; Rodier and Campisi, 2011).

La primera evidència ens descriu que la presència de cèl·lules senescentes als teixits mitòticament competents augmenta amb l'edat, i aquests teixits són els més susceptibles a desenvolupar una neoplàsia. La segona evidència recau sobre el fenotip SASP, ja que s'ha descrit que les cèl·lules senescentes poden activar la secreció de citocines inflammatòries o altres factors induint de forma paracrina fenotips associats a cèl·lules canceroses agressives (Bavik et al., 2006; Coppe et al., 2008; Parrinello et al., 2005; Young and Narita, 2009). Tot i així, aquestes evidències han estat descrites gràcies a experiments de xenografts de ratolins i co-cultius cel·lulars i es desconeix si aquest mecanisme succeeix en tumors *in vivo* (Campisi, 2011).

4.2.3 La senescència i l'envelliment

Els primers estudis *in vivo* sobre la senescència cel·lular ens demostren que el nombre de cèl·lules senescentes incrementa amb l'edat i es relaciona amb patologies degeneratives relacionades amb l'envelliment, com l'aterosclerosi o l'osteoartritis.

Durant el procés d'envelliment, la gran majoria de cèl·lules mare adultes són capaces d'activar la senescència cel·lular, comproment tant la reparació com la regeneració i renovació normal del teixits. Per tant, els factors secretats per les cèl·lules senescentes, poden pertorbar les estructures i les funcions dels teixits, promovent l'envelliment del organisme (Janzen et al., 2006; Krishnamurthy et al., 2004). És possible que les cèl·lules

senescents siguin una font “estèril” d’inflamació, és a dir sense infecció, claus per l’envelliment dels teixits i pel desenvolupament de múltiples patologies relacionades amb l’edat (Freund et al., 2010).

4.2.4 La senescència i la reparació tissular

Si ens fixem amb els factors que componen el fenotip SASP, s’observen factors que són importants per la reparació i regeneració dels teixits. S’han descrit dos estudis (Jun and Lau, 2010; Krizhanovsky et al., 2008), on es demostra que les cèl·lules senescents, secreten metal·loproteinases de la matriu extracel·lular (MMPs), importants per limitar l’extensió de la fibrosi als teixits danyats i necessaris per promoure la reparació tissular.

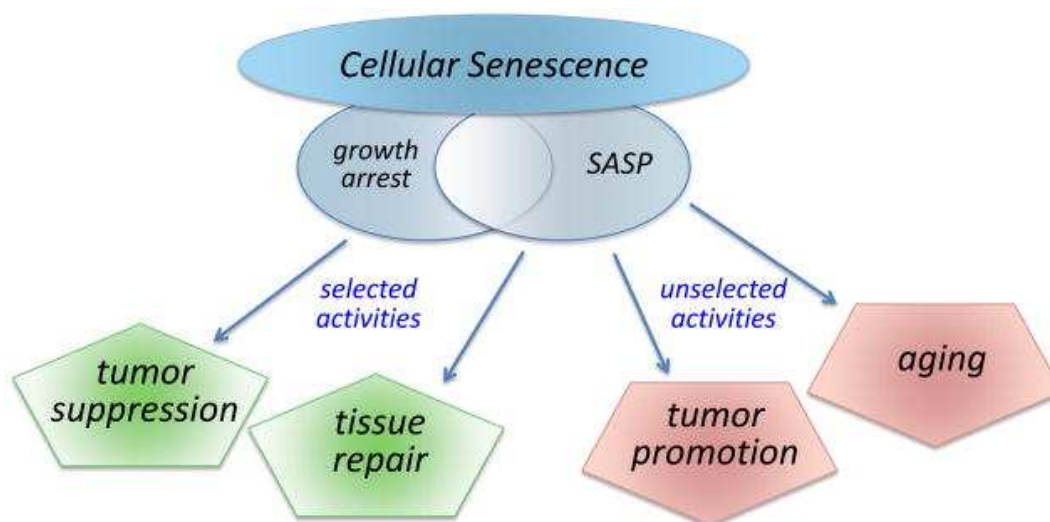


Figura 10: Representació dels quatre processos biològics activats per les cèl·lules senescents. La senescència cel·lular pot contribuir a l’activació de quatre processos biològics. Aquests processos poden estar activats degut a l’aturada del creixement cel·lular de manera autònoma o també a partir de l’activitat paracrina del fenotip secretor associat a la senescència cel·lular (Campisi, 2011) .

4.3 Mecanismes d’inducció de la senescència cel·lular: les vies p53/ARF i pRb/p16

S’han descrit diversos estímuls que indueixen la senescència cel·lular, però sembla ser que la gran majoria d’aquests convergeixen en dues vies de senyalització liderades pels supressors tumorals p53 i pRb. Durant l’entrada de senescència, p53 s’activa i indueix l’expressió d’inhibidors dels cicles cel·lulars, com els membres de la família KIP/CIP p21 i p27. En canvi, la proteïna Rb es troba en estat hipofosforilat i per tant, unida a E2F implicant la transcripció dels gens diana, que són efectors del cicle cel·lular (Campisi, 2005; McDuff and Turner, 2011; Narita et al., 2003) (Figura 11).

El locus INK4A/ARF juga un paper important en la supressió tumoral. Aquest locus codifica pel supressor tumoral p16INK4a, inhibidor de les cinases CDK4 i CDK6, que regulen la fosforilació de pRb a la fase G1 del cicle cel·lular. D'altra banda, el mateix locus INK4a/ARF codifica pel supressor de tumors ARF (*Alternative Reading Frame*), p14ARF en cèl·lules humanes i p19ARF en cèl·lules de ratolí, que activa a p53. ARF comparteix dos exons amb p16, però es tradueix amb una pauta de lectura diferent. Pròxim al locus INK4A/ARF, es troba p15INK4b, un altre inhibidor del cicle cel·lular amb funcions bioquímiques molt semblants a les de p16 (Gil and Peters, 2006).

Diferents estudis han intentat establir la importància relativa de cada via de senyalització en resposta a la senescència cel·lular. Els resultats d'aquests estudis són complexos i posen de manifest l'existència de diferències segons el tipus cel·lular i l'espècie.

P16INK4a és el principal regulador de pRb durant la senescència cel·lular, doncs s'ha observat la inducció d'aquest gen en lesions senescentis tant humanes com de ratolins *in vivo* (Collado et al., 2005; Dhomen et al., 2009; Goel et al., 2009; Michaloglou et al., 2005; Ohtani et al., 2004). La inactivació de p16 en cèl·lules humanes provoca un retràs en l'entrada de senescència d'alguns tipus cel·lulars (Campisi, 2005; Serrano et al., 1997), és per això que es troba freqüentment mutat en tumors humans (Krimpenfort et al., 2001; Sharpless et al., 2001). Sembla ser que l'activació de la senescència via p16-Rb està conservada entre humans i ratolins, però presenta un paper més important en models humans (Ben-Porath and Weinberg, 2005).

En el context de senescència cel·lular, p53 s'activa per dues vies principals: una a través d'una resposta de dany al DNA (DDR), mitjançant les cinases ATM/ATR i CHK1/CHK2 que fosforil·len i activen a p53; l'altra a través de ARF, que inhibeix la lligasa d'ubiquitina E3 Mdm2, provocant l'estabilitat de p53 que actuarà com a supressor tumoral. ARF s'activa en situacions d'estrés, com l'activació d'oncògens o l'acumulació de passatges en cultiu cel·lulars, per tal d'activar la senescència (Chen et al., 2005; Michaloglou et al., 2005; Rodier et al., 2007). ARF és un important supressor de tumors en models de ratolí, ja que el ratolí *knockout* de ARF és susceptible al desenvolupament d'un gran nombre de tumors (Kamijo et al., 1997; Sharpless et al., 2004). Tot i que l'activació de ARF també s'observa en cèl·lules senescentis humanes, s'ha acceptat que aquesta via és més important durant la inducció de la senescència de cèl·lules de ratolí (Dimri et al., 2000).

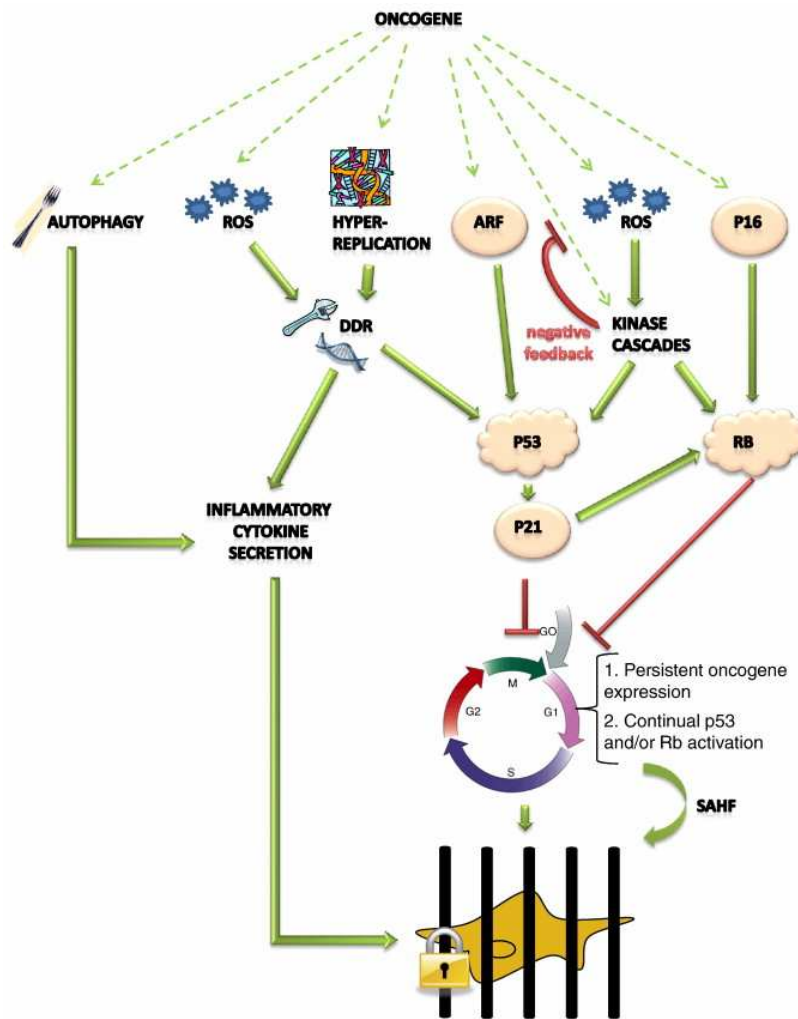


Figura 11: **Mecanismes d'activació de la senescència cel·lular induïda per un insult oncogènic.** La senescència cel·lular és una conseqüència de l'activació d'una xarxa complexa de vies de senyalització, encapçalades per les vies ARF/p53 i/o p16/pRb. ARF activa p53 estabilitzant-lo, el qual induïx la senescència cel·lular mitjançant p21. En canvi p16 activa pRb, inhibint la seva fosforil·lació, provocant la inhibició dels gens E2F, fet que promourà l'aturada del cicle cel·lular en G1. La supressió estable dels gens E2F s'aconsegueix a través de la formació de SAHF, que es creu que contribueix a la irreversibilitat de la senescència. Altres mecanismes importants per tal d'establir i reforçar la senescència cel·lular són la cascada de senyalització induïda per ROS, la retroalimentació negativa (*feedback*) activada per cinases, autofàgia, dany al DNA i la producció i secreció de citocines pro-inflamatòries (SASP) (McDuff and Turner, 2011).

En resum, els inhibidors del cicle cel·lulars codificats pel locus INK4A/ARF són necessaris per la resposta de la senescència cel·lular, en connexió amb els supressors de tumors p53 i pRb. Existeixen diferències en la importància de les dues vies durant la inducció de la senescència cel·lular, ja que dependrà del tipus cel·lular, de les mutacions oncogèniques i de l'espècie, ja sigui humana o ratolí.

4.4 Marcadors cel·lulars i molecular de la senescència cel·lular

Les cèl·lules senescentes són incapaces de progressar a través del cicle cel·lular, sinó que **aturen el creixement proliferatiu** però resten actives metabòlicament (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Al marge de l'activació dels **locus INK4A/ARF** i les vies de senyalització de **p53** i **pRb**, les cèl·lules senescentes presenten canvis morfològics, són més aplanades i més grans i presenten un augment de la vacuolització citoplasmàtica i un patró nuclear característic (Hayflick, 1965). S'han descrit diversos marcadors, que s'utilitzen normalment per identificar les cèl·lules senescentes, tot i que no són exclusius per aquestes cèl·lules ni es manifesten tots alhora. Avui en dia no existeix un marcador característic i únic per les cèl·lules senescentes (Campisi, 2011) (Figura 12).

A part dels canvis morfològics, el marcador de senescència més conegut és l'activitat β -galactosidasa associada a la senescència cel·lular (**SA- β -Gal**, *Senescence-Associated β -Galactosidase Activity*). Aquest marcador es detecta mitjançant tinció histoquímica en la majoria de cèl·lules senescentes a pH 6 (Dimri et al., 1995). Aquesta tinció prové de l'activitat β -Galactosidasa lisosomal, probablement degut al excés de lisosomes a les cèl·lules senescentes (Lee et al., 2006). Actualment no hi ha evidències que descriguin la importància d'aquest enzim en la resposta a la senescència cel·lular (Kuilman et al., 2010).

La senescència cel·lular està caracteritzada també per canvis en l'estructura de la cromatina, associats a canvis en l'expressió gènica. Els focus d'heterocromatina associats a la senescència (**SAHF**, *Senescence Associated Heterochromatic Foci*), són estructures d'heterocromatina que provoquen el silenciament de l'expressió de gens necessaris per la progressió del cicle cel·lular. Aquests SAHFs s'acumulen durant la senescència replicativa o induïda per oncògens, i podrien contribuir amb la irreversibilitat del fenotip senescent ja que suprimeixen l'expressió de gens diana dels factors de transcripció E2F a través del reclutament de Rb i proteïnes de la heterocromatina (Narita et al., 2003). Aquests focus contenen nombroses proteïnes associades a la heterocromatina com la histona 3 metilada a la lisina 9 (H3K9) i la HP1, que augmenten el grau de compactació de la cromatina i inactiven els factors de transcripció necessaris per la progressió del cicle cel·lular (Funayama and Ishikawa, 2007; Nielsen et al., 2001; Zhang and Adams, 2007). Els SAHFs també es caracteritzen per la manca de la histona 1 i per l'augment d'altres proteïnes com les HMGA (Narita et al., 2006)

Finalment s'ha descrit el fenotip secretor associat a la senescència, **SASP**, que es caracteritza per la secreció d'un gran nombre de citocines, factors de creixement i proteases que desencadenen diverses respostes biològiques tant autocrines com paracrines (Freund et al., 2010; Young and Narita, 2009).

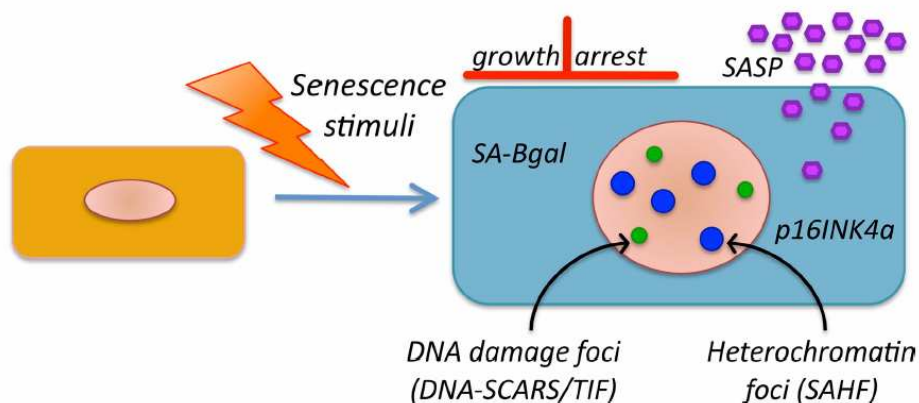


Figura 12: **Marcadors cel·lulars i moleculars** que es poden detectar en una cèl·lula que ha entrat en senescència (Rodier and Campisi, 2011)

4.5 Fenotip secretor associat a la senescència cel·lular (SASP)

Tradicionalment la senescència cel·lular s'ha descrit com una resposta estrictament intracel·lular a diversos estímuls oncogènics o d'estrés. Però recentment diversos laboratoris han descrit que les cèl·lules senescentes poden secretar diversos factors com citocines, quèmocines, factors de creixement i proteases activant el fenotip secretor associat a la senescència cel·lular, SASP (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*) (Campisi, 2005) o també anomenat secretoma senyalitzador de la senescència, SMS (*Senescence Messaging Secretome*) (Kuilman and Peeper, 2009).

Actualment existeix certa controvèrsia sobre les funcions biològiques que poden desencadenar els factors secretats per les cèl·lules senescentes. El fenotip SASP crea una xarxa de senyalització molt complexa on els factors secretats afecten no només a la pròpia cèl·lula (efectes autocrins) sinó també al microambient de les cèl·lules veïnes (efectes paracrins) de manera autònoma (Campisi, 2013). S'ha descrit que les citocines pro-inflamatòries secretades per les cèl·lules senescentes poden desencadenar diverses respostes tant beneficioses com perjudicials. Per tant és probable que els mateixos factors que contribueixin en l'activació del fenotip SASP, puguin activar mecanismes oposats, és a dir que actuïn com a supressors tumorals o com activadors pro-neoplàsics (Campisi, 2011).

Estudis recents (Acosta et al., 2008; Coppe et al., 2008; Kuilman et al., 2008; Massague, 2008; Wajapeyee et al., 2008; Young and Narita, 2009) han identificat diverses citocines involucrades en el fenotip SASP que reforcen aquesta idea. Per exemple, el gen IGFBP7 indueix la senescència cel·lular als fibroblasts humans i al melanòcits que presenten una mutació oncogènica de B-Raf (Wajapeyee et al., 2008). Per altra banda, la secreció de les interleucines IL-6 i IL-8 i la interacció amb els seus receptors és indispensable perquè les cèl·lules entrin en un estat de senescència cel·lular en resposta a un estímul oncogènic, com B-Raf o degut a la senescència replicativa. Aquesta activació de la senescència és transmesa pels factors de transcripció C/EBP β (*CCAAT/Enhancer-Binding Protein beta*) i NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) i s'associa amb l'activació d'un fenotip secretor com el SASP (Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008). A més, també s'ha identificat la secreció de la proteïna PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor 1*) necessària per la inducció de la senescència replicativa induïda per p53 en fibroblasts humans i de ratolí (Kortlever et al., 2006). Tots aquests estudis descriuen que els factors secretats actuen com a supressors tumorals activant mecanismes de senescència cel·lular, per tal d'inhibir la proliferació de les cèl·lules malignes. O també en alguns casos, els factors de SASP estimulen el sistema immunològic innat que provocarà la mort i regressió de les cèl·lules tumorals (Xue et al., 2007).

D'altra banda els mateixos factors secretats poden actuar promovent la progressió tumoral mitjançant mecanismes paracrins. Per exemple, un estudi descriu que l'expressió oncogènica de Ras a les cèl·lules epitelials preneoplàsiques d'ovari indueix l'expressió de GRO1, una citocina reconeguda per CXCR2 (Yang et al., 2006). Aquesta citocina té el potencial d'induir la senescència cel·lulars en fibroblasts d'ovari *in vitro*, però si aquests fibroblasts es co-injecten amb cèl·lules epitelials pre-neoplàsiques de ratolí, promouran el creixement tumoral d'aquestes. Un altre estudi també posa de manifest que fibroblasts senescents poden crear un microambient secretor que estimula la proliferació de cèl·lules preneoplàsiques epitelials *in vitro* i també promouen la formació de tumors *in vivo* (Krtolica et al., 2001). Coppé *et al*, han descrit que el medi condicionat de fibroblasts humans senescents indueixen la transició epiteli-mesènquimal de línies cel·lulars de càncer de mama, activant mecanismes de invasió tumoral i metàstasi (Coppe et al., 2008). Per exemple el TGF β pot activar mecanismes pro o anti-proliferatiu a les cèl·lules tumorals en funció de l'estadi de malignitat tumoral (Massague, 2008). Finalment, la secreció de IL-6 i IL-8 pot reforçar el fenotip senescent de manera autònoma o pel contrari activar la tumorigènesi de les cèl·lules veïnes mitjançant mecanismes no autònoms (Young and Narita, 2009).

En aquest projecte de tesi doctoral ens va semblar interessant estudiar el possible paper de Sprouty1 com a supressor tumoral a la tiroide. En aquest treball hem utilitzat tant models cel·lulars *in vitro* sobreexpressant Sprouty1 com també model *in vivo* utilitzant ratolins *knockout* per aquest gen.

Inicialment vam voler analitzar el paper de Sprouty1 com un possible gen supressor de tumors al Carcinoma Medul·lar de Tiroide (MTC). Per tant vam sobreexpressar Sprouty1 en una línia cel·lular derivada d'un MTC humà, la línia TT. En aquests cultius *in vitro* vam analitzar els possibles mecanismes que activa Sprouty1 per tal de regular la proliferació d'aquestes cèl·lules tumorals i actuar com un supressor de tumors. D'altra banda també vam voler analitzar els nivells d'expressió de Spry1 i les modificacions epigenètiques de mostres de MTC humanes.

Els nostres resultats ens demostren que el gen Spry1 pot ser un supressor de tumors en el Carcinoma Medul·lar de Tiroide, degut a que l'expressió de nivells moderats de Sprouty1 a les cèl·lules TT redueix la proliferació cel·lular tant *in vitro* com amb xenografts *in vivo*. A més, és interessant descriure, que la disminució de la proliferació cel·lular no és degut a una inhibició de la senyalització per Ret sinó degut a la inducció de la senescència cel·lular. Finalment, hem descrit que el promotor de Sprouty1 es troba freqüentment metilat en mostres de MTC humanes, cosa que provoca la disminució dels nivells d'expressió de Spry1 en aquest tipus de càncer.

Paralelament vam voler estudiar si la pèrdua de Sprouty1 provocava un desenvolupament tumoral a la tiroide. Per tant vam analitzar les tiroides dels ratolins *knockout* per Spry1 i també vam establir cultius de cèl·lules fol·liculars *in vitro*. Aquests experiments ens mostren que la pèrdua de Spry1 provoca un augment del tamany de la tiroide dels ratolins, a causa d'un increment de la proliferació cel·lular degut a l'evasió de la senescència cel·lular, una potent barrera per la progressió tumoral. Per altra banda hem descrit un nou mecanisme de senyalització a través de Sprouty1 a la tiroide dels ratolins. Spry1 activa la via NF- κ B, que actuarà com a regulador del fenotip secretor associat a la senescència cel·lular, doncs induirà l'expressió i secreció de IL-6 i KC, dues citocines proinflamàtores, necessàries per induir i mantenir la senescència cel·lular a la tiroide.

Finalment per tal d'analitzar si la pèrdua de Spry1 pot accelerar la progressió tumoral, vam creuar els ratolins *knockout* per Spry1 amb ratolins susceptibles al desenvolupament tumoral, com els ratolins heterozigots per Pten. L'anàlisi dels ratolins doble mutants ens va permetre determinar que l'eliminació de Spry1 promou

la incidència de tumors a la glàndula tiroide i a la glàndual adrenal si ho comparem amb els ratolins Pten +/-.

Tots aquests resultats ens han servit per demostrar la importància de Sprouy1 com a supressor tumoral a la tiroide, degut a l'activació de la senescència cel·lular.

Objectius

1. Anàlisi del paper de Sprouty1 com a gen supressor de tumors al Carcinoma Medul·lar de Tiroide (MTC).
 - 1.1. Anàlisi de les lesions derivades de cèl·lules C a la tiroide del ratolí Sprouty1^{-/-}
 - 1.2. Estudi dels mecanismes moleculars implicats en la regulació de la proliferació de les cèl·lules C per Sprouty1
 - 1.3. Estudi de les alteracions genètiques i epigenètiques de Sprouty1 en mostres de MTC humà.
2. Anàlisi del paper de Sprouty1 a la senescència cel·lular a la tiroide dels ratolins.
 - 2.1. Estudi dels marcadors de senescència cel·lular a la tiroide dels ratolins *knockout* per Sprouty1 *in vivo*.
 - 2.2. Estudi de les vies de senyalització regulades per Sprouty1 en relació a la senescència cel·lular
3. Anàlisi de la progressió tumoral dels ratolins doble mutants per Sprouty1 i Pten.
 - 3.1. Estudi de les lesions neoplàsiques a la glàndula tiroide
 - 3.2. Estudi del desenvolupament tumoral a la glàndula adrenal.

Materials i Mètodes

1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ.

Els mètodes experimentals utilitzats amb els animals de laboratori que es detallen a continuació s'han regit seguint les recomanacions recollides en les següents disposicions legals:

- Llei 5/1995, de 21 de juny, de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques.
- Decret 214/1997, de 30 de juliol, que desenvolupa l'esmentada llei.
- Reial Decret 1201/2005, de 10 d'octubre, sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques.

Tots els procediments en els que es varen utilitzar ratolins, es van realitzar sota la supervisió del personal pertinent de la nostra institució, respectant totes les disposicions legals i ètiques vigents per a la manipulació d'animals d'experimentació. A més a més, el present treball ha estat aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Lleida.

1.1 Ratolins utilitzats

1.1.1 Ratolins *knockout* per Sprouty1.

Els ratolins *knockout* per Sprouty1 utilitzats en aquest treball varen estar cedits molt amablement pel Dr M. Albert Basson. La generació d'aquests ratolins es va dur a terme mitjançant la tecnologia Cre/lox (Lewandoski et al., 1997; Rodriguez et al., 2000), a aquestes línies de ratolí s'hi havia eliminat la seqüència codificant de l'al·lel de Spry1. Tots els experiments es varen dur a terme amb ratolins que presentaven un fons genètic mixt (129/SvJ; C57BL/6). Els ratolins heterozigots per la deleció de Spry1 (Spry1^{+/-}) són viables, fèrtils i amb un fenotip aparentment normal, en canvi els ratolins *knockout* (Spry1^{-/-}) tenen problemes renals i sobreviuen fins als cinc mesos de vida (Basson et al., 2005).

1.1.2 Ratolins *knockout* per Pten.

Els ratolins *knockout* per Pten utilitzats al llarg d'aquest treball van ser generats pel laboratori del Dr R. Parson (Podsypanina et al., 1999); i van ser adquirits per la *NCI mouse repository* (<http://mouse.ncifcrf.gov/>). Aquests animals es van generar mitjançant la tècnica d'electroporació de cèl·lules mare embrionàries amb un plàsmid que conté la deleció dels exons 4 i 5 del gen de Pten; posteriorment aquestes cèl·lules

mare embrionàries van ser injectades en blastocists i implantats en femelles pseudoembarassades. D'aquesta manera es van generar animals quimèrics per Pten. Aquests animals presenten l'expressió d'una proteïna truncada per Pten, la qual ha perdut el seu domini fosfatasa (exó 5). Els ratolins *knockout* per Pten són inviàbles i moren a dia embrionari 8.5, en canvi els ratolins heterozigots per aquesta mutació (Pten^{+/-}) són viàbles, fèrtils tot i que als 6 mesos de vida presenten neoplàsies en múltiples òrgans.

1.1.3 Ratolins SCID.

Els ratolins SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) es caracteritzen per la incapacitat de poder donar una resposta immune apropiada a causa de l'absència o defectuositat dels limfòcits T i B, degut a una mutació recessiva en el cromosoma 16. A nivell funcional, aquesta mutació provoca que el sistema immunològic no maduri i aquests ratolins no poden combatre infeccions ni rebutjar tumors o trasplantaments. Aquests ratolins s'utilitzen com a model animal per l'estudi de tumors subcutanis o xenografts.

1.2 Genotipatge dels ratolins.

En primer lloc s'extreu el DNA genòmic d'una porció de teixit del extrem de la cua dels ratolins, i posteriorment es procedeix a generar les reaccions de PCR.

La deleció del al·lel de *Sprouty1* es va confirmar mitjançant el programa de genotipatge per PCR que consta de 43 cicles de 45'' a 94°C, 45'' a 55°C i 45'' a 72°C, amb un cicle final de 5 min a 72°C. Els primers utilitzats són:

P1 (*primer WT*): 5'-CTCAATAGGAGTGGACTGTGAAACTGC-3'

P2 (*primer comú*): 5'-GGGAAAACCGTGTCTAAGGAGTAGC-3'

P3 (*primer KO*): 5'-GTTCTTTGTGGCAGACACTCTTCATTC-3'

Pel que fa a la deleció del al·lel de *Pten* es va confirmar gràcies a un programa de PCR que consta de 40 cicles de 35'' a 94°C, 35'' a 55°C i 40'' a 72°C seguit d'un cicle final de 7 minuts a 72°C, amb els següents primers:

Primer 1 (WT) : 5'-TTG CAC AGT ATC CTT TTG AAG-3'

Primer 2 (comú) : 5'-GTC TCT GGT CCT TAC TTC C-3'

Primer 3 (KO): 5'-ACG AGA CTA GTG AGA CGT GC-3'

1.3 Extracció de sèrum de ratolí.

Per tal d'analitzar les hormones tiroïdals (TSH, T3 i T4) implicades en la fisiologia de la glàndula tiroide, es necessiten mostres de sèrum dels ratolins a estudiar. Mitjançant una petita punxada a la vena facial dels ratolins podem aconseguir uns 400-500µl de sang, després es centrifuga a 13000rpm durant 10 minuts i aconseguim un volum de 100-150µl de sèrum que es pot utilitzar per diversos anàlisis o guardar a -80°C. Gràcies a les mostres de sèrum vam poder analitzar els nivells de les hormones TSH, T3 i T4 de ratolins *wild-type* i *knockout* per Sprouty1 de tres mesos d'edat mitjançant un *Multiplex (MILLIPLEX MAP Rat Thyroid Hormone T3 - Endocrine Multiplex Assay #RTHY-30K-03)*.

2. CULTIUS CEL·LULARS.

2.1 Cultiu de la línia cel·lular derivada d'un MTC (línia cel·lular TT).

La línia cel·lular TT deriva d'un Carcinoma Medul·lar de Tiroide humà. Aquesta línia cel·lular la cultivem amb medi DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, GIBCO Invitrogen) suplementat amb 10% de sèrum fetal boví (FBS) inactivat, 10% d'aminoàcids no essencials (NEAA, GIBCO), 1nM Piruvat Sòdic (GIBCO) i 20ug/ml de Penicil·lina/Stretomicina (GIBCO), i es mantenen les cèl·lules a 37°C en una atmosfera humida al 5% de CO₂.

Pel manteniment d'aquesta línia es renta la placa de cèl·lules amb tampó fosfat salí (PBS), i es desenganxen les cèl·lules amb tripsina-EDTA (GIBCO) durant 3 minuts al incubador de 37°C. Després s'inactiva la tripsina amb medi que conté 10% de sèrum i tot seguit es recullen les cèl·lules i es centrifuguen a 1000rpm durant 5 minuts. Un cop centrifugades les cèl·lules es divideixen en un ratio de 1:2 o 1:4 i es sembren, ja que el temps de duplicació d'aquestes cèl·lules és molt lent, es dupliquen cada 72h.

2.2 Cultiu de la línia cel·lular HEK 293T.

Les HEK 293T, una línia cel·lular humana de ronyó embrionari, és un bon model per la sobreexpressió de proteïnes intracel·lulars, extracel·lulars, secretades o de membrana. És una variant de la línia cel·lular humana del epitelí renal 293, transformada amb el gen E1A d'adenovirus, que expressa l'antigen T de SV40. El manteniment d'aquesta línia cel·lular es realitza desenganxant les cèl·lules de forma mecànica (no és necessari l'ús de tripsina), després es centrifuguen les cèl·lules a 1000rpm durant 3 minuts i es

divideixen les cèl·lules 1:10 o 1:15, ja que el temps de duplicació és molt ràpid. Les cèl·lules s'incuben a 37°C en un atmosfera controlada del 5% de CO₂.

2.3 Cultius primaris de tiroide de ratolí.

Els ratolins d'entre 5 i 12 setmanes d'edat es sacrifiquen per dislocació cervical, s'extreuen els dos lòbuls de la tiroide i es trosseguen en petits trossets de 1mm³ aproximadament. Aquests trossets de tiroide es digereixen en un solució que conté 1mg/ml de Col·lagenasa IV (Worthington) i 1,2U/ml de Dispase II (Roche) en una solució de PBS durant 40 minuts a 37°C amb moviment d'uns 600rpm. Després es pipeteja la solució per tal de disgregar els trossets, es centrifuga a 1000rpm 5 minuts per tal que sedimentin al tub del eppendorf els fol·licles disgregats. Posteriorment es resuspenen els fol·licles amb medi complet, que conté DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, GIBCO Invitrogen) suplementat amb 10% de FBS inactivat, 10% d'aminoàcids no essencials (NEAA, GIBCO), 1nM Piruvat Sòdic (GIBCO) i 100ug/ml de Penicil·lina/Streptomicina (GIBCO), B27 (GIBCO) i 1mIU/ml de TSH (Sigma). Després les cèl·lules es planten en grups de fol·licles, per tal de mantenir al màxim l'estructura de la tiroide *in vivo*. Al cap de dos dies ja es poden estimular o deixar créixer per fer assajos de proliferació. Les cèl·lules s'incuben a 37°C en un atmosfera controlada del 5% de CO₂.

Pels assajos de proliferació les cèl·lules van estar subjectes a un sistema 3T3, és a dir, que primer es van plantar 300.000 cèl·lules en p60 (21cm²) i cada tres dies es tripsinitzaven les cèl·lules i es tornava a plantar 300.000 en plaques de p60, cada vegada que es tripsinitzen les cèl·lules es conta un passatge cel·lular.

Per a la resta d'experiments s'utilitzen les cèl·lules plantades amb fol·licles i tractades dos dies després ja que el cultiu cel·lular ja està estable. Els cultius de fol·licles *in vitro* es van deprivar amb medi sense sèrum ni TSH durant 3 hores i després es van estimular amb 50ng/ml de IL-6 (GIBCO, Ref: PMC0065) durant 10 minuts o amb IL-1 α (GIBCO, Ref: PHC0015) durant 24 hores. Després es van recollir els sobrenadants per realitzar els experiments de ELISA i *array* d'anticossos, també es van obtenir extractes proteics de les cèl·lules en cultiu. Pels experiments amb els anticossos bloquejants, els cultius de les cèl·lules fol·liculars de la tiroide es van estimular amb α IL-6 (eBioscience Ref:16-7061-85) i α IL-6R (eBioscience Ref:16-1261-85) amb medi deprivat durant 48h, després es van recollir els sobrenadants i es van obtenir extractes proteics de les cel·lules fol·liculars estimulades.

El nivells de IL-6 i KC secretats al medi de cultiu es van analitzar mitjançant un ELISA (Tebu-Bio/RayBiotech Ref:ELM-IL6-001C i Tebu-Bio/Peptotech Ref:167900-M127). Per l'anàlisi dels altres factor secretats pels cultius de les cèl·lules fol·liculars vam utilitzar un *array* d'anticossos de citocines pro-inflamatòries (CytokineG-arrayIII Tebu-Bio Ref: 126AAM-CYT-G).

3. PRODUCCIÓ DE LENTIVIRUS

3.1 Construccions plasmídiques: generació de vectors lentivirals de sobreexpressió de proteïnes.

Al laboratori hem generat un vector lentiviral per tal de sobreexpressar el gen Sprouty1 humà. El que hem fet és clonar el cDNA de Spry1 al vector lentiviral de sobre-expressió FCIV.

A l'enginyeria genètica, un vector és una molècula de DNA que pot ser utilitzada per introduir una seqüència de DNA codificant dins d'una cèl·lula. Aquest vector, dins la cèl·lula es mantindrà i es replicarà. Generalment es tracta d'un plàsmid o un genoma viral. Els plàsmids són petites molècules de DNA circular extracromosòmic que es troben a molts bacteris. Es repliquen de forma independent del cromosoma principal i poden haver-hi múltiples còpies del plàsmid en la mateixa cèl·lula. En canvi, els virus són entitats infeccioses que contenen l'àcid nucleic que codifica per la seva pròpia estructura, però no tenen la maquinària enzimàtica d'una cèl·lula. És per això que els virus es repliquen invaïent cèl·lules eucariotes .

Per generar vectors de sobreexpressió necessitem el fragment o insert de DNA que conté la seqüència del gen que volem clonar. Per tant, en primer lloc, es realitza una amplificació per PCR del insert, utilitzant els *primers* que reconeixen l'inici i el final de la seqüència que volem clonar del gen d'interès. El producte de PCR es corre amb un gel d'agarosa al 1%, on el fragment amplificat és la base del insert. Tallem la banda del fragment amplificat i s'extreu el DNA del gel d'agarosa amb un kit comercial (Qiagen).

En segon lloc s'ha d'obrir el vector lentiviral, en el nostre cas el vector FCIV, per tal de clonar-hi l'insert. Digerim el vector i l'insert amb els enzims de restricció específics que tallin a la regió MCS (*multicloning side*) del vector, així crearem extrems compatibles entre si. Un cop tenim l'insert i el vector preparats, es fa la reacció de lligació utilitzant l'enzim T4 Lligasa (Roche), utilitzem una concentració molar 1:3 de plàsmid respecte a l'insert. Finalment es transforma 1/5 part de la reacció de lligació amb la soca

bacteriana *E. Coli Stbl3*, que són bacteris competents que incorporen el vector clonat gràcies a un protocol de xoc tèrmic.

Un cop transformada la lligació, els bacteris es planten amb plaques d'agar que contenen l'antibiòtic específic del vector subclonat, en el nostre cas ampicil·lina, i es deixen O/N (*overnight*) a una estufa a 37°C. Per últim, es preparen cultius bacterians de les colònies crescudes al agar i s'extreu el DNA mitjançant uns kits comercials de minipreps (Sigma). El DNA obtingut es digereix amb uns enzims de restricció específic que tallin tant a l'insert com al vector per tal de fer un anàlisi de les colònies crescudes. Finalment i gràcies a l'anàlisi de restricció podem escollir quines colònies han internalitzat el vector amb l'insert i descartar aquelles que han internalitzat el vector buit.

3.2 Transducció lentiviral.

Els vectors lentivirals permeten la integració de DNA plasmídic al genoma de les cèl·lules que infecten, per tant presenten l'avantatge d'aconseguir una expressió mantinguda al llarg del temps i que aquesta es transmeti a la descendència.

3.2.1 Transfecció i producció de lentivirus a la línia cel·lular HEK293T.

Les partícules lentivirals varen ser produïdes gràcies a la línia cel·lular HEK293T, mitjançant la co-transfecció amb la tècnica de fosfat càlcic. La **transfecció amb Fosfat Càlcic** és un mètode econòmic, senzill i molt utilitzat per la incorporació de material genètic de forma eficient a les línies cel·lulars, com les 293T. Es basa en la formació de precipitats insolubles de sals de calci que atrapen el DNA i el dipositen a la superfície de les cèl·lules. Aquestes desencadenen un procés d'endocitosi per tal d'incorporar el material genètic i alliberar-lo dins de les cèl·lules en cultiu. És una tècnica poc utilitzada en cultius primaris, degut a la gran toxicitat cap a les cèl·lules, però és molt efectiva en altres línies cel·lular, com és el cas de les 293T.

Per realitzar aquesta tècnica de transfecció s'utilitza dos solucions, la primera conté el DNA plasmídic, aigua i CaCl_2 250mM i la segona solució és un *buffer* BBS a pH 7 (concentració 2X), el qual es tira gota a gota sobre la primera solució. El pH del *buffer* BBS és un paràmetre crític en l'èxit d'aquest protocol.

Es transfecta un total de 30ug de DNA per placa p100 (75cm²), que corresponen als tres vectors plasmídics en proporció 1:1:1. El primer vector utilitzat és el vector lentiviral que conté la seqüència de DNA a transferir a les cèl·lules diana, el segon vector conté totes les proteïnes necessàries per l'empaquetament del virus, en el

nostre cas hem utilitzat el vector psPAX2 i el tercer vector conté totes les seqüències que codifiquen per l'embolcall del virus, on hem utilitzat el plàsmid PMD2G.

Els vectors lentivirals utilitzats han estat: el vector de sobreexpressió FCIV que conté el cDNA de Sprouty1 i vectors lentivirals per l'expressió de shRNA, el vector FSV, que conté la seqüència de shRNA pel receptor Ret (Gallel et al., 2008) i per les proteïnes IKK α i IKK β (Dolcet et al., 2006)

Un dia després de la transfecció es canvia el medi de les cèl·lules amb medi complet i es deixen incubant durant 2-3 dies més, perquè les cèl·lules 293T tinguin temps de produir les partícules víriques i les secretin al medi de cultiu. A continuació es recullen els sobrenadants de les plaques, on s'hi troben les partícules víriques, es filtren amb filtres de 0,45 μ m i finalment s'apliquen directament a les cèl·lules que es volen infectar.

3.2.2 Transducció de la línia cel·lular TT i dels cultius primaris de tiroide.

Un cop plantades les cèl·lules i deixades almenys 24h a l'incubador, perquè s'enganxin bé a la placa i s'estabilitzin totes les condicions fisiològiques, s'hi afegeix el sobrenadant filtrat que conté les partícules virals. Les cèl·lules es deixen en contacte amb el virus durant 18-20 hores i posteriorment es canvia el medi amb medi complet. Al cap de 2 o 3 dies ja tenim la transducció lentiviral estable i per tant podem seguir amb els anàlisis de proliferació i apoptosi o realitzar tècniques de immunodetecció.

4. ASSAJOS DE PROLIFERACIÓ *IN VITRO*.

4.1 Recompte cel·lular.

Pels assajos de proliferació de les cèl·lules TT es va plantar 10.000 cèl·lules en pous d'una placa "multi-well" de 96 pous (M96 (0.32cm²)) i es van contar el nombre de cèl·lules al llarg dels dies indicats. Es van realitzar almenys triplicats per cada temps i l'experiment es va repetir com a mínim tres vegades.

Pel que fa a les tiroïdes en cultiu es va dur terme un sistema 3T3, que consisteix en plantar 300.000 en plaques p60 (21cm²) i deixar créixer les cèl·lules durant 3 dies, llavors tripsinitzar les cèl·lules i tornar a plantar 300.000 en una placa del mateix tamany i deixar-les tres dies més. Cada vegada que es tripsinitza es considera un passatge de les cèl·lules.

4.2 Assaig d'incorporació de Bromodeoxyuridina.

La Bromodeoxyuridina (BrdU o 5-bromo-2'-deoxyuridine) és un nucleòtid sintètic anàleg a la timidina. La BrdU és un compost que s'utilitza de forma molt comú a l'hora de detectar cèl·lules que proliferen. La BrdU té la capacitat d'incorporar-se al DNA i substituir un nucleòtid de timidina a les noves cadenes de DNA sintetitzades per les cèl·lules que repliquen. El fenomen de replicació s'efectua durant la fase S del cicle cel·lular.

Per fer aquest assaig d'incorporació és necessari que hi hagi la BrdU al medi de cultiu de les cèl·lules que volem analitzar. Així doncs, en el cas de la línia cel·lular TT afegim la BrdU a una concentració final de 4 µg/ml durant 2 hores, mentre que en el cas dels cultius primaris de tiroide, afegim la BrdU a la mateixa concentració però durant 4 hores.

Un cop transcorregut el temps necessari perquè s'incorpori la BrdU a les cèl·lules, les fixem amb una solució que conté 4% de paraformaldehid (PFA) fred durant 20 minuts a temperatura ambient. Tot seguit fem tres rentats amb solució salina (PBS) i afegim HCl 2M durant 30 minuts a 37°C, perquè el DNA de les cèl·lules es desnaturalitzi i l'anticòs primari sigui capaç de reconèixer la BrdU incorporada. Transcorreguts els 30 minuts afegim Tetraborat Sòdic 0,1M durant 2 minuts al pou, per tal de neutralitzar el HCl. Tot seguit tornem a fer 3 rentats amb PBS i afegim la solució de bloqueig, que conté PBS + 5% *Horse Serum* (HS) + 5% *Fetal Bovine Serum* (FBS) + 0.2% glicina + 0.1% Tritó (TX-100), durant 1 hora a temperatura ambient. Després rentem 3 cops amb PBS, i incubem les cèl·lules amb l'anticòs primari durant 18 hores a 4°C. L'endemà rentem els pous tres cops amb PBS i afegim l'anticòs secundari, en el nostre cas és un anticòs conjugant a un fluorocrom Dylight594 (Jackson), i també s'afegeix 0,5 µg/ml de Hoechst 33258 durant 1 hora a temperatura ambient. Després es renten els pous tres cops més amb PBS i s'analitzen i es compten el nombre de cèl·lules positives per BrdU mitjançant un microscopi òptic de fluorescència.

4.3 Assaig clonogènic.

Per realitzar els assajos de colònies, es van plantar les cèl·lules TT en una densitat clonal de 420 cèl·lules/cm² amb plaques de 6 pous (M6 (9,5cm²)) i es va plantar cada condició a analitzar per triplicat. Al cap de 10 dies en cultiu les colònies ja s'han format, s'incuben les cèl·lules amb 0,5mg/ml del reactiu MTT entre 45 minuts i 1 hora al incubador de cultius. Després es fixen les cèl·lules amb formol durant 10 minuts i es renten amb PBS.

4.4 Recompte de mort apoptòtica per tinció de Hoechst.

El reactiu Hoechst 33258 o Bisbenzimidazó és un compost fluorescent que s'uneix al DNA i es visualitza al microscopi òptic de fluorescència. Pot tenyir tant cèl·lules vives com fixades, ja que la seva estructura molecular pot travessar la membrana plasmàtica de les cèl·lules intactes.

Pel recompte de la mort apoptòtica es plantes les cèl·lules TT i s'estabilitza el cultiu durant dos dies, després es fixa amb PFA al 4% durant 15 minuts, es fan tres rentats amb PBS i es tenyeixen les cèl·lules amb 0,5 µg/ml de colorant Hoechst durant 30 minuts a temperatura ambient. Per comptabilitzar la mort apoptòtica, es consideren positives aquelles cèl·lules que presenten condensació de la cromatina nuclear o aquells nuclis que formen petits orgànuls anomenats nuclis apoptòtics.

5. TUMORS SUBCUTANIS EN RATOLINS SCID.

Per l'estudi de la proliferació dels tumors subcutanis o xenògrafs *in vivo* es van utilitzar ratolins SCID femella d'aproximadament 8 setmanes d'edat i un pes comprès entre els 15 i 20 grams. Els animals van ser alimentats *ad libitum*. En primer lloc es va injectar subcutàniament al costat dret de l'esquena dels ratolins SCID, 10^7 cèl·lules de les dues línies cel·lulars TT creades (Vector vs Spry1A). El creixement tumoral es va mesurar cada setmana mitjançant un peu de rei digital, fins que el tumor va adquirir un tamany màxim de 2,5cm³. El volum tumoral es va calcular d'acord amb la fórmula TV (*Tumor Volume*): $d^2 \times D / 2$, on la lletra d equival al diàmetre més curt i la lletra D al més llarg.

6. PCR EN TEMPS REAL: RT-PCR.

6.1 Extracció de RNA.

L'extracció del RNA es realitza mitjançant el *kit* comercial *RNAeasy mini kit* (Qiagen) acoblat a la digestió amb DNasa I, que elimina tot el DNA genòmic contaminant que pugui restar en la mostra i que pot donar una senyal falsa durant la RT-PCR.

En el cas dels cultius cel·lulars, el *buffer* d'extracció de RNA s'aplica directament a les cèl·lules, en canvi en el cas dels òrgans primer s'esmicola el teixit mitjançant l'aplicació de Nitrogen Líquid i la pressió del teixit amb un morter, després s'afegeix el *buffer* de lisi. Els extractes de RNA es guarden a -80°C i es quantifica la concentració de RNA obtinguda amb el NanoDrop® ND-1000.

6.2 Síntesi de cDNA.

Per la síntesi de cDNA s'utilitza el màxim de µg de RNA de la mostra i es realitza el protocol descrit pel *kit* Taqman® (Applied Biosystems). Les condicions de la reacció de retro-transcripció són: 2min a 90°C (només el RNA), 10min a 25°C, 60min a 42°C i 5min 95°C. Un cop sintetitzat el cDNA es pot utilitzar directament per la tècnica de PCR en temps real (RT-PCR).

6.3 RT-PCR.

La tècnica de PCR en temps real utilitza una sonda específica per a cada gen a analitzar. Aquesta sonda està marcada amb un fluorocrom (normalment FAM) que el termociclador *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) llegeix i quantifica. El programa que utilitzem consta de 40 cicles de 15'' a 95°C i 1 minut a 60°C. Les sondes que es detallen a la Taula 4 van ser adquirides a *Applied Biosystems*. El gen de la GAPDH, tant humà com de ratolí, va ser utilitzat com a control d'expressió de les mostres analitzades.

Gen	Espècie	Nº Catàleg
Sprouty1	humà	Hs00398096_m1
Sprouty1	humà	Hs01083036_s1
Sprouty1	humà	HSPRY1CDS
Wnt11	humà	Hs00182986_m1
Calcitonina	humà	Hs01100741_m1
p14ARF	humà	Hs00924091_m1
p15INK4b	humà	Hs00793225_m1
p16INK4a	humà	Hs02902543_m1
p21CIP/WAF1	humà	Hs00355782_m1
p27KIP	humà	Hs001532277_m1
GAPDH	humà	Hs99999905_m1
Sprouty1	ratolí	Mm01285700_m1
p16INK4a	ratolí	MMP16INK
p19ARF	ratolí	Mm01257348_m1
Pten	ratolí	Mm004772308_m1
IL-6	ratolí	Mm00446190_m1
GAPDH	ratolí	Mm99999915_g1

Taula 4: Sondes utilitzades per realitzar RT-PCR obtingudes de *Applied Biosystems*.

Un cop finalitzat el protocol de PCR, els resultats ens mostren a quin cicles de PCR comença el creixement exponencial de síntesi de la mostra analitzada, és a dir la Ct (*Cycle Threshold*). Per tant, com més petita sigui la Ct d'un gen analitzat més quantitat de mRNA s'ha amplificat i per tant més nivells d'expressió d'aquest gen hi ha a la mostra. La quantitat relativa de mRNA de cada gen es calcula de la següent manera: $\Delta Ct = Ct \text{ del gen diana} - Ct \text{ del gen GAPDH}$. Després es calcula la $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ mostra} - \Delta Ct \text{ control}$, on el control serà els nivells relatius iguals a 1. A partir d'aquests càlculs els nivells relatius de mRNA en comparació al control és $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$. Amb aquests valors es calcula el valor promig de cada mostra per triplicat i els errors estàndards.

7. IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES

7.1 Immunoprecipitació i Western Blot.

7.1.1 Extracció de proteïna.

Després de cada tractament, les cèl·lules es renten amb tampó fosfat (PBS 1x) fred, abans de processar la mostra. L'extracció de proteïna s'ha de realitzar de forma ràpida i eficient per evitar degradacions i perquè l'extracció representi l'estat fisiològic de les proteïnes. En el cas de l'extracció proteica de la tiroide, primer s'extreu la glàndula del ratolí es neteja acuradament i es congela ràpidament amb nitrogen líquid, després mitjançant un morter s'esmicola i s'hi aplica el *buffer* d'extracció proteica.

L'extracció proteica pot realitzar-se mitjançant una solució desnaturalitzant o amb una solució que manté les propietats naturals de les proteïnes. En el primer cas s'utilitza un tampó d'extracció que conté Tris-HCl 62,5mM (pH 6,8) amb 2% de SDS. En el segon cas s'utilitza un *buffer* NP-40 que conté 1% d'un detergent no iònic Nonidet P-40, 150mM NaCl, 50mM Tris pH8, 1mM EDTA, 1mM EGTA, complementat amb un còctel d'inhibidors de proteases (Roche), 1mM d'Ortovanadat Sòdic (NaVO_4), 10mM Florur de Sodi (NaF) i 50mM de β -glicerofosfat.

7.1.2 Immunoprecipitació.

Pel assajos d'immunoprecipitació és necessari mantenir les propietats naturals de les proteïnes, per tant utilitzarem extractes proteics amb el *buffer* NP-40. Normalment s'utilitza entre 100-300 μg d'extracte proteic que s'incuba amb l'anticòs primari contra la proteïna que volem precipitar, juntament amb boles magnètiques unides a proteïna A i/o G (Invitrogen) durant 2 hores o tota la nit (ON) a 4°C en rotació. Posteriorment es renten els immunocomplexes formats amb *buffer* NP-40 fresc, després es resuspenen

amb *buffer* de Laemmli (LB) i finalment es bullen durant 5 minuts a 95°C pel posterior anàlisi per Western Blot.

7.1.3 Western Blot.

Un cop tenim els extractes proteics, aquests es resolen mitjançant electroforesi amb gels de poli-acrilamida amb SDS. Aquests gels s'utilitzen per a separar barreges proteiques complexes segons el seu pes molecular. Es preparen a partir de la solució ACRYL/BIS™, que conté un 39% d'acrilamida amb un 1% de bis-acrilamida. La reacció de polimerització es realitza amb 0,1% de TEMED (Sigma) com a iniciador de la reacció i amb persulfat d'amoni (Sigma S208) al 0,05% com a catalitzador. Els gels estan formats bàsicament per dos parts; la part superior (o gel apilador) on es carreguen les mostres i s'utilitza un percentatge baix d'acrilamida (5%) i la part inferior (o gel separador) on el percentatge d'acrilamida dependrà del pes molecular de les proteïnes que volem separar. Les mostres ja quantificades, mitjançant el *kit* de Lowry (Bio-Rad), es preparen afegint tampó de càrrega 5x, compost per 10% SDS, 250 mM Tris pH 6,8, 50% glicerol, 720nM de β-mercaptoetanol i blau de bromofenol. L'electroforesi es migra a voltatge constant (150 V) amb un tampó de migració que conté 25mM Tris, 1,44% glicina i 0,1% SDS.

Un cop les proteïnes estan separades es realitza l'electro-transferència d'aquestes a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore), gràcies a una solució de transferència composta per 25 mM Tris, 192 mM glicina a pH8,3 i es transfereix a voltatge constant (90-100V) durant 1 hora. Un cop es finalitza la transferència, la membrana s'incuba amb solució de bloqueig, que conté TBST (20 mM Tris a pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) amb 5% d'albúmina de sèrum boví (BSA) durant una hora a temperatura ambient, per tal d'eliminar les hibridacions inespecífiques.

A continuació s'incuben les membranes amb els anticossos primaris indicats a cada experiment (Taula 5) amb una solució de TBST al 1% de BSA amb 0,02% d'Azida sòdica, tota la nit (ON) a 4°C, tot i que en alguns casos també es pot realitzar durant 1 hora a temperatura ambient.

Tot seguit la membrana es renta 3 vegades (3x 10 minuts) amb TBST i s'incuba amb l'anticòs secundari (Taula 5) en una solució de TBST que conté 1% de BSA durant 1 hora a temperatura ambient. Finalment la membrana es renta 3 vegades (3x 10 minuts) amb TBST.

Antigen	Dilució	Proveïdor	Nº Catàleg
Anticossos primaris			
Ret9	1/500	Santa Cruz	sc-167-G (C-19G)
Ret51	1/500	Santa Cruz	sc-1290 (C-20G)
p-ERK1/2	1/3000	Cell signaling	9101S
Tubulin	1/10000	Sigma	T5168
p-Tirosina	1/1000	Millipore	4G10
p14ARF	1/1000	Sigma	P2610
p15INK4b	1/1000	Santa Cruz	sc-612 (C-20)
p16INK4a	1/1000	Cell signaling	4824
p21CIP/WAF1	1/1000	Millipore	05-453
p27KIP	1/1000	BD Biosciences	61041
p19ARF	1/1000	Abcam	ab80
p-AKT	1/1000	Cell signaling	9271
pPLC γ	1/1000	Cell signaling	2821
pSrc	1/1000	Cell signaling	2101
Pten	1/1000	Cell signaling	9559
IKBa	1/1000	Santa Cruz	sc-371 (C-21)
β -actina	1/5000	Santa Cruz	sc-1616 (I-19)
p-STAT3	1/1000	Millipore	04-1059
STAT3	1/1000	Santa Cruz	sc-482 (C-20)
IKK α	1/1000	Calbiochem	14A231
IKK β	1/1000	Calbiochem	OP134
Anticossos secundaris			
Rabbit IgG-HRP	1/10000	Jackson	111-035-003
Mouse IgG-HRP	1/10000	Jackson	115-035-003
Goat IgG-HRP	1/10000	Jackson	705-035-147

Taula 5: Anticossos primaris i secundaris utilitzats als assajos de Western Blot.

L'anticòs secundari està conjugat a una peroxidasa (HRP), i per detectar-la utilitzem uns reactius comercials que associen la catàlisi de l'aigua oxigenada a l'oxidació del luminol, donant lloc a un increment de la quimioluminescència. Els reactius utilitzats per revelar la senyal són *EZ-ECL* (Biological Industries) o *ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit* (Amersham Biosciences) si tenim molta o poca senyal quimioluminiscent respectivament. La membrana s'analitza amb el *VersaDoc Imaging system Model 4000* (BioRad Laboratories).

7.2 HISTOLOGIA I TINCIONS D'IMMUNOLOGIA.

7.2.1 Histologia bàsica.

Els òrgans dels ratolins s'extreuen del animal i immediatament es fixen amb paraformaldehid al 4% en PBS (pH7-7,4) durant 2 hores a 4°C. Posteriorment, depenent de la tècnica histològica que volem emprar, es poden realitzar dos protocols diferents. Per fer protocols d'Immunohistoquímica, els teixits s'inclouen en parafina i posteriorment es fan seccions de 5µm amb un micròtom per tal de fer tincions d'Hematoxilina-Eosina (H-E) a fi d'estudiar la histologia de cada teixit o tincions d'antigens específics per l'anàlisi de marcadors proteics. En canvi per realitzar protocols d'Immunofluorescència, els teixits fixats es submergeixen en una solució de PBS amb 40% de sucrosa tota la nit a 4°C, per tal de crioprotegir el teixit. Posteriorment s'inclou el teixit en OCT per congelar el material a -80°C i poder fer seccions de 5µm amb un criostat.

7.2.2 Immunohistoquímica.

Abans de començar el procés, els talls de 5µm de parafina es posen a assecar a una estufa de 65°C durant 1h, després es realitza un pretractament de desparafinació i rehidratació del teixit. Posteriorment es submergeixen els portaobjectes en un *buffer* que conté 50x Tris/EDTA a pH 9 a 95°C durant 20minuts, utilitzant un aparell de pretractament PTLINK (DAKO), per tal de recuperar els antigens emmascarats durant la preparació dels teixits per a la tinció (*epitope retrieval*). Abans de la tinció, els talls de parafina s'incuben amb 0.3% de H₂O₂ per bloquejar la peroxidasa endògena i disminuir el fons (*Background*) quan utilitzem el cromogen. Després es fan tres rentats amb PBS i ja podem aplicar l'anticòs primaris (Taula 6) durant 20-30 minuts a temperatura ambient. Posteriorment a la incubació es fan tres rentats amb PBS i s'aplica l'anticòs secundari. Si s'utilitza directament l'anticòs secundari unit a la peroxidasa (HRP) s'incuba durant 30 minuts, en canvi si s'utilitza un sistema d'amplificació de la senyal, s'incuba primer l'anticòs unit a biotina durant 30 minuts, després es fan tres rentats amb PBS i s'incuba el teixit amb Streptavidina unida a peroxidasa (HRP) durant 15 minuts, tot a temperatura ambient. Finalment per tal de visualitzar la reacció s'aplica el cromogen de diaminobenzidina (DAB) i es contra tenyeix amb Hematoxilina per marcar els nuclis de les cèl·lules del teixit analitzat.

Antigen	Dilució	Proveïdor	Nº Catàleg
<i>Anticossos primaris</i>			
Calcitonina	1/1000	Dako	IR515
p16INK4a	1/100	MTM labs	9511
Ki-67	1/250	Dako	M7249
p-ERK	1/100	Cell Signaling	43765 (20G11)
p-AKT	1/100	Cell Signaling	4060S (D9E)
TH	1/100	Millipore	Ab1542
<i>Anticossos secundaris</i>			
Sheep IgG-HRP	1/200	Sigma	A3415
Rabbit anti-biotina	1/200	Jackson	111-065-144
Rat anti-biotina	1/200	Jackson	712-065-150
Streptavidina-HRP	1/400	Jackson	016-030-084

Taula 6: Anticossos primaris i secundaris utilitzats en assajos d'Immunohistoquímica.

7.2.3 Immunofluorescència.

La tècnica d'immunofluorescència l'hem realitzat tant en cèl·lules en cultiu fixades com amb talls congelats de criostat. En primer lloc es fan tres rentats amb PBS i en el cas de la detecció de p65 i Ki-67 s'incuba amb metanol 100% fred durant 10 minuts, per tal de millorar la detecció nuclear.

Abans d'aplicar l'anticòs primari, cal incubar les cèl·lules o el tall del teixit amb solució de bloqueig, que conté PBS amb 5% HS i 0,2% de Tritó X-100 durant 1 hora a temperatura ambient. Durant el procés de bloqueig es donen dos processos, per una banda el Tritó provoca la permeabilització de les membranes de les cèl·lules, fet que permetrà l'accés dels anticossos i la unió als seus antígens específics i per l'altra, gràcies al sèrum de cavall (HS) es bloqueigen els llocs d'unio inespecífics.

L'anticòs primari (Taula 7) s'incuba tota la nit a 4°C. Després de tres rentats amb PBS s'incuba amb l'anticòs secundari unit al fluorocrom (Taula 7) i també s'afegeix el Hoeschst 33258 durant 2 hores a temperatura ambient. En acabar es fan tres rentats de 10 minuts amb PBS i ja es poden observar i analitzar les mostres al microscopi òptic invertit d'epifluorescència Olympus 1X70 o bé al microscopi Confocal Olympus FV-1000.

Antigen	Dilució	proveïdor	Nº Catàleg
Anticossos primaris			
Sprouty1	1/100	Sigma	WH001025
Sprouty1	1/100	Invitrogen	40-1800
Sprouty1	1/100	Abcam	Ab575492
Sprouty1	1/100	Santa Cruz	sc30048
β-galactosidasa	1/100	Abcam	ab9361
Calcitonina	1/1000	Dako	A0576
BrdU	1/100	Dako	M0744
p65	1/200	Santa Cruz	sc-372 (C-20)
KI-67	1/100	Dako	M7249
Anticossos secundaris			
Mouse IgG Dylight488	1/500	Jackson	715-485-150
Rabbit IgG Dylight488	1/500	Jackson	711-485-152
Chicken IgG Dylight488	1/500	Jackson	103-485-155
Mouse IgG Dylight594	1/500	Jackson	715-515-150
Rabbit IgG Dylight594	1/500	Jackson	711-515-152
Rat IgG Dylight594	1/500	Jackson	712-515-150

Taula 7: Anticossos primaris i secundaris utilitzats en assajos d'Immunofluorescència.

8. ANÀLISI MORFOMÈTRIC.

8.1 Anàlisi del tamany de la tiroide.

Per analitzar el volum lobular de les tiroides dels ratolins de 3 mesos, vam utilitzar la fórmula el·lipsoide (Shabana et al., 2006). Per poder operar amb aquesta fórmula es necessiten tres distàncies: la distància més llarga de la glàndula (H), que entre els dos vèrtexs de la tiroide, la distància més curta (W), entre esquerra i dreta de la glàndula i per últim la profunditat de la tiroide (D), que és la distància entre una cara i l'altra de la glàndula. Un cop analitzades les tiroides i fetes les mesures s'aplica la fórmula $LB(mm^3) = H \times W \times D \times \pi/6$ i es determina el volum lobular de cada tiroide.

8.2 Tamany dels fol·licles de la tiroide.

Per analitzar el nombre i el tamany dels fol·licles de les tiroides vam analitzar talls de parafina tenyits amb Hematoxilina-Eosina de cinc tiroides de ratolins de 3 mesos d'edat dels dos genotips analitzats (Spry1^{+/+} i Spry1^{-/-}). Mitjançant el programa *Cell*

Profiler Software (Carpenter et al., 2006), vam poder fer un anàlisi morfomètric dels fol·licles de les tiroides.

9. ACTIVITAT B-GALACTOSIDASA (SA- B-GAL).

Per tal d'analitzar l'activitat β -galactosidasa associada a la senescència cel·lular vam utilitzar tant cèl·lules en cultiu com talls de criostat fixats o amb un *buffer* de PBS amb 0.5% de glutaraldehid o PFA al 4%, respectivament. En primer lloc, tant les cèl·lules com les seccions de criostat s'incuben amb un *buffer* de PBS amb 2mM de $MgCl_2$ durant 10 minuts i posteriorment s'incuben amb la solució X-gal, composta per 20mg/ml X-Gal (Sigma), 5mM $K_3Fe(CN)_6$, 5mM $K_4Fe(CN)_6$, i 2mM $MgCl_2$ en un *buffer* de PBS a pH6. La incubació es dur a terme almenys 2 hores dins d'una estufa a 37°C on es va comprovant la tinció, ja que les cèl·lules adopten un color verd turquesa molt característic quan són senescents. És molt important realitzar aquesta tinció a pH6 o inclús a pH5, ja que l'activitat β -galactosidasa dels lisosomes només és activa a pH àcid. Per tal de poder comparar les mostres analitzades, l'assaig es va dur a terme amb totes les mostres simultàniament.

10. ANÀLISI DE LA METILACIÓ DEL DNA GENÒMIC.

Vam voler analitzar el grau de metilació de la regió promotora del gen *Sprouty1*. El DNA genòmic dels MTC analitzats va ser cedit molt amablement pel grup de la Dr M. Robledo del centre CNIO de Madrid. Per fer l'anàlisi de metilació s'ha de modificar el DNA amb bisulfit sòdic per diferenciar les citosines metilades de les no metilades, per fer-ho vam seguir les instruccions del *kit MethylCode Bisulfite conversion kit* (Invitrogen). Aquesta modificació del DNA està basada en la diferència de sensibilitat de la citosina i la 5'-metilcitosina (la citosina metilada) a la desaminació pel bisulfit sòdic en condicions àcides. Durant aquest procés la citosina no metilada es converteix en uracil, mentre que la 5'-metilcitosina no reacciona, mantenint-se com a citosina a la cadena de DNA.

Després del procés de bisulfitació, s'amplifica per PCR la regió promotora del gen *Sprouty1* que conté un altra freqüència de llocs CpG. Per tant es van dissenyar uns *primers* utilitzant el programa *Methprimer* (Li and Dahiya, 2002), que s'uneixen específicament a seqüències modificades pel *kit* de bisulfitació, independentment del seu estat de metilació. La posterior amplificació per PCR fa que l'uracil, generat en el procés de bisulfitació i que correspon a les citosines no metilades, passi a timina, mentre que la citosina, que estava metilada, queda intacta.

Els *primers* utilitzats són:

- *primers* DNA Metilat (Meth) → 'M2Fw': 5'-GTTGTTGTTTCGAGTTAGGATTC-3' i 'M2Rev': 5'-AAAAAAAACCCTATCCTATTACGTT-3'
- *primers* DNA no Metilat (Unmeth) → 'U2Fw': 5'- TTGTTGTTTGAGTTAGGATTTG-3' i 'U Rev': 5'- AAAAAAACCCTATCCTATTACATT-3'.

Les condicions d'amplificació del producte de PCR consta de 40 cicles de 30'' a 94°C, 30'' a 55°C i 30'' a 72°C seguit d'un cicle final de 10 minuts a 72°C. Els productes de PCR es van córrer en un gel d'agarosa.

Resultats

1. SPROUTY1 S'EXPRESSA A LA GLÀNDULA TIROIDE DE RATOLÍ.

Inicialment, per tal d'estudiar el paper que desenvolupa Sprouty1 a la glàndula tiroide vam voler determinar si aquest s'hi s'expressava. Mitjançant RT-PCR en temps real vàrem analitzar diferents teixits de ratolins recent nascuts utilitzant la sonda contra Sprouty1 i normalitzant els resultats amb l'expressió de GAPDH. Tal i com s'observa a la Figura 13, els nivells relatius de mRNA a la tiroide de ratolins són més elevats si els comparem amb altres òrgans on s'ha descrit que l'expressió de Spry1 és elevada, tals com el cor o els pulmons, en canvi són més baixos que els observats en el ronyó, on Spry1 hi presenta un rol específic i característic. Per tal de determinar si l'expressió de Spry1 persisteix a la tiroide durant la vida adulta, vàrem voler analitzar els nivells de Spry1 de diferents teixits de ratolins d'un mes de vida. Observem alts nivells de mRNA de Spry1 a la tiroide dels ratolins d'un mes, semblants als que s'observen als pulmons, suggerint que aquesta proteïna pot jugar un paper important durant la vida adulta dels ratolins.

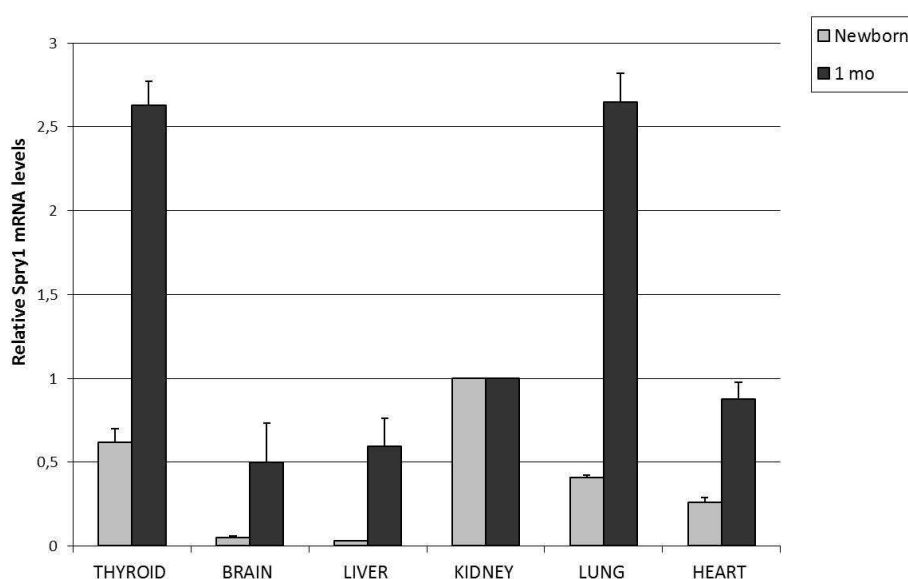


Figura 13: **Sprouty1 s'expressa a la glàndula tiroide.** Anàlisi dels nivells de Sprouty1 mitjançant PCR en temps real (RT-PCR) de diferents òrgans de ratolins recent nascuts (newborn) i d'un mes d'edat (1 mo).

La tiroide dels ratolins presenta unes característiques estructurals i fisiològiques molt semblants a les que podem observar a les tiroïdes humanes. Com ja s'ha explicat anteriorment, aquestes presenten dos tipus cel·lulars principals: les cèl·lules fol·liculars, les majoritàries i disposades en fol·licles secretant les hormones tiroïdals i les cèl·lules parafol·liculars o cèl·lules C, que es troben disperses entre els fol·licles, i que secreten la hormona calcitonina. Les cèl·lules C es desenvolupen a partir dels

cossos ultimobranquials (UB) mentre que les cèl·lules fol·liculars deriven d'un diverticle de la regió endodèrmica que desenvoluparà la faringe.

Per tal de determinar si l'expressió de Sprouty1 és al conjunt de tota la tiroide o si s'expressava de forma més concreta en algun tipus cel·lular, vàrem voler analitzar la seva expressió específica al conjunt de les cèl·lules C. En primer lloc vam analitzar l'expressió de Spry1 als precursors embrionaris de les cèl·lules C. Mitjançant la tècnica de la hibridació *in situ* sobre seccions de parafina de ratolins de 10,5 dies d'edat embrionària (E10,5), vam poder analitzar el patró d'expressió de Sprouty1 en els embrions de ratolí. Com es mostra a la Figura 14, l'expressió de Sprouty1 es detecta a la quarta (4th) bossa faríngia del embrió de ratolí, a partir de la qual es desenvoluparan els cossos ultimobranquials, precursors de les cèl·lules parafol·liculars, és a dir, que Spry1 s'expressa als precursors de les cèl·lules C.

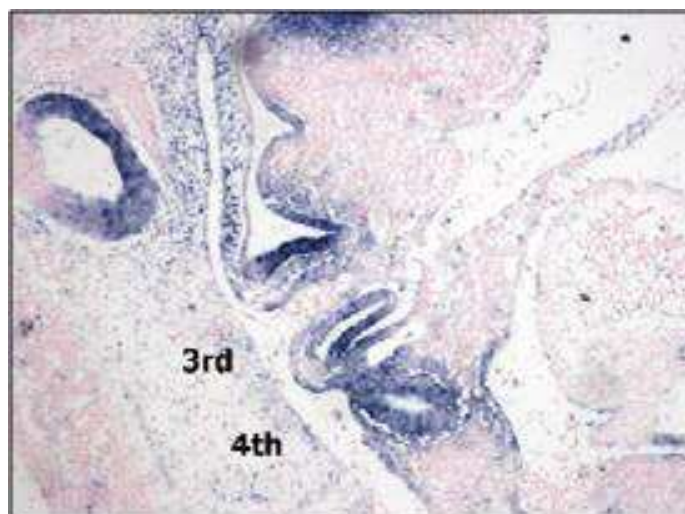


Figura 14: **Spry1 s'expressa als precursors de les cèl·lules C de ratolí.** Hibridació *in situ* de seccions d'embrions de ratolí de E10.5, on s'observa l'expressió de Spry1 a la quarta bossa faríngia (4th), d'on s'originen les cèl·lules C de la tiroide.

En segon lloc vam voler analitzar l'expressió de Sprouty1 a les cèl·lules C de la tiroide d'un ratolí adult, a fi de determinar si aquesta expressió s'hi manté. Inicialment, vàrem provar diversos anticossos comercials disponibles contra Spry1 utilitzant fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs, *Mouse Embryonic Fibroblast*) provinents d'animals *wild-type* i *knockout* de Spry1. Malauradament cap dels anticossos comercials utilitzats van presentar un patró específic de detecció mitjançant tècniques d'immunofluorescència, ja que s'observa un marcatge positiu als MEFs *knockout* de Spry1 (Figura 15).

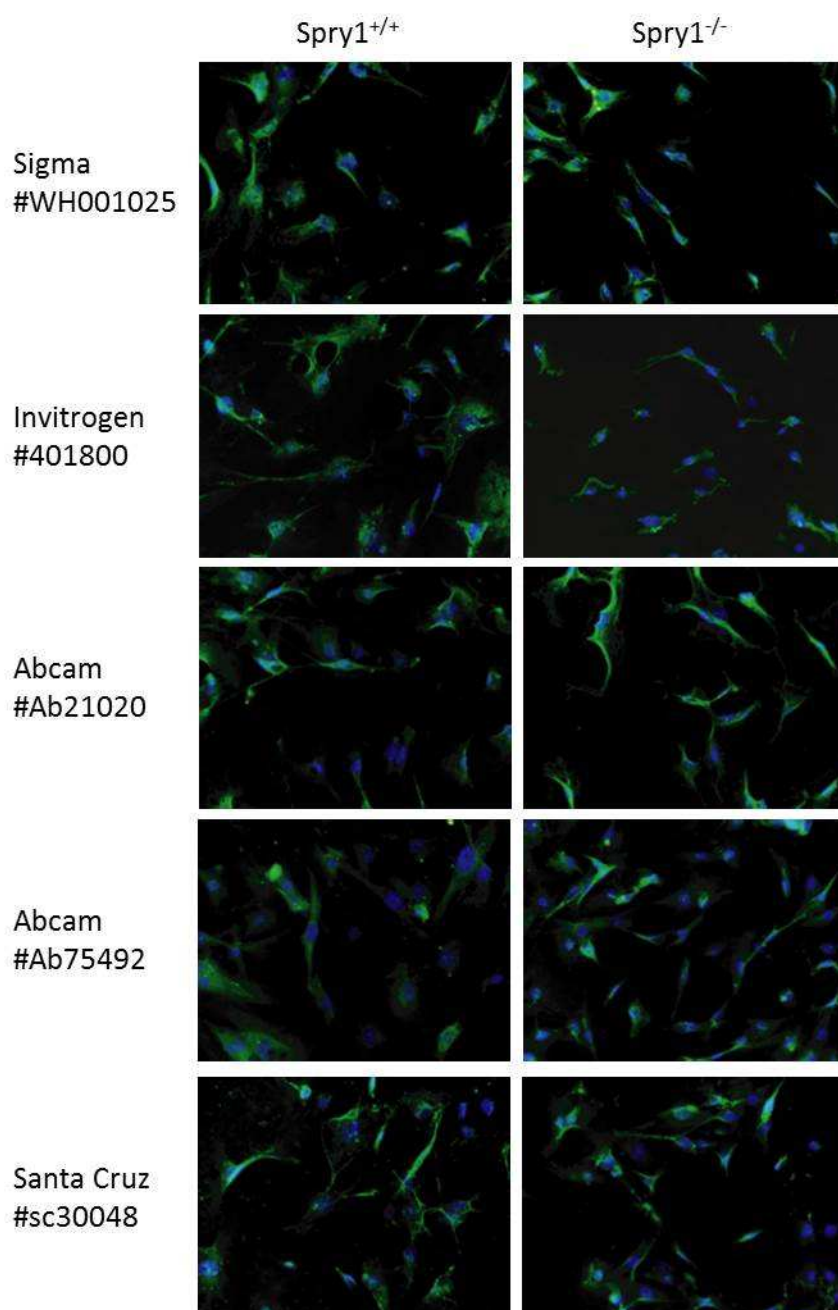


Figura 15: Immunofluorescència contra Sprouty1 en fibroblasts embrionaris murins (MEFs) d'animals *wild-type* (Spry1^{+/+}) i *knockout* de Spry1 (Spry1^{-/-}) utilitzant diferents anticossos comercials. Cap dels anticossos analitzats presenta un marcatge específic tant si els fixem amb paraformaldehid 4% com amb metanol.

Per tal d'evadir aquest problema de detecció inespecífica i analitzar l'expressió de Sprouty1 a les cèl·lules C, vàrem analitzar l'expressió de Spry1 a la tiroide dels ratolins Spry1^{LacZ/+}, mitjançant tincions contra β -galactosidasa. Aquest ratolí *knockin* expressa el gen LacZ al locus de Spry1, és a dir, que és un ratolí heterozigot per Spry1 on l'altre al·lel expressa el gen LacZ en els teixits i òrgans on Sprouty1 s'expressi (Thum et al., 2008) (Figura 16).

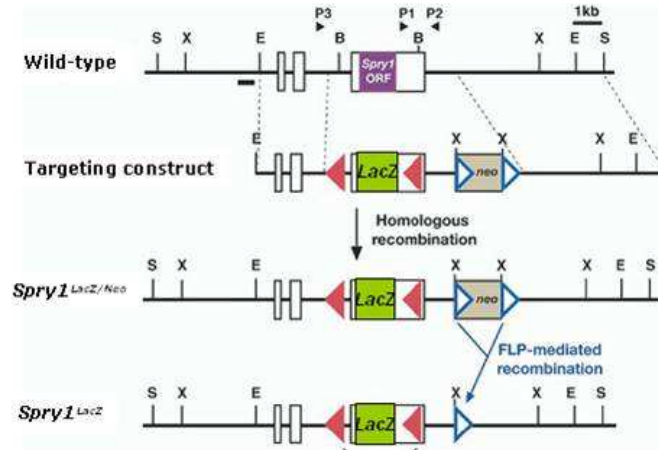


Figura 16: Disseny del constructe generat per desenvolupar el ratolí *Spry1^{LacZ/+}*. Aquest ratolí expressa el gen *LacZ* al locus d'expressió de *Sprouty1* sota el seu promotor (Thum et al., 2008).

Mitjançant seccions congelades de tiroïdes de ratolí *Spry1^{LacZ/+}* vàrem realitzar una doble tinció d'immunofluorescència utilitzant anticossos contra β -galactosidasa bacteriana i calcitonina (la hormona que sintetitzen les cèl·lules C). La Figura 17 ens demostra que *Spry1* s'expressa a les cèl·lules C amb nivells força elevats i a més a més també s'hi expressa de forma més moderada a les cèl·lules parafol·liculars de la tiroide de ratolí.

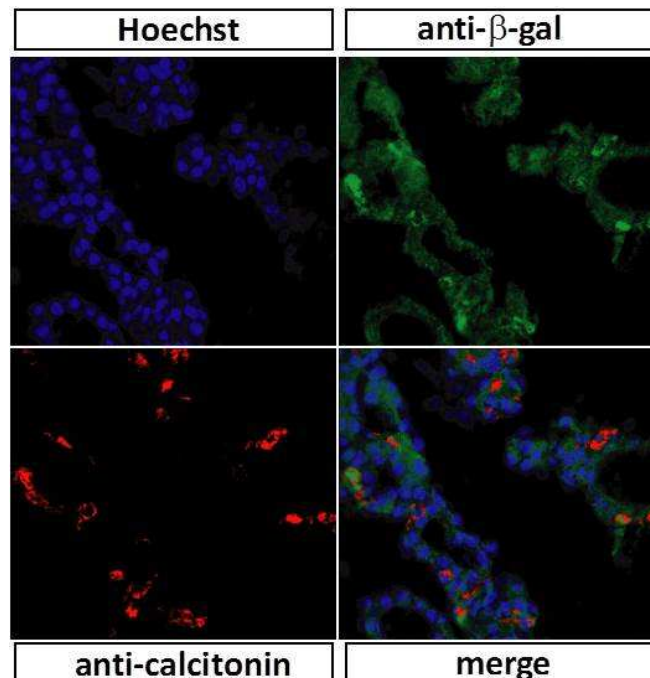


Figura 17: *Sprouty1* s'expressa a les cèl·lules C de la glàndula tiroide de ratolí. Doble immunofluorescència contra Beta-galactosidasa bacteriana (verd) i contra calcitonina (vermell) de seccions de criostat de tiroide de ratolins *Spry1^{LacZ/+}* d'un mes d'edat. Els nuclis van ser tenyits amb Hoechst.

2. EL RATOLÍ *KNOCKOUT* PER *SPROUTY1* DESENVOLUPA HIPERPLÀSIA DE LES CÈL·LULES C.

Com ja s'ha descrit a la introducció, els membres de la família de Sprouty, sobretot *Spry1* i 2, poden jugar un paper com a supressors tumorals en una gran varietat de carcinomes. Per tant, un cop vam establir que *Sprouty1* s'expressa a les cèl·lules C de la tiroide adulta, vàrem voler indagar sobre el paper de *Sprouty1* com a supressor tumoral al Carcinoma Medul·lar de Tiroide (MTC). Per una banda vam analitzar macroscòpicament les tiroides dels ratolins *wild-type* i *knockout* de *Sprouty1* d'un a tres mesos d'edat. Tot i que les tiroides dels ratolins *knockout* de tres mesos són més grans, si les comparem amb les dels ratolins germans *wild-type*, tenen una estructura i forma normal (Figura 29). Per altra banda, vàrem voler analitzar les tiroides amb més detall, per tant vam fer tincions d'Hematoxilina-Eosina i tincions immunohistoquímiques contra calcitonina, però no hi vam observar cap signe de malignitat (Figura 18 dalt). Ara bé, després de realitzar el comptatge del nombre de cèl·lules positives per calcitonina, vam observar que les tiroides dels ratolins *knockout* tenen gairebé el doble de cèl·lules C que les tiroides del grup control (Figura 18), per tant presenten hiperplàsia de les cèl·lules C a la tiroide.

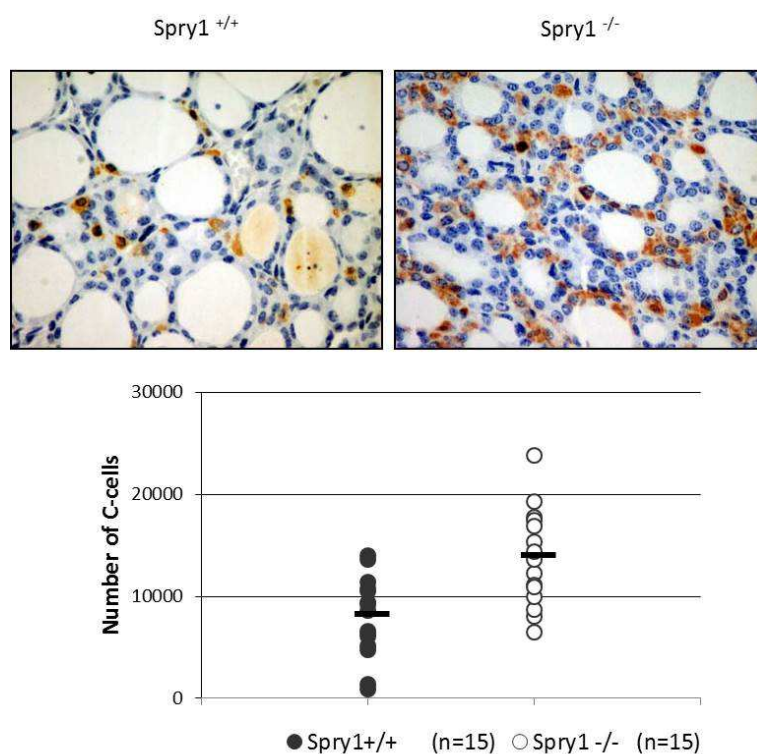


Figura 18: Els ratolins *knockout* de *Spry1* desenvolupen una hiperplàsia de les cèl·lules C a la tiroide. (dalt) Immunohistoquímica contra calcitonina de tiroides de ratolins *Spry1*^{+/+} i *Spry1*^{-/-} de tres mesos d'edat. (baix) Gràfic del comptatge del nombre de cèl·lules C a la tiroide d'ambdós genotips ($p < 0,01$ analitzada mitjançant la prova T de Student). Els resultats els vàrem obtenir analitzant 15 animals de cada genotip entre 1 i 3 mesos d'edat.

Els ratolins *knockout* per *Spry1* moren prop dels 5 mesos d'edat degut a problemes renals (Basson et al., 2005), per tant no vam poder analitzar l'evolució d'aquesta hiperplàsia en ratolins més adults o vells.

Posteriorment volíem determinar si l'aparició d'aquesta hiperplàsia era fruit d'un problema desenvolupat en l'adult o en edats primerenques. Per això vàrem comptar el nombre de cèl·lules positives per calcitonina, mitjançant el mateix procediment d'immunohistoquímica, de tiroïdes de ratolins acabats de néixer. Tal i com s'observa al gràfic de la Figura 19a, no es van trobar diferències significatives en el nombre de cèl·lules C entre els ratolins recent nascuts *wild-type* i *Spry1*^{-/-}. A més a més, tampoc es van observar signes d'hiperplàsia als cossos ultimobranquials d'embrions E12,5 (Figura 19b).

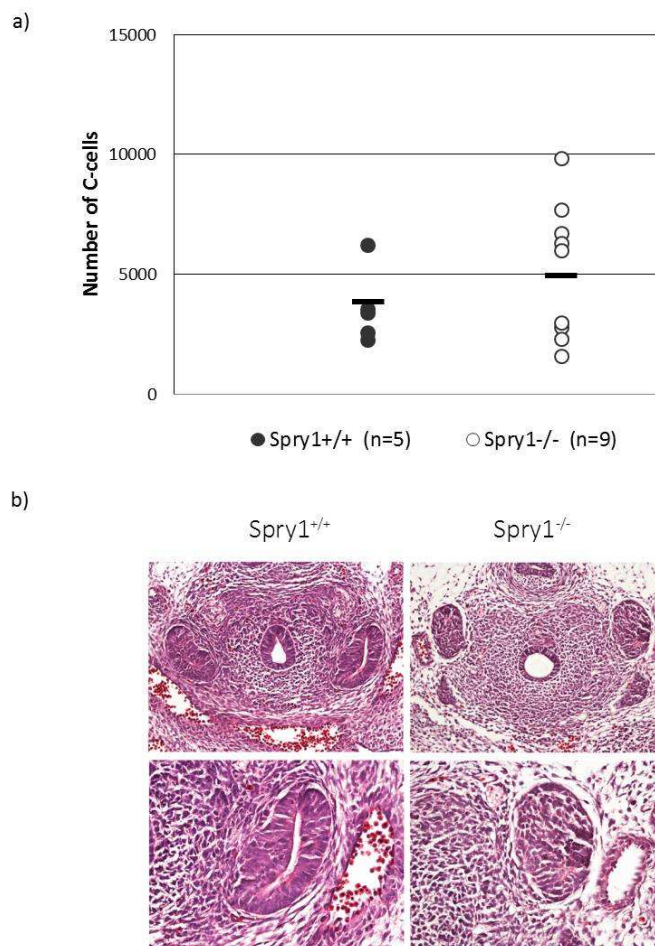


Figura 19: El desenvolupament de la hiperplàsia de les cèl·lules C de la tiroide és durant l'edat adulta. (a) Quantificació del nombre de cèl·lules C a les tiroïdes dels ratolins recent nascuts, on no s'observen diferències significatives entre els dos genotips ($p=0,14$; prova T de Student). (b) Hematoxilina-eosina dels cossos ultimobranquials de ratolins E12,5 *knockout* de *Spry1* i control. No s'observen signes de hiperplàsia en els precursors de les cèl·lules C.

Gràcies a aquests resultats podem determinar amb major força que l'increment del nombre de cèl·lules C observat a les tiroides dels ratolins *knockout* per Spry1 és degut a un augment de la proliferació de les cèl·lules C durant l'edat adulta enlloc d'un defecte en el desenvolupament. Per tant, l'eliminació de Spry1 causa el desenvolupament d'hiperplàsia de les cèl·lules C a la tiroide, una lesió precancerosa que precedeix al desenvolupament del MTC.

3. L'EXPRESSIÓ DE SPROUTY1 REDUEIX LA PROLIFERACIÓ DE LES CÈL·LULES DERIVADES D'UN MTC HUMÀ TANT EN MODELS *IN VITRO* COM *IN VIVO*.

Després d'observar un increment en el nombre de cèl·lules C a les tiroides dels ratolins Spry1^{-/-} de tres mesos vàrem voler determinar si els efectes observats eren deguts a un mecanisme autònom de la pròpia cèl·lula. Per tal d'abordar-ho, vàrem utilitzar una línia cel·lular humana derivada d'un MTC (línia cel·lular TT) on hi vam manipular els nivells de Spry1.

En primer lloc, vam mesurar els nivells d'expressió de Spry1 en aquesta línia cel·lular per mitjà de RT-PCR i es van comparar els valors obtinguts amb altres teixits o línies cel·lulars humanes on es coneix que Spry1 s'hi expressa, tals com HEK293 i HK2, dues línies cel·lulars immortalitzades derivades d'un ronyó embrionari o adult, respectivament. Tal i com s'observa en la Figura 20a, els nivells d'expressió de Spry1 són molt baixos a les cèl·lules TT (Vector), tal i com s'esperava trobar, si Sprouty1 juga un paper com a gen supressor tumoral. Per tant, per tal d'indagar sobre el paper que pot jugar Sprouty1 com a supressor de tumors a la línia cel·lular derivada d'un MTC, vàrem decidir generar línies estables que expressessin diferents quantitats de Sprouty1. Per mitjà d'infeccions lentivirals, les quals ens permetien generar línies que expressessin nivells gairebé endògens del transgen, vàrem crear dues línies cel·lulars estables, les línies Spry1A i Spry1B. A més, com a línia cel·lular control vàrem infectar les cèl·lules TT amb virus que contenien el vector lentiviral sol (Vector).

En segon lloc vam voler caracteritzar les dues línies cel·lulars generades mitjançant RT-PCR per analitzar tant els nivells d'expressió de mRNA de Spry1 com el nombre de còpies incorporades avaluant el DNA genòmic. Com es mostra a la Figura 20a, la línia cel·lular Spry1A expressa aproximadament 10 vegades més Spry1 que les cèl·lules infectades amb el vector sol (Vector), nivells semblants als que s'observen en tota la tiroide humana (*Thyroid*). En canvi, en el cas de les cèl·lules Spry1B, els nivells d'expressió de Spry1 són al voltant de 20 vegades més que el control.

Al analitzar el DNA genòmic d'aquestes línies cel·lulars creades, observem que les cèl·lules Spry1A tenen inserides al genoma una còpia addicional de Spry1 de mitjana, mentre que les cèl·lules Spry1B alberguen aproximadament dues còpies extres inserides al seu genoma (Figura 20b).

Finalment, al analitzar les cèl·lules al detall, ens vam adonar que al sobreexpressar Spry1 a les cèl·lules TT, aquestes pateixen un canvi morfològic, ja que els cossos arrodonits que presenten les cèl·lules control es tornen més petits i brillants i apareixen algunes prolongacions que surten de les mateixes cèl·lules (Figura 20c).

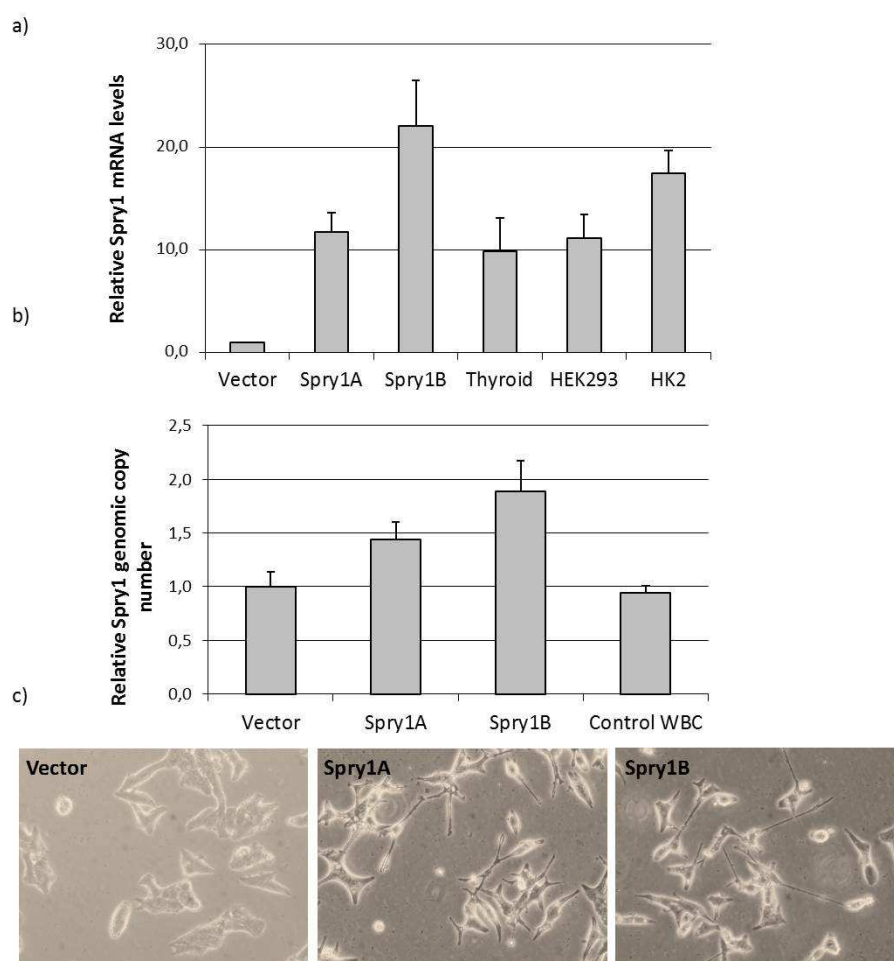
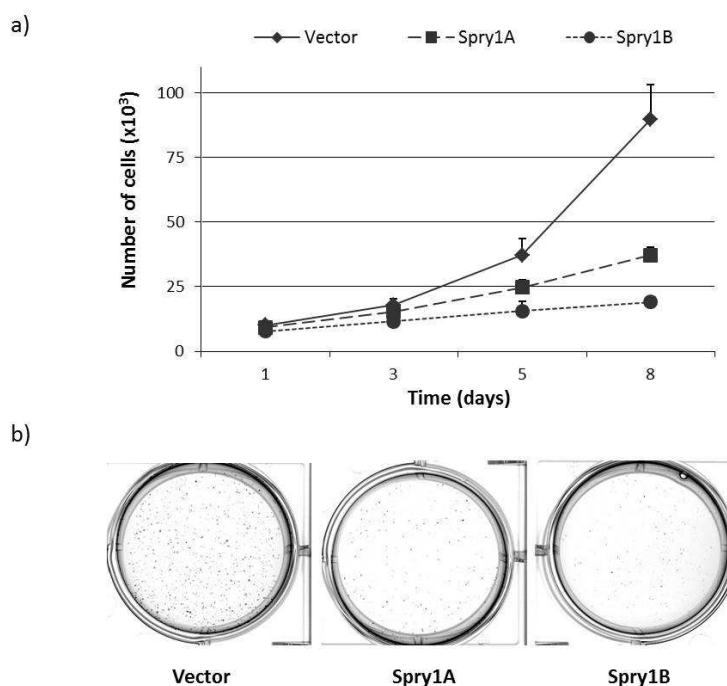


Figura 20: **Caracterització de les línies cel·lulars TT que expressen diferents nivells de Spry1.** (a) Nivells relatius de mRNA que expressen les diferents línies cel·lulars creades derivades de les cèl·lules TT (Vector, Spry1A i Spry1B). Com a comparació, analitzem els nivells d'expressió de Spry1 a la tiroide humana i a dues línies cel·lulars de ronyó humanes, com HEK293 i HK2. (b) Anàlisi del nombre de còpies de Spry1 inserides al genoma de les línies cel·lulars TT creades. Com a control utilitzem el DNA genòmic de cèl·lules normals blanques de la sang (WBC, *white blood cells*). (c) Imatges representatives de les línies cel·lulars generades mitjançant microscopia òptica amb contrast de fase.

3.1 La sobreexpressió de Sprouty1 redueix la proliferació de les cèl·lules TT *in vitro*.

A continuació vàrem analitzar com l'expressió de Spry1 afectava a la proliferació de les cèl·lules TT *in vitro*. Primer de tot vam realitzar corbes de creixement mitjançant el comptatge de les cèl·lules control, Spry1A i Spry1B durant els diferents temps indicats al gràfic, on es demostra que l'augment dels nivells d'expressió de Spry1 provoca una reducció gradual del creixement cel·lular (Figura 21a). Per altra banda, vàrem realitzar assajos clonogènics que ens corroboraven els mateixos resultats, ja que les cèl·lules Spry1A i B desenvolupen menys colònies i més petites dins la placa d'agar (Figura 21b).

Posteriorment, per tal de determinar si la reducció del creixement és degut a una disminució de la proliferació o per un increment en la mort cel·lular per apoptosi, vam realitzar assajos de 5'Bromo-deoxyuridina (BrdU) amb immuno-tinció dels nuclis amb Hoechst. La Figura 21c ens mostra que les dues línies que sobreexpressen Spry1 presenten una reducció en la incorporació de 5'Bromo-deoxyuridina, i per tant una reducció del nombre de cèl·lules en fase S. Per altra banda, mitjançant la tinció del nuclis amb Hoechst, vàrem voler quantificar els nuclis amb morfologia apoptòtica. Tot i que en aquestes línies cel·lulars gairebé no s'hi detecten nuclis apoptòtics (Figura 21d), els pocs que vam poder quantificar no revelen diferències significatives entre les línies cel·lulars (Vector $1.1 \pm 1.4\%$, Spry1A $0.5 \pm 0.4\%$, Spry1B $0.1 \pm 0.1\%$; $P=0.5$ Vector vs Spry1A i $P=0.3$ Vector vs Spry1B mitjançant una prova T de Student).



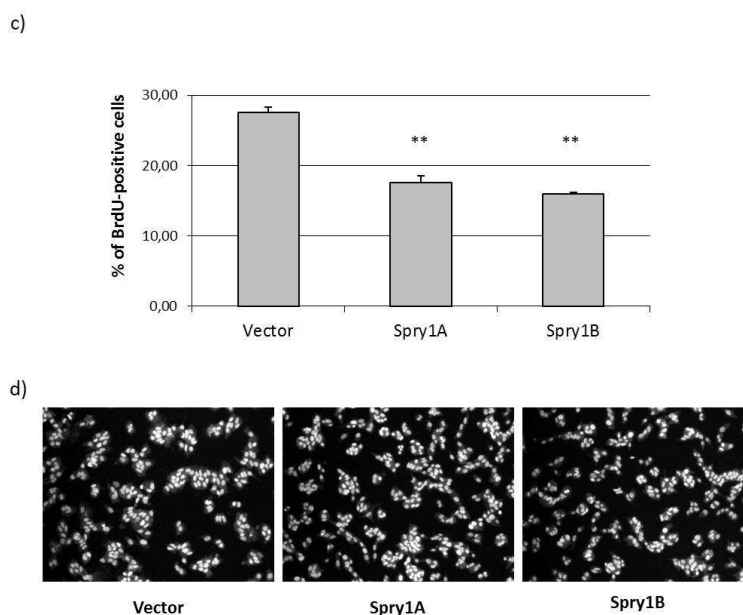


Figura 21: L'expressió de **Sprouty1** redueix la proliferació de les cèl·lules TT *in vitro*. (a) Anàlisi de la proliferació de les tres línies cel·lulars generades mitjançant una corba de creixement, on ens mostra una reducció del nombre de cèl·lules al llarg del temps de les línies que sobreexpressen Spry1. (b) Assaig de proliferació de colònies de les diferents línies cel·lulars utilitzades. (c) Quantificació del percentatge de cèl·lules positives per 5'Bromo-deoxyuridina, les quals ens indiquen les cèl·lules que estan en fase proliferativa. (** $p < 0,01$, prova T de Student). (d) Imatges de la immuno-tinció dels nuclis amb Hoechst de les cèl·lules TT, les quals no ens revelen signes de nuclis apoptòtics en cap de les línies cel·lulars estudiades. ** $p < 0,01$ mitjançant la prova T de Student.

En conjunt i tenint en compte aquests resultats podem dir que Spry1 indueix una reducció de la proliferació de les cèl·lules TT *in vitro*. A més a més, aquest efecte ja s'observa quan s'insereix una única còpia al genoma de les cèl·lules TT i es sobreexpressen nivells de Spry1 molt semblants als observats en una tiroide humana (Spry1A) (Figura 20a,b i Figura 21a,c). Així doncs els següent experiments es van dur a terme utilitzant únicament la línia cel·lular Spry1A.

3.2 La sobreexpressió de **Sprouty1** redueix la proliferació de les cèl·lules TT *in vivo*.

Donat que les cèl·lules TT són capaces de desenvolupar tumors subcutanis quan s'injecten sota la pell de ratolins immunocompromesos (*SCID mice*), vàrem voler verificar si quan sobreexpressavem Spry1 en aquestes cèl·lules es reduïa l'habilitat de formar tumors *in vivo*. Així mateix vàrem injectar subcutàniament un nombre concret de cèl·lules control o Spry1A a l'esquena dreta del ratolins SCID femella. Després vam fer mesures cada setmana per analitzar el creixement tumoral dels xenografts generats mitjançant un peu de rei. Com es mostra a la Figura 22a, amb l'expressió de Spry1 observem un volum tumoral menor, al finalitzar l'experiment, si el comparem amb els tumors desenvolupats amb les cèl·lules control (Vector). A més, després de 5 setmanes (37 dies) d'haver injectat les cèl·lules subcutàniament ja podem observar una

disminució significativa del creixement dels xenografts Spry1A, que es manté al llarg dels dos mesos i mig que va durar l'experiment (Figura 22b). Finalment, mitjançant RT-PCR en temps real vàrem mesurar els nivells relatius de mRNA de Spry1 dels xenografts un cop finalitzat l'experiment. La Figura 22c, ens indica que els nivells de sobreexpressió de Spry1 als tumors generats es mantenen gairebé iguals a partir de la línia cel·lular Spry1A.

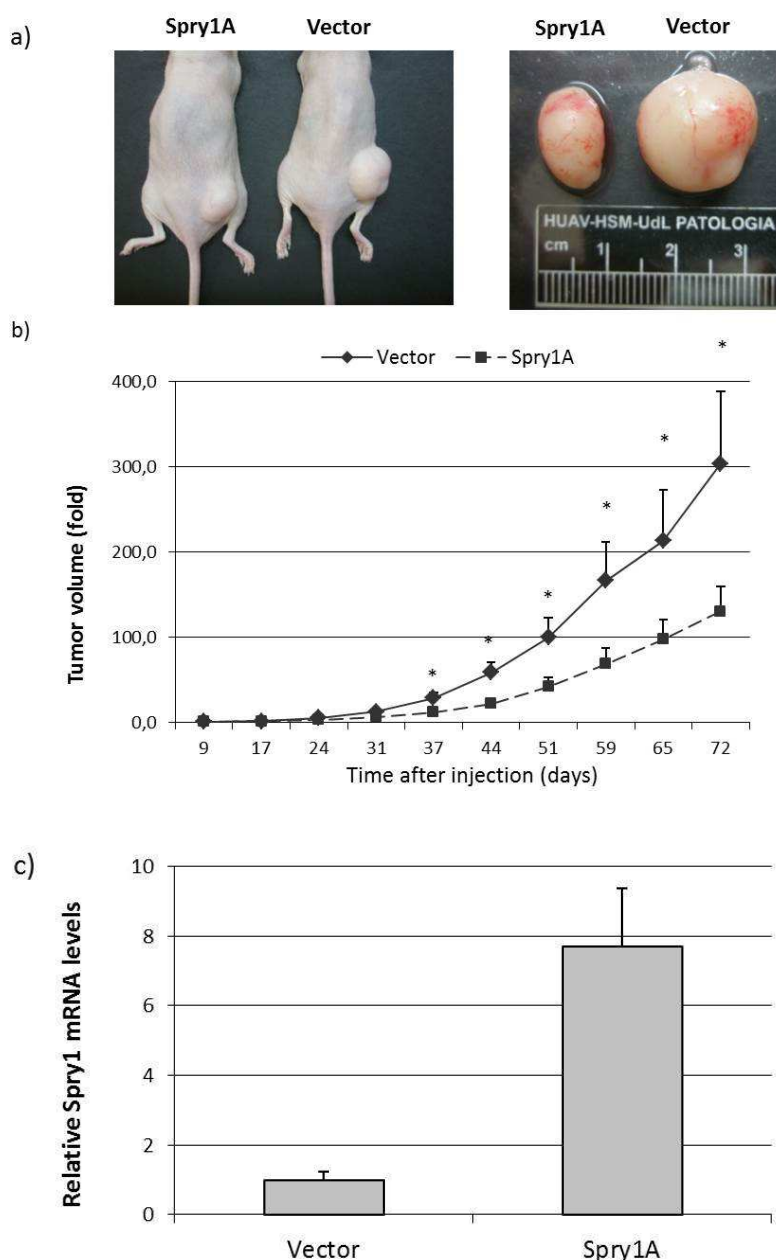


Figura 22: L'expressió de Sprouty1 redueix la proliferació dels xenografts *in vivo*. (a) Imatge representativa de l'esquena dels ratolins SCID amb els tumors subcutanis (esquerra). Imatge representativa del tamany dels xenografts subcutanis obtinguts a partir de les línies cel·lulars derivades de les cèl·lules TT (dreta). (b) Corba de creixement del volum tumoral dels xenografts subcutanis desenvolupats en ratolins SCID, els quals varen ser mesurats setmanalment (Vector n=8 i Spry1A n=10). * p < 0,05; prova T de Student. (c) RT-PCR que analitza els nivells de Spry1 que presenten els xenografts derivats de les línies cel·lulars estudiades.

Per tant podem dir que l'expressió de Spry1 a les cèl·lules TT, a nivells semblants als que s'observen a les tiroïdes humanes sanes, redueix la proliferació tant *in vitro* com en tumors subcutanis *in vivo*.

4. L'EXPRESSIÓ DE SPROUTY1 NO INHIBEIX LA SENYALITZACIÓ DE RET A LES CÈL·LULES TT.

Tal i com s'ha descrit a la introducció, tant al carcinoma medul·lar de tiroide hereditari com en les formes esporàdiques, s'han descrit mutacions de guany de funció del receptor tirosina cinasa Ret. Una de les observacions que ens ha motivat per tal d'estudiar el paper de Spry1 durant el desenvolupament del MTC, és el fet que els membres de la família de Sprouty inhibeixen la senyalització de Ret *in vivo*. Per una banda s'ha descrit que el ratolí *knockout* de Spry1 causa un desenvolupament anormal dels ronyons on aquest defecte pot ser rescatat quan es creua amb el ratolí heterozigot per GDNF o amb el ratolí que presenta la mutació hipomòrfica Tyr1062Phe al receptor Ret (Basson et al., 2005; Basson et al., 2006; Michos et al., 2010; Rozen et al., 2009). Per altra banda, la supressió selectiva de Spry2 condueix al desenvolupament d'una hiperplàsia al sistema nerviós entèric, la qual es pot evitar mitjançant anticossos bloquejants contra GDNF (Taketomi et al., 2005).

Per començar a indagar si l'expressió de Spry1 a les cèl·lules TT redueix la proliferació cel·lular gràcies a la inhibició de la senyalització per Ret, vàrem decidir identificar proteïnes diana de la senyalització intracel·lular activada per Ret. És ben sabut que l'expressió oncogènica de Ret, de forma endògena a les cèl·lules TT, desencadena la fosforilació de les MAPK de tipus ERK (Melillo et al., 2005). A més, s'ha demostrat que durant el desenvolupament del ronyó la proteïna Wnt11 s'expressa com a resposta a la senyalització per Ret (Basson et al., 2006; Majumdar et al., 2003) i en les línies cel·lulars derivades de MTC s'expressa la proteïna calcitonina en resposta a l'activació del receptor (Akeno-Stuart et al., 2007). Per tal de confirmar aquests resultats descrits vam silenciar l'expressió de Ret de les cèl·lules TT mitjançant l'expressió lentiviral d'un shRNA. Tal i com es mostra a la Figura 23a, quan silenciem l'expressió de Ret les proteïnes ERK1/2 no es fosforil·len a més de no activar-se l'expressió de Wnt11 ni de calcitonina, ja que els nivells relatius de mRNA són inferiors si els comparem amb les cèl·lules TT control (Figura 23b).

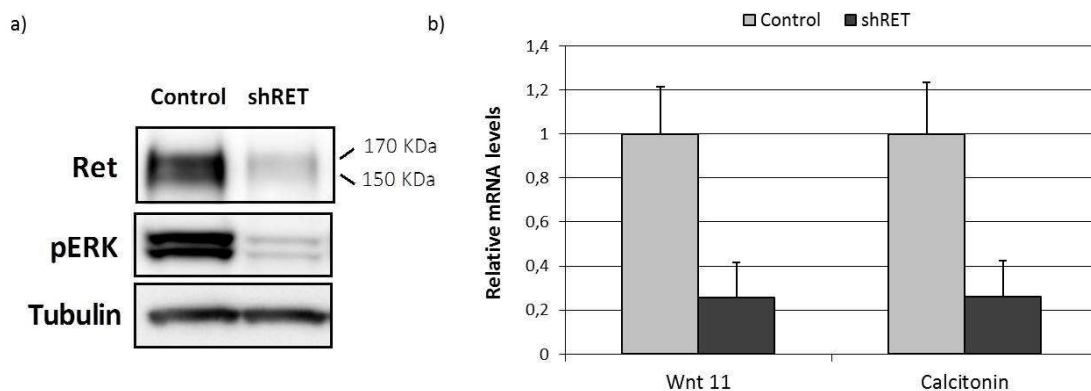


Figura 23: El silenciament de Ret a les cèl·lules TT inhibeix la fosforilació de les proteïnes ERK i disminueix l'expressió de Wnt11 i Calcitonina. (a) Western Blot de la disminució de l'expressió de Ret i la disminució de les pERK en cèl·lules infectades amb lentivirus portadors de shRNA contra RET o vector buit (Control). (b) Anàlisi dels nivells relatius de mRNA de Wnt11 i calcitonina de les cèl·lules TT control i shRET. On s'observa una disminució dels nivells de mRNA quan silenciem RET a la línia cel·lular derivada del MTC.

Un cop identificades les proteïnes MAPK de tipus ERK, Wnt11 i calcitonina com a dianes de la senyalització per Ret, vàrem voler analitzar l'estat d'aquestes proteïnes a les cèl·lules sobreexpressores de Spry1 (línia cel·lular Spry1A). Sorprenentment, l'expressió de Spry1 no inhibeix la senyalització intracel·lular desencadenada pel receptor Ret en cap de les dianes estudiades. Quan sobreexpressem Spry1 no s'observa una reducció de la fosforilació de les ERK1/2, tal i com esperariem degut a la funció principal dels gens de la família de Sprouty, sinó que fins i tot podem detectar un petit increment de la fosforilació d'aquestes cinases mitjançant Western Blot. A més, al immunoprecipitar el receptor Ret no observem diferències en la fosforilació del receptor quan incrementem els nivells de Spry1 (Figura 24a). Per altra banda, els nivells relatius de mRNA tant de Wnt11 com de Calcitonina, no varien amb l'expressió de Spry1 (Figura 24b).

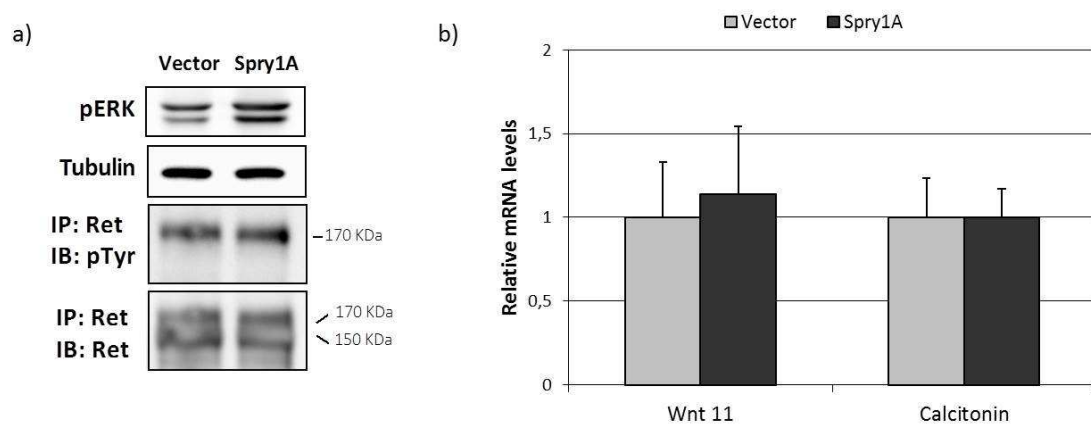


Figura 24: L'expressió de Sprouty1 no inhibeix la senyalització del receptor Ret. (a) Western blot que ens demostra que l'expressió de Spry1 no redueix la fosforilació de les ERK ni fa variar la fosforilació del receptor Ret. (b) Anàlisi dels nivells relatius de mRNA de Wnt11 i Calcitonina per mitjà de RT-PCR, on no s'observen diferències entre ambdós línies cel·lulars estudiades.

Aquestes evidències ens suggereixen que Spry1 no redueix la proliferació de les cèl·lules TT antagonitzant la senyalització intracel·lular activada per Ret.

5. SPROUTY1 INDUEIX L'EXPRESSIÓ DEL LOCUS CDKN2A I ACTIVA LA SENESCÈNCIA CEL·LULAR

Després de descartar la inhibició de la senyalització per Ret com un mecanisme pel qual Spry1 redueix la proliferació de les cèl·lules TT, vam voler examinar diversos gens reguladors del cicle cel·lular. Mitjançant l'anàlisi per RT-PCR d'un *array qPCR* vàrem estudiar els diferents nivells de mRNA de diverses proteïnes relacionades amb el cicle cel·lular de les cèl·lules Vector i Spry1A. Vam detectar increments de tres vegades en l'expressió d'inhibidors de les proteïnes cinases CDK del locus CDKN2A i un increment modest de l'expressió de CDKN2B a les cèl·lules Spry1A (Annex I).

El locus CDKN2A genera almenys dos mRNA diferents mitjançant *splicing* alternatiu, els quals donen lloc a dos proteïnes no relacionades anomenades p16INK4a i p14ARF (p19ARF en els ratolins). Donat que la sonda utilitzada per detectar CDKN2A en la tècnica de *array qPCR* no és capaç de distingir entre els dos mRNA que es generen, vàrem decidir mesurar la seva expressió per RT-PCR en temps real mitjançant sondes específiques per a cada transcrit. Tal i com s'observa a la Figura 25a, les cèl·lules Spry1A presenten 8 vegades més mRNA de p16INK4A que el control, a més d'expressar al voltant de 3 vegades més de p14ARF i un lleuger increment en el nivells de mRNA de p15INK4b, codificat pel locus CDKN2B. Per contra, els nivells de mRNA que codifiquen pels inhibidors de les CDK de la família KIP/CIP, el p21^{CIP/WAF1} i el p27^{KIP1}, es mantenen pràcticament iguals entre les cèl·lules control i les Spry1A (Figura 25a dreta). Per altra banda, vam confirmar els mateixos resultats però mitjançant immunoblots d'extractes proteics de les dues línies cel·lulars estudiades, observant sobretot un gran augment de p16INK4a a les cèl·lules Spry1A (Figura 25b).

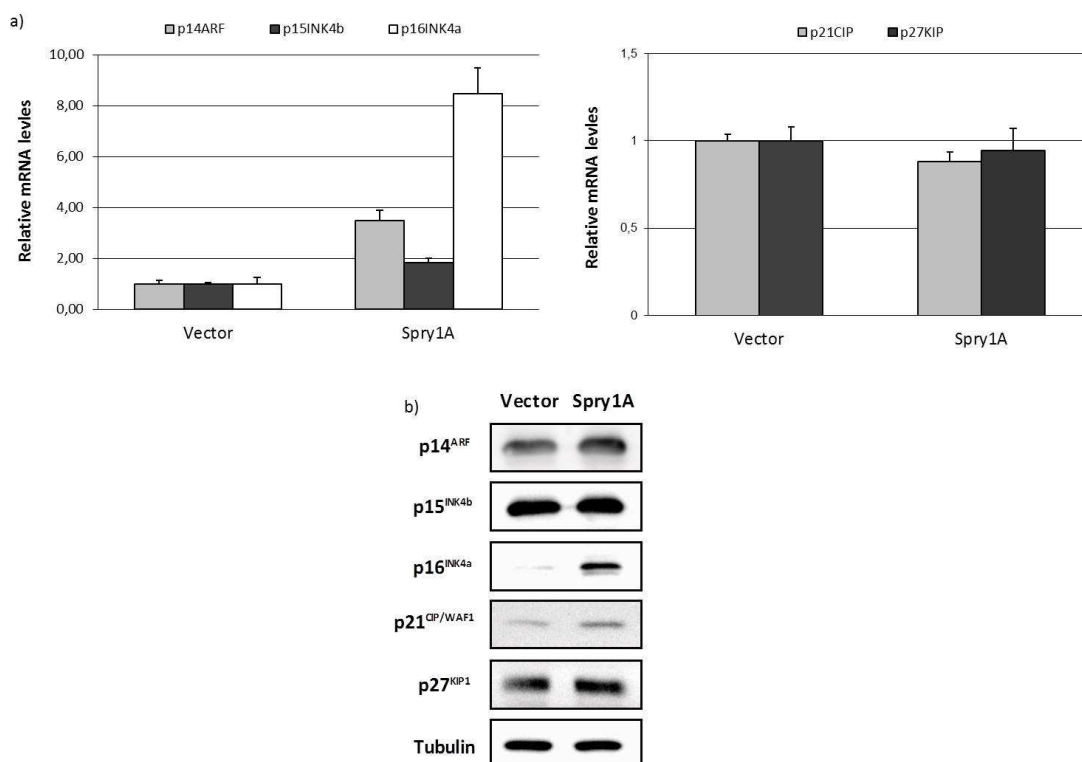


Figura 25: **Spry1** induïx l'expressió dels gens codificats pel locus **CDKN2A**. (a) Quantificació per RT-PCR dels nivells relatius de mRNA de diversos gens reguladors del cicle cel·lular, com (esquerra) els gens del locus **CDKN2A** (p16INK4a i P14ARF) i **CDKN2B** (p15INK4b) i (dreta) ls inhibidors de les cinases CDK de la família KIP/ CIP (p21 i p27), els quals no canvien amb l'expressió de **Spry1**. (b) Anàlisi per Western Blot de l'expressió proteica de diversos inhibidors del cicle cel·lular on observem un augment de l'expressió de P16INK4a a les cèl·lules sobreexpressores de **Spry1**. Per comprovar que hi ha la mateixa quantitat de proteïna a cada carril es va detectar la Tubulina.

Tot i que les seqüències que codifiquen per p16INK4a i p14ARF són molt diferents, ambdues proteïnes provoquen que les cèl·lules entrin en un estat d'aturada del seu creixement conegut com senescència cel·lular.

Tal i com hem mencionat a la introducció, la senescència cel·lular pot desenvolupar-se com a conseqüència de l'escurçament dels telòmers (senescència replicativa) o mitjançant insults provocats per proteïnes oncogèniques (senescència induïda per oncògens, OIS) a més d'iniciar-se per la pèrdua del supressor tumoral Pten (PICS).

A banda de l'expressió de p16INK4a i p14ARF, el marcador més extensament utilitzat per la detecció de la senescència cel·lular és la tinció que ens mesura l'activitat β -galactosidasa associada a la senescència cel·lular (SA- β -gal). Quan les cèl·lules presenta activitat β -galactosidasa a un pH de 6, es tornen de color verd turquesa. Tal i com s'observa a la Figura 26a, l'expressió de **Spry1** a les cèl·lules TT causa un increment important (15%) del nombre de cèl·lules positives per l'activitat SA- β -gal, suggerint que

la sobreexpressió de Sprouty1 provoca l'entrada en senescència de les cèl·lules TT. Posteriorment per tal de reforçar els resultats obtinguts vam voler analitzar els xenografts de l'experiment *in vivo*. Així mateix vàrem comprovar que els tumors subcutanis generats de la línia Spry1A presenten un tinció immunohistoquímica positiva per p16INK4a i un increment del nombre de cèl·lules reactives a l'activitat SA- β -gal (Figura 26b).

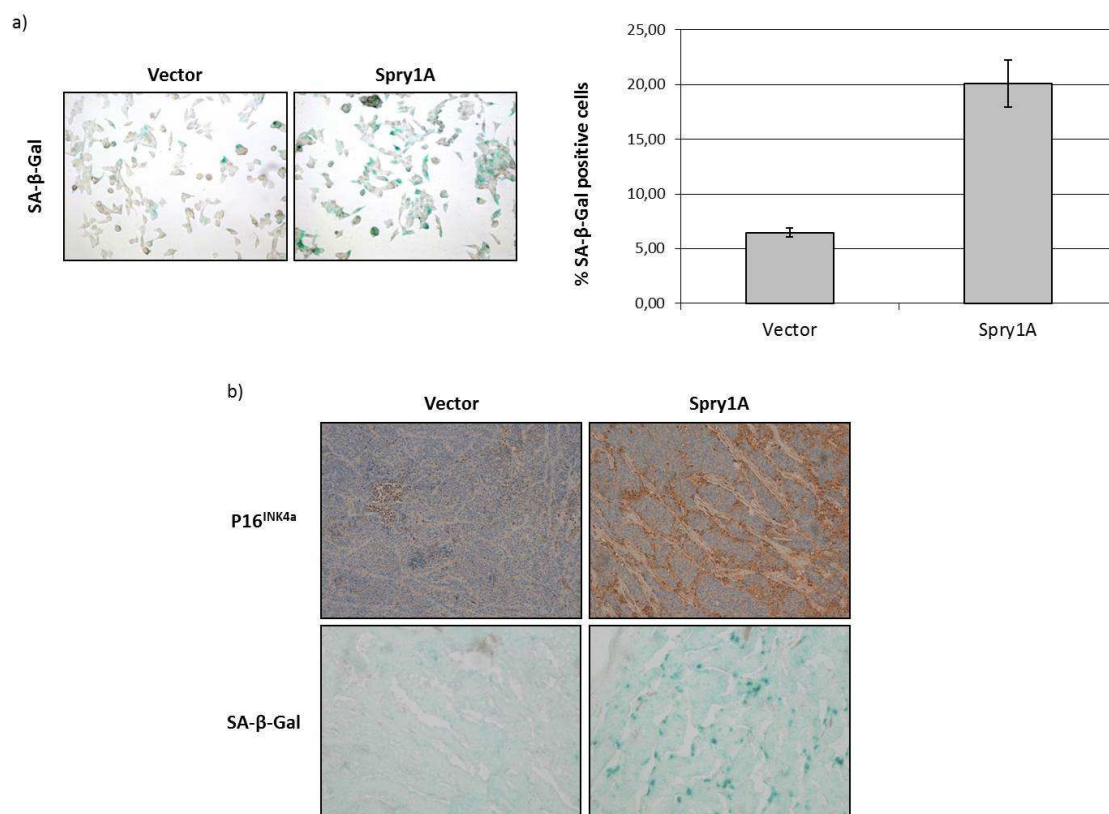


Figura 26: L'expressió de Spry1 indueix la senescència cel·lular a les cèl·lules derivades d'un MTC. (a) Activitat β -galactosidasa associada a la senescència cel·lular de les dues línies cel·lulars estudiades. (b) Immunotinció de p16INK4a i activitat SA- β -gal dels xenografts derivats de les cèl·lules TT control i expressores de Spry1.

En resum podem suggerir que l'expressió de Spry1 provoca la reducció de la proliferació de les cèl·lules TT perquè s'activa un programa de senescència cel·lular.

6- EL PROMOTOR DE SPROUTY1 ES TROBA FREQUÈNTMENT METILAT ALS MTC HUMANS

Com ja hem mencionat a la introducció, els membres de la família de Sprouty poden actuar com a supressors de tumors ja que estan silenciats en diversos carcinomes humans mitjançant metilació del seu promotor (Frank et al., 2009; Kwabi-Addo et al., 2009; McKie et al., 2005; Velasco et al., 2011). Pel que fa al locus de Spry1 en humans, s'ha descrit que es troba silenciats en càncers de pròstata mitjançant la metilació del promotor (Kwabi-Addo et al., 2009). Gràcies a assajos *reporter*, s'ha pogut descriure

que la metilació s'efectua entre les illes CpG entre l'exó 1b i 1a, afectant de forma dramàtica l'expressió de *Spry1*. Per tal de comprovar si en el Carcinoma Medul·lar de Tiroide el promotor de *Spry1* està metilat, vàrem analitzar les illes CpG del promotor de *Spry1* de mostres de DNA genòmic obtingut de MTC humans i després vàrem analitzar els nivells d'expressió de *Spry1* dels mateixos casos estudiats.

Gràcies al banc de teixits del CNIO de Madrid i gràcies a la Dr M Robledo, vam poder obtenir DNA genòmic i cDNA de 17 mostres humanes de MTC i analitzar-les. Les característiques dels MTC analitzats es desglossen a l'Annex II.

Primer de tot vàrem dissenyar uns *primers* de metilació específics per tal d'amplificar la regió concreta que compren entre l'exó 1b i 1a i que conté les illes CpG (veure l'apartat 10 de Materials i Mètodes). Posteriorment, mitjançant PCR, vam analitzar l'amplificació d'aquesta regió de DNA genòmic de les mostres de MTC humanes. Si ens fixem amb la Figura 27a, la gran majoria de les mostres de MTC analitzades estan metilades, ja que s'amplifica la PCR específica amb primers de metilació (Meth). Per contra, no es detecta la metilació del promotor de la tiroide normal amb les mateixes condicions experimentals. Aquest fet ens suggereix que el silenciament dels gen *Spry1* pot ser degut a la metilació del seu promotor al MTC humans.

Posteriorment vam voler analitzar si els nivells d'expressió de *Spry1* estaven disminuïts en els MTC humans, tal i com s'esperaria d'un supressor de tumors. Per tal de caracteritzar-ho vàrem analitzar els nivells relatius de mRNA de *Spry1*, mitjançant RT-PCR, del cDNA de les mateixes mostres (excepte de la mostra 04T241, ja que no teníem cDNA). Tal i com es mostra a la Figura 27b, la gran majoria dels MTC humans presenten una disminució dels nivells de *Spry1* si els comparem amb la tiroide humana (*Thyroid*). Només dues mostres que presenten el promotor metilat (04T238 i 04T241) també presenten alts nivells d'expressió de *Spry1*. Per altra banda, dues mostres que no presenten el promotor metilat (08T38 i 08T47), expressen nivells de *Spry1* semblants als que observem a la tiroide humana. Per últim, les mostres 08T31, 08T49 i de forma més específica la mostra 09T133 presenten nivells baixos d'expressió de *Spry1* però una metilació feble del promotor, indicant que en alguns MTC humans hi poden aparèixer altres processos responsables de la reducció dels nivells de *Spry1*.

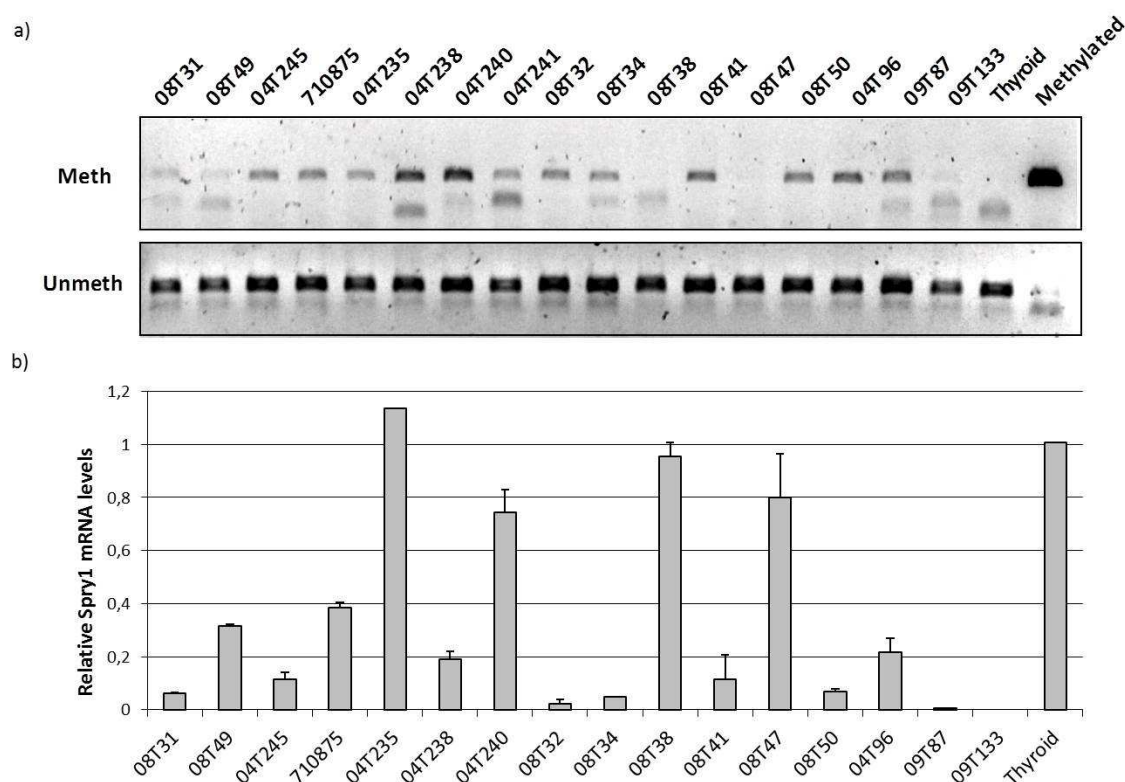


Figura 27: Els MTC humans presenten una metilació del promotor de *Spry1* i una reducció dels seus nivells d'expressió. (a) Anàlisi de metilació del promotor de *Spry1* de 17 mostres de MTC mitjançant una PCR amb primers específics de metilació. Com a control positiu s'inclou DNA genòmic metilat de forma enzimàtica (Methylated). (b) Anàlisi dels nivells de *Spry1* de 16 mostres de MTC mitjançant RT-PCR. Totes les dades s'han normalitzat mitjançant l'expressió de GAPDH. Com a comparació s'utilitza el DNA genòmic i el cDNA d'una tiroide humana (*Thyroid*).

Per confirmar la relació entre la metilació del promotor i els nivells d'expressió de *Spry1*, vàrem tractar les cèl·lules TT amb 5'-Aza-deoxycytidine (5'Aza-dC), un agent que bloqueja el procés de metilació. Tal i com esperàvem, les cèl·lules TT tractades amb 5'-Aza-dC mostren un increment dels nivells de mRNA de *Spry1* de fins a 6 vegades si el comparem amb les cèl·lules control (tractades amb vehicle) (Figura 28a). A més, per tal de comprovar que l'agent hipometilant (5'Aza-dC) havia funcionat, vàrem realitzar PCR amb els mateixos primers específics, comprovant que les cèl·lules tractades no amplifiquen la banda de metilació (Figura 28b).

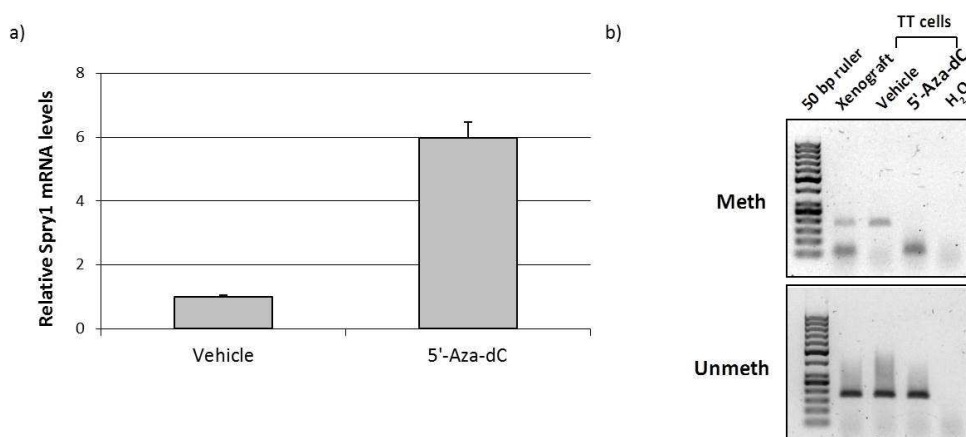


Figura 28: La línia cel·lular TT presenta metilació del promotor i baixos nivells d'expressió de Spry1. (a) RT-PCR dels nivells d'expressió de Spry1 de les cèl·lules TT tractades amb l'agent hipometilant 5'-Aza-dC. (b) PCR amb primers específics de metilació de DNA genòmic de les cèl·lules TT i les tractades amb Aza.

Com a resum d'aquest primer bloc de resultats podem dir que Spry1 s'expressa a les cèl·lules C de la tiroide de ratolí i que la seva deleció desencadena el desenvolupament d'hiperplàsia d'aquestes cèl·lules. L'expressió moderada de Spry1 a la línia cel·lular TT, derivada d'un MTC humà, redueix la proliferació *in vitro* i la capacitat d'aquestes cèl·lules de generar tumors subcutanis *in vivo*. Sorprenentment la reducció de la proliferació no és degut a la inhibició de la senyalització de Ret, sinó degut a l'activació de la senescència cel·lular. Finalment, el promotor de Spry1 es troba freqüentment metil·lat al MTC humà, desencadenant una reducció del nivells d'expressió d'aquesta proteïna. Per tant podem dir que Spry1 és un potencial gen supressor de tumors dels MTC. Els resultats fins aquí mostrats varen estar publicats el 2012 a la revista Oncogene (Macià et al., 2012)

7. ELS RATOLINS *KNOCKOUT* PER *SPROUTY1* PRESENTEN UN AUGMENT DEL TAMANY DE LA GLÀNDULA TIROIDE.

Tal i com hem explicat anteriorment, els ratolins *knockout* per Spry1 presenten hiperplàsia de les cèl·lules C de la tiroide, una lesió precancerosa que precedeix al desenvolupament de MTC. Durant l'anàlisi exhaustiu d'aquest fenotip a les tiroides dels ratolins Spry1^{-/-} de 3 mesos d'edat ens vàrem adonar que aquestes eren mes grans que les dels seus germans *wild-type*. Tot i ser més grans, no presentaven signes de malignitat, sinó una estructura normal i uniforme a nivell macroscòpic (Figura 29a).

Per tal de confirmar aquestes observacions vàrem estimar el volum lobular de les tiroides dels ratolins de 3 mesos mitjançant la fórmula el·lipsoide (Shabana et al., 2006) (detallat al apartat 8.1 de Materials i Mètodes). Tal i com s'observa a la Figura 29b, les tiroides dels ratolins *knockout* són al voltant de tres vegades més grans, que

les tiroides dels germans *wild-type*. A més per tal de corroborar-ho, vàrem mesurar la quantitat total de RNA que vam obtenir dels homogenats de les tiroides, observant que aquesta és més gran en el cas dels homogenats de les tiroides provinents dels ratolins *knockouts* de *Spry1* (Figura 29c).

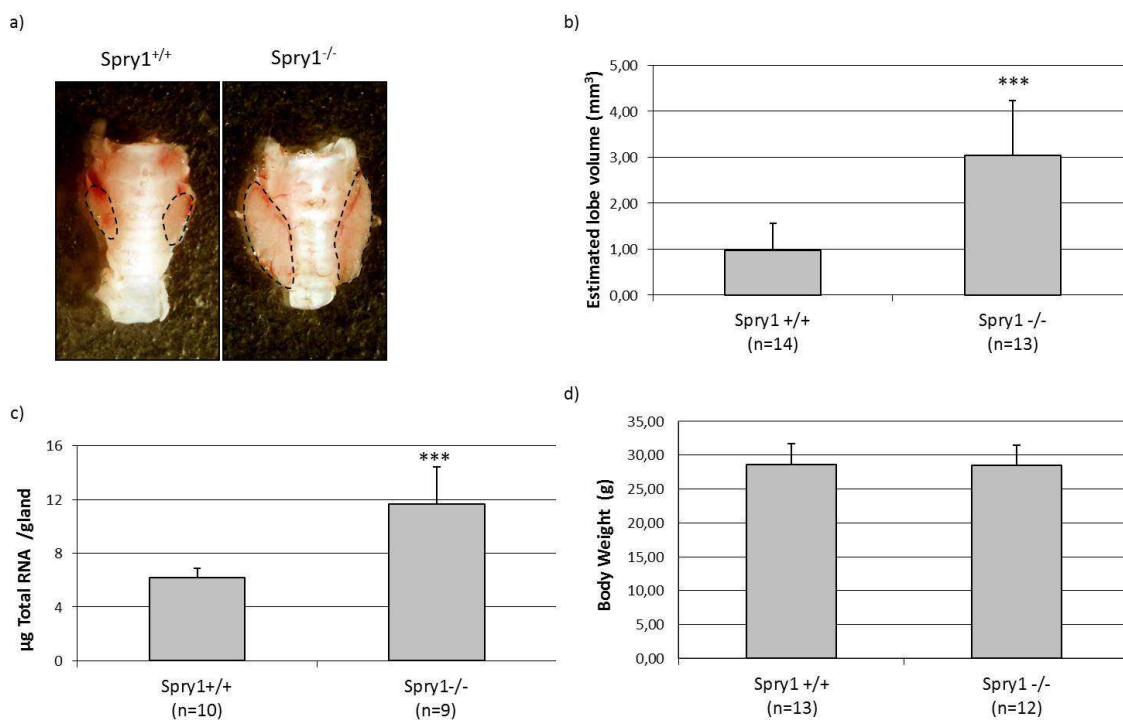


Figura 29: Els ratolins *knockout* per *Spry1* presenten un augment del tamany de la glàndula tiroide. (a) Imatge representativa de la tiroide dels ratolins de 3 mesos d'edat dels genotips indicats. (b) Estimació del volum dels lòbuls de la tiroide mitjançant la fórmula el·lipsoide dels genotips indicats. (c) Quantitat de mRNA obtingut després de l'extracció de la glàndula tiroide. (d) Gràfic del pes dels ratolins *wild-type* i *knockout* per *Spry1* de tres mesos d'edat. *** p<0,001, mitjançant la prova T de Student.

A més, no vam observar diferències en el pes dels ratolins analitzats (Figura 29d). Totes aquestes evidències ens indiquen que l'augment del tamany de la tiroide dels ratolins *knockout* per *Spry1* és específic i no es deu a un sobrecreixement del ratolí.

Per altra banda, si realitzem un estudi histològic de les tiroides dels ratolins *knockout* no observem diferències en l'estructura fol·licular si ho comparem amb la tiroide dels ratolins *wild-type*. Mitjançant tincions d'hematoxilina-eosina (Figura 30a), observem que les cèl·lules es disposen en forma de fol·licles ben ordenats i no presenten cap signe de transformació neoplàsica. Després per tal de caracteritzar el nombre i el tamany dels fol·licles de les tiroides vàrem realitzar un anàlisi morfomètric dels talls histològics de les tiroides mitjançant el *Cell Profiler Software* (Carpenter et al., 2006). Tal i com es mostra a la Figura 30b, la tiroide dels ratolins mutants presenta un increment en el nombre de fol·licles. Però la variabilitat del tamany (àrea) d'aquests

fol·licles es distribueix d'una forma semblant entre els dos genotips estudiats (Figura 30c). Per tant podem dir que l'augment del tamany de la tiroide dels ratolins *Spry1*^{-/-} és degut a un increment del nombre de cèl·lules de la glàndula.

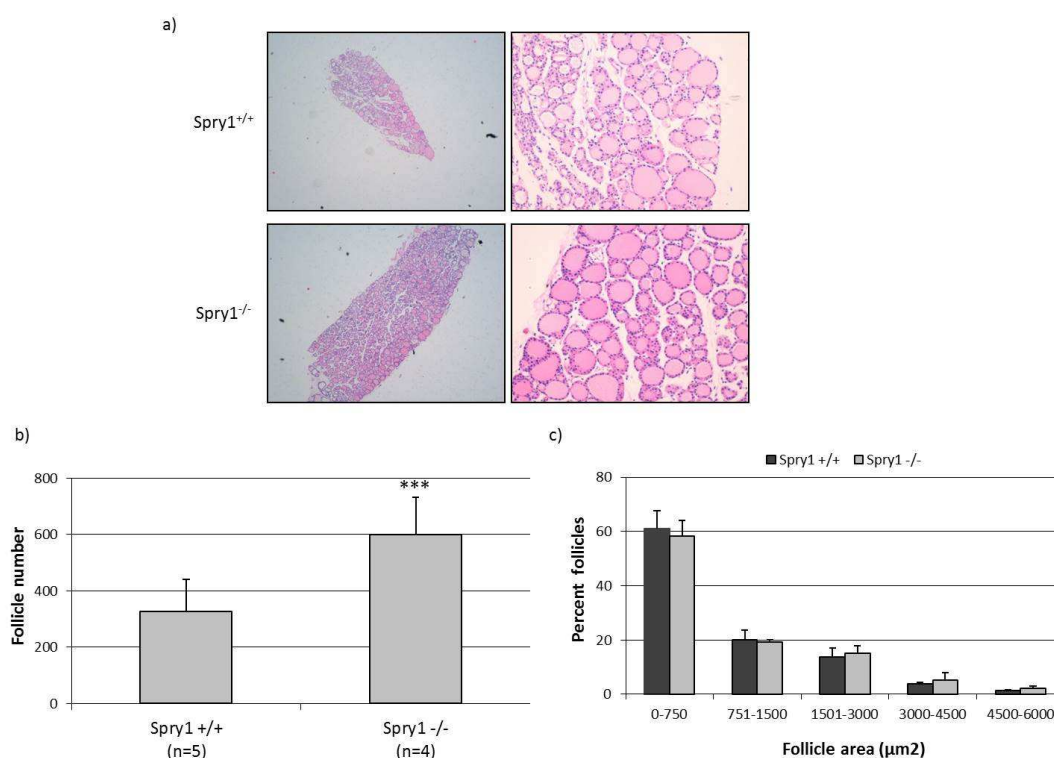


Figura 30: La pèrdua de *Spry1* causa un increment del tamany de la glàndula tiroide. (a) Tinció de Hematoxilina-Eosina de seccions de parafina de tiroides *wild-type* i *knockout* per *Spry1* (4x i 20x). (b) Quantificació del nombre de fol·licles de la glàndula tiroide dels genotips indicats. *** $p < 0,001$, mitjançant prova T de Student. (c) Histograma que ens mostra les freqüències (en percentatge) de les àrees dels fol·licles de les tiroides d'ambdós genotips estudiats.

8. LA PÈRDUA DE SPROUTY1 CAUSA UN AUGMENT DE LA PROLIFERACIÓ DE LES CÈL·LULES FOL·LICULARS DE LA TIROIDE

A continuació vam voler indagar si els efectes observats en l'augment del tamany de la tiroide en els ratolins *Spry1*^{-/-} de tres mesos era degut a un augment de la proliferació de les cèl·lules fol·liculars. En primer lloc, vam realitzar un marcatge immunohistoquímic contra Ki-67, que s'expressa en cèl·lules proliferants (Figura 31b). La Figura 31a ens mostra que les tiroides dels ratolins *knockout* presenten un increment del nombre de cèl·lules positives per Ki-67, indicant un augment en la proliferació de les cèl·lules fol·liculars. Aquest resultat ens suggereix que la pèrdua de Sprouty1 podria ser responsable (almenys parcialment) de l'increment del tamany de la glàndula tiroide.

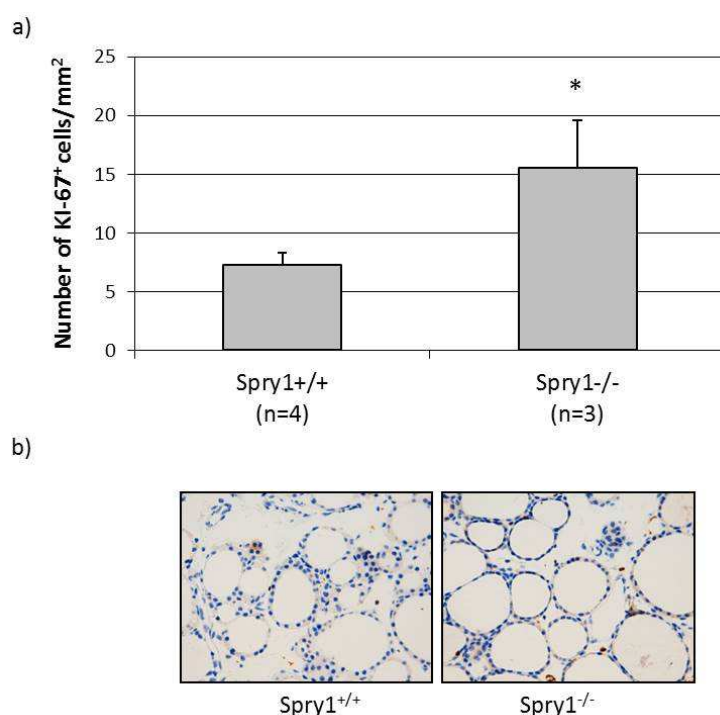


Figura 31: (a) Comptatge del nombre de **cèl·lules positives per ki-67 a la tiroide dels ratolins** de 3 mesos d'edat dels genotips indicats. * $p < 0,05$ analitzat mitjançant prova T de Student. (b) Imatge de la tinció d'immunohistoquímica contra Ki-67 de la glàndula tiroide.

Com ja hem esmentat anteriorment, la TSH és la hormona que regula la funció de la tiroide i controla el creixement d'aquesta, ja que pot induir tant una hiperplàsia com una hipertròfia de la glàndula, a més a més aquesta hormona augmenta o disminueix en funció de les concentracions de les hormones tiroïdals, T3 i T4 a la sang. Per estudiar si l'increment de la proliferació de les cèl·lules fol·liculars de la tiroide és degut a variacions en l'hormona TSH, vam voler analitzar els nivells tant de TSH com de T3 i T4 de sèrums extrets de ratolins *knockout* per *Spry1* i els seus germans *wild-type* mitjançant la tècnica ELISA (Milliplex- Milipore).

Per una banda no vàrem trobar diferències significatives dels nivells de TSH en sèrum, cosa que ens indica que els nivells sistèmics d'aquesta hormona no juguen cap paper en l'augment del tamany de la glàndula tiroide dels ratolins mutants (Figura 32a). Per l'altra banda, els nivells circulants de T3 i T4 van ser pràcticament idèntics entre ambdós genotips (Figura 32b i 32c), cosa que indica que la tiroide dels ratolins *Spry1*^{-/-} té una funció normal, és a dir que els ratolins són eutiroids.

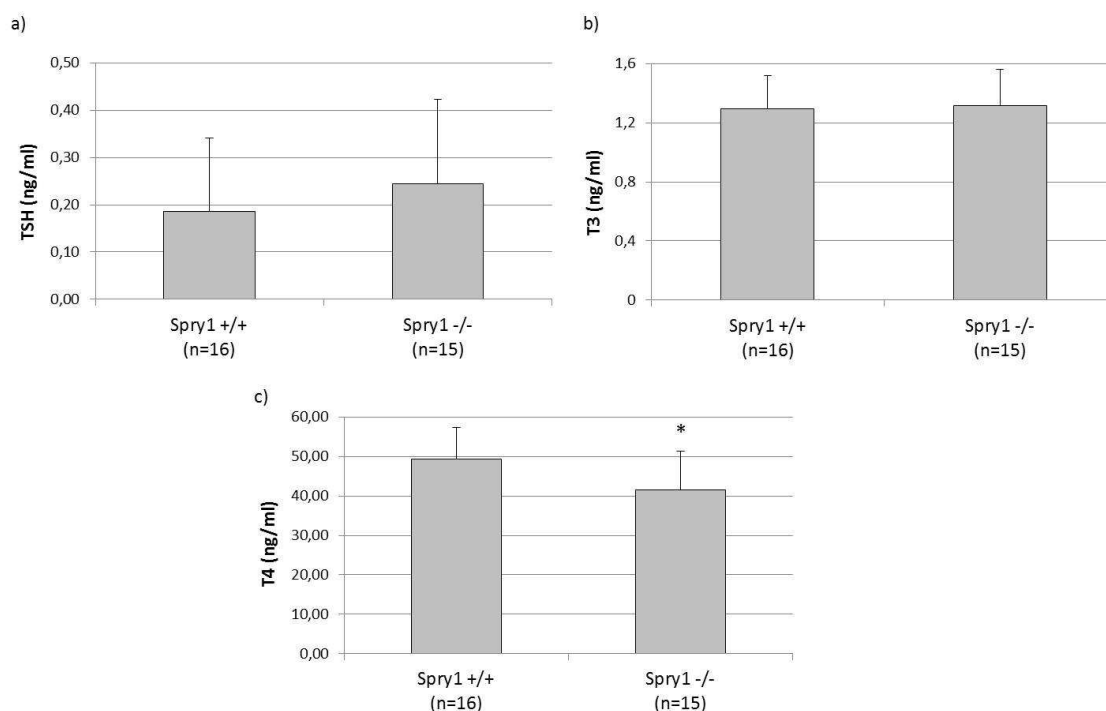


Figura 32: No s'observen diferències dels nivells sistèmics de TSH, T3 i T4 al sèrum dels ratolins *Spry1*^{-/-}. Anàlisi dels nivells de TSH (a), T3 (b) i T4 (c) en mostres de sèrum de ratolins de tres mesos d'edat *wild-type* i *knockout* per *Spry1*

Aquestes evidències i el fet que les tiroïdes dels ratolins de tres mesos presentin alts nivells d'expressió de *Spry1*, si els comparem amb altres òrgans (Figura 13), ens suggereix que *Spry1* pot influir amb la proliferació de les cèl·lules fol·liculars de manera autònoma.

Per comprovar aquesta hipòtesi, vàrem realitzar cultius primaris de tiroide de ratolins d'ambdós genotips i vàrem realitzar experiments de proliferació cel·lular mitjançant el comptatge directe del nombre de cèl·lules en els cultius establerts. Tal i com es mostra a la Figura 33a, les cèl·lules parafol·liculars en cultiu dels ratolins *knockout*, proliferen més ràpid que les provinents dels ratolins *wild-type*. A més a més, si realitzem un assaig de Bromodeoxiuridina (BrdU), observem un increment del nombre de cèl·lules positives per BrdU (Figura 33b). Aquests resultats ens indiquen que l'augment del tamany de la tiroide dels ratolins mutants és degut a un increment de la proliferació de les cèl·lules fol·liculars de forma autònoma.

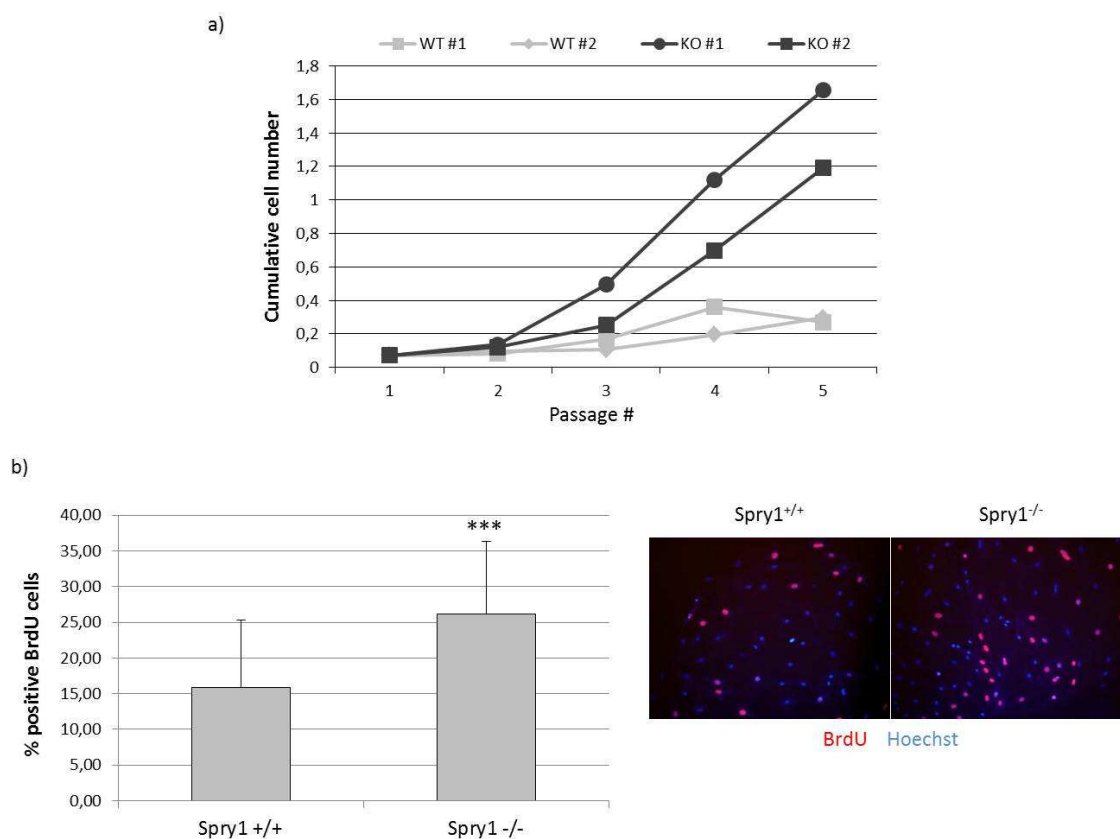


Figura 33: **Spry1** influeix en la proliferació de les cèl·lules fol·liculars *in vitro* de manera autònoma. (a) Corba de proliferació de les cèl·lules de la tiroide en cultiu d'animals *wild-type* (WT) i *knockout* (KO) per **Spry1**. (b) Assaig de proliferació mitjançant el comptatge de les cèl·lules positives per BrdU de les tiroides en cultiu d'ambdós genotips estudiats.

9. LA SUPRESSIÓ DE SPROUTY1 NO INDUEIX LA FOSFORILACIÓ DE LES PROTEÏNES MAPK ERK

Tal i com s'ha explicat a la introducció, les proteïnes de Sprouty es consideren inhibidors de la senyalització dels RTK, i de forma més específica de la via de senyalització de les MAPK ERK, tot i que s'han observat algunes excepcions molt ben documentades. A més, s'ha descrit que l'activitat de les proteïnes ERK està molt relacionada amb la proliferació tant *in vivo* com *in vitro* en una gran quantitat de sistemes diferents. Per tant, la hipòtesi més evident per tal d'explicar les nostres observacions podria ser que les cèl·lules fol·liculars de les tiroides dels ratolins mutants són més sensibles als mitògens degut a un hiperactivació de la senyalització per ERK.

Per tant vàrem analitzar l'estat de la via de senyalització de les ERK en les cèl·lules fol·liculars de la tiroide tant *in vivo* com en cultius *in vitro*. Mitjançant homogenats proteics de tiroides vàrem analitzar els nivells de les proteïnes ERK1/2 fosforil·lades i els vam quantificar mitjançant densitometria. Sorprenentment, no vàrem trobar un

increment de la fosforilació de les ERK a les tiroides del ratolins *knockout* per *Spry1*, tal i com esperaríem trobar d'un inhibidor de la via. Si ens fixem amb la Figura 34a, observem que no hi ha diferències entre els mutants i el *wild-type*, si més no, es mostra una lleugera disminució de la fosforilació de les ERK a les tiroides mutants, fet que ens recorda als mateixos resultats observats quan sobreexpressavem *Spry1* a la línia cel·lular derivada d'un MTC (Figura 24a). Pel que fa a les cèl·lules fol·liculars *in vitro*, tampoc s'observa cap diferència en la fosforilació de les ERK entre ambdós genotips (Figura 34b). Per tant podem suggerir que el creixement de la tiroide dels ratolins *knockout* per *Spry1* no és degut a una hiperactivació de la via de les MAPK ERK.

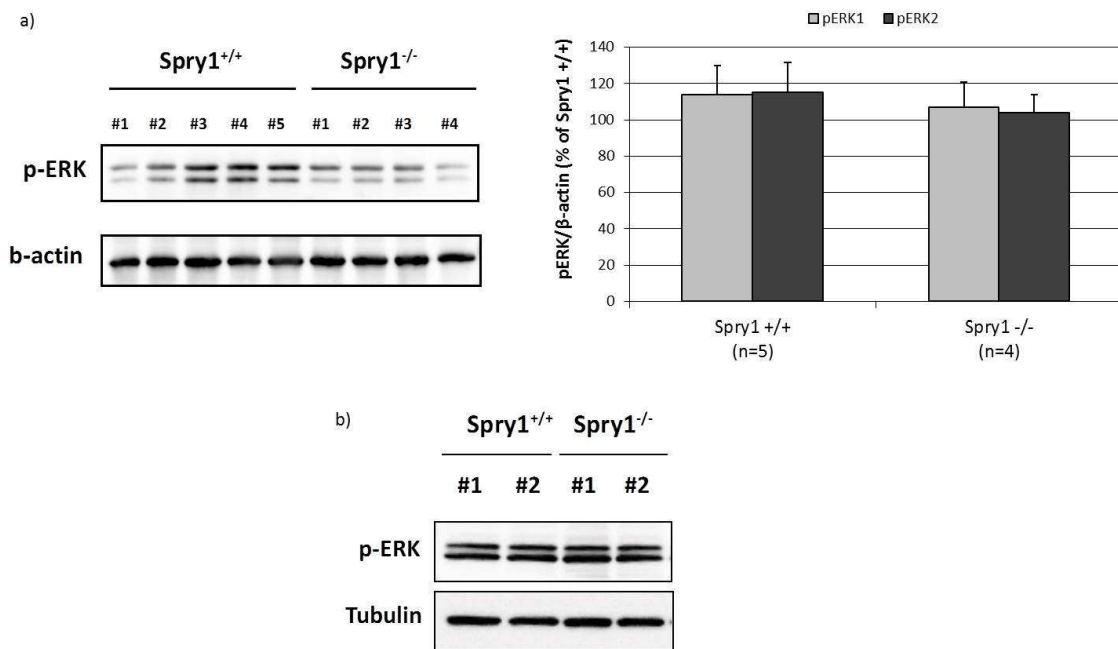


Figura 34: La supressió de *Spry1* no induïx la fosforilació de les proteïnes ERK. Anàlisi mitjançant Western Blot dels nivells de fosforilació de les proteïnes ERK1/2 (a) de les tiroides de ratolins *wild-type* i *knockout* de *Spry1* i (b) de cultius *in vitro* de tiròcits d'ambdós genotips.

10. SPROUTY1 ACTIVA LA FOSFORIL·LACIÓ DE STAT3 A LA TIROIDE

Al no observar un increment de la fosforilació de les proteïnes ERK a la tiroide dels ratolins *knockout* per *spry1*, sinó que inclús una possible disminució de la fosforilació d'aquest proteïnes, vàrem voler analitzar l'estat de fosforilació d'altres vies de senyalització activades pels RTK on Sprouty hi pot tenir un paper rellevant. Com ja s'ha comentat a la introducció, Sprouty2 regula negativament la PI3K/Akt al sistema nerviós entèric i a la pròstata, tot i que se'n desconeix el mecanisme molecular (Patel et al., 2013; Taketomi et al., 2005). Per tant, podria ser que Sprouty1 tingués un paper rellevant amb la regulació de la via PI3K/Akt a la tiroide. Mitjançant immunoblots contra p-AKT d'extractes proteics de diferents tiroides agrupades de cada genotip, no

observem diferències en la fosforilació d'aquesta proteïna, el mateix que ens succeeix amb les ERK (Figura 35). Després, vam voler analitzar els nivells proteics de Pten, una fosfatasa que regula l'activitat de la via PI3K inhibint la fosforilació de la Akt. Tot i que en el nostre model, Sprouty1 no regula la fosforilació de la Akt, un estudi recent suggereix que Sprouty2 modula els nivells i l'activitat de Pten *in vitro* (Edwin et al., 2006). Tot i així, com es pot observar a la Figura 35, els nivells proteics de Pten són iguals a la tiroide d'ambdós genotips.

Al no observar cap alteració de les proteïnes ERK ni AKT, vàrem voler analitzar altres vies de senyalització implicades en la proliferació cel·lular i on Sprouty1 hi pot jugar un paper important. En primer lloc vam analitzar la proteïna PLC γ , donat que un estudi recent indica que existeix una interacció entre la fosfolipasa PLC γ i Spry1 o Spry2. Aquesta interacció provoca la disminució de la fosforilació i activitat de PLC γ , provocant la inhibició de la cascada de senyalització intracel·lular dependent de calci (Akbulut et al., 2010). Per altra banda, també vam voler analitzar la proteïna Src, una proteïna serina-treonina cinasa important per la regulació de la senyalització induïda per múltiples RTK. Src s'uneix a Sprouty i l'activa fosforil·lant el residu de tirosina conservat del domini N-terminal, així Spry pot inhibir la senyalització dels RTK (Li et al., 2004; Mason et al., 2006). Mitjançant la tècnica de Western blot no vam poder detectar la fosforil·lació de les proteïnes PLC γ ni Src a la tiroide dels ratolins Spry1^{+/+} i Spry1^{-/-} (Figura 35). Per tant no podem saber si la fosforil·lació d'aquestes proteïnes està afectada o no per la pèrdua de Sprouty1.

Finalment, vam decidir analitzar altres vies de senyalització involucrades en la regulació de la senyalització per RTKs. El receptor EGFR és un activador de senyals mitogèniques de les cèl·lules fol·liculars. S'ha descrit que la localització citoplasmàtica i nuclear tant del EGF com del receptor (EGFR) juguen un paper en la proliferació cel·lular i la formació tumoral de la tiroide *in vivo* (Marti et al., 2001). També s'ha descrit que si s'inhibeix el receptor EGFR en una línia cel·lular de tiroide de rata es redueix la fosforil·lació de les proteïnes ERK *in vitro* (Elia et al., 2005). Per altra banda, s'ha descrit que el EGFR activa la via de senyalització via STAT3. La proteïna STAT3 és un factor de transcripció situat al citoplasma, s'activa mitjançant la fosforilació d'un residu de tirosina que causa la dimerització i la translocació al nucli de la cèl·lula per actuar com a factor de transcripció. Gràcies a la interacció de EGF amb el seu receptor, es fosforil·len uns residus de tirosina del domini C-terminal del EGFR, on s'uniran les proteïnes STAT3 que es fosforil·laràn i s'activaran per promoure la senyalització intracel·lular (Gao et al., 2007; Shao et al., 2003). Per altra banda també s'ha descrit que

mutacions oncogèniques de Ret activen la proteïna STAT3 regulant l'expressió de diversos gens intracel·lulars (Hwang et al., 2003). La proteïna STAT3 està implicada en promoure la supervivència i el creixement cel·lular i facilitar l'aparició d'angiogènesi i metàstasi en diversos càncer. La fosforil·lació de STAT3 s'observa a les cèl·lules tumoral d'una gran varietat de neoplàsies com el càncer de pròstata, pell, ovari, pulmons i en metàstasis de càncer de tiroide i de mama entre d'altres (Chen et al., 2013; Gao et al., 2007; Mora et al., 2002; Pedranzini et al., 2004; Yue et al., 2012; Zhang et al., 2011) Tot i així, la funció pro-tumoral de STAT3 s'ha vist qüestionada per certs estudis on s'ha descrit que la fosforilació de STAT3 pot tenir un paper com a supressor de tumors al càncers de tiroide i al glioblastoma (Couto et al., 2012; de la Iglesia et al., 2008b; Kim et al., 2012). Aquest mecanisme dual fa pensar que l'activació de STAT3 pot jugar una paper pro o anti-tumoral depenent del context genètic del teixit analitzat.

Per tot això, vam voler analitzar la fosforil·lació de STAT3 a la tiroide dels ratolins mutants. En el nostre model, observem que la tiroide dels ratolins *wild-type* presenten el residu Tyr705 de STAT3 fosforil·lat i per tant ens indica que la proteïna està activa. En canvi a la tiroide dels ratolins *knockout* per *Spry1* observem que desapareixen completament els nivells de fosforilació de STAT3, indicant que la pèrdua de *Sprouty1* fa disminuir l'activació d'aquesta proteïna a la tiroide (Figura 35).

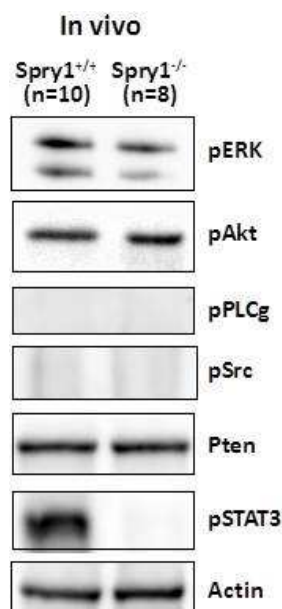


Figura 35: La pèrdua de *Sprouty1* a la tiroide dels ratolins inhibeix la fosforilació de la proteïna STAT3. Western blot de lisats proteics de tiroïdes de tres mesos dels genotips indicats, on no s'observen diferències en la fosforilació de les proteïnes ERK, Akt, PLCγ, Src ni diferències en els nivells de Pten. En canvi es mostra la manca de fosforilació de les proteïnes STAT3 a la tiroide dels ratolins *Spry1*^{-/-}.

11. LA PÈRDUA DE SPROUTY1 A LA TIROIDE DELS RATOLINS INHIBEIX L'EXPRESSIÓ I LA SECRECIÓ D'IL-6.

La proteïna STAT3 s'activa en resposta als receptors de citocines com ara la IL-6, el lligand canònic (Berishaj et al., 2007; Gao et al., 2007). La IL-6 és una interleucina que regula la resposta immunològica, la hematopoiesis i la inflamació. Per tal d'activar totes aquestes respostes biològiques la IL-6 s'uneix amb dues molècules, el IL-6R (receptor de IL-6) i la proteïna gp130. El IL-6R és un polipèptid unit a la membrana plasmàtica que quan s'hi uneix la IL-6 desencadena la homodimerització amb la proteïna gp130, una glicoproteïna de superfície citoplasmàtica, per tal de formar un tricomplex d'alta afinitat. La homodimerització d'aquest complex receptor activa les proteïnes JAK (*Janus Kinases*), les quals fosforil·laràn els residus de tirosina del domini citoplasmàtic de la proteïna gp130 (Mihara et al., 2012). Aquesta fosforil·lació permetrà la unió de les proteïnes STAT (particularment STAT3) al receptor, cosa que provocarà la fosforil·lació i dimerització de les STAT3 que actuaran com a factors de transcripció activant l'expressió gènica.

Per tant en primer lloc vàrem voler analitzar si les tiroïdes en cultiu dels ratolins *wild-type* i *Spry1*^{-/-} eren capaces d'activar la via JAK-STAT en resposta a IL-6. Tal i com s'observa a la Figura 36a, quan estimulem les cèl·lules fol·liculars amb 50ng/ml de IL-6 durant 10minuts s'observa fosforilació de la Tyr705 de STAT3 a nivells similars entre els dos genotips estudiats, és a dir, que les tiroïdes dels ratolins *knockout* per *Spry1* són capaces d'activar la via JAK/STAT3 si es subministra IL-6 de forma exògena.

Donat que *Spry1* no és necessari per a l'activació de STAT3 a les cèl·lules fol·liculars en resposta a un estímul de IL-6, vam voler analitzar si la manca de fosforil·lació de STAT3 observada a la tiroide dels ratolins *knockout* és deguda a una disminució de la disponibilitat dels lligands activadors d'aquesta proteïna.

S'ha descrit que les cèl·lules fol·liculars de la tiroide són immunoreactives a interleucina 6 (IL-6) *in vivo* i que són capaces de sintetitzar i secretar IL-6 *in vitro* (Basolo et al., 1998; Couto et al., 2012; Weetman et al., 1990; Zheng et al., 1991). A més, s'ha publicat que la disminució de l'expressió de IL-6 pot ser un marcador pel carcinomes no diferenciats de la tiroide (Basolo et al., 1998).

Per tant en segon lloc vam voler analitzar els nivells d'expressió de IL-6 a la tiroide dels ratolins *in vivo*. A la Figura 36b observem que els nivells relatius de mRNA d'aquesta interleucina estan reduïts prop d'un 80% a la tiroide dels ratolins *knockout*, si els comparem amb els nivells de mRNA de la tiroide dels ratolins *wild-type* (*Spry1*^{+/+}).

Finalment, per correlacionar la disminució de l'expressió de IL-6 a la tiroide amb la secreció d'aquesta per les cèl·lules fol·liculars, vam analitzar els nivells de IL-6 del medi de cultiu de les tiroides de ratolins de tres mesos d'edat. Com es mostra a la Figura 36c, el medi de cultiu de les cèl·lules fol·liculars *Spry1*^{-/-} presenta una concentració més baixa de IL-6 si la comparem amb el medi de les tiroides dels ratolins *wild-type*, fet que ens indica que secreten menys IL-6 al medi.

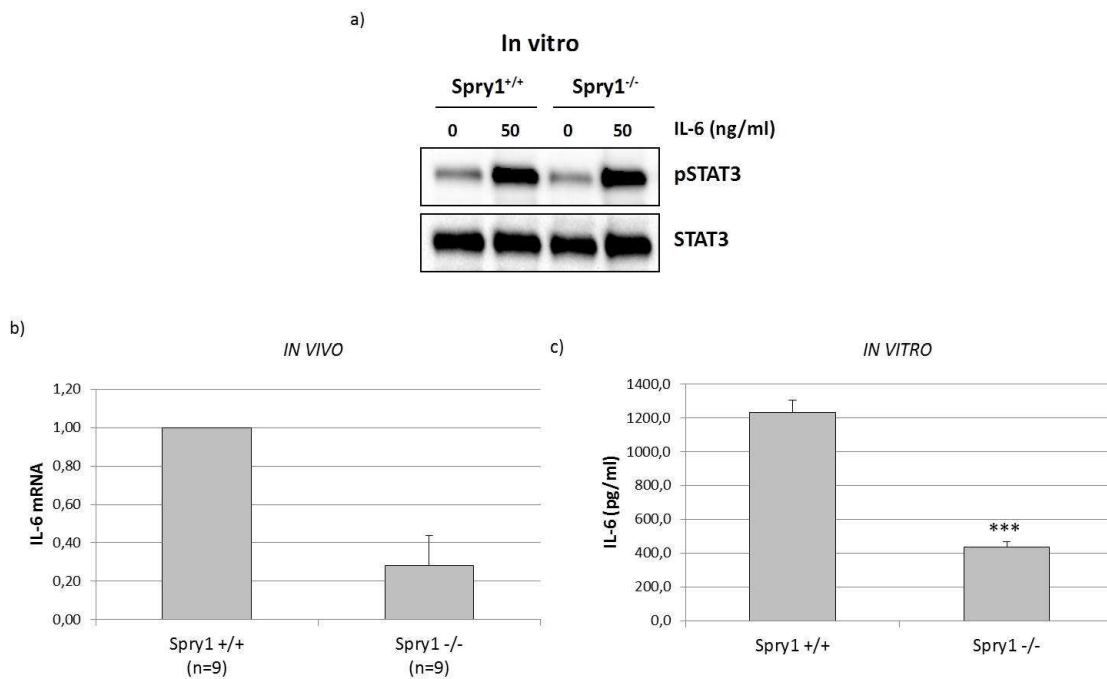


Figura 36: La IL-6 activa la fosforilació de les proteïnes STAT3 en cultius primaris de tiroide de ratolí. a) Western blot que ens mostra els nivells de fosforilació de la proteïna STAT3 quan s'estimulen les cèl·lules de la tiroide *in vitro* amb IL-6. La tiroide dels ratolins *Spry1*^{-/-} presenta una disminució dels nivells d'expressió i secreció de IL-6. (b) Resultats de la RT-PCR, que ens mostra els nivells relatius de mRNA de IL-6 de les tiroides dels ratolins analitzats. (c) Anàlisi mitjançant ELISA dels nivells de IL-6 secretats al medi de cultiu per les cèl·lules fol·liculars de les tiroides del ratolins de tres mesos d'edat d'ambdós genotips.

A continuació vam voler analitzar la contribució de la IL-6 secretada per les cèl·lules fol·liculars amb la fosforil·lació de la STAT3. Vàrem incubar les cèl·lules de les tiroides *wild-type* amb anticossos bloquejants contra IL-6 i contra el seu receptor (IL-6R) durant 48 hores. Si ens fixem amb l'immunoblot de la Figura 37a, els anticossos bloquejants provoquen una disminució de la fosforilació de la proteïna STAT3. Per tant podem concloure que la IL-6 secretada per les cèl·lules fol·liculars és un dels lligands principals de l'activació de la via JAK/STAT3 a la tiroide, constituint un *loop* autocrí. Tot i així, la disminució de la fosforilació de la STAT3 no és total, tot i que les concentracions d'anticòs bloquejant utilitzades són capaces de neutralitzar tota la IL-6 present al medi de cultiu (Figura 37b). Per tant probablement altres lligands secretats per les cèl·lules fol·liculars poden estar activant també aquesta via de senyalització.

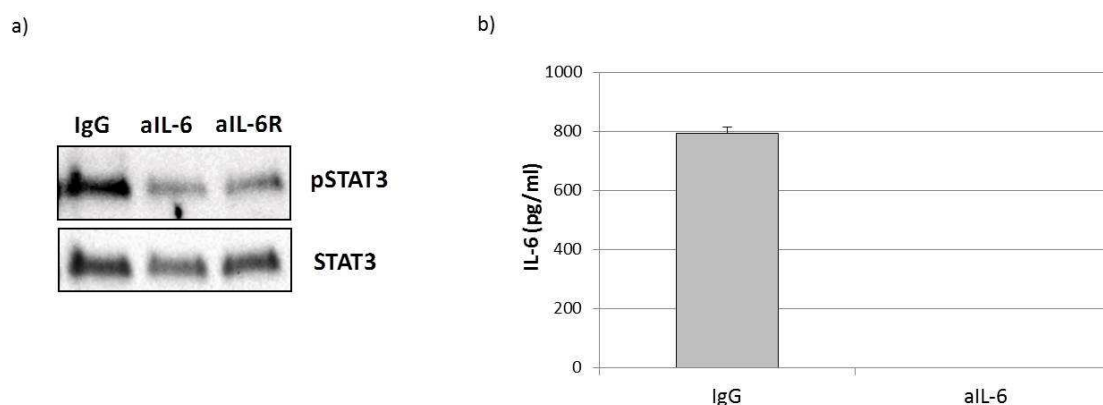


Figura 37: **La IL-6 és el lligand principal de l'activació de la via JAK/STAT3 a la tiroide.** (a) Western blot que ens mostra la disminució de la fosforilació de la proteïna STAT3 quan s'incuben les cèl·lules fol·liculars de la tiroide amb anticossos bloquejants de la IL-6 i el seu receptor. (c) Anàlisi, mitjançant ELISA, dels nivells de IL-6 secretats al medi de cultiu de tirocits quan s'utilitzen anticossos bloquejats contra IL-6.

En resum podem dir que la tiroide dels ratolins *knockout* per *Sprouty1* presenta una disminució tant de l'expressió com de la secreció d'IL-6. La manca d'IL-6 desencadena la inhibició de la fosforilació de les proteïnes STAT3, fet que podria ser responsable de l'increment de la proliferació de les cèl·lules fol·liculars de la tiroide (veure Discussió).

12. LA PÈRDUA DE SPROUTY1 A LA TIROIDE DELS RATOLINS INHIBEIX LA SECRECIÓ DE KC AL MEDI DE CULTIU I L'EXPRESSIÓ DE IGFBP7.

Com s'ha explicat a la introducció, una de les característiques de les cèl·lules senescentes és l'increment de la producció de diverses proteïnes secretades, que desencadenen múltiples efectes tant autocrins com paracrins. Així, el fenotip secretor associat a la senescència cel·lular o SASP, inclou la secreció de proteases, factors de creixement (IGFBP), citocines pro-inflamatòries (IL-6, IL1 α) o quemocines (IL-8, CXCL1).

A més, tal i com hem demostrat anteriorment, quan sobreexpressem *Spry1* a la línia cel·lular TT, derivada d'un Carcinoma Medul·lar de Tiroide, observem una disminució de la proliferació cel·lular i un increment dels marcadors de senescència cel·lular. Amb aquests indicis que ens relacionen *Sprouty1* amb la senescència cel·lular i la secreció de IL-6, vam voler analitzar si l'increment de IL-6 observat a les tiroides *wild-type* forma part d'un fenotip secretor associat a la senescència cel·lular.

Utilitzant un *array* d'anticossos de citocines pro-inflamatòries vam analitzar un conjunt de factors secretats al medi de cultiu de les cèl·lules fol·liculars dels ratolins *knockout* per *Sprouty1* i ho vàrem comparar amb el medi de cultiu de les tiroïdes *wild-type*. Només vam poder detectar 18 factor que ens donaven un senyal per sobre del *background*. La gran majoria dels factors detectats no varien entre genotips excepte la IL-6, KC, MIP-2, MIP-1 γ , RANTES i sTNFRII, on es detecta una disminució dràstica dels seus nivells al medi de cultiu de les tiroïdes dels ratolins *Spry1*^{-/-} (Figura 38a). Totes aquestes citocines pro-inflamatòries que disminueixen a la tiroide dels ratolins mutants formen part del fenotip secretor SASP (Acosta et al., 2008; Chien et al., 2011; Coppe et al., 2008; Freund et al., 2010; Jing et al., 2011; Kuilman et al., 2008; Rodier et al., 2009).

Per altra banda s'han descrit els factors IGFBP3, 5, 6 com a proteïnes involucrades amb la senescència cel·lular, però a l'*array* d'anticossos utilitzat no vam aconseguir que ens donés una senyal per sobre del *background*. Finalment, vam voler analitzar els nivells relatius de mRNA de IGFBP7, un altre factor involucrat amb la senescència cel·lular (Wajapeyee et al., 2008), observant que aquests són inferiors a les tiroïdes dels ratolins mutants (Figura 38b). Per tant és possible que altres factors secretats per les cèl·lules senescentes puguin influenciar amb el creixement de les cèl·lules fol·liculars.

Degut que els *arrays* d'anticossos són tècniques semiquantitatives vam voler analitzar els nivells de KC mitjançant la tècnica de ELISA, per tal de corroborar els resultats observats. La IL-8, juntament amb la IL-6, són probablement els factors SASP millor estudiats. Donat que a rosegadors el gen de la IL-8 està delectat, vam voler corroborar els nivells de KC (*Keratinocyte chemoattractant*, coneguda com a Gro- α a humans o CXCL1), considerat l'homòleg funcional de la IL-8 a ratolí. S'ha descrit que la proteïna KC és un potent factor per la inducció i el manteniment de la senescència cel·lular i interacciona amb el receptor CXCR2, el mateix receptor que la IL-8 (Acosta et al., 2008; Maxwell et al., 2012; Terkeltaub et al., 1998; Yang et al., 2006).

Com es pot veure a la Figura 38c, el medi de cultiu de les cèl·lules fol·liculars dels ratolins *Spry1*^{-/-} conté menys KC que el medi de les cèl·lules dels ratolins *wild-type*. Fet que correlaciona amb els resultats observats amb l'*array* d'anticossos (Figura 38b).

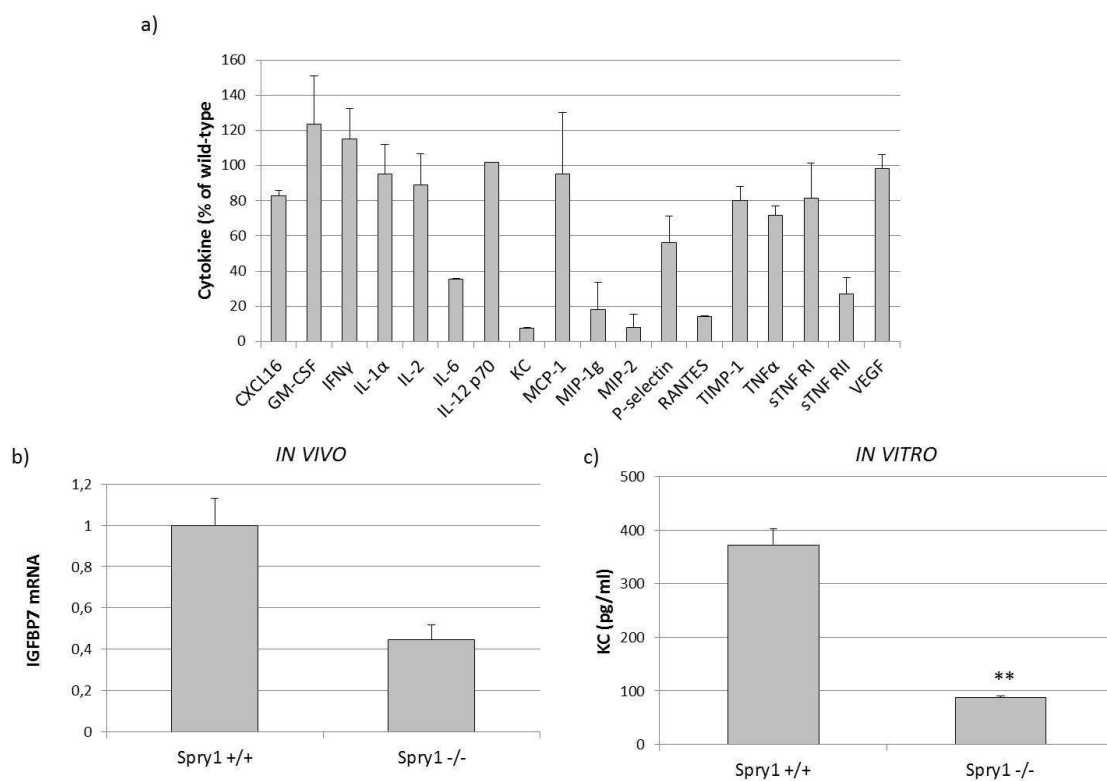


Figura 38: La pèrdua de Sprouty1 a les cèl·lules fol·liculars *in vitro* provoca una disminució dels nivells d'expressió de IGFBP7 i una disminució de la secreció de KC al medi de cultiu. (a) Resultats del *array* d'anticossos de citocines pro-inflamatòries. Els resultats es mostren segons el percentatge (%) de senyal que s'observa respecte la senyal de la tiroide *wild-type*. En aquest gràfic només es mostren les citocines que van donar una senyal per sobre del *background*. (b) Anàlisi dels nivells relatius de mRNA de IGFBP7 per mitjà de RT-PCR, on observem una disminució dels nivells a les tiroides dels ratolins Spry1^{-/-}. (c) Anàlisi mitjançant ELISA dels nivells de KC secretats al medi de cultiu per les cèl·lules fol·liculars de les tiroides del ratolins de tres mesos d'edat.

En resum, totes aquestes dades suggereixen que Sprouty1 és necessari per la síntesi i secreció de citocines proinflamatòries importants per a la generació del fenotip secretor associat a la senescència cel·lular a la glàndula tiroide.

13. LES CÈL·LULES FOL·LICULARS DE LA TIROIDE DELS RATOLINS *KNOCKOUT* PER *SPROUTY1* MOSTREN UNA DISMINUCIÓ DELS MARCADORS DE SENESCÈNCIA CEL·LULAR.

Per tal d'analitzar si les cèl·lules fol·liculars de la tiroide presenten altres marcadors de senescència cel·lular, vàrem realitzar l'assaig de l'activitat β -galactosidasa (SA- β -gal) en talls de criostat de tiroides *wild-type* i de tiroides de ratolins *Spry1*^{-/-} de 3 mesos d'edat. Tal i com es mostra a la Figura 39a, pràcticament totes les cèl·lules fol·liculars dels ratolins *wild-type* són positives per l'activitat SA- β -gal, mentre que a les tiroides dels ratolins mutants s'hi observa una minoria de cèl·lules positives amb una tinció més dèbil. Enlloc de realitzar un comptatge individual de les cèl·lules positives, vàrem mesurar si la tiroide en el seu conjunt és positiva o negativa per l'activitat SA- β -gal.

Al realitzar l'assaig vàrem observar que la gran majoria de les tiroides dels animals *wild-type* són positives mentre que les tiroides dels mutants són majoritàriament negatives per l'activitat SA- β -gal (Figura 39b).

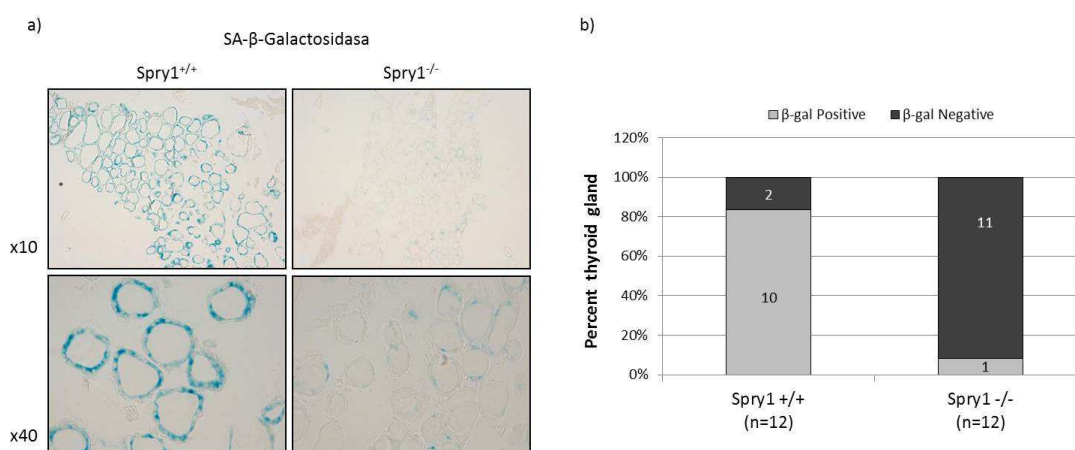


Figura 39: Les cèl·lules fol·liculars dels ratolins *wild-type* són positives per l'activitat SA- β -gal. (a) Imatge de la tiroide d'un ratolí del genotip indicat després d'haver realitzat l'activitat β -galactosidasa associada a la senescència cel·lular. (b) Quantificació del nombre de tiroides positives i negatives per l'activitat SA- β -gal tant de tiroides *Spry1*^{+/+} com tiroides *Spry1*^{-/-}.

A més a més, vam voler analitzar altres marcadors específics associats a la senescència, com els gens expressats del locus CDKN2A, p16INK4a i P19ARF. Mitjançant RT-PCR, vam mesurar els nivells relatius de mRNA d'aquests dos inhibidors del cicle cel·lular a les tiroides dels ratolins d'ambdós genotips. Tal i com s'observa a la Figura 40a, no hi ha diferències en els nivells de p16INK4a entre els dos grups, en canvi els nivells de mRNA de p19ARF disminueixen significativament en el conjunt de totes les tiroides dels ratolins mutants (Figura 40b), encara que vàrem observar certa heterogeneïtat entre els animals d'un mateix grup. Per altra banda, gràcies a extractes proteics de

tiroides, es va poder confirmar la disminució dels nivells de la proteïna p19ARF a les tiroide dels ratolins *Spry1*^{-/-} (Figura 40c).

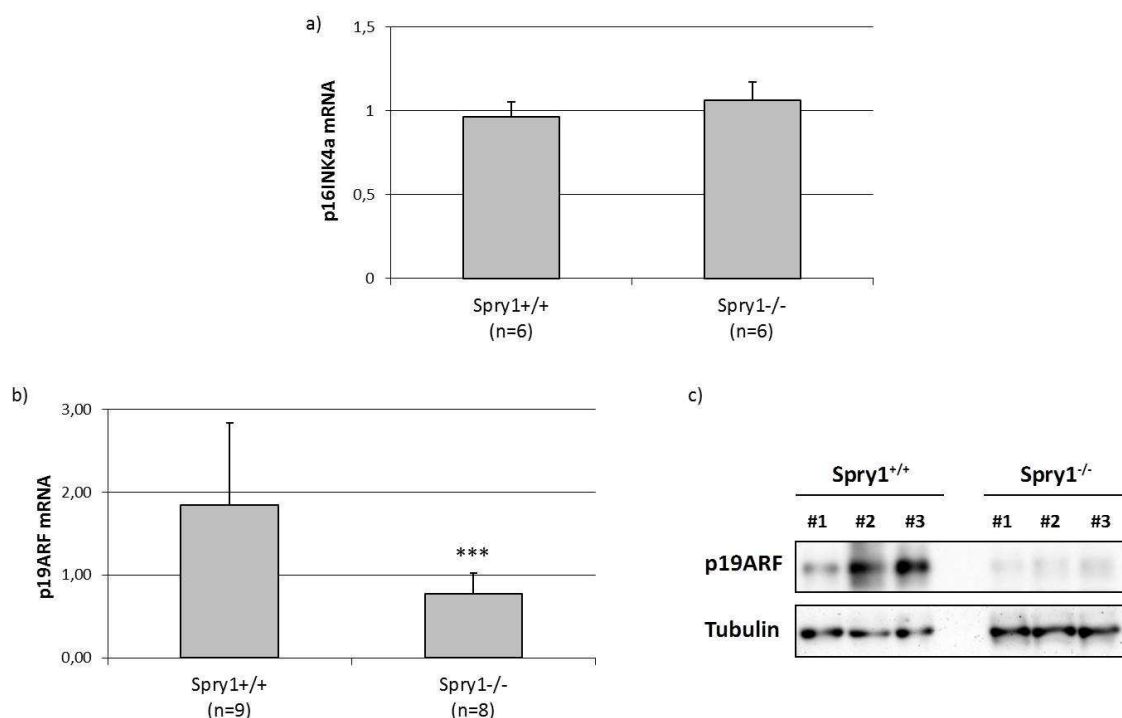


Figura 40: Els nivells de P19ARF disminueixen a les tiroides dels ratolins *Spry1*^{-/-}. (a) RT-PCR dels nivells relatius de mRNA de p16INK4a i de (b) p19ARF de les tiroides de ratolins *Spry1*^{+/+} i *Spry1*^{-/-}. *** p<0,001 mitjançant prova T Student. (c) Anàlisi mitjançant Western Blot dels nivells proteics de p19ARF de les tiroides d'ambdós genotips.

Amb tots aquests resultats podem suggerir que Sprouty1 és necessari per la inducció de la senescència cel·lular a la tiroide. Aquest fet es dedueix perquè les cèl·lules de la tiroide *wild-type* presenten marcadors de senescència com un baix índex de proliferació (Ki-67), augment de l'activitat SA-β-Gal, i p19ARF, a més d'activar la síntesi de diverses citocines pro-inflamatòries, com IL-6 i KC, les quals formen part del fenotip SASP. Tot i així, en aquest punt, no podem saber si el SASP és la causa o la conseqüència de la senescència cel·lular a la tiroide.

14. SPROUTY1 REGULA LA SÍNTESI DE IL-6 I KC MITJANÇANT L'ACTIVACIÓ DE LA VIA NF-KB.

Després d'analitzar tots els resultats descrit fins aquest punt, la pregunta que ens vam plantejar va ser quin podria ser el mecanisme de senyalització iniciat per Sprouty1 per tal d'activar la senescència cel·lular a la tiroide dels ratolins.

Durant els últims anys, s'han investigat i examinat els mecanismes de senyalització que regulen la senescència cel·lular. Actualment s'ha descrit que els supressors tumorals p53 i pRB estan implicats en l'activació de la senescència cel·lular mitjançant l'aturada

del cicle cel·lular però no indueixen SASP (Campisi, 2005; McDuff and Turner, 2011). En canvi, diverses publicacions han descrit que els factors de transcripció NF- κ B i C/EBP β són els reguladors principals del fenotip secretor associat a la senescència cel·lular (Acosta et al., 2008; Burgess, 2011; Chien et al., 2011; Crescenzi et al., 2011; Hardy et al., 2005; Jing et al., 2011; Kuilman et al., 2008; Orjalo et al., 2009; Rovillain et al., 2011; Salminen et al., 2012). Tots dos factors de transcripció regulen l'estrès cel·lular i les senyals inflammatòries, la senyalització via NF- κ B regula el sistema immunològic adaptatiu i innat i el C/EBP β actua com a co-regulador transcripcional de la resposta inflammatòria (Lu et al., 2009; Vallabhapurapu and Karin, 2009). Sembla ser que existeix una cooperació entre les vies de senyalització de NF- κ B i C/EBP β per regular la resposta inflammatòria (Cappello et al., 2009).

El NF- κ B és un complex proteic que controla la transcripció de diferents gens. Existeixen cinc factors de transcripció que formen part del complex NF- κ B en mamífers: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) i p52/p100 (NF- κ B2). Els complexos NF- κ B són dímers de proteïna que es troben inactivats quan es mantenen segregats al citoplasma degut a la unió d'una proteïna de la família dels inhibidors κ B (I κ B). Aquesta via de senyalització s'activa mitjançant productes bacterials, citocines, expressió de gens virals, factors de creixement o altres estímuls d'estrès. Un cop activada la via el tricomplex de les proteïnes cinases IKKs (IKK α , IKK β , IKK γ) fosforil·len la proteïna I κ B provocant la seva degradació pel proteasoma. En aquets punt, el complex p65/p50 que queda lliure al citoplasma i es transloca cap al nucli, on actuarà com a factor de transcripció activant la síntesi de diversos gens implicats en una resposta immune i inflammatòria (Wan and Lenardo, 2009). D'altra banda, s'ha descrit que la IL-1 α és una interleucina essencial per l'activació del fenotip secretor associat a la senescència cel·lular. Aquesta citocina activa la síntesi i secreció de les citocines pro-inflamatòries IL-6 i IL-8, necessàries per activar i mantenir la senescència cel·lular (Apte et al., 2006; Orjalo et al., 2009). A més a més, la interacció de la IL-1 α amb el receptor d'IL-1 (IL-1R) estimula l'expressió de IL-6/IL-8 a través de l'activació dels factors de transcripció de la via NF- κ B (Freund et al., 2010; Kimura et al., 1998; Orjalo et al., 2009)

Com que no vam observar diferències en els nivells de IL-1 α entre les tiroïdes WT i KO al *array* d'anticossos, però sí en els nivells de IL-6 i KC (Figura 38a), vam voler analitzar si Spry1 modula la síntesi de IL-6 i KC per sota de IL-1 α . En primer lloc vam analitzar si la IL-1 α activa o indueix la síntesi de IL-6 i KC a les tiroïdes del ratolins. Primer vam estimular les cèl·lules fol·liculars de la tiroïde dels ratolins *wild-type* amb 50ng/ml de IL-1 α durant 24h amb medi deprivat de TSH i sèrum i després vam analitzar el medi de

cultiu mitjançant ELISA. Com es mostra a la Figura 41a, l'estimulació de IL-1 α provoca la secreció tant de IL-6 com de KC al medi de cultiu.

A continuació, vam voler estudiar si la via NF- κ B està implicada en la síntesi de IL-6 i KC, donat que la IL-1 α és un potent activador de la via NF- κ B i que la síntesi d'ambdós factors depèn de NF- κ B en d'altres models cel·lulars. Per tant vam infectar les cèl·lules de la tiroide *wild-type* amb lentivirus portadors de shRNA contra els gens IKK α i IKK β (Dolcet et al., 2006; Encinas et al., 2008). Cinc dies després de la infecció, l'expressió de la IKK α i IKK β va ser analitzada mitjançant Western blot. Cada shRNA va causar la disminució específica de l'expressió de la seva proteïna, si ho comparem amb les cèl·lules infectades amb el vector control (Figura 41c). Simultàniament, vam analitzar els nivells de IL-6 i KC al medi de cultiu. La Figura 41b, ens mostra que l'infecció lentiviral amb el shRNA de IKK β provoca una disminució de la secreció de IL-6 i KC al medi si ho comparem amb les cèl·lules infectades amb el vector sol. D'altra banda, la inhibició de l'expressió de IKK α no provoca grans canvis en la secreció de les citocines pro-inflamatòries.

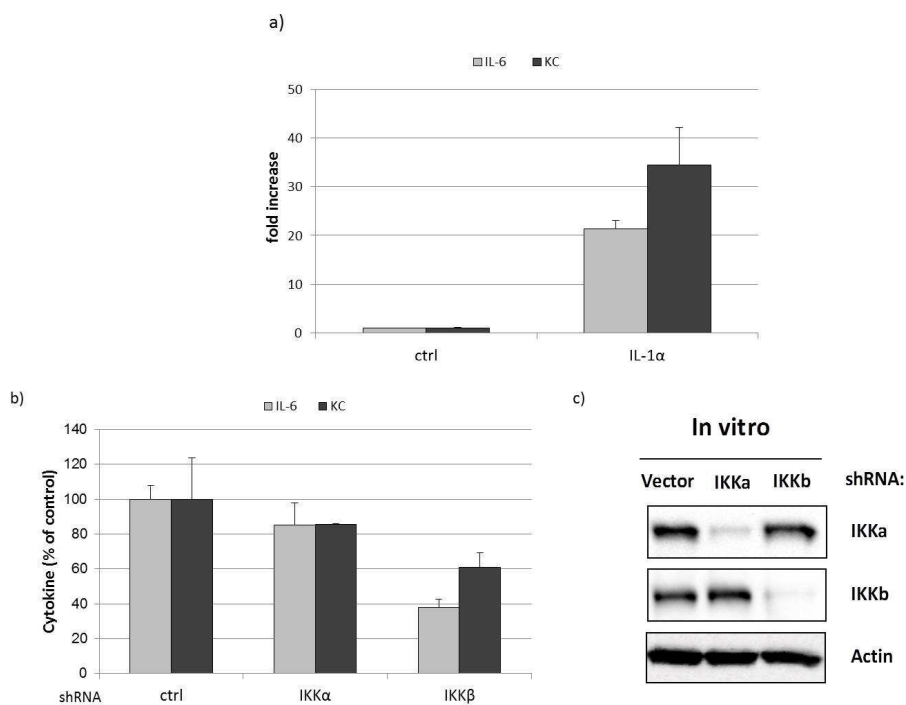


Figura 41: **L'estimulació amb IL-1 α provoca la secreció de IL-6 i KC al medi de cultiu.** (a) Anàlisi dels nivells de IL-6 i KC mitjançant ELISA, del medi de cultiu de les cèl·lules foliculars estimulades amb 50ng/ml de IL1 α durant 24h. **L'absència de IKK β fa disminuir la secreció de IL-6 i KC al medi de cultiu de les tiroïdes *wild-type*.** (b) Anàlisi dels nivells de IL-6 i KC secretats al medi de cultiu mitjançant ELISA, quan es disminueix l'expressió de IKK α i IKK β . (c) Western blot mostrant la disminució dels nivells de IKK α i IKK β després d'infectar les cèl·lules de la tiroide de ratolins *wild-type* amb shRNA. Per comprovar que en tots els carrils hi ha la mateixa quantitat de proteïna es detecta l'actina.

En resum podem dir que la IL-1 α activa la secreció de IL-6 i KC a les tiroides dels ratolins *wild-type* i que l'activació de la via NF- κ B és en part necessària per la secreció d'aquesta citocina i quimocina.

15. LA PÈRDUA DE SPROUTY1 A LA TIROIDE DELS RATOLINS INHIBEIX LA VIA NF- κ B *IN VIVO*.

Per determinar si la manca de síntesi de IL-6 i KC a la tiroide dels ratolins mutants *in vivo* és degut a la inhibició de la via NF- κ B, vàrem voler estudiar l'activació de la via NF- κ B a la tiroide dels ratolins *knockout* per *Spry1*. En primer, lloc per tal d'estudiar el grau d'activació de la via NF- κ B *in vivo*, vam analitzar la degradació de la proteïna I κ B α a la tiroide dels ratolins d'ambdós genotips estudiats. Com ja hem explicat anteriorment la I κ B α és un inhibidor de la via NF- κ B, que interacciona amb el complex p50/p65 i el reté al citoplasma. Quan s'activa la via, la proteïna I κ B α és fosforil·lada pel tricomplex de les IKKs i es degrada pel proteasoma, deixant lliure el dímer p50/p65 que es translocarà al nucli i activarà la síntesi del gens diana. Tal i com s'observa a la Figura 42, els nivells de I κ B α són més alts a les tiroides del ratolins *knockout* per *Spry1* que a les tiroides dels animals *wild-type*, cosa que ens suggereix que la I κ B α no s'ha degradat tant pel proteasoma i per tant podem suggerir que la manca de *Sprouty1* causa la inhibició de la via NF- κ B.

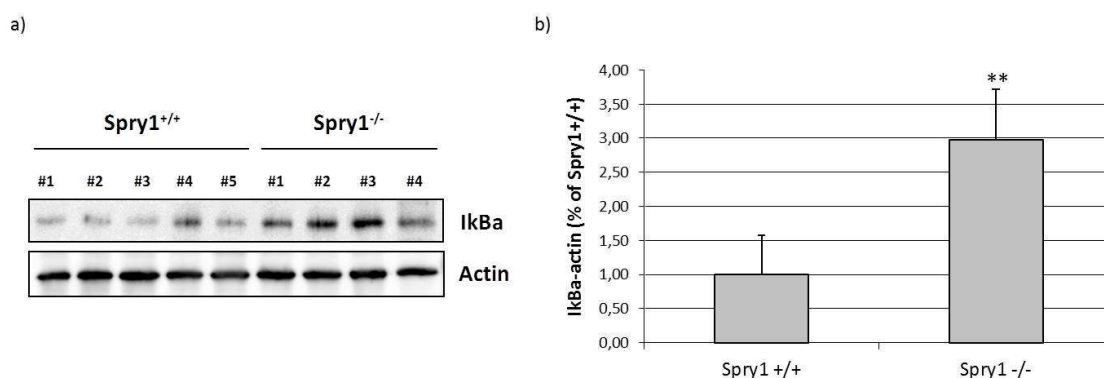


Figura 42: **Sprouty1 activa la degradació de I κ B α a les tiroides dels ratolins.** (a) Immunoblot contra I κ B α de diverses tiroides de ratolins tants *Spry1*^{+/+} com *Spry1*^{-/-}. Vam comprovar que totes es condicions tenen la mateixa quantitat de proteïna mitjançant la detecció amb Actina. (b) També vam quantificar els nivells de I κ B α expressat a les tiroides dels ratolins mutants respecte els nivells dels animals WT.

En segon lloc vam voler analitzar la localització subcel·lular de la proteïna p65 RelA, el factor de transcripció principal de la via canònica de NF- κ B, a les tiroides dels ratolins de 3 mesos d'edat mitjançant la tècnica d'immunofluorescència. A la Figura 43 es mostra una exclusió nuclear de p65 RelA de la gran majoria de cèl·lules de la tiroide

dels ratolins *knockout* per Spry1. Aquests resultats ens indiquen que la via NF- κ B està reprimida a la tiroide dels ratolins mutants i activa a la tiroide dels ratolins *wild-type*.

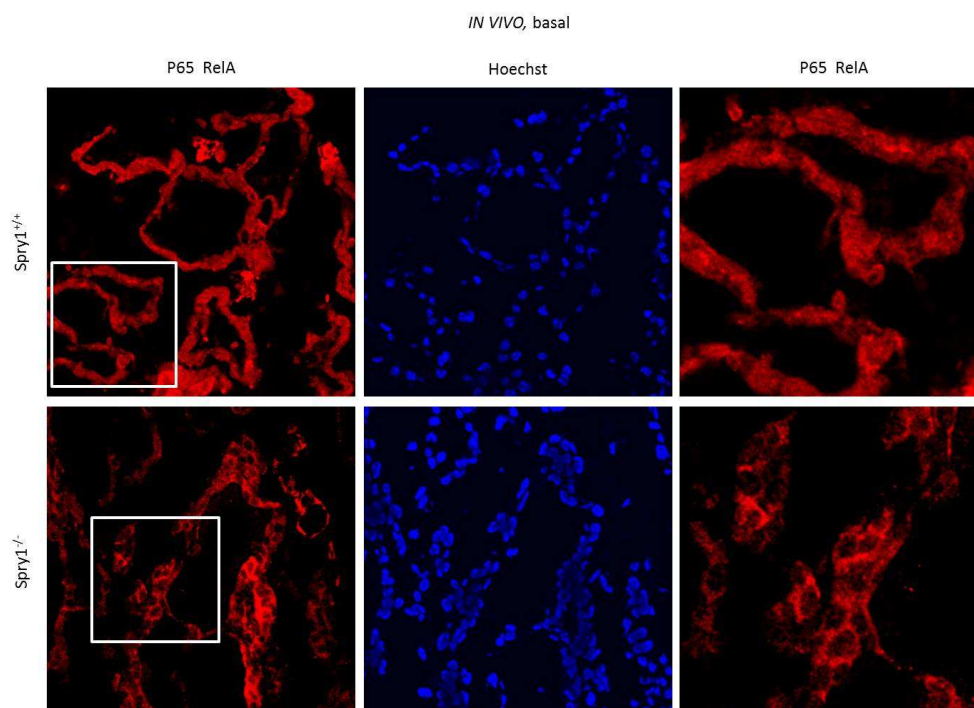


Figura 43: La pèrdua de Sprouty1 provoca una exclusió nuclear de p65 a la tiroide dels ratolins. Immunofluorescència contra p65 RelA de seccions de criostat de tiroide de ratolins de tres mesos d'edat dels genotips indicats.

Finalment, vam voler determinar si la repressió de la via NF- κ B a la tiroide dels ratolins *knockout* per Spry1 és deguda a un defecte de l'activació de la via. Per tant vam injectar intraperitonealment 2,5mg/Kg de LPS tant a ratolins control com a ratolins *knockout* per Spry1 de tres mesos d'edat. És ben sabut que el lipopolisacàrid (LPS) activa la via NF- κ B mitjançant la unió d'aquest als receptors TLR (*Toll-like receptor*). Després d' 1,5h de la injecció intraperitoneal de LPS vam analitzar la localització de p65 i el nivells de I κ B α a la tiroide d'ambdós genotips. Com es pot veure a la immunofluorescència de la Figura 44a, després de la injecció de LPS als ratolins *wild-type*, p65 es transloca al nucli en més del 60% de les cèl·lules de la tiroide. En canvi, tot i que les tiroides dels ratolins *knockout* si que responen a la injecció de LPS, s'observa una tinció més dèbil i un percentatge menor (32%) de nuclis positius per p65 RelA (Figura 44b). Per altra banda, l'immunoblot de la Figura 44c, ens mostra que els nivells de I κ B α de la tiroide *wild-type* sense estimular són més baixos que els nivells de la tiroide mutant, tal i com havien observat anteriorment (Figura 42), i a més a més, després de l'administració de LPS, tot i que també s'observa una disminució dels nivells

de IκBα a les tiroides del ratolins *knockout*, els nivells són molt més baixos a les tiroides *wild-type* (Figura 44c).

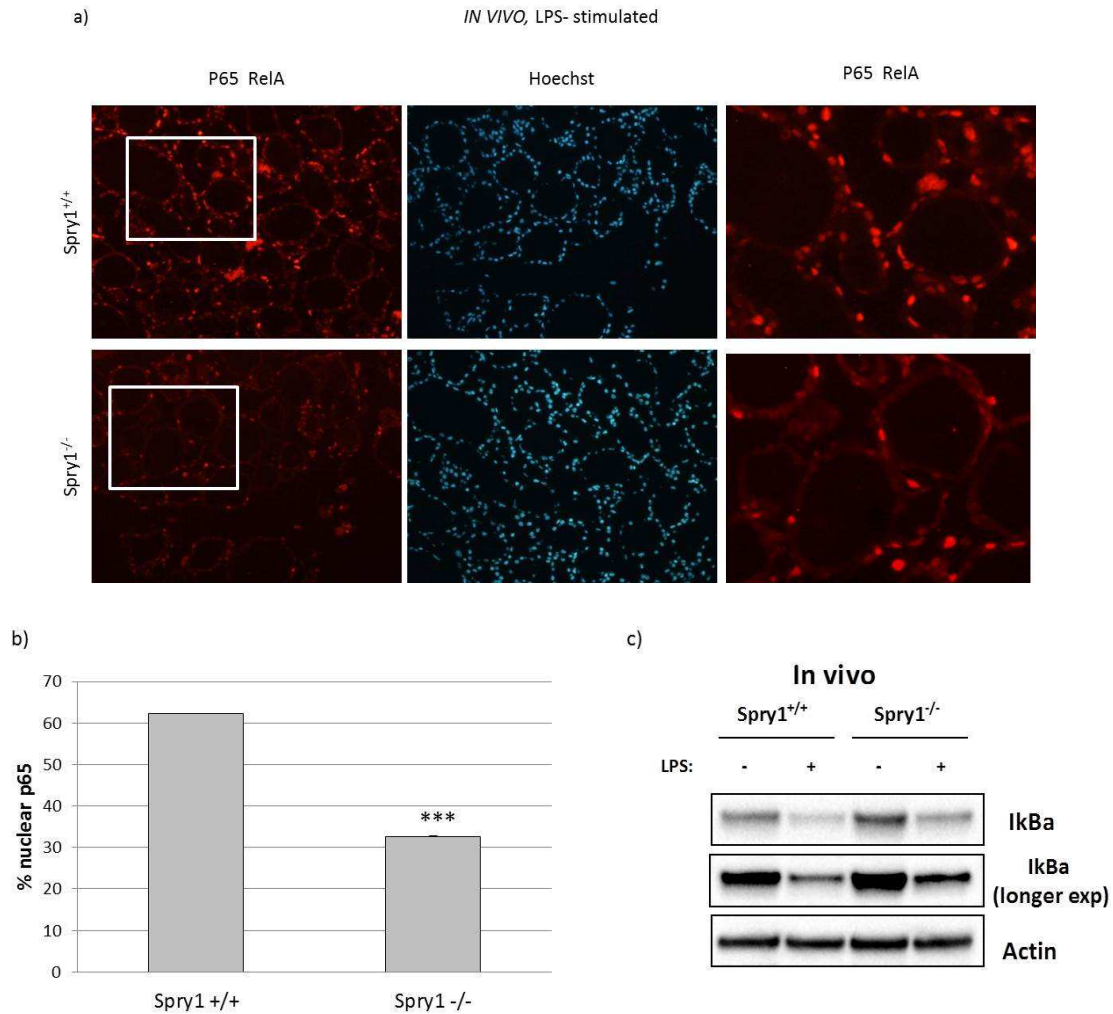


Figura 44: **Disminució de l'estimulació de la via NF-κB a la tiroide dels ratolins *Spry1*^{-/-} després d'injectar LPS.** (a) Immunofluorescència contra p65 de seccions de criostat de tiroide de ratolins de tres mesos d'edat, els quals se'ls hi ha injectat intraperitonealment 2,5mg/Kg de LPS. (b) Quantificació dels nuclis positius per p65 observats a les tiroides estudiades. Els resultats s'expressen en percentatge del total de cèl·lules de la glàndula. *** P<0,001 mitjançant prova T Student. (c) Western blot que ens mostra la disminució dels nivells de IκBα a les tiroides dels ratolins injectats amb LPS. Observem una disminució menor en el cas dels ratolins *Spry1*^{-/-}. L'actina ens indica que tots els carrils contenen la mateixa quantitat de proteïna.

En resum podem dir que la pèrdua de Sprouty1 a la tiroide dels ratolins provoca que s'inhibeixi la via NF-κB, ja que la proteïna IκBα no es degrada i per tant p65 RelA no es transloca al nucli per tal d'activar la transcripció de gens diana, com per exemple la síntesi de IL-6 i KC. Per tant podem suggerir que Sprouty1 modula la via NF-κB, que activarà la síntesi de factors SASP, com les citocines pro-inflamatòries IL-6 i KC, que activaran i mantindran la senescència cel·lular a la tiroide dels ratolins.

16. LA SUPRESSIÓ GÈNICA DE SPROUTY1 ACCELERA L'APARICIÓ DE TUMORS EN ANIMALS HETEROZIGOTS PER PTEN

Tal i com hem descrit, els ratolins *knockout* per *Spry1* no desenvolupen un fenotip tumoral a la tiroide als cinc mesos d'edat, sinó que les glàndules de la tiroide són més grans i presenten menys marcadors de senescència cel·lular que les tiroides dels ratolins *wild-type*. Tal i com s'explica a la introducció, la senescència induïda per oncògens (OIS) es considera un mecanisme de defensa contra la transformació tumoral provocada per un insult oncogènic. Com a tal, les cèl·lules que no tenen els components essencials per activar la maquinària de senescència són més susceptibles a la transformació tumoral tant *in vitro* com *in vivo*.

Per tant, per analitzar si les cèl·lules de la tiroide dels ratolins *Spry1*^{-/-} són més susceptibles a la transformació després d'un insult oncogènic, vàrem creuar ratolins mutants per *Spry1* amb ratolins heterozigots per *Pten*. Vam utilitzar els ratolins heterozigots per *Pten* per tres raons: la primera perquè desenvolupen una gran varietat de tumors incloent-hi el carcinoma de tiroide (Bayascas et al., 2005; Di Cristofano et al., 1998; Liaw et al., 1997; Podsypanina et al., 1999). La segona, perquè la pèrdua de *Pten* s'ha descrit com un potent inductor de la senescència cel·lular (Alimonti et al., 2010b; Chen et al., 2005). I la tercera perquè s'ha descrit que *STAT3* pot actuar com un supressor de tumors en la via de senyalització de *Pten*, doncs la pèrdua de *Pten* desencadena una cascada de senyalització que inhibeix la senyalització de *STAT3* al les cèl·lules tumorals de glioblastoma (de la Iglesia et al., 2008b).

16.1 La supressió gènica de *Sprouty1* en ratolins heterozigots per *Pten* accelera la tumorigènesi a la GLÀNDULA TIROIDE

Un cop creuats els animals mutants per *Spry1* amb els ratolins mutants per *Pten*, vàrem deixar créixer la descendència fins als tres mesos d'edat. La Figura 45a, ens mostra que si als ratolins haploinsuficients per *Pten* els hi suprimim *Spry1* desenvolupen una hiperplàsia de les cèl·lules fol·liculars als 3 mesos d'edat, mentre que les tiroides dels ratolins germans *Pten*^{+/-} són normals. Pel que fa al ratolins de cinc mesos d'edat, tot i que un gran percentatge dels heterozigots de *Pten* presenten una hiperplàsia nodular de les cèl·lules fol·liculars, les lesions dels ratolins doble mutants són molt més grans i més freqüents (80% dels ratolins estudiats) (Figura 45b i 45c).

Les tiroides dels ratolins doble mutants (*Pten*^{+/-}; *Spry1*^{-/-}) presenten algunes vegades àrees on els fol·licles normals s'han substituït per lesions més sòlides, les quals es caracteritzen per presentar cèl·lules eosinòfiles més grans (cèl·lules de Hurthle) (Figura

45d esquerra). Per altra banda, en regions de la tiroide on es conserva l'arquitectura fol·licular, s'observen fol·licles més irregulars que els normals i que presenten una estructura papil·lar o fins i tot compostos per cèl·lules altes (tall cells) (Figura 45dreta).

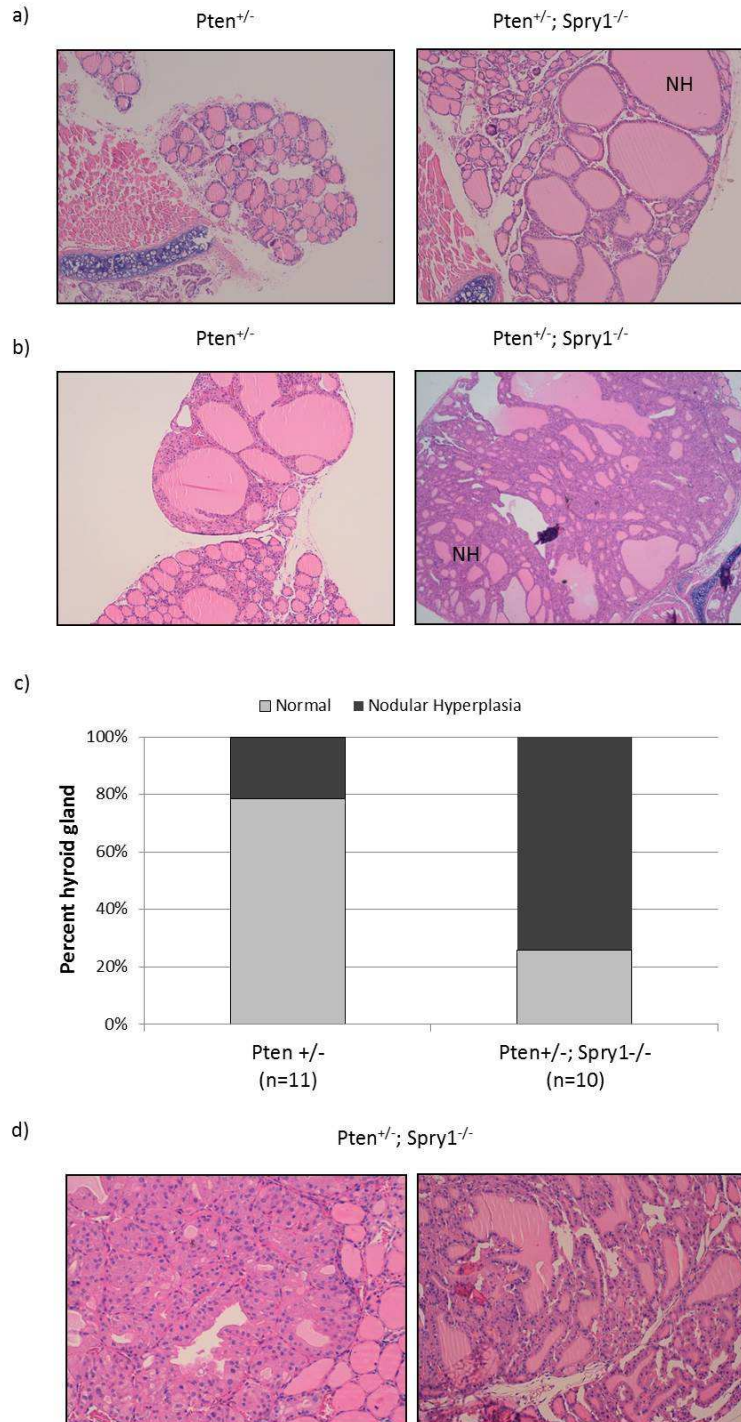


Figura 45: La supressió de **Spry1** en ratolins $Pten^{+/-}$ accelera la tumorigenesis a la tiroide. (a) Tincions d'Hematoxilina-Eosina de la glàndula tiroide de ratolins de tres mesos dels genotips indicats. (b) Imatge de seccions de tiroide de ratolins $Pten^{+/-}$ i doble mutants de cinc mesos d'edat. Imatges preses a 100x. (c) Gràfic de barres del percentatge d'animals de 3-5 mesos que desenvolupen hiperplàsia a la tiroide (d) Tincions d'Hematoxilina-Eosina per poder analitzar els tipus cel·lulars que s'hi desenvolupen. Imatges preses a 200x. NH: Hiperplàsia nodular.

Posteriorment vàrem realitzar experiments d'immunohistoquímica per tal d'analitzar més profundament les lesions hiperplàsiques de les tiroïdes estudiades. En primer lloc vàrem analitzar el marcador de proliferació Ki-67, on s'hi en fixem amb la Figura 46a, podem observar que les tiroïdes dels ratolins doble mutants presenten un increment del nombre de cèl·lules positives per aquest marcador i per tant un índex de proliferació més elevat si ho comparem amb les tiroïdes dels ratolins $Pten^{+/-}$.

Posteriorment vàrem voler analitzar la fosforilació de dues proteïnes que són importants per l'activació de les vies de senyalització on Pten i Spry1 hi poden jugar un paper important, les proteïnes ERK i AKT. Com ja hem descrit anteriorment, al teixit d'estructura normal de la glàndula tiroide dels ratolins $Spry1^{-/-}$, no hi podem observar diferències en la fosforilació d'aquestes proteïnes si ho comparem amb les tiroïdes dels ratolins *wild-type*. A més a més, als fol·licles d'estructura normal de les tiroïdes dels ratolins $Pten^{+/-}$ tampoc s'hi observa un increment de la fosforilació d'aquestes proteïnes (Figura 46). Tot i així, si observem les lesions hiperplàsiques de les cèl·lules fol·liculars de les tiroïdes dels ratolins $Pten^{+/-}$ i dels ratolins doble mutants, hi observem un increment del nombre de cèl·lules positives per la proteïna fosforil·lada ERK (Figura 46b) i per la proteïna fosforil·lada AKT (Figura 46c).

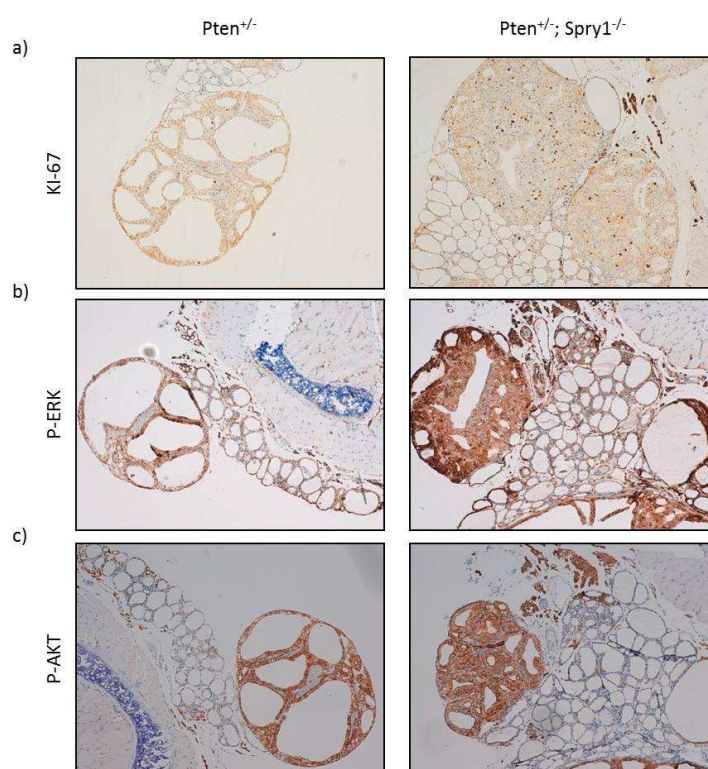


Figura 46: Les hiperplàsies de les tiroïdes presenten un augment de cèl·lules positives per Ki-67, p-ERK i p-AKT. (a) Immunohistoquímica de (a) Ki-67, un marcador de proliferació, (b) de p-Erk, amb marcatge nuclear i citoplasmàtic i de (c) p-Akt amb marcatge citoplasmàtic, de les hiperplàsies de les tiroïdes dels ratolins de cinc mesos dels genotips indicats. Totes les imatges estan preses a 100x.

En resum podem dir, que la deleció única de Spry1 no és suficient per promoure la transformació del teixit tiroïdal, però quan la combinem amb una haploinsuficiència de Pten s'accelera el procés d'aparició de lesions neoplàsiques a la glàndula tiroide.

16.2 La supressió gènica de Sprouty1 en ratolins heterozigots per Pten accelera la tumorigènesi de la GLÀNDULA ADRENAL .

El paper de Spry1 com a fre per la transformació cel·lular no està restringit únicament a la tiroide sinó que es troba representat en altre teixits en el context d'una haploinsuficiència de Pten.

Per tant a continuació vàrem voler analitzar les glàndules adrenals dels ratolins mutants de cinc mesos d'edat per tal de determinar l'aparició de transformacions tumorals en aquestes glàndules endocrines. Mitjançant l'anàlisi de seccions de parafina de les glàndules adrenals dels ratolins heterozigots per Pten i dobles mutants per Pten i Spry1, ens vàrem adonar que gairebé la meitat dels ratolins Pten^{+/-}; Spry1^{+/-} desenvolupen feocromocitoma, un tumor neuroendocrí provinent de les cèl·lules cromafins de la medul·la adrenal, relacionat amb el síndrome MEN2A o FMTC (explicats a la introducció) (Figura 47c). Gràcies a un anàlisi histològic, podem observar que la medul·la adrenal d'un ratolí que no ha desenvolupat lesions neoplàsiques, presenta un patró de "niu" o alveolar, en canvi quan s'hi desenvolupa un feocromocitoma, aquest patró és substituït per grups de cèl·lules més atapeïdes formant com cordons que comprimeixen el parènquima del còrtex adjacent de la glàndula adrenal (Figura 47a). Per tal de comprovar l'origen de les cèl·lules que formen aquests tumors, vàrem realitzar una immunotinció contra Tirosina-Hidroxilasa (a-TH), una proteïna que sintetitzen les cèl·lules de la medul·la adrenal. Com s'observa a la Figura 47b, les cèl·lules tumorals són positives per TH i per tant ens demostra que són cèl·lules que s'originen de les cèl·lules cromafins i per tant provenen de la medul·la adrenal.

D'altra banda, gairebé l'altre meitat dels ratolins Pten^{+/-}; Spry1^{+/-} analitzats, no desenvolupen feocromocitoma sinó que desenvolupen una hiperplàsia nodular a la medul·la adrenal (Figura 47c), on la morfologia de les cèl·lules cromafins és iguals a les d'un feocromocitoma, però aquestes no comprimeixen el còrtex de la glàndula sinó que es mantenen formant nòduls (Figura 47a). Per contra, els ratolins Pten^{+/-} de cinc mesos d'edat analitzats, no desenvolupen cap feocromocitoma a la glàndula adrenal, sinó que prop del 25% manifesten hiperplàsia nodular a la medul·la, mentre que el 75% restant presenten les glàndules adrenals normals (Figura 47c). En canvi prop del

70% dels ratolins $Pten^{+/-}; Spry1^{-/-}$ desenvolupen hiperplàsia nodular, però no vam observar cap ratolí que desenvolupés feocromocitoma a la glàndula adrenal.

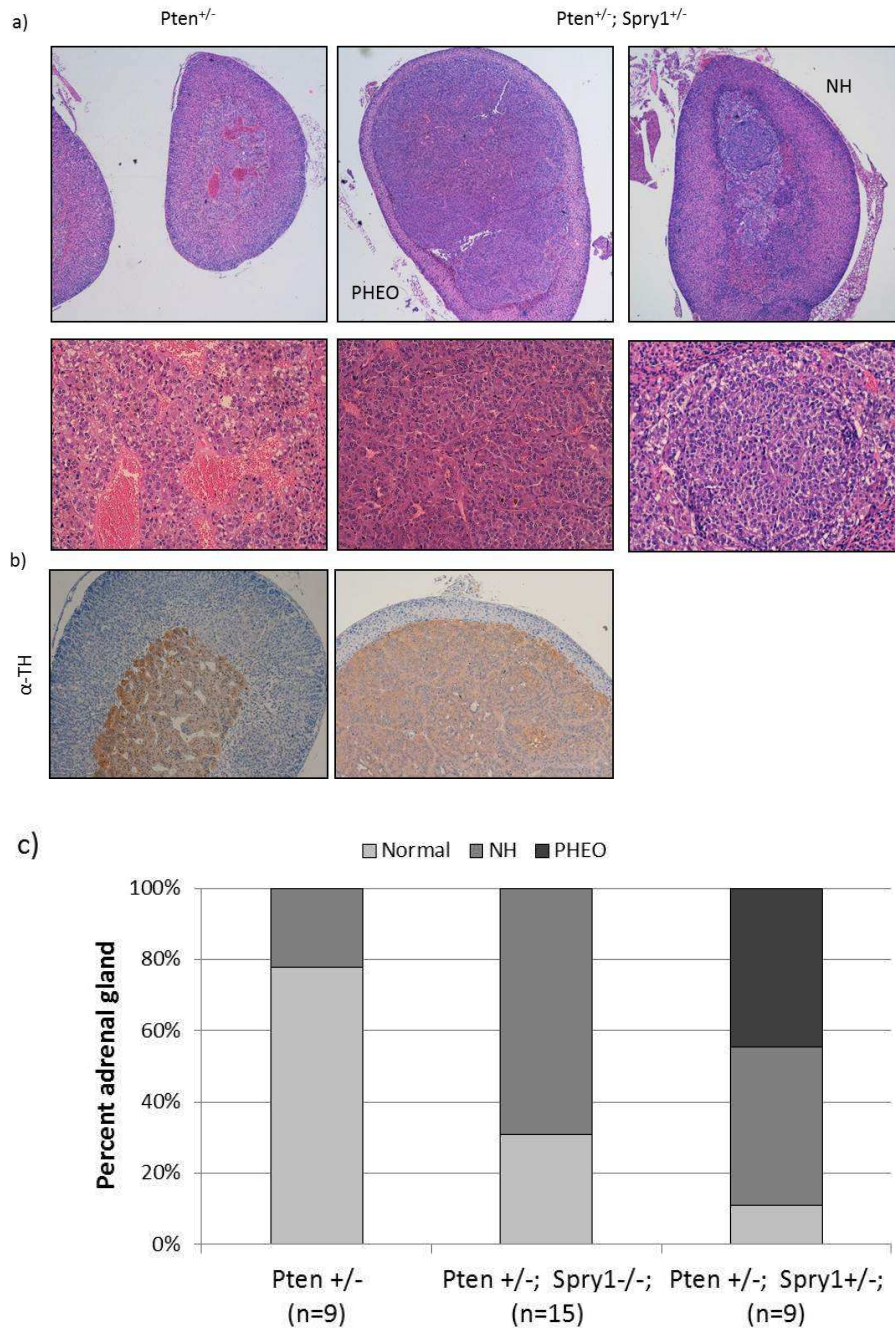


Figura 47: La supressió de *Spry1* en ratolins heterozigots per *Pten* accelera el desenvolupament de feocromocitoma. (a) Hematoxilina-Eosina de seccions de parafina de la glàndula adrenal de ratolins de cinc mesos d'edat dels genotips indicats. Imatges a baix augment (40x) i alt augment (200x) que ens mostren l'estructura de les cèl·lules cromafins d'un feocromocitoma(PHEO) i una hiperplàsia nodular (NH) comparada amb una glàndula adrenal normal (esquerra). (b) Immunotinció contra Tirosina-Hidroxilasa (α -TH) per marcar les cèl·lules de la medul·la adrenal. Imatge a 100x. (c) Gràfic de barres apilades que ens mostra els percentatges de ratolins de cinc mesos d'edat que desenvolupen tant hiperplàsia nodular com feocromocitoma a la glàndula adrenal.

Per tal de caracteritzar les lesions neoplàsiques observades a la glàndula adrenal, vam analitzar les cèl·lules positives per Ki-67 a les adrenals dels ratolins. Com es mostra a la Figura 48, els feocromocitomes presenten un marcatge positiu per Ki-67, cosa que ens indica la capacitat proliferativa d'aquestes cèl·lules de la medul·la adrenal.

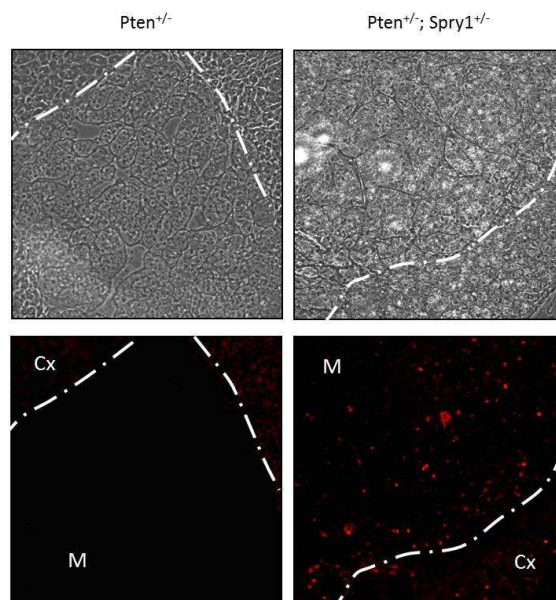
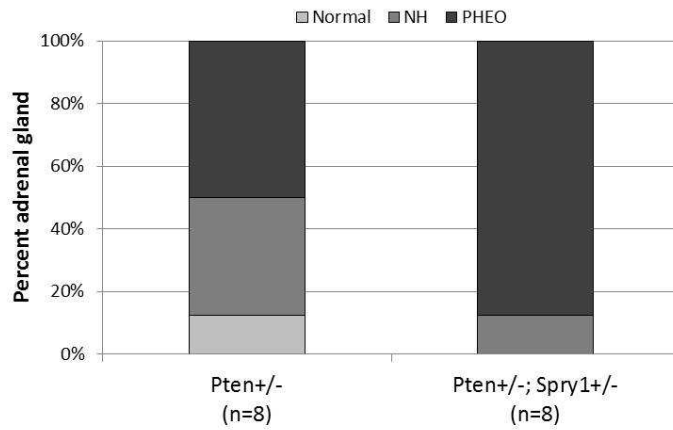


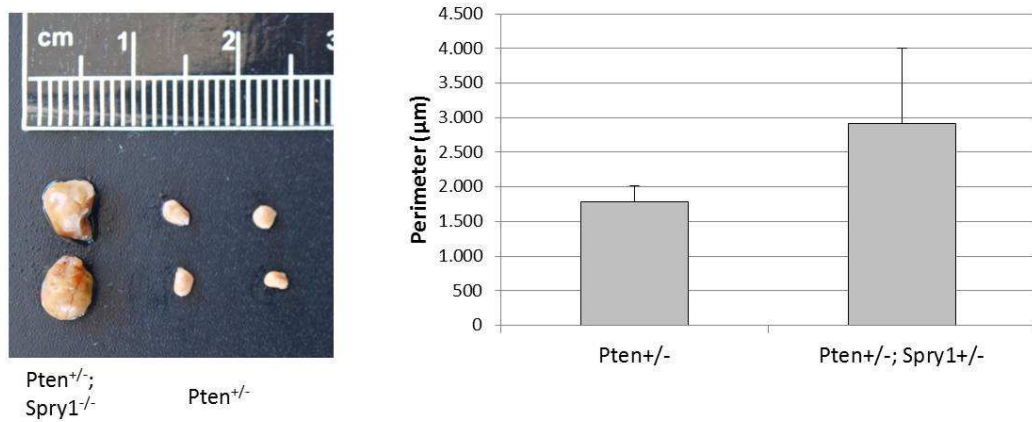
Figura 48: Els feocromocitomes de la glàndula adrenal dels ratolins $Pten^{+/-}$; $Spry1^{+/-}$ presenten un augment de cèl·lules positives per Ki-67. Immunofluorescència contra el marcador de proliferació Ki-67 a la glàndula adrenal dels ratolins de cinc mesos d'edat dels genotips indicats. Cx= Còrtex; M=medul·la.

Finalment vàrem analitzar ratolins d'ambdós genotips de fins a 9 mesos d'edat, on gairebé el 90% dels ratolins doble heterozigots analitzats desenvolupen feocromocitoma i el 10% restant presenten una hiperplàsia nodular, en canvi prop del 50% dels ratolins $Pten^{+/-}$ desenvolupen aquest tumor a la medul·la adrenal, un 35% d'animals presenten una hiperplàsia nodular i el 15% restant no desenvolupen cap tipus de malignitat a la glàndula adrenal (Figura 49a). Per altra banda, vàrem observar que les glàndules adrenals dels animals $Pten^{+/-}$; $Spry1^{+/-}$ tenen un tamany molt més gran, cosa que en suggereix pensar que puguin ser feocromocitomes molt més agressiu i amb caràcter invasiu (Figura 49b). Gràcies a la tinció contra Tirosina-Hidroxilasa, podem observar com el sobrecreixement de les cèl·lules de la medul·la adrenal comprimeix l'escorça, l'envaeix i fins i tot pot causa el trencament de la càpsula adrenal, per tal de poder desencadenar la invasió a altres teixits (Figura 49c). Tot i així, ni l'examen macroscòpic dels pulmons i del fetge ni l'examen microscòpic amb tincions d'Hematoxilina-Eosina o mitjançant la tinció contra TH dels ganglis limfàtics adjacents a la glàndula adrenal varen revelar signes de metàstasi.

a)



b)



c)

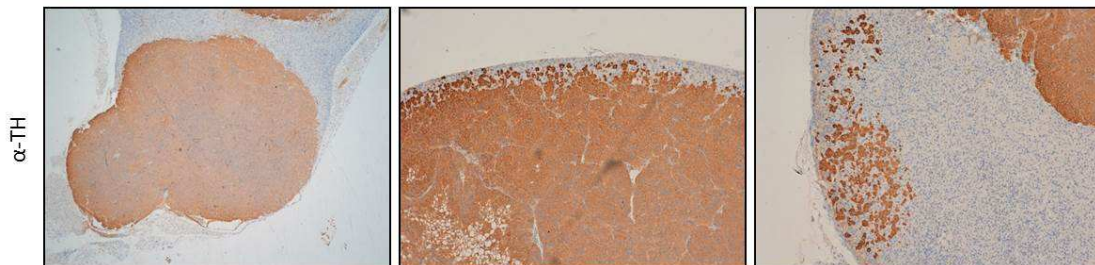


Figura 49: La supressió de **Spry1** en ratolins heterozigots per **Pten** causa el desenvolupament de feocromocitomes molt més agressiu i de caràcter invasiu (a) Gràfic de barres del percentatge d'animals que desenvolupen tant feocromocitomes com hiperplàsies nodulars a les glàndules adrenals dels ratolins de nou mesos d'edat dels genotips indicats. (b) Imatge de les glàndules adrenals (esquerra). Gràfic del perímetre de les glàndules adrenals dels ratolins de nou mesos dels genotips indicats (***) $p < 0,001$ mitjançant prova T Student) (c) Immunotinció contra Tirosina-Hidroxilasa (α -TH) de seccions de parafina de feocromocitomes de ratolins doble heterozigots de nou mesos d'edat.

En resum podem dir que si comparem els ratolins Pten^{+/-}; Spry1^{+/-} amb els ratolins heterozigots per Pten, presenten un increment de la incidència de tumors a la tiroide i a la glàndula adrenal, per tant podem proposar el gen Spry1 com un supressor tumoral.

Discussió

1. SPROUTY1 COM A GEN SUPRESSOR DE TUMORS AL CARCINOMA MEDUL·LAR DE TIROIDE (MTC).

A la primera part d'aquest treball de tesis doctoral ens hem centrat amb l'estudi del paper de Sprouty1 en el Carcinoma Medul·lar de Tiroide (MTC). Al llarg dels anys s'ha anat descrivint un gran nombre de mutacions puntuals en gens involucrats en el desenvolupament de diverses patologies a la glàndula tiroide, molts d'ells descrits com a oncògens o com a supressors tumorals. Concretament al Carcinoma Medul·lar de Tiroide s'han descrit mutacions oncogèniques al receptor tirosina cinasa Ret. Aquestes mutacions apareixen en totes les forma hereditàries del MTC i prop del 50% del casos de MTC esporàdics. Tot i així, tant estudis clínics com models animals evidencien el fet que puguin existir altres alteracions genètiques necessàries pel desenvolupament d'aquest carcinoma (Santarpia et al., 2009). Com ja hem mencionat anteriorment, els gens de la família Sprouty són inhibidors de la senyalització per Ret durant el desenvolupament embrionari del ratolí (Basson et al., 2005; Taketomi et al., 2005). Per tant vàrem iniciar l'estudi analitzant els afectes que podria tenir l'eliminació de Sprouty1 en el desenvolupament i la fisiologia de la glàndula tiroide.

Els nostres resultats indiquen que Sprouty1 s'expressa de forma abundant al conjunt de la glàndula tiroide, aquesta expressió s'incrementa amb l'edat, fet que ens suggereix el paper important que pot desenvolupar aquest gen en la funció de la tiroide durant l'edat adulta. Per tal d'estudiar el paper de Sprouty1 a la tiroide vàrem decidir utilitzar una línia de ratolins *knockout* per Sprouty1. A l'estudiar detingudament la tiroide d'aquests ratolins vàrem observar que desenvolupen hiperplàsia de les cèl·lules C. Aquesta proliferació no sembla ser deguda a un defecte durant el desenvolupament embrionari de la tiroide, sinó a un defecte durant el desenvolupament post natal. Tot i així, aquests animals *knockout* per Sprouty1 no arriben a desenvolupar mai MTC durant la seva vida adulta, sinó que mantenen la hiperplàsia de les cèl·lules C. Una possible explicació d'aquest fenotip observat podria ser degut a que l'estudi es va realitzar amb animals d'entre tres i cinc mesos, edats primerenques pel desenvolupament d'un Carcinoma Medul·lar de Tiroide. Tot i així, com ja hem comentat anteriorment, els ratolins *knockout* per Sprouty1 desenvolupen malalties renals que els hi provoquen la mort de forma prematura al voltant dels cinc mesos d'edat (Basson et al., 2005), cosa que impedeix l'estudi en edats més avançades. En consonància amb aquesta hipòtesi, s'han descrit diversos ratolins transgènics que expressen una mutació del receptor Ret del tipus MEN2A o MEN2B sota el promotor de calcitonina o sota altres promotors, que desenvolupen MTC a

edats que comprenen entre els 8 i els 14 mesos o fins i tot en edats més avançades (Acton et al., 2000; Kawai et al., 2000; Michiels et al., 1997; Reynolds et al., 2001). Alternativament, podem suggerir que la deleció genètica de Sprouty1 no és suficient per desenvolupar MTC i per tant és necessària la presència d'altres insults oncogènics per a provocar el desenvolupament d'aquest tipus de carcinoma a la tiroide dels ratolins. En aquest sentit, diversos estudis descriuen que ratolins *knockin* per mutacions específiques de MEN2A (C620R) i MEN2B (M918T), desenvolupen hiperplàsia de les cèl·lules C, però mai s'observen signes de MTC en edats més avançades (Smith-Hicks et al., 2000; Yin et al., 2007). És important remarcar que a diferència dels transgènics, el ratolins *knockin* per a aquestes mutacions expressen nivells endògens del receptor, i per tant mimetitzen la patologia humans de manera més adequada. Actualment estem treballant en aquesta hipòtesis generant ratolins doble mutants que expressen una mutació oncogènica de Ret (Carniti et al., 2006) i que presenten delecions en el nostre gen d'interès, Spry1.

Malgrat que els ratolins Spry1^{-/-} no desenvolupen MTC en edats primerenques, vam voler aprofundir en el mecanisme pel qual la pèrdua de Spry1 desencadena l'aparició de la hiperplàsia de les cèl·lules C. Per dur-ho a terme vam utilitzar una línia cel·lular derivada d'un Carcinoma Medul·lar de Tiroide humà, la línia cel·lular TT, a fi d'analitzar si l'efecte observat és autònom o no. En aquest model, hem determinat que l'expressió de Sprouty1 redueix la proliferació de les cèl·lules TT tant *in vitro* com amb models de xenografts *in vivo*. Sorprenentment aquesta disminució de la proliferació és independent de la senyalització per Ret, ja que no observem canvis en la fosforil·lació del receptor ni de les MAPK ERK, ni tampoc canvis en els nivells d'expressió de Wnt11 i calcitonina, que són gens diana de Ret a aquestes cèl·lules. A més, tampoc depèn de l'activació de l'apoptosi, sinó que s'indueix un mecanisme de senescència cel·lular que provoca l'aturada del creixement d'aquestes cèl·lules.

Encara que l'apoptosi sigui un mecanisme de supressió tumoral molt acceptat, durant els últims anys, s'ha fet palès que la senescència induïda per oncògens (OIS) és una barrera per la transformació de cèl·lules pre-malignes a tumorals en models *in vivo*. Per exemple l'expressió de les formes actives de Ras (K-Ras, N-Ras i H-Ras) indueixen la senescència cel·lular en lesions pre-malignes de pulmó, pàncrees, limfòcits i glàndula mamària entre d'altres (Braig et al., 2005; Collado et al., 2005; Sarkisian et al., 2007). Un altre exemple és la mutació oncogènica de B-raf (BrafV600E) que indueix senescència cel·lular en neoplàsies de pulmó i en melanomes (Dankort et al., 2007; Dhomen et al., 2009). I també l'expressió del factor de transcripció E2F3, que forma

part de la senyalització per Ras, que indueix la senescència cel·lular i atura la formació tumoral a la hipòfisi (Lazzerini Denchi et al., 2005). L'associació entre la senescència cel·lular i la supressió tumoral s'ha descrit en models animals de càncer, on la deleció genètica del locus *Cdkn2a* o del gen *Trp53* inhibeix la resposta de senescència cel·lular de les lesions pre-malignes de pulmó (Braf V600E) (Dankort et al., 2007), melanomes (BrafV600E) (Goel et al., 2009) o neoplàsies a la glàndula mamària (HRAS^{G12V}) (Sarkisian et al., 2007). La combinació de la deleció d'aquets gens amb les mutacions de OIS provoquen la progressió de les cèl·lules cap un fenotip més maligne, cosa que ens demostra la relació que hi ha entre els supressors de tumors i la inducció de la senescència cel·lular mitjançant INK4a, ARF i p53 (Collado and Serrano, 2010; Prieur and Peeper, 2008). També, la presència de mutacions d'haploinsuficiència de Retinoblastoma (Rb) en ratolins, provoca el desenvolupament d'adenomes benignes de les cèl·lules C, que progressen a adenocarcinomes quan s'observen delecions de N-Ras. En aquest cas, s'ha observat que la presència de N-Ras inhibeix la transformació dels adenomes de les cèl·lules C a tumors més malignes, degut a la inducció de la senescència cel·lular (Shamma et al., 2009). En el moment de realitzar aquest treball desconexíem els mecanismes cel·lulars pels quals Sprouty1 indueix la senescència cel·lular en el model de la línia cel·lular TT. Tot i així, tal i com mostren els resultats de la segona part de la tesi, podríem suggerir que l'activació de la senescència cel·lular per Sprouty1 podria ser deguda a l'aparició d'un fenotip secretor associat a la senescència cel·lular (discutit més endavant).

El fet que diversos membres de la família de Sprouty s'hagin proposat com possibles supressors tumorals en una gran varietat de tumors, i que per altra banda, diverses evidències demostrin que la senescència cel·lular sigui un mecanisme de barrera a la transformació tumoral, fa que puguem suggerir que l'activació de la senescència cel·lular mitjançant Sprouty1 és un mecanisme de supressió tumoral a la tiroide.

S'ha demostrat que els nivells d'expressió dels diferents membres de la família de Sprouty es troben disminuïts en un gran varietat de càncers humans, si els comparem amb els nivells expressats del teixit normal adjacent a la lesió maligna. Per exemple, els nivells de Spry1 i Spry2 disminueixen en el càncer de pròstata i de mama (Fritzsche et al., 2006; Kwabi-Addo et al., 2004; McKie et al., 2005), mentre que s'ha descrit una desregulació de Spry2 en el carcinoma hepatocel·lular, al limfoma de les cèl·lules B i al carcinoma d'endometri, entre d'altres patologies (Fong et al., 2006; Frank et al., 2009; Velasco et al., 2011). En el nostre model de MTC resulta particularment complicat realitzar l'anàlisi dels nivells de Spry1 a les cèl·lules C de la tiroide de forma exclusiva,

doncs només comprenen el 5% del total de cèl·lules de la glàndula i es troben envoltant els fol·licles de forma dispersa. Per tant, la comparació entre cèl·lules C del teixit normal i del teixit tumoral resulta impossible mitjançant tècniques com RT-PCR o Western Blot. Es necessitaria poder disgregar molt bé els fol·licles de la tiroide i obtenir una solució de cèl·lules soles aïllades (*single cells*) per tal de capturar, mitjançant anticossos contra calcitonina o GFRa4, les cèl·lules C i separar-les de la resta de cèl·lules fol·liculars, per exemple mitjançant un *sorter*. Malauradament, els nostres intents de purificar cèl·lules C a partir de biòpsies humanes de glàndula tiroide normal mitjançant aquestes i d'altres tècniques han resultat infructuosos. Per altra banda, la manca d'anticossos específics analitzats mitjançant tècniques d'immunofluorescència, ens fa difícil la detecció de la proteïna de Sprouty1, a les matrius de teixits tumorals o TMA (*Tissue micro-array*) de carcinomes de tiroide. Per tant, els nivells d'expressió de Sprouty1 als MTC humans els vàrem comparar amb els nivells d'expressió d'aquest gen a tota la tiroide o a partir d'una línia cel·lular on es coneix que Sprouty1 s'hi expressa. Aquesta comparació no és la ideal, però considerem que pot ser legítima gràcies als resultats mostrats amb les tiroides dels ratolins *Spry1^{LacZ/+}*. Els nostres resultats ens indiquen que les cèl·lules C de la tiroide dels ratolins *Spry1^{LacZ/+}* expressen nivells més alts de β -galactosidasa que les cèl·lules fol·liculars veïnes.

Un cop demostrat que la gran majoria dels MTC analitzats presenten baixos nivells d'expressió de Sprouty1 si els comparem amb els nivells observats a la tiroide normal, vàrem determinar que aquest fet es correlaciona amb la hipermetilació del promotor de Sprouty1 dels MTC analitzats. Sembla ser que el silenciament epigenètic dels membres de la família de Sprouty i la disminució dels nivells d'expressió d'aquests gens és freqüent a les cèl·lules tumorals. Tant és així, que s'ha demostrat que el promotor de Sprouty1, Sprouty2 i Sprouty4 es troba metilat en el carcinoma de pròstata (Kwabi-Addo et al., 2009; McKie et al., 2005; Wang et al., 2006), a més a més també s'ha observat la metilació del promotor de Sprouty2 al carcinoma hepàtic, al limfoma de cèl·lules B, i al carcinoma d'endometri (Fong et al., 2006; Frank et al., 2009; McKie et al., 2005; Velasco et al., 2011). D'altra banda també s'han descrit altres mecanismes que poden contribuir amb la disminució dels nivells de Sprouty i que són independents a la metilació del promotor. Aquests mecanismes podrien explicar els resultats observats amb les mostres de MTC 08T31, 08T49 i 09T133, les quals presenten baixos nivells de mRNA de *Spry1* i una dèbil o inexistent metilació del promotor. Un d'aquests mecanismes podria ser la pèrdua d'heterozigositat del locus d'expressió de *Spry*, descrit en el cas de Sprouty2 al carcinoma de pròstata (McKie et al., 2005). D'altra banda gràcies a un estudi utilitzant tècniques d'hibridació genòmica

comparativa d'alta resolució es va descobrir que 8 de les 30 mostres (27% aprox) de MTC humanes analitzades presentaven pèrdues al·lèliques del 4q28.1, on es situa el gen de Sprouty1. A més, resulta interessant destacar, que en el mateix treball un 33% dels MTC analitzats presenta pèrdues genètiques al 5q31.1, on mapa Sprouty4 (Ye et al., 2008). Finalment, l'alteració de l'activitat post-transcripcional d'alguns gens, pot ser un altre mecanisme durant el desenvolupament del càncer per tal de silenciar un gen de manera independent a la metilació del promotor. Un estudi recent indica que l'expressió del micro RNA mi-R-21 en els tumors de pròstata pot ser responsable de la reducció de l'expressió de Spry1 en aquests tumors, els quals no mostren una metilació del promotor (Darimipourain et al., 2011).

En resum, hem descrit una nova funció de Spry1 com un candidat gen supressor tumoral en el Carcinoma Medul·lar de Tiroide, que ens proporciona informació a l'hora d'estudiar noves dianes terapèutiques pel tractament i prevenció del MTC. Un possible tractament podria ser activar l'expressió de Sprouty1 als tumors malignes de manera farmacològica amb quimioterapèutics, per tal d'inhibir el creixement tumoral induint la senescència cel·lular. O també mitjançant teràpies epigenètiques, gràcies a agents desmetilants dels DNA o inhibidors de les histones deacetilases (Schmitt, 2007). Aquestes teràpies anti-cancerígenes podrien induir la senescència cel·lular en resposta a la desmetilació concreta del locus CDKN2A o d'altres supressors de tumors, com el promotor de Sprouty1 per reactivar la síntesi del gens (Lanigan et al., 2011). Tot i així, cal anar amb compte a l'hora d'utilitzar teràpies epigenètiques, ja que poden afectar l'expressió d'un gran nombre de gens importants tant de les cèl·lules normals com canceroses, alterant vies de senyalització necessàries per l'activitat fisiològica de les cèl·lules.

2. SPROUTY1 INDUEIX EL FENOTIP SECRETOR ASSOCIAT A LA SENESCÈNCIA CEL·LULAR (SASP) REGULANT L'ACTIVACIÓ DE LA VIA NF-KB A LA TIROIDE DELS RATOLINS.

A la segona part d'aquest treball vam voler seguir analitzant la funció que realitza Sprouty1 a la tiroide dels ratolins. Mentre continuàvem amb l'anàlisi de la tiroide dels ratolins *knockout* per Spry1 vam determinar que aquesta és més gran degut a l'increment de la proliferació de les cèl·lules fol·liculars. Quan realitzem cultius *in vitro* de cèl·lules fol·liculars dels ratolins mutants, aquestes proliferen més ràpidament que les cèl·lules provinents de la tiroide dels seus germans *wild-type*, cosa que ens indica que Spry1 provoca l'increment del tamany de la tiroide de manera autònoma.

D'altra banda les cèl·lules fol·liculars de la tiroide dels ratolins *knockout* per *Spry1* mostren una disminució dels marcadors de senescència cel·lular *in vivo*. Observem un descens dels nivells de p19ARF, una de les dues proteïnes producte del locus CDKN2A, una disminució de l'activitat β -galactosidasa i una disminució de les cèl·lules positives per Ki-67. A més, també hem descrit que *Sprouty1* activa la síntesi de IL-6 i KC mitjançant l'activació de la via NF- κ B i que és important per a la generació del fenotip secretor associat a la senescència cel·lular a la glàndula tiroide.

Els resultats que hem obtingut ens indiquen que els afectes de *Spry1* sobre la senescència cel·lular són independents tant de la via de senyalització de les MAPK/ERK com de la via PI3K/AKT, dues vies de senyalització activades pels RTK, on *Sprouty* hi juga un paper com a regulador. Cal dir que aquests mateixos resultats els hem observat en el model *in vitro* de Carcinoma Medul·lar de Tiroide, quan sobreexpressàvem *Spry1* a les cèl·lules TT. No obstant, encara que les proteïnes de la família de *Sprouty* es considerin inhibidors de la via de les MAPK/ERK, el paper que juguen dependrà del tipus cel·lular i del factor de creixement que activi la via. S'han trobat evidències que descriuen que les proteïnes de la família de *Sprouty* poden activar, inhibir o fins i tot no desencadenar cap efecte sobre la fosforil·lació i la via de senyalització de les MAPK/ERK (Edwin et al., 2009).

La tiroide dels ratolins *knockout* per *Sprouty1* no presenta la proteïna STAT3 fosforil·lada al residu Tyr705 i per tant la pèrdua de *Sprouty1* fa disminuir la seva activació donat que aquesta tirosina es troba al *loop* d'activació de STAT3. La proteïna STAT3 és un factor de transcripció que regula diversos gens involucrats en processos de supervivència, proliferació, invasió i angiogènesi (Aggarwal et al., 2009). Les proteïnes STAT poden induir la proliferació cel·lular activant l'expressió de ciclinaD o c-Myc, però també pot activar la síntesi d'inhibidors del cicle cel·lular com p21, p27 o p14ARF, cosa que causa la inhibició de la proliferació cel·lular (Bowman et al., 2000; Smithgall et al., 2000). Diverses publicacions descriuen que la fosforil·lació de la proteïna STAT3 s'ha observat en una gran varietat de teixits tumorals com el càncer de pròstata, pell, ovari, pulmons i en metàstasi provinents del càncer de tiroide i de mama entre d'altres (Chen et al., 2013; Gao et al., 2007; Mora et al., 2002; Pedranzini et al., 2004; Yue et al., 2012; Zhang et al., 2011), però aquesta funció pro-tumoral ha estat qüestionada per altres estudis, on s'ha descrit que la proteïna STAT3 activada pot comportar-se com un supressor de tumors als gliomes, càncer hepàtic, de mama, intestinal, de cap i coll i de tiroide (Couto et al., 2012; de la Iglesia et al., 2008b; Dilled-

Filhart et al., 2003; Kim et al., 2012; Musteanu et al., 2010; Pectasides et al., 2010; Schneller et al., 2011).

Així doncs, en glioblastomes humans la proteïna STAT3 pot jugar un paper pro-oncogènic o supressor tumoral depenent del *background* genètic o de les mutacions presents en aquest tipus de càncer. S'ha descrit que STAT3 pot formar un complex nuclear amb la variant oncogènica del EGFR (EGFRvIII) i induir la transformació glial o la formació de glioblastomes. D'altra banda, STAT3 pot actuar com un supressor de tumors per sota de la cascada de senyalització regulada per Pten, doncs a les cèl·lules de glioblastoma que presenten delecions en Pten s'observa una inhibició de la senyalització de STAT3 (de la Iglesia et al., 2008b). A més si s'expressa STAT3 en línies cel·lular de glioblastoma deficientes en Pten s'inhibeix la proliferació i la capacitat d'invasió i propagació a la mielina (de la Iglesia et al., 2008a). D'altra banda, en un model de ratolí de càncer intestinal, s'ha descrit que la pèrdua de STAT3 desencadena la progressió tumoral desenvolupant carcinomes més invasius (Musteanu et al., 2010). També s'ha observat en models de carcinoma hepatocel·lular que la proteïna STAT3 pot comportar-se com un gen supressor de tumor o un promotor del desenvolupament cancerigen depenent dels nivells de p19ARF (Schneller et al., 2011). A més s'ha correlacionat alts nivells nuclears de pY-STAT3 en tumors de cap i coll amb una millora de la supervivència tumoral i un fenotip menys agressiu (Pectasides et al., 2010).

Finalment dos estudis recents descriuen que STAT3 pot comportar-se com un supressor tumoral a la tiroide. Couto JP i els seus col·laboradors descriuen una correlació inversa entre l'expressió de STAT3 als carcinomes de tiroide (PTC, FTC, FTA) i el tamany dels tumors i la presència de metàstasis distals. A més, descriuen que el manteniment dels nivells alts de p-STAT3 a les línies cel·lulars derivades dels carcinomes de tiroide és degut a un *loop* autocrí induït per la via IL-6/gp130/JAK, que alhora suprimeix la tumorigènesi (Couto et al., 2012). Al mateix temps Kim i els seus col·laboradors demostren que l'activitat basal de STAT3 es troba disminuïda a les cèl·lules tumorals dels carcinomes papil·lars de tiroide (PTC) i també observen una correlació inversa entre l'activitat de STAT3 i el tamany del carcinoma a la tiroide (Kim et al., 2012). A més s'ha descrit una correlació positiva entre la fosforil·lació de STAT3 i l'expressió d' IGFBP7 (un factor SASP, discutit més endavant) (Freund et al., 2010; Wajapeyee et al., 2008), una proteïna que està involucrada en l'activitat inhibidora de la proteïna STAT3 sobre el creixement de les cèl·lules fol·liculars de la tiroide (Couto et al., 2012). És més, s'ha descrit que IGFBP7 pot actuar com un supressor de tumors ja

que els seus nivells es troben disminuïts en els carcinomes fol·liculars i papil·lars de la tiroide (Vizioli et al., 2010), càncer de mama (Benatar et al., 2012), melanoma (Wajapeyee et al., 2008) i en el càncer de colon, en aquest últim cas mitjançant silenciament epigenètic (hipermetilació del promotor de IGFBP7) (Lin et al., 2008; Wajapeyee et al., 2009).

Gràcies a un *array* d'anticossos hem pogut observar que la pèrdua de Sprouty1 fa disminuir el fenotip secretor associat a la senescència cel·lular a la tiroide, ja que hem observat una disminució de la secreció dels factors IL-6, KC, MIP-2, MIP-1 γ , RANTES i sTNFRII a la tiroide dels ratolins *Spry1*^{-/-}. Tots aquests factors són citocines pro-inflamatòries que formen part de del fenotip secretor associat a la senescència (SASP: *senescence-associated secretory phenotype*) o també anomenat secretoma senyalitzador de la senescència (SMS: *senescence messaging secretoma*) (Coppe et al., 2008; Freund et al., 2010; Kuilman and Peepers, 2009).

El SASP inclou diversos factors tant solubles com insolubles que poden dividir-se en tres categories: factors de senyalització solubles (interleucines, quemocines i factors de creixement), proteases secretades i proteïnes secretades insolubles de la matriu extracel·lular. S'ha descrit una gran llista de factors involucrats en SASP que poden actuar de manera autocrina o afectant les cèl·lules veïnes de manera paracrina (Coppe et al., 2010; Freund et al., 2010).

D'altra banda mitjançant ELISA i RT-PCR hem observat que la pèrdua de *Spry1* a la tiroide dels ratolins inhibeix l'expressió de IL-6, KC i IGFBP7, tres factors associats a SASP. Com ja hem explicat anteriorment, el gen de la IL-8 està deletat en rosegadors, per tant vam estudiar el que es considera el seu homòleg funcional, la proteïna KC, també coneguda com a CXCL1 o com GRO α en els humans. Tant la proteïna IL-8 com KC s'uneixen al mateix receptor CXCR2, i per tant es creu que poden desencadenar els mateixos efectes biològics per tal d'activar la senescència cel·lular (Acosta et al., 2008; Yang et al., 2006).

Encara que alguns factors SASP poden induir una resposta proliferativa d'una manera paracrina, s'han publicat tres articles al 2008 que descriuen diversos gens (IL-6, IL-8, CXCR2, IGFBP7) necessaris per activar i mantenir la senescència cel·lular de manera autònoma (Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008; Wajapeyee et al., 2008). Gràcies a experiments amb shRNA, demostren que la pèrdua d'aquests factors causa la inhibició de la senescència induïda per oncògens (OIS) o la senescència replicativa, de manera autònoma. Kuilman i els seus col·laboradors descriuen que la OIS induïda per

BrafV600E es correlaciona amb la síntesi de citocines pro-inflamatòries com la IL-6 i la IL-8, per un mecanisme autònom de la cèl·lula senescent (Kuilman et al., 2008). Al mateix temps, Acosta i els seus col·laboradors van descriure que la pèrdua del receptor de quemoquinas CXCR2 (receptor principal de IL-8, KC i GRO α) inhibeix tant la senescència replicativa com la OIS induïda per H-Ras, suggerint que les cèl·lules senescentes secreten quemoquinas que al unir-se al seu receptor CXCR2 reforcen l'aturada del creixement cel·lular i per tant la senescència cel·lular (Acosta et al., 2008). Finalment, Wajapeyee i els seus col·laboradors descriuen que l'expressió de BrafV600E en melanòcits incrementa la síntesi i secreció de la proteïna IGFBP7, que indueix tant apoptosi com senescència cel·lular, bloquejant la proliferació de les cèl·lules de forma autocrina i paracrina (Wajapeyee et al., 2008).

A banda del fenotip SASP, la tiroide dels ratolins *knockout* per *Sprouty1* presenten una disminució d'altres marcadors de senescència com l'activitat SA- β -GAL, p19ARF i Ki-67, cosa que ens permet suggerir que *Sprouty1* és necessari per a poder activar la senescència cel·lular a la tiroide dels ratolins. Mitjançant la síntesi i secreció de factors SASP

La IL1 α s'ha descrit com una interleucina essencial i necessària per activar la senyalització del fenotip secretor associat a la senescència cel·lular. La IL1 α interacciona amb el seu receptor (IL-1R) per mantenir l'estimulació de la cèl·lula i activar la secreció de IL-6/IL-8 a fi de conservar el fenotip secretor associat a la senescència (Apte et al., 2006; Orjalo et al., 2009). En els nostres resultats no observem diferències en els nivells de IL-1 α entre les tiroïdes WT i mutants a l'*array* d'anticossos, però sí en els nivells de IL-6 i KC. A més, les cèl·lules fol·liculars de la tiroide dels ratolins *wild-type* responen a estímuls de IL-1 α incrementant la secreció de IL-6 i KC per poder mantenir el fenotip SASP. D'altra banda, s'ha descrit que la IL-1 α estimula l'expressió de la IL-6 i la IL-8 a través de l'activació dels factors de transcripció C/EBP β i NF- κ B (Freund et al., 2010), a més, aquesta activació s'ha observat que és independent al tipus d'estímul inductor de la senescència cel·lular (Orjalo et al., 2009). Per tant al no observar cap diferència en els nivells de IL-1 α , podria ser que aquesta interleucina sigui la que activi *Sprouty1* per tal de desencadenar el fenotip secretor associat a la senescència cel·lular gràcies a l'activació de la via NF- κ B a les tiroïdes dels ratolins.

Actualment s'ha descrit que les vies de senyalització p53/ARF i pRB/p16INK4a implicades en l'activació de la senescència cel·lular no indueixen SASP (Campisi, 2005; McDuff and Turner, 2011). En canvi diverses publicacions han descrit els factors de

transcripció NF- κ B i C/EBP β , com a principals reguladors dels fenotip secretor associat a la senescència cel·lular (Burgess, 2011; Cappello et al., 2009; Rovillain et al., 2011; Salminen et al., 2012). S'ha demostrat que el factor de transcripció C/EBP β regula la síntesi tant de la IL-6 com de la IL-8, necessàries per l'entrada i el manteniment de la senescència cel·lular activada per un insult oncogènic (Kuilman et al., 2008). I per altra banda s'ha descrit que les cèl·lules sotmeses a un procés OIS secreten diverses quemoquinas que interaccionen amb el receptor CXCR2 mitjançant l'activació de vies de senyalització regulades pels factors de transcripció NF- κ B i C/EBP β (Acosta et al., 2008). Per altra banda s'ha observat una relació entre aquests factors de transcripció per tal d'activar la senescència cel·lular. Cappello *et al.* van observar que C/EBP β estimula la senyalització de la via NF- κ B mitjançant la reducció dels nivells de I κ B α . A més en aquests resultats la disminució dels nivells de I κ B α no depenen en cap cas de l'activació del complex IKKs. (Cappello et al., 2009).

S'ha demostrat que la senyalització de la via NF- κ B promou l'activació de la senescència cel·lular en fibroblasts, al sistema limfàtic i al sistema hepàtic (Chien et al., 2011; Jing et al., 2011; Rovillain et al., 2011; Xue et al., 2007). Chien *et al.* mitjançant tècniques de CHIP amb un model de fibroblasts humans senescents, mostren que la subunitat p65 es troba amb més freqüència a la cromatina de les cèl·lules senescents, si es compara amb p53, fet que provoca l'increment de l'expressió i secreció de factors SASP, com la IL-6 i la IL-8 entre d'altres (Chien et al., 2011). Paral·lelament Rouvillain *et al.* demostren que la inhibició de la via NF- κ B en fibroblasts humans pot sobrepassar l'aturada del creixement induïda per la senyalització via p53-p21Cip1, indicant que la via NF- κ B té un paper causal en la inducció de la senescència cel·lular (Rouvillain et al., 2011). El fet que l'expressió de citocines proinflamàtores, com IL-6 i IL-8, depengui de l'activació de la via NF- κ B, planteja la possibilitat que les cèl·lules senescents promoguin una activació de la vigilància immune, un component no autònom de la cèl·lula senescent.

Els nostres resultats demostren que si inhibim l'expressió de la cinasa IKK β , els nivells dels factors IL-6 i KC al medi de cultiu disminueixen, corroborant així el fet que la via NF- κ B activa la síntesi de citocines pro-inflamatòries a la tiroide dels ratolins *wild-type*. A més, la pèrdua de Sprouty1 a la tiroide provoca una disminució de l'activació de la via NF- κ B, ja que no es degrada la proteïna I κ B α i p65 es manté al citoplasma de les cèl·lules fol·liculars. D'altra banda hem observat que quan injectem amb LPS, un potent activador de la via NF- κ B, els ratolins *knockout* per Spry1, no observem una activació tant marcada de la via NF- κ B a la tiroide. Finalment resultats preliminars d'un

assaig luciferasa sota el promotor de la via NF- κ B ens indiquen que al sobreexpressar Sprouty1 a les cèl·lules 293T s'observa un increment de l'activitat luciferasa si es compara amb les cèl·lules control. El fet d'utilitzar un model més fàcil de manipular com les cèl·lules 293T ens permetrà investigar amb més profunditat el mecanisme d'acció de Sprouty1 sobre la via NF- κ B. Tots aquests resultats ens indiquen que Spry1 controla l'activació de la via NF- κ B, la qual regula la síntesi de IL-6 i KC a la tiroide, però no sabem si aquesta activació depèn del complex IKKs o pel contrari pot dependre del factor de transcripció C/EBP β .

L'absència d'un domini conservat a les proteïnes de Sprouty fa difícil determinar quin podria ser el mecanisme pel qual Sprouty1 modula la via NF- κ B per tal d'activar la senescència cel·lular. Per exemple s'ha descrit que la proteïna CIN85 (*Cbl interacting protein*) és una proteïna adaptadora que s'uneix al domini C-terminal de la ubiquitina lligasa E3 Cbl i estabilitza la seva funció. S'ha descrit que CIN85 interacciona amb el receptor de les cèl·lules B (BCR) i activa la via NF- κ B, mitjançant la activació de la proteïna IKK β per un mecanisme desconegut (Kometani et al., 2011). CIN85 interacciona amb Cbl i aquest s'ha descrit que interacciona amb Sprouty2 (Edwin et al., 2009). Les tres proteïnes formen un complex ternari provocant la competició de Cbl per la unió al receptor de EGF, cosa que causarà la degradació del receptor pel proteasoma (Haglund et al., 2005). A més s'ha descrit Cbl com un modulador de l'activació de la via NF- κ B a les cèl·lules dendrítiques (Chiou et al., 2011). Per altra banda les cinases de la família de Raf, incloent-hi B-raf interaccionen amb el domini CRD de Spry1 (Guy et al., 2009), a més a més, l'activació de Raf ha estat vinculada amb el mecanisme d'activació de la via NF- κ B (Arsura et al., 2000; Edelblum et al., 2008; Liu et al., 2007).

Al marge de l'activació de la via NF- κ B i el fenotip SASP, és possible que Spry1 activi la senescència cel·lular via mecanismes complementaris. Per altra banda un mecanisme pel qual Sprouty1 podria activar la senescència cel·lular seria mitjançant la proteïna cinasa Dyrk1A. Per exemple, resultats recents descriuen que aquesta cinasa pot fosforil·lar específicament la proteïna LIN52, necessària per l'assemblatge del complex DREAM, el qual promourà la senescència cel·lular (Litovchick et al., 2011). A més a més, s'ha demostrat que Dyrk1A interacciona amb Sprouty2 pel domini ric en cisteïnes (CRD) que es troba altament conservat en totes les isoformes de Sprouty (Aranda et al., 2008; Edwin et al., 2009; Guy et al., 2009). D'aquesta manera, Sprouty1 podria interaccionar amb la cinasa Dyrk1A i promoure l'activació de la senescència cel·lular. D'altra banda, mitjançant anàlisis d'interacció proteïna-proteïna, s'ha identificat que

Spry1 interacciona amb la proteïna E1A, un inhibidor de l'activació de senescència induïda per Ras en fibroblasts humans (Zaremba et al., 2011).

3. LA DELECIÓ GENÈTICA DE SPROUTY1 ACCELERA LA FORMACIÓ DE TUMORS EN RATOLINS HETEROZIGOTS PER PTEN.

Com ja s'ha dit anteriorment la senescència cel·lular s'ha postulat com una barrera per tal d'aturar la transformació de cèl·lules pre-malignes a tumors *in vivo*. Tot i així, encara que les cèl·lules de la tiroide dels ratolins mutants no presenten marcadors de senescència, aquest mecanisme no és suficient per desenvolupar tumors a la glàndula, almenys en els animals estudiats d'entre tres i cinc mesos d'edat. En aquest punt ens tornem a trobar amb el mateix handicap que la primera part del treball, doncs els ratolins *knockout* per Spry1 moren al voltant dels cinc mesos d'edat (Basson et al., 2005), fet que dificulta poder seguir estudiant la formació de tumors en aquest model animal (discutit més endavant).

En els nostres resultats, la senescència cel·lular s'observa a la tiroide dels ratolins *wild-type*, com un mecanisme fisiològic en un teixit normal. La gran majoria de cèl·lules dels mamífers tenen un temps de vida finit, es creu que desenvolupen un mecanisme de protecció contra la proliferació il·limitada i per tant acaben entrant en un procés de senescència cel·lular. Tot i que s'ha descrit que algunes cèl·lules senescentes són eliminades pel sistema immune (Kang et al., 2011), està ben establert que les cèl·lules dels teixits normals poden entrar en senescència i persistir en l'organisme adult, (Campisi, 2005; Dimri et al., 1995; Krishnamurthy et al., 2004). Un exemple són les pigues, les lesions benignes o pre-malignes, que freqüentment presenten mutacions oncogèniques de Braf (la mutació V600E) les quals activen la senescència cel·lular (Michaloglou et al., 2005). Aquest és un exemple de senescència induïda per oncògens (OIS) en un teixit de manera fisiològica.

Cal destacar que la glàndula tiroide es considera un òrgan en estat latent, que presenta una renovació cel·lular molt lenta. En humans, està estimat que les cèl·lules fol·licular de la tiroide es divideixen al voltant de cinc vegades durant tota l'edat adulta (Dumont et al., 1992). Per tant es podria suggerir que aquesta glàndula ha entrat en un estat d'aturada del creixement cel·lular o senescència de manera fisiològica.

La senescència induïda per oncògens (OIS) s'ha descrit com una barrera per la transformació tumoral causada per un insult oncogènic. Per tant les cèl·lules que no presenten la maquinària per activar una resposta de senescència són més susceptibles a la transformació tumoral. Per tal d'analitzar si les cèl·lules dels ratolins *knockout* per

Spry1 poden transformar-se després d'un estímul oncogènic, vam creuar la línia de ratolins mutants de Spry1 amb una línia de ratolins heterozigots per Pten. La proteïna Pten és una fosfatasa lipídica, que extreu grups fosfats del fosfatidilinositol(3,4,5)-trifosfat (PIP3), inactivant així la resposta en cascada i regenerant el fosfatidilinositol(4,5)-bifosfat (PIP2) (Maehama and Dixon, 1998; Myers and Tonks, 1997). Actua com a inhibidor de la via PI3K/Akt donat que limita l'activitat de la PI3K i per tant la inhibició de la fosforil·lació de la proteïna Akt (Sansal and Sellers, 2004). Pten és un dels principal supressors de tumors inactivat en un gran nombre de neoplàsies humanes, com el càncer de pròstata, d'endometri, glioblastoma, melanoma, càncer de mama i de tiroide (Alimonti et al., 2010a; Salmena et al., 2008; Sansal and Sellers, 2004). D'altra banda també s'ha descrit que la pèrdua de Pten activa mecanismes de senescència cel·lular (Alimonti et al., 2010b; Chen et al., 2005).

Com hem esmentat anteriorment, l'expressió dels gens de la família Sprouty pot estar disminuïda en diversos tipus de càncer, indicant la possibilitat que pugui actuar com un supressor de tumors. Els ratolins *knockout* per Spry1 de 3-5 mesos d'edat no desenvolupen cap signe de malignitat a la tiroide, sinó que presenten una hiperplàsia de les cèl·lules C i un augment del tamany de la glàndula. Per altra banda, els ratolins heterozigots per Pten desenvolupen una gran varietat de neoplàsies a diversos òrgans com a la mama, pròstata, endometri, pell, colon, sistema limfàtic, glàndula adrenal i també a la tiroide, entre d'altres (Di Cristofano et al., 1998; Podsypanina et al., 1999; Stambolic et al., 1998). Tot i així cal esmentar però que la deleció única de Pten presenta fenotips poc agressius, que poden contribuir a la tumorigènesi quan ho combinem amb altres alteracions genètiques (Chang et al., 2008; Chen et al., 2006; Chen et al., 2005; You et al., 2002).

Quan vam analitzar els ratolins doble mutants per Pten i Spry1 vam observar que desenvolupen neoplàsies a la tiroide en edats primerenques, entre 3 i 5 mesos d'edat si ho comparem amb les tiroides dels seus germans Pten^{+/-}. D'altra banda, vam voler estudiar les glàndules adrenals, perquè s'ha descrit una estreta relació entre el desenvolupament del MTC amb l'aparició de feocromocitomes quan s'observen mutacions del tipus MEN2A al receptor Ret. A més, una fracció dels ratolins Pten^{+/-} adults (al voltant de 30 setmanes) desenvolupen aquest tipus de tumors a la glàndula adrenal (Podsypanina et al., 1999; Puc et al., 2006). A l'analitzar els ratolins doble mutants per Pten i Spry1 vam observar que gairebé el 50% desenvolupen feocromocitoma. Aquests resultats ens indiquen que després d'un insult oncogènic,

com la pèrdua d'un al·lel de Pten, la deleció total o parcial de Sprouty1 activa la transformació de les cèl·lules normals o pre-malignes a cèl·lules tumorals.

Pten s'ha descrit com un supressor de tumors i que actua com una barrera per la transformació tumoral, ja que protegeix les cèl·lules d'una transformació oncogènica mitjançant la inducció de la senescència cel·lular. Recolzant aquest fet, s'ha demostrat que la deleció de Pten a la pròstata indueix la senescència cel·lular, però si s'indueix una deleció de *Trp53* al mateix temps, se sobrepassa l'entrada en senescència i es generen tumors més agressius. De manera consistent s'ha descrit que la supressió de Pten promou l'aparició d'un carcinoma de pròstata poc agressiu i de llarga latència, en canvi els ratolins doble mutants (pèrdua de Pten i *Trp53*) desenvolupen carcinomes prostàtics molt agressiu i letals (Chen et al., 2005). També, s'ha descrit que l'expressió de AKT1 a la pròstata causa el desenvolupament d'una hiperplàsia intraepitelial a la pròstata (PIN) on s'observen marcadors de senescència. Però si aquest genotip es combina amb ratolins que presenten deleccions de *CDKN1b* (p27), s'evita l'entrada de senescència i es desenvolupa un carcinoma de pròstata invasiu (Majumder et al., 2008). Per altra banda, s'ha demostrat que amb els ratolins doble mutants per Pten i pel locus *INK4a/Arf*, també desenvolupen una gran varietat de tumors molt agressius, si es comparen amb els ratolins heterozigots per Pten. Entre les diferents neoplàsies s'observa el desenvolupament de feocromocitomes, ja que la pèrdua del locus *CDKN2A* podria provocar la inhibició de la senescència cel·lular a les cèl·lules cromafins i per tant un increment en la transformació tumoral d'aquestes. S'ha descrit almenys quatre vies de senyalització que tenen un paper important en la formació de feocromocitomes: la inactivació de la via p16INK4a-Rb i la via p19ARF-p53, activació del receptor tirosina cinasa Ret o una alteració de les proteïnes que formen part de la cascada de senyalització de Ret, i la deleció d'un supressor de tumors com VHL, SDH, MYC i MAX (Gimenez-Roqueplo et al., 2012; You et al., 2002).

Donat el seu paper causal en la inducció i manteniment de la senescència, no és sorprenent que el fenotip secretor associat a la senescència cel·lular (SASP) pugui actuar com un mecanisme de supressió tumoral. S'ha descrit que l'expressió de CXCR2, un receptor de quimocines com la IL-8 i CXCL1, incrementa en les lesions preneoplàsiques de pròstata i de pell *in vivo* (Acosta et al., 2008). També s'ha descrit que l'expressió de IL-8 col·localitza amb p16INK4a en adenomes de colon humans i la manca d'expressió d'aquestes dues proteïnes correlaciona amb l'augment de cèl·lules positives per Ki-67 (Kuilman et al., 2008). Finalment s'ha demostrat que la disminució

dels nivells de IGFBP7 es correlaciona amb el desenvolupament de melanomes en humans (Wajapeyee et al., 2008).

No obstant això, existeix certa controvèrsia sobre les funcions biològiques que poden causar els factors secretats per les cèl·lules senescentes. Si els factors actuen de forma autocrina reforcen l'aturada del creixement de la pròpia cèl·lula senescent actuant com a supressors tumorals (Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008). Però per altra banda, si actuen de forma paracrina poden activar la senescència de les cèl·lules veïnes que comparteixen el mateix microambient o tot el contrari, activar la proliferació, invasió i/o transformació cel·lular de les cèl·lules cancerígenes veïnes (Coppe et al., 2008; Krtolica et al., 2001; Kuilman et al., 2010; Orjalo et al., 2009; Wajapeyee et al., 2008; Xue et al., 2007; Yang et al., 2006; Young and Narita, 2009). S'ha descrit que les mateixes citocines pro-inflamatòries poden activar mecanismes de supressió tumoral o pro-tumorals depenent de la cèl·lula diana (Campisi, 2005). Per exemple la proteïna STAT3 juga un paper com a supressor tumoral per sota de cascada de senyalització de Pten en les cèl·lules glials, però pot formar un complex nuclear amb la variant oncogènica de EGFR i induir la formació de glioblastomes (de la Iglesia et al., 2008b). També s'ha observat que la proteïna STAT3 presenta un paper dual com a supressor tumoral o activador del desenvolupament cancerigen depenent dels nivells de p19ARF en els carcinomes hepàtics (Schneller et al., 2011). Un altre exemple es la secreció de citocines pro-inflamatòries com IL-6 i IL-8 que poden activar i mantenir el fenotip senescent de manera autocrina i autònoma o pel contrari activar el desenvolupament tumoral mitjançant mecanismes paracrins i no autònoms (Young and Narita, 2009). Finalment el TGF β pot activar mecanismes activadors o inhibidors de la transformació tumorals depenent de l'estadi de malignitat (Massague, 2008). Tots aquests resultats ens indiquen que les funcions biològiques desencadenades pel fenotip SASP depenen del tipus i context cel·lular i sobretot de les lesions oncogèniques que presenten les cèl·lules dianes (Kuilman et al., 2010; Salminen et al., 2012).

Aquesta controvèrsia també la trobem en el cas dels gens de la via NF- κ B, ja que l'expressió forçada de la via pot sobrepassar la senescència cel·lular i activar la progressió tumoral (Batsi et al., 2009; Jing et al., 2011), o tot el contrari, actuar com un supressor de tumors activant la senescència cel·lular. S'ha demostrat que la via NF- κ B controla programes tant autònoms com no autònoms de la cèl·lula per activar mecanisme de senescència cel·lular i actuar com un supressor tumoral contribuint a la investigació de noves teràpies contra el càncer (Burgess, 2011; Chien et al., 2011; Jing et al., 2011). A més diversos estudis suggereixen que la via NF- κ B regula i activa la

síntesi de citocines proinflamatòries pròpies del SASP (Acosta et al., 2008; Rovillain et al., 2011; Wang et al., 2009).

En resum els nostres resultats demostren que Spry1 indueix la via NF- κ B que activarà la síntesi de diverses citocines pro-inflamatòries provocant l'activació i manteniment del SASP a les cèl·lules de la glàndula tiroide (Figura 50).

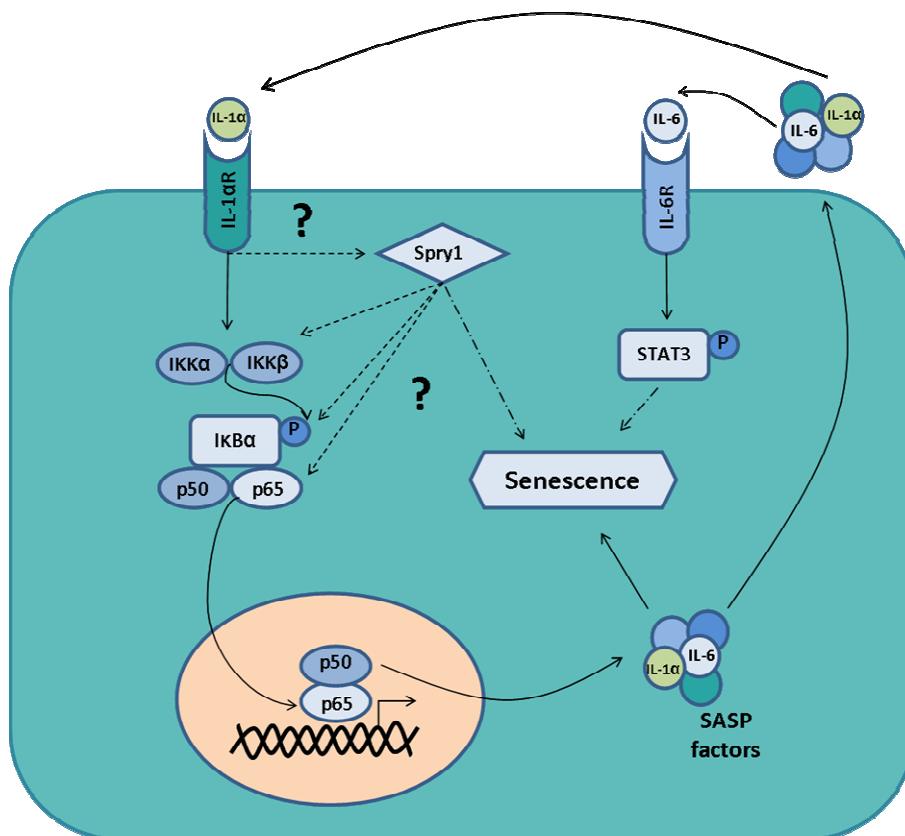


Figura 50: **Esquema del paper de Sprouty1 a la glàndula tiroide.** Els nostres resultats suggereixen que Sprouty1 activa la via NF- κ B, provocant la síntesi de diverses citocines pro-inflamatòries, com IL-6 i KC que actuaran de manera autocrina activant el fenotip secretor associat a la senescència cel·lular a la glàndula tiroide.

La secreció de citocines, com IL-6 activarà la proteïna STAT3 activant mecanismes de supressió tumoral. A més Sprouty1 actua com un supressor de tumors a la tiroide i a la glàndula adrenal ja que la pèrdua de Spry1 en un fons genètic Pten^{+/-} provoca un increment del risc de tumorigènesi en aquests òrgans. En consonància amb els nostres resultats, s'ha publicat molt recentment dos estudis que demostren, mitjançant models *in vivo* de ratolí, la relació de la progressió del càncer de pròstata amb la pèrdua de diferents membres de la família de Sprouty. Descriuen que la pèrdua de Sprouty1 i/o Sprouty2 juntament amb haploinsuficiència de Pten provoca el creixement tumoral del epiteli de la pròstata (Patel et al., 2013; Schutzman and Martin, 2012) fet que dona més força als nostres resultats.

Donat que s'ha observat alteracions en els nivells de les proteïnes de Sprouty en una gran varietat de tumors, estudis futurs podrien estar dirigits a estudiar i analitzar els possibles mecanismes que es desencadenen a les cèl·lules canceroses quan es perd l'expressió d'aquests gens i fa que siguin més susceptibles al desenvolupament tumoral. A més, també s'hauria d'estudiar els mecanismes que causen la inhibició de l'expressió dels membres de la família de Sprouty en les cèl·lules tumorals (Lo et al., 2006).

L'estudi dels gens de la família de Sprouty podria ser un objectiu pel desenvolupament de noves dianes terapèutiques. Per exemple una nova estratègia pel tractament anti-tumoral podria ser la reactivació dels gens de Sprouty mitjançant l'activació del seu RNA, ja que els nivells d'expressió estan reduït en les cèl·lules tumorals (Kang et al., 2012), a fi de prevenir o retardar l'aparició de lesions malignes més agressives mitjançant la modulació de les seves vies de senyalització principals, com la senescència cel·lular. Una altra teràpia anti-cancerígena podria ser l'activació del fenotip secretor associat a la senescència cel·lular mitjançant l'expressió de les proteïnes de Sprouty1. En aquest sentit, és molt important adquirir un coneixement específic del mecanisme responsable de la inducció de senescència, ja que durant el fenotip SASP, els factors secretats poden reforçar la senescència de forma autocrina i paracrina, però també poden estimular fenotips malignes de les cèl·lules tumorals veïnes (Collado and Serrano, 2010).

Conclusions

Primera. El ratolí *knockout* per Sprouty1 desenvolupa hiperplàsia de les cèl·lules C.

Segona. L'expressió de Sprouty1 redueix la proliferació de la línia cel·lular TT, tant en models *in vitro* com en tumors subcutanis *in vivo*.

Tercera. L'expressió de Sprouty1 a les cèl·lules TT no inhibeix la via de senyalització del receptor tirosina cinasa Ret, sinó que indueix l'expressió del locus CDKN2A i activa la senescència cel·lular.

Quarta. Els Carcinomes medul·lars de tiroide humans presenten metilació del promotor de Sprouty1 que comporta la reducció dels nivells d'expressió d'aquest gen.

Cinquena. Els ratolins *knockout* per Sprouty1 presenten un augment del tamany de la glàndula tiroide degut a l'increment de la proliferació de les cèl·lules fol·liculars.

Sisena. Sprouty1 no inhibeix la fosforilació de les proteïnes ERK ni AKT a la tiroide sinó que activa la fosforilació de les proteïnes STAT3.

Setena. Sprouty1 indueix el fenotip secretor associat a la senescència cel·lular (SASP) a la glàndula tiroide dels ratolins, gràcies a l'activació de la via NFκB.

Vuitena. Les cèl·lules fol·liculars de la tiroide dels ratolins *knockout* per Spry1 mostren una disminució dels marcadors de senescència cel·lular, com l'activitat β-Galactosidasa, p19ARF i SASP.

Novena. La deleció gènica de Spry1 en animals heterozigots per Pten accelera el desenvolupament de tumors a la glàndula tiroide i a la glàndula adrenal.

Bibliografia

Acosta, J. C., O'Loghlen, A., Banito, A., Guijarro, M. V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., *et al.* (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. In *Cell*, (United States), pp. 1006-1018.

Acton, D. S., Velthuyzen, D., Lips, C. J., and Hoppener, J. W. (2000). Multiple endocrine neoplasia type 2B mutation in human RET oncogene induces medullary thyroid carcinoma in transgenic mice. *Oncogene* 19, 3121-3125.

Adams, P. D. (2009). Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence. In *Mol Cell*, (United States), pp. 2-14.

Aggarwal, B. B., Kunnumakkara, A. B., Harikumar, K. B., Gupta, S. R., Tharakan, S. T., Koca, C., Dey, S., and Sung, B. (2009). Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci* 1171, 59-76.

Airaksinen, M. S., and Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3, 383-394.

Airaksinen, M. S., Titievsky, A., and Saarma, M. (1999). GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 13, 313-325.

Akbulut, S., Reddi, A. L., Aggarwal, P., Ambardekar, C., Canciani, B., Kim, M. K., Hix, L., Vilimas, T., Mason, J., Basson, M. A., *et al.* (2010). Sprouty proteins inhibit receptor-mediated activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Mol Biol Cell* 21, 3487-3496.

Akeno-Stuart, N., Croyle, M., Knauf, J. A., Malaguarnera, R., Vitagliano, D., Santoro, M., Stephan, C., Grosios, K., Wartmann, M., Cozens, R., *et al.* (2007). The RET kinase inhibitor NVP-AST487 blocks growth and calcitonin gene expression through distinct mechanisms in medullary thyroid cancer cells. In *Cancer Res*, (United States), pp. 6956-6964.

Alberti, L., Borrello, M. G., Ghizzoni, S., Torriti, F., Rizzetti, M. G., and Pierotti, M. A. (1998). Grb2 binding to the different isoforms of Ret tyrosine kinase. *Oncogene* 17, 1079-1087.

Alessi, D. R., Pearce, L. R., and Garcia-Martinez, J. M. (2009). New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Sci Signal* 2, pe27.

Alimonti, A., Carracedo, A., Clohessy, J. G., Trotman, L. C., Nardella, C., Egia, A., Salmena, L., Sampieri, K., Haveman, W. J., Brogi, E., *et al.* (2010a). Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. In *Nat Genet*, (United States), pp. 454-458.

Alimonti, A., Nardella, C., Chen, Z., Clohessy, J. G., Carracedo, A., Trotman, L. C., Cheng, K., Varmeh, S., Kozma, S. C., Thomas, G., *et al.* (2010b). A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J Clin Invest* 120, 681-693.

- Amiel, J., and Lyonnet, S. (2001). Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *J Med Genet* 38, 729-739.
- Amiel, J., Sproat-Emison, E., Garcia-Barcelo, M., Lantieri, F., Burzynski, G., Borrego, S., Pelet, A., Arnold, S., Miao, X., Griseri, P., *et al.* (2008). Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* 45, 1-14.
- Apte, R. N., Dotan, S., Elkabets, M., White, M. R., Reich, E., Carmi, Y., Song, X., Dvozkin, T., Krelin, Y., and Voronov, E. (2006). The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and. *Cancer Metastasis Rev* 25, 387-408.
- Aranda, S., Alvarez, M., Turro, S., Laguna, A., and de la Luna, S. (2008). Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A. In *Mol Cell Biol*, (United States), pp. 5899-5911.
- Arighi, E., Borrello, M. G., and Sariola, H. (2005). RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 441-467.
- Arsura, M., Mercurio, F., Oliver, A. L., Thorgeirsson, S. S., and Sonenshein, G. E. (2000). Role of the I κ B kinase complex in oncogenic Ras- and Raf-mediated transformation of rat liver epithelial cells. *Mol Cell Biol* 20, 5381-5391.
- Asai, N., Iwashita, T., Matsuyama, M., and Takahashi, M. (1995). Mechanism of activation of the ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutations. *Mol Cell Biol* 15, 1613-1619.
- Asai, N., Jijiwa, M., Enomoto, A., Kawai, K., Maeda, K., Ichihara, M., Murakumo, Y., and Takahashi, M. (2006). RET receptor signaling: dysfunction in thyroid cancer and Hirschsprung's disease. In *Pathol Int*, (Australia), pp. 164-172.
- Ball, D. W. (2007). Medullary thyroid cancer: monitoring and therapy. In *Endocrinol Metab Clin North Am*, (United States), pp. 823-837, viii.
- Baloh, R. H., Enomoto, H., Johnson, E. M., and Milbrandt, J. (2000). The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* 10, 103-110.
- Basolo, F., Fiore, L., Pollina, L., Fontanini, G., Conaldi, P. G., and Toniolo, A. (1998). Reduced expression of interleukin 6 in undifferentiated thyroid carcinoma: in. *Clin Cancer Res* 4, 381-387.
- Basson, M. A., Akbulut, S., Watson-Johnson, J., Simon, R., Carroll, T. J., Shakya, R., Gross, I., Martin, G. R., Lufkin, T., McMahon, A. P., *et al.* (2005). Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction. *Dev Cell* 8, 229-239.
- Basson, M. A., Watson-Johnson, J., Shakya, R., Akbulut, S., Hyink, D., Costantini, F. D., Wilson, P. D., Mason, I. J., and Licht, J. D. (2006). Branching morphogenesis of the ureteric epithelium during kidney development is coordinated by the opposing functions of GDNF and Sprouty1. *Dev Biol* 299, 466-477.

- Batsi, C., Markopoulou, S., Vartholomatos, G., Georgiou, I., Kanavaros, P., Gorgoulis, V. G., Marcu, K. B., and Kolettas, E. (2009). Chronic NF-kappaB activation delays RasV12-induced premature senescence of human fibroblasts by suppressing the DNA damage checkpoint response. In *Mech Ageing Dev*, (Ireland), pp. 409-419.
- Bavik, C., Coleman, I., Dean, J. P., Knudsen, B., Plymate, S., and Nelson, P. S. (2006). The Gene Expression Program of Prostate Fibroblast Senescence Modulates Neoplastic Epithelial Cell Proliferation through Paracrine Mechanisms.
- Bayascas, J. R., Leslie, N. R., Parsons, R., Fleming, S., and Alessi, D. R. (2005). Hypomorphic mutation of PDK1 suppresses tumorigenesis in PTEN(+/-) mice. In *Curr Biol*, (England), pp. 1839-1846.
- Ben-Porath, I., and Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 961-976.
- Benatar, T., Yang, W., Amemiya, Y., Evdokimova, V., Kahn, H., Holloway, C., and Seth, A. (2012). IGFBP7 reduces breast tumor growth by induction of senescence and apoptosis pathways. *Breast Cancer Res Treat* 133, 563-573.
- Berishaj, M., Gao, S. P., Ahmed, S., Leslie, K., Al-Ahmadie, H., Gerald, W. L., Bornmann, W., and Bromberg, J. F. (2007). Stat3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/glycoprotein 130/Janus. *Breast Cancer Res* 9, R32.
- Bianco, A. C., and Larsen, P. R. (2005). Cellular and structural biology of the deiodinases. *Thyroid* 15, 777-786.
- Bongarzone, I., Vigano, E., Alberti, L., Borrello, M. G., Pasini, B., Greco, A., Mondellini, P., Smith, D. P., Ponder, B. A., Romeo, G., and Pierotti, M. A. (1998). Full activation of MEN2B mutant RET by an additional MEN2A mutation or by ligand GDNF stimulation. *Oncogene* 16, 2295-2301.
- Borrello, M. G., Alberti, L., Arighi, E., Bongarzone, I., Battistini, C., Bardelli, A., Pasini, B., Piutti, C., Rizzetti, M. G., Mondellini, P., *et al.* (1996). The full oncogenic activity of Ret/ptc2 depends on tyrosine 539, a docking site for phospholipase Cgamma. *Mol Cell Biol* 16, 2151-2163.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474-2488.
- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A. H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C. A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. In *Nature*, (England), pp. 660-665.
- Burgess, D. J. (2011). Senescence. NF-kappaB shows its beneficial side. In *Nat Rev Cancer*, (England), pp. 832-833.

Cabrita, M. A., and Christofori, G. (2008). Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. *Angiogenesis* 11, 53-62.

Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. In *Cell*, (United States), pp. 513-522.

Campisi, J. (2011). Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. In *Curr Opin Genet Dev*, (England: 2010 Elsevier Ltd), pp. 107-112.

Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* 75, 685-705.

Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. In *Nat Rev Mol Cell Biol*, (England), pp. 729-740.

Cappello, C., Zwergal, A., Kanclerski, S., Haas, S. C., Kandemir, J. D., Huber, R., Page, S., and Brand, K. (2009). C/EBPbeta enhances NF-kappaB-associated signalling by reducing the level of IkappaB-alpha. In *Cell Signal*, (England), pp. 1918-1924.

Carlson, K. M., Dou, S., Chi, D., Scavarda, N., Toshima, K., Jackson, C. E., Wells, S. A., Goodfellow, P. J., and Donis-Keller, H. (1994). Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1579-1583.

Carniti, C., Belluco, S., Riccardi, E., Cranston, A. N., Mondellini, P., Ponder, B. A., Scanziani, E., Pierotti, M. A., and Bongarzone, I. (2006). The Ret(C620R) mutation affects renal and enteric development in a mouse model of Hirschsprung's disease. *Am J Pathol* 168, 1262-1275.

Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., Guertin, D. A., Chang, J. H., Lindquist, R. A., Moffat, J., *et al.* (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. In *Genome Biol*, (England), p. R100.

Casci, T., Vinos, J., and Freeman, M. (1999). Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. In *Cell*, (United States), pp. 655-665.

Cerrato, A., De Falco, V., and Santoro, M. (2009). Molecular genetics of medullary thyroid carcinoma: the quest for novel therapeutic targets. In *J Mol Endocrinol*, (England), pp. 143-155.

Chang, C. J., Mulholland, D. J., Valamehr, B., Mosessian, S., Sellers, W. R., and Wu, H. (2008). PTEN nuclear localization is regulated by oxidative stress and mediates p53-dependent tumor suppression. *Mol Cell Biol* 28, 3281-3289.

Chen, M. L., Xu, P. Z., Peng, X. D., Chen, W. S., Guzman, G., Yang, X., Di Cristofano, A., Pandolfi, P. P., and Hay, N. (2006). The deficiency of Akt1 is sufficient to suppress tumor development in Pten+/- mice. In *Genes Dev*, (United States), pp. 1569-1574.

Chen, Y., Wang, J., Wang, X., Liu, X., Li, H., Lv, Q., Zhu, J., Wei, B., and Tang, Y. (2013). STAT3, a Poor Survival Predictor, Is Associated with Lymph Node Metastasis from. *J Breast Cancer* 16, 40-49.

Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H. K., Dotan, Z. A., Niki, M., Koutcher, J. A., Scher, H. I., Ludwig, T., Gerald, W., *et al.* (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. In *Nature*, (England), pp. 725-730.

Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., Premssirrut, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C. S., *et al.* (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. In *Genes Dev*, (United States), pp. 2125-2136.

Chiou, S. H., Shahi, P., Wagner, R. T., Hu, H., Lapteva, N., Seethammagari, M., Sun, S. C., Levitt, J. M., and Spencer, D. M. (2011). The E3 ligase c-Cbl regulates dendritic cell activation. *EMBO Rep* 12, 971-979.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., *et al.* (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. In *Nature*, (England), p. 642.

Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 10, 51-57.

Coppe, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor. *Annu Rev Pathol* 5, 99-118.

Coppe, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Munoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. In *PLoS Biol*, (United States), pp. 2853-2868.

Corvi, R., Lesueur, F., Martinez-Alfaro, M., Zini, M., Decaussin, M., Murat, A., and Romeo, G. (2001). RET rearrangements in familial papillary thyroid carcinomas. In *Cancer Lett*, (Ireland), pp. 191-198.

Costantini, F., and Shakya, R. (2006). GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *Bioessays* 28, 117-127.

Coulpier, M., Anders, J., and Ibáñez, C. F. (2002). Coordinated activation of autophosphorylation sites in the RET receptor tyrosine kinase: importance of tyrosine 1062 for GDNF mediated neuronal differentiation and survival. *J Biol Chem* 277, 1991-1999.

Couto, J. P., Daly, L., Almeida, A., Knauf, J. A., Fagin, J. A., Sobrinho-Simoes, M., Lima, J., Maximo, V., Soares, P., Lyden, D., and Bromberg, J. F. (2012). STAT3 negatively regulates thyroid tumorigenesis. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, (United States), pp. E2361-2370.

Crescenzi, E., Pacifico, F., Lavorgna, A., De Palma, R., D'Aiuto, E., Palumbo, G., Formisano, S., and Leonardi, A. (2011). NF-kappaB-dependent cytokine secretion controls Fas expression on chemotherapy-induced premature senescent tumor cells. *Oncogene* *30*, 2707-2717.

Dankort, D., Filenova, E., Collado, M., Serrano, M., Jones, K., and McMahon, M. (2007). A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev* *21*, 379-384.

Darimipourain, M., Wang, S., Ittmann, M., and Kwabi-Addo, B. (2011). Transcriptional and post-transcriptional regulation of Sprouty1, a receptor tyrosine kinase inhibitor in prostate cancer. In *Prostate Cancer Prostatic Dis*, (England), pp. 279-285.

de la Iglesia, N., Konopka, G., Lim, K. L., Nutt, C. L., Bromberg, J. F., Frank, D. A., Mischel, P. S., Louis, D. N., and Bonni, A. (2008a). Dereglulation of a STAT3-interleukin 8 signaling pathway promotes human glioblastoma cell proliferation and invasiveness. *J Neurosci* *28*, 5870-5878.

de la Iglesia, N., Konopka, G., Puram, S. V., Chan, J. A., Bachoo, R. M., You, M. J., Levy, D. E., Depinho, R. A., and Bonni, A. (2008b). Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway. In *Genes Dev*, (United States), pp. 449-462.

DeLellis, R., Lloyd, R., Heitz, P., and Eng, C. (2004). WHO Classification. Tumours of Endocrine Organs, (Lyon: IARC Press).

DeLellis, R. A. (2006). Pathology and genetics of thyroid carcinoma. *J Surg Oncol* *94*, 662-669.

Dhomen, N., Reis-Filho, J. S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C., and Marais, R. (2009). Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* *15*, 294-303.

Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P. P. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* *19*, 348-355.

Dimri, G. P., Itahana, K., Acosta, M., and Campisi, J. (2000). Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol* *20*, 273-285.

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 9363-9367.

Diéguez, C., and Yturriaga, R. (2007). *Tiroides*, 2n edition edn: McGraw-Hill).

Dolcet, X., Llobet, D., Encinas, M., Pallares, J., Cabero, A., Schoenenberger, J. A., Comella, J. X., and Matias-Guiu, X. (2006). Proteasome inhibitors induce death but

activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *J Biol Chem* 281, 22118-22130.

Dolled-Filhart, M., Camp, R. L., Kowalski, D. P., Smith, B. L., and Rimm, D. L. (2003). Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res* 9, 594-600.

Downward, J. (2004). PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 15, 177-182.

Dumont, J. E., Lamy, F., Roger, P., and Maenhaut, C. (1992). Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol Rev* 72, 667-697.

Edelblum, K. L., Washington, M. K., Koyama, T., Robine, S., Baccharini, M., and Polk, D. B. (2008). Raf protects against colitis by promoting mouse colon epithelial cell survival through NF-kappaB. *Gastroenterology* 135, 539-551.

Edwin, F., Anderson, K., Ying, C., and Patel, T. B. (2009). Intermolecular interactions of Sprouty proteins and their implications in development and disease. In *Mol Pharmacol*, (United States), pp. 679-691.

Edwin, F., Singh, R., Endersby, R., Baker, S. J., and Patel, T. B. (2006). The tumor suppressor PTEN is necessary for human Sprouty 2-mediated inhibition of cell proliferation. In *J Biol Chem*, (United States), pp. 4816-4822.

Egan, J. E., Hall, A. B., Yatsula, B. A., and Bar-Sagi, D. (2002). The bimodal regulation of epidermal growth factor signaling by human Sprouty proteins. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, (United States), pp. 6041-6046.

Elia, M. G., Muscella, A., Romano, S., Greco, S., Di Jeso, B., Verri, T., Storelli, C., and Marsigliante, S. (2005). Effects of extracellular nucleotides in the thyroid: P2Y2 receptor-mediated ERK1/2 activation and c-Fos induction in PC Cl3 cells. *Cell Signal* 17, 739-749.

Encinas, M., Crowder, R. J., Milbrandt, J., and Johnson, E. M. (2004). Tyrosine 981, a novel ret autophosphorylation site, binds c-Src to mediate neuronal survival. *J Biol Chem* 279, 18262-18269.

Encinas, M., Rozen, E. J., Dolcet, X., Jain, S., Comella, J. X., Milbrandt, J., and Johnson, E. M. (2008). Analysis of Ret knockin mice reveals a critical role for IKKs, but not PI 3-K, in neurotrophic factor-induced survival of sympathetic neurons. *Cell Death Differ* 15, 1510-1521.

Eng, C., Clayton, D., Schuffenecker, I., Lenoir, G., Cote, G., Gagel, R. F., van Amstel, H. K., Lips, C. J., Nishisho, I., Takai, S. I., *et al.* (1996). The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA* 276, 1575-1579.

Eng, P. H., Cardona, G. R., Fang, S. L., Previti, M., Alex, S., Carrasco, N., Chin, W. W., and Braverman, L. E. (1999). Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* *140*, 3404-3410.

Fagman, H., and Nilsson, M. (2010). Morphogenesis of the thyroid gland. In *Mol Cell Endocrinol*, (Ireland), pp. 35-54.

Fong, C. W., Chua, M. S., McKie, A. B., Ling, S. H., Mason, V., Li, R., Yusoff, P., Lo, T. L., Leung, H. Y., So, S. K., and Guy, G. R. (2006). Sprouty 2, an inhibitor of mitogen-activated protein kinase signaling, is down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* *66*, 2048-2058.

Frank, M. J., Dawson, D. W., Bensinger, S. J., Hong, J. S., Knosp, W. M., Xu, L., Balatoni, C. E., Allen, E. L., Shen, R. R., Bar-Sagi, D., *et al.* (2009). Expression of sprouty2 inhibits B-cell proliferation and is epigenetically silenced in mouse and human B-cell lymphomas. *Blood* *113*, 2478-2487.

Frattini, M., Ferrario, C., Bressan, P., Balestra, D., De Cecco, L., Mondellini, P., Bongarzone, I., Collini, P., Gariboldi, M., Pilotti, S., *et al.* (2004). Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. In *Oncogene*, (England), pp. 7436-7440.

Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P. Y., and Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. In *Trends Mol Med*, (England: 2010 Elsevier Ltd), pp. 238-246.

Fritzsche, S., Kenzelmann, M., Hoffmann, M. J., Müller, M., Engers, R., Gröne, H. J., and Schulz, W. A. (2006). Concomitant down-regulation of SPRY1 and SPRY2 in prostate carcinoma. *Endocr Relat Cancer* *13*, 839-849.

Funayama, R., and Ishikawa, F. (2007). Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma* *116*, 431-440.

Gallel, P., Pallares, J., Dolcet, X., Llobet, D., Eritja, N., Santacana, M., Yeramian, A., Palomar-Asenjo, V., Lagarda, H., Mauricio, D., *et al.* (2008). Nuclear factor-kappaB activation is associated with somatic and germ line RET mutations in medullary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* *39*, 994-1001.

Gao, S. P., Mark, K. G., Leslie, K., Pao, W., Motoi, N., Gerald, W. L., Travis, W. D., Bornmann, W., Veach, D., Clarkson, B., and Bromberg, J. F. (2007). Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J Clin Invest* *117*, 3846-3856.

Garcia-Rostan, G., Costa, A. M., Pereira-Castro, I., Salvatore, G., Hernandez, R., Hermsem, M. J., Herrero, A., Fusco, A., Cameselle-Teijeiro, J., and Santoro, M. (2005). Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. In *Cancer Res*, (United States), pp. 10199-10207.

Gil, J., and Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 667-677.

Gimenez-Roqueplo, A. P., Dahia, P. L., and Robledo, M. (2012). An update on the genetics of paraganglioma, pheochromocytoma, and associated hereditary syndromes. *Horm Metab Res* 44, 328-333.

Giusti, F., Falchetti, A., Franceschelli, F., Marini, F., Tanini, A., and Brandi, M. L. (2010). Thyroid cancer: current molecular perspectives. *J Oncol* 2010, 351679.

Goel, V. K., Ibrahim, N., Jiang, G., Singhal, M., Fee, S., Flotte, T., Westmoreland, S., Haluska, F. S., Hinds, P. W., and Haluska, F. G. (2009). Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene* 28, 2289-2298.

Gross, I., Bassit, B., Benezra, M., and Licht, J. D. (2001a). Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. In *J Biol Chem*, (United States), pp. 46460-46468.

Gross, I., Bassit, B., Benezra, M., and Licht, J. D. (2001b). Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J Biol Chem* 276, 46460-46468.

Guy, G. R., Jackson, R. A., Yusoff, P., and Chow, S. Y. (2009). Sprouty proteins: modified modulators, matchmakers or missing links? *J Endocrinol* 203, 191-202.

Guy, G. R., Wong, E. S., Yusoff, P., Chandramouli, S., Lo, T. L., Lim, J., and Fong, C. W. (2003). Sprouty: how does the branch manager work? In *J Cell Sci*, (England), pp. 3061-3068.

Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y., and Krasnow, M. A. (1998). sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. In *Cell*, (United States), pp. 253-263.

Haglund, K., Schmidt, M. H., Wong, E. S., Guy, G. R., and Dikic, I. (2005). Sprouty2 acts at the Cbl/CIN85 interface to inhibit epidermal growth factor receptor downregulation. In *EMBO Rep*, (England), pp. 635-641.

Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P. P., and Dikic, I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5, 461-466.

Hall, A. B., Jura, N., DaSilva, J., Jang, Y. J., Gong, D., and Bar-Sagi, D. (2003). hSpry2 is targeted to the ubiquitin-dependent proteasome pathway by c-Cbl. In *Curr Biol*, (England), pp. 308-314.

Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., and Nishida, E. (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. In *Nat Cell Biol*, (England), pp. 850-858.

Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C. J., Creighton, M. P., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 462, 595-601.

Harach, H. R., Lesueur, F., Amati, P., Brown, A., Canzian, F., Kraimps, J. L., Levillain, P., Menet, E., Romeo, G., and Bonneau, D. (1999). Histology of familial thyroid tumours linked to a gene mapping to chromosome 19p13.2. In *J Pathol*, (England: 1999 John Wiley & Sons, Ltd.), pp. 387-393.

Hardy, K., Mansfield, L., Mackay, A., Benvenuti, S., Ismail, S., Arora, P., O'Hare, M. J., and Jat, P. S. (2005). Transcriptional networks and cellular senescence in human mammary fibroblasts. *Mol Biol Cell* 16, 943-953.

Hawkins, P. T., Jackson, T. R., and Stephens, L. R. (1992). Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P₃ by activating a PtdIns(4,5)P₂ 3-OH kinase. *Nature* 358, 157-159.

Hayflick, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res* 37, 614-636.

Hou, P., Liu, D., Shan, Y., Hu, S., Studeman, K., Condouris, S., Wang, Y., Trink, A., El-Naggar, A. K., Tallini, G., *et al.* (2007). Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. In *Clin Cancer Res*, (United States), pp. 1161-1170.

Huang, S. C., Torres-Cruz, J., Pack, S. D., Koch, C. A., Vortmeyer, A. O., Mannan, P., Lubensky, I. A., Gagel, R. F., and Zhuang, Z. (2003). Amplification and overexpression of mutant RET in multiple endocrine neoplasia type 2-associated medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 459-463.

Hwang, J. H., Kim, D. W., Suh, J. M., Kim, H., Song, J. H., Hwang, E. S., Park, K. C., Chung, H. K., Kim, J. M., Lee, T. H., *et al.* (2003). Activation of signal transducer and activator of transcription 3 by oncogenic. *Mol Endocrinol* 17, 1155-1166.

Impagnatiello, M. A., Weitzer, S., Gannon, G., Compagni, A., Cotten, M., and Christofori, G. (2001). Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells. *J Cell Biol* 152, 1087-1098.

Iwashita, T., Asai, N., Murakami, H., Matsuyama, M., and Takahashi, M. (1996). Identification of tyrosine residues that are essential for transforming activity of the ret proto-oncogene with MEN2A or MEN2B mutation. *Oncogene* 12, 481-487.

Jain, S., Encinas, M., Johnson, E. M., Jr., and Milbrandt, J. (2006). Critical and distinct roles for key RET tyrosine docking sites in renal development. *Genes Dev* 20, 321-333.

Janzen, V., Forkert, R., Fleming, H. E., Saito, Y., Waring, M. T., Dombkowski, D. M., Cheng, T., DePinho, R. A., Sharpless, N. E., and Scadden, D. T. (2006). Stem-cell ageing

modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. In *Nature*, (England), pp. 421-426.

Jing, H., Kase, J., Dorr, J. R., Milanovic, M., Lenze, D., Grau, M., Beuster, G., Ji, S., Reimann, M., Lenz, P., *et al.* (2011). Opposing roles of NF-kappaB in anti-cancer treatment outcome unveiled by cross-species investigations. In *Genes Dev*, (United States), pp. 2137-2146.

Jun, J. I., and Lau, L. F. (2010). The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. In *Nat Cell Biol*, (England), pp. 676-685.

Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M. F., Quelle, D. E., Downing, J. R., Ashmun, R. A., Grosveld, G., and Sherr, C. J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91, 649-659.

Kang, M. R., Yang, G., Place, R. F., Charisse, K., Epstein-Barash, H., Manoharan, M., and Li, L. C. (2012). Intravesical delivery of small activating RNA formulated into lipid nanoparticles inhibits orthotopic bladder tumor growth. In *Cancer Res*, (United States: 2012 Aacr.), pp. 5069-5079.

Kang, T. W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., *et al.* (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. In *Nature*, (England: 2011 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved), pp. 547-551.

Kawai, K., Iwashita, T., Murakami, H., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Kusakabe, M., Ono, K., Iida, K., Nakayama, A., and Takahashi, M. (2000). Tissue-specific carcinogenesis in transgenic mice expressing the RET proto-oncogene with a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Cancer Res* 60, 5254-5260.

Kim, W. G., Choi, H. J., Kim, W. B., Kim, E. Y., Yim, J. H., Kim, T. Y., Gong, G., Kim, S. Y., Chung, N., and Shong, Y. K. (2012). Basal STAT3 activities are negatively correlated with tumor size in papillary. *J Endocrinol Invest* 35, 413-418.

Kimura, E. T., Nikiforova, M. N., Zhu, Z., Knauf, J. A., Nikiforov, Y. E., and Fagin, J. A. (2003). 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* 63, 1454-1457.

Kimura, H., Inukai, Y., Takii, T., Furutani, Y., Shibata, Y., Hayashi, H., Sakurada, S., Okamoto, T., Inoue, J., Oomoto, Y., and Onozaki, K. (1998). Molecular analysis of constitutive IL-1alpha gene expression in human melanoma. *Cytokine* 10, 872-879.

Knauf, J. A., Ma, X., Smith, E. P., Zhang, L., Mitsutake, N., Liao, X. H., Refetoff, S., Nikiforov, Y. E., and Fagin, J. A. (2005). Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. In *Cancer Res*, (United States), pp. 4238-4245.

Kometani, K., Yamada, T., Sasaki, Y., Yokosuka, T., Saito, T., Rajewsky, K., Ishiai, M., Hikida, M., and Kurosaki, T. (2011). CIN85 drives B cell responses by linking BCR signals to the canonical NF-kappaB pathway. *J Exp Med* *208*, 1447-1457.

Kondo, T., Ezzat, S., and Asa, S. L. (2006). Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. In *Nat Rev Cancer*, (England), pp. 292-306.

Kortlever, R. M., Higgins, P. J., and Bernards, R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* *8*, 877-884.

Krimpenfort, P., Quon, K. C., Mooi, W. J., Loonstra, A., and Berns, A. (2001). Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* *413*, 83-86.

Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N. E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* *114*, 1299-1307.

Krizhanovsky, V., and Lowe, S. W. (2009). Stem cells: The promises and perils of p53. In *Nature*, (England), pp. 1085-1086.

Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., and Lowe, S. W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. In *Cell*, (United States), pp. 657-667.

Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y., and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, (United States), pp. 12072-12077.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. In *Genes Dev*, (United States), pp. 2463-2479.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., Aarden, L. A., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. In *Cell*, (United States), pp. 1019-1031.

Kuilman, T., and Peeper, D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. In *Nat Rev Cancer*, (England), pp. 81-94.

Kwabi-Addo, B., Ren, C., and Ittmann, M. (2009). DNA methylation and aberrant expression of Sprouty1 in human prostate cancer. *Epigenetics* *4*, 54-61.

Kwabi-Addo, B., Wang, J., Erdem, H., Vaid, A., Castro, P., Ayala, G., and Ittmann, M. (2004). The expression of Sprouty1, an inhibitor of fibroblast growth factor signal transduction, is decreased in human prostate cancer. *Cancer Res* *64*, 4728-4735.

Lanigan, F., Geraghty, J. G., and Bracken, A. P. (2011). Transcriptional regulation of cellular senescence. In *Oncogene*, (England), pp. 2901-2911.

- Lao, D. H., Yusoff, P., Chandramouli, S., Philp, R. J., Fong, C. W., Jackson, R. A., Saw, T. Y., Yu, C. Y., and Guy, G. R. (2007). Direct binding of PP2A to Sprouty2 and phosphorylation changes are a prerequisite. *J Biol Chem* 282, 9117-9126.
- Lazzerini Denchi, E., Attwooll, C., Pasini, D., and Helin, K. (2005). Deregulated E2F activity induces hyperplasia and senescence-like features in the mouse pituitary gland. *Mol Cell Biol* 25, 2660-2672.
- Ledda, F., Bieraugel, O., Fard, S. S., Vilar, M., and Paratcha, G. (2008). Lrig1 is an endogenous inhibitor of Ret receptor tyrosine kinase activation, downstream signaling, and biological responses to GDNF. *J Neurosci* 28, 39-49.
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., and Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. In *Aging Cell*, (England), pp. 187-195.
- Leeksa, O. C., Van Achterberg, T. A., Tsumura, Y., Toshima, J., Eldering, E., Kroes, W. G., Mellink, C., Spaargaren, M., Mizuno, K., Pannekoek, H., and de Vries, C. J. (2002). Human sprouty 4, a new ras antagonist on 5q31, interacts with the dual specificity kinase TESK1. *Eur J Biochem* 269, 2546-2556.
- Lewandoski, M., Meyers, E. N., and Martin, G. R. (1997). Analysis of Fgf8 gene function in vertebrate development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62, 159-168.
- Li, L. C., and Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18, 1427-1431.
- Li, X., Brunton, V. G., Burgar, H. R., Wheldon, L. M., and Heath, J. K. (2004). FRS2-dependent SRC activation is required for fibroblast growth factor. *J Cell Sci* 117, 6007-6017.
- Li, X., Wheldon, L., and Heath, J. K. (2003). Sprouty: a controversial role in receptor tyrosine kinase signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 31, 1445-1446.
- Liaw, D., Marsh, D. J., Li, J., Dahia, P. L., Wang, S. I., Zheng, Z., Bose, S., Call, K. M., Tsou, H. C., Peacocke, M., *et al.* (1997). Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 16, 64-67.
- Lin, J., Lai, M., Huang, Q., Ruan, W., Ma, Y., and Cui, J. (2008). Reactivation of IGFBP7 by DNA demethylation inhibits human colon cancer cell growth in vitro. *Cancer Biol Ther* 7, 1896-1900.
- Lindahl, M., Poteryaev, D., Yu, L., Arumae, U., Timmusk, T., Bongarzone, I., Aiello, A., Pierotti, M. A., Airaksinen, M. S., and Saarma, M. (2001). Human glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha 4 is the receptor for persephin and is predominantly expressed in normal and malignant thyroid medullary cells. *J Biol Chem* 276, 9344-9351.

Litovchick, L., Florens, L. A., Swanson, S. K., Washburn, M. P., and DeCaprio, J. A. (2011). DYRK1A protein kinase promotes quiescence and senescence through DREAM complex assembly. In *Genes Dev*, (United States), pp. 801-813.

Liu, J., Suresh Kumar, K. G., Yu, D., Molton, S. A., McMahon, M., Herlyn, M., Thomas-Tikhonenko, A., and Fuchs, S. Y. (2007). Oncogenic BRAF regulates beta-Trcp expression and NF-kappaB activity in human melanoma cells. *Oncogene* 26, 1954-1958.

Liu, X., Vega, Q. C., Decker, R. A., Pandey, A., Worby, C. A., and Dixon, J. E. (1996). Oncogenic RET receptors display different autophosphorylation sites and substrate binding specificities. *J Biol Chem* 271, 5309-5312.

Lo, T. L., Fong, C. W., Yusoff, P., McKie, A. B., Chua, M. S., Leung, H. Y., and Guy, G. R. (2006). Sprouty and cancer: the first terms report. *Cancer Lett* 242, 141-150.

Lo, T. L., Yusoff, P., Fong, C. W., Guo, K., McCaw, B. J., Phillips, W. A., Yang, H., Wong, E. S., Leong, H. F., Zeng, Q., *et al.* (2004). The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer. In *Cancer Res*, (United States), pp. 6127-6136.

Lu, Y. C., Kim, I., Lye, E., Shen, F., Suzuki, N., Suzuki, S., Gerondakis, S., Akira, S., Gaffen, S. L., Yeh, W. C., and Ohashi, P. S. (2009). Differential role for c-Rel and C/EBPbeta/delta in TLR-mediated induction of. *J Immunol* 182, 7212-7221.

Macià, A., Gallel, P., Vaquero, M., Gou-Fabregas, M., Santacana, M., Maliszewska, A., Robledo, M., Gardiner, J. R., Basson, M. A., Matias-Guiu, X., and Encinas, M. (2012). Sprouty1 is a candidate tumor-suppressor gene in medullary thyroid carcinoma. *Oncogene* 31, 3961-3972.

Maehama, T., and Dixon, J. E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273, 13375-13378.

Majumdar, A., Vainio, S., Kispert, A., McMahon, J., and McMahon, A. P. (2003). Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development. *Development* 130, 3175-3185.

Majumder, P. K., Grisanzio, C., O'Connell, F., Barry, M., Brito, J. M., Xu, Q., Guney, I., Berger, R., Herman, P., Bikoff, R., *et al.* (2008). A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27 Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression. *Cancer Cell* 14, 146-155.

Marti, U., Ruchti, C., Kampf, J., Thomas, G. A., Williams, E. D., Peter, H. J., Gerber, H., and Burgi, U. (2001). Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues. *Thyroid* 11, 137-145.

Mason, J. M., Morrison, D. J., Bassit, B., Dimri, M., Band, H., Licht, J. D., and Gross, I. (2004). Tyrosine phosphorylation of Sprouty proteins regulates their ability to inhibit

growth factor signaling: a dual feedback loop. In *Mol Biol Cell*, (United States), pp. 2176-2188.

Mason, J. M., Morrison, D. J., Basson, M. A., and Licht, J. D. (2006). Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. In *Trends Cell Biol*, (England), pp. 45-54.

Massague, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215-230.

Maxwell, P. J., Coulter, J., Walker, S. M., McKechnie, M., Neisen, J., McCabe, N., Kennedy, R. D., Salto-Tellez, M., Albanese, C., and Waugh, D. J. (2012). Potentiation of Inflammatory CXCL8 Signalling Sustains Cell Survival in PTEN-deficient Prostate Carcinoma. *Eur Urol*.

Mazzaferri, E. L., and Kloos, R. T. (2001). Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1447-1463.

Mazzanti, C., Zeiger, M. A., Costouros, N. G., Umbricht, C., Westra, W. H., Smith, D., Somervell, H., Bevilacqua, G., Alexander, H. R., Libutti, S. K., and Costourous, N. (2004). Using gene expression profiling to differentiate benign versus malignant thyroid tumors. *Cancer Res* 64, 2898-2903.

McDuff, F. K., and Turner, S. D. (2011). Jailbreak: oncogene-induced senescence and its evasion. *Cell Signal* 23, 6-13.

McKie, A. B., Douglas, D. A., Olijslagers, S., Graham, J., Omar, M. M., Heer, R., Gnanapragasam, V. J., Robson, C. N., and Leung, H. Y. (2005). Epigenetic inactivation of the human sprouty2 (hSPRY2) homologue in prostate cancer. In *Oncogene*, (England), pp. 2166-2174.

Melillo, R. M., Castellone, M. D., Guarino, V., De Falco, V., Cirafici, A. M., Salvatore, G., Caiazza, F., Basolo, F., Giannini, R., Kruhoffer, M., *et al.* (2005). The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest* 115, 1068-1081.

Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. In *Nature*, (England), pp. 720-724.

Michiels, F. M., Chappuis, S., Caillou, B., Pasini, A., Talbot, M., Monier, R., Lenoir, G. M., Feunteun, J., and Billaud, M. (1997). Development of medullary thyroid carcinoma in transgenic mice expressing the RET protooncogene altered by a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3330-3335.

Michos, O., Cebrian, C., Hyink, D., Grieshammer, U., Williams, L., D'Agati, V., Licht, J. D., Martin, G. R., and Costantini, F. (2010). Kidney development in the absence of Gdnf and Spry1 requires Fgf10. *PLoS Genet* 6, e1000809.

Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M., and Shiina, M. (2012). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* *122*, 143-159.

Minowada, G., Jarvis, L. A., Chi, C. L., Neubüser, A., Sun, X., Hacohen, N., Krasnow, M. A., and Martin, G. R. (1999). Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development* *126*, 4465-4475.

Miyoshi, K., Wakioka, T., Nishinakamura, H., Kamio, M., Yang, L., Inoue, M., Hasegawa, M., Yonemitsu, Y., Komiya, S., and Yoshimura, A. (2004). The Sprouty-related protein, Spred, inhibits cell motility, metastasis, and Rho-mediated actin reorganization. *Oncogene* *23*, 5567-5576.

Mora, L. B., Buettner, R., Seigne, J., Diaz, J., Ahmad, N., Garcia, R., Bowman, T., Falcone, R., Fairclough, R., Cantor, A., *et al.* (2002). Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* *62*, 6659-6666.

Musteanu, M., Blaas, L., Mair, M., Schleder, M., Bilban, M., Tauber, S., Esterbauer, H., Mueller, M., Casanova, E., Kenner, L., *et al.* (2010). Stat3 is a negative regulator of intestinal tumor progression in Apc(Min) mice. In *Gastroenterology*, (United States: 2010 AGA Institute. Published by Elsevier Inc), pp. 1003-1011 e1001-1005.

Myers, M. P., and Tonks, N. K. (1997). PTEN: sometimes taking it off can be better than putting it on. *Am J Hum Genet* *61*, 1234-1238.

Myers, S. M., Eng, C., Ponder, B. A., and Mulligan, L. M. (1995). Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. *Oncogene* *11*, 2039-2045.

Narita, M., Krizhanovsky, V., Nunez, S., Chicas, A., Hearn, S. A., Myers, M. P., and Lowe, S. W. (2006). A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* *126*, 503-514.

Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. In *Cell*, (United States), pp. 703-716.

Negri, E., Ron, E., Franceschi, S., La Vecchia, C., Preston-Martin, S., Kolonel, L., Kleinerman, R. A., Mabuchi, K., Jin, F., Wingren, G., *et al.* (2002). Risk factors for medullary thyroid carcinoma: a pooled analysis. *Cancer Causes Control* *13*, 365-372.

Nielsen, A. L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J. A., Remboutsika, E., Chambon, P., and Losson, R. (2001). Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell* *7*, 729-739.

Nikiforov, Y. E., and Nikiforova, M. N. (2011). Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. In *Nat Rev Endocrinol*, (England), pp. 569-580.

Nikiforova, M. N., Lynch, R. A., Biddinger, P. W., Alexander, E. K., Dorn, G. W., 2nd, Tallini, G., Kroll, T. G., and Nikiforov, Y. E. (2003). RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2318-2326.

Nix, P. A., Nicolaidis, A., and Coatesworth, A. P. (2006). Thyroid cancer review 3: management of medullary and undifferentiated thyroid cancer. In *Int J Clin Pract*, (England), pp. 80-84.

Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A., and Hara, E. (2004). The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest* 51, 146-153.

Orjalo, A. V., Bhaumik, D., Gengler, B. K., Scott, G. K., and Campisi, J. (2009). Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, (United States), pp. 17031-17036.

Ozaki, K., Miyazaki, S., Tanimura, S., and Kohno, M. (2005). Efficient suppression of FGF-2-induced ERK activation by the cooperative. *J Cell Sci* 118, 5861-5871.

Papini, E., Guglielmi, R., Bianchini, A., Crescenzi, A., Taccogna, S., Nardi, F., Panunzi, C., Rinaldi, R., Toscano, V., and Pacella, C. M. (2002). Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1941-1946.

Parisi, M. A., and Kapur, R. P. (2000). Genetics of Hirschsprung disease. *Curr Opin Pediatr* 12, 610-617.

Parrinello, S., Coppe, J.-P., Krtolica, A., and Campisi, J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation.

Patel, R., Gao, M., Ahmad, I., Fleming, J., Singh, L. B., Rai, T. S., McKie, A. B., Seywright, M., Barnetson, R. J., Edwards, J., *et al.* (2013). Sprouty2, PTEN, and PP2A interact to regulate prostate cancer progression. *J Clin Invest* 123, 1157-1175.

Pectasides, E., Egloff, A. M., Sasaki, C., Kountourakis, P., Burtness, B., Fountzilas, G., Dafni, U., Zaramboukas, T., Rampias, T., Rimm, D., *et al.* (2010). Nuclear localization of signal transducer and activator of transcription 3 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with a better prognosis. In *Clin Cancer Res*, (United States), pp. 2427-2434.

Pedrazzini, L., Leitch, A., and Bromberg, J. (2004). Stat3 is required for the development of skin cancer. *J Clin Invest* 114, 619-622.

Pierchala, B. A., Milbrandt, J., and Johnson, E. M. (2006). Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent recruitment of Ret into lipid rafts enhances signaling by partitioning Ret from proteasome-dependent degradation. *J Neurosci* 26, 2777-2787.

Pierotti, M. A., Bongarzone, I., Borrello, M. G., Mariani, C., Miranda, C., Sozzi, G., and Greco, A. (1995). Rearrangements of TRK proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas. *J Endocrinol Invest* 18, 130-133.

Pinchot, S. N., Kunnimalaiyaan, M., Sippel, R. S., and Chen, H. (2009). Medullary thyroid carcinoma: targeted therapies and future directions. *J Oncol* 2009, 183031.

Plaza-Menacho, I., Burzynski, G. M., de Groot, J. W., Eggen, B. J., and Hofstra, R. M. (2006). Current concepts in RET-related genetics, signaling and therapeutics. In *Trends Genet*, (England), pp. 627-636.

Podsypanina, K., Ellenson, L. H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K. M., Cordon-Cardo, C., Catoretti, G., Fisher, P. E., and Parsons, R. (1999). Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1563-1568.

Prieur, A., and Peeper, D. S. (2008). Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. In *Curr Opin Cell Biol*, (United States), pp. 150-155.

Puc, J., Placha, G., Wocial, B., Podsypanina, K., Parsons, R., and Gaciong, Z. (2006). Analysis of PTEN mutation in non-familial pheochromocytoma. *Ann N Y Acad Sci* 1073, 317-331.

Rameh, L. E., Toliyas, K. F., Duckworth, B. C., and Cantley, L. C. (1997). A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 390, 192-196.

Reich, A., Sapir, A., and Shilo, B. (1999). Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development* 126, 4139-4147.

Reynolds, L., Jones, K., Winton, D. J., Cranston, A., Houghton, C., Howard, L., Ponder, B. A., and Smith, D. P. (2001). C-cell and thyroid epithelial tumours and altered follicular development in transgenic mice expressing the long isoform of MEN 2A RET. *Oncogene* 20, 3986-3994.

Rhoden, K. J., Unger, K., Salvatore, G., Yilmaz, Y., Vovk, V., Chiappetta, G., Qumsiyeh, M. B., Rothstein, J. L., Fusco, A., Santoro, M., *et al.* (2006). RET/papillary thyroid cancer rearrangement in nonneoplastic thyrocytes: follicular cells of Hashimoto's thyroiditis share low-level recombination events with a subset of papillary carcinoma. In *J Clin Endocrinol Metab*, (United States), pp. 2414-2423.

Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. In *J Cell Biol*, (United States), pp. 547-556.

Rodier, F., Campisi, J., and Bhaumik, D. (2007). Two faces of p53: aging and tumor suppression. In *Nucleic Acids Res*, (England), pp. 7475-7484.

Rodier, F., Coppe, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Munoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage

signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. In *Nat Cell Biol*, (England), pp. 973-979.

Rodriguez, C. I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A. F., and Dymecki, S. M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25, 139-140.

Roger, P. P., van Staveren, W. C., Coulonval, K., Dumont, J. E., and Maenhaut, C. (2010). Signal transduction in the human thyrocyte and its perversion in thyroid tumors. In *Mol Cell Endocrinol*, (Ireland: 2009 Elsevier Ireland Ltd), pp. 3-19.

Rovillain, E., Mansfield, L., Caetano, C., Alvarez-Fernandez, M., Caballero, O. L., Medema, R. H., Hummerich, H., and Jat, P. S. (2011). Activation of nuclear factor-kappa B signalling promotes cellular senescence. In *Oncogene*, (England), pp. 2356-2366.

Rozen, E. J., Schmidt, H., Dolcet, X., Basson, M. A., Jain, S., and Encinas, M. (2009). Loss of Sprouty1 rescues renal agenesis caused by Ret mutation. *J Am Soc Nephrol* 20, 255-259.

Rubin, C., Litvak, V., Medvedovsky, H., Zwang, Y., Lev, S., and Yarden, Y. (2003). Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. In *Curr Biol*, (England), pp. 297-307.

Rubin, C., Zwang, Y., Vaisman, N., Ron, D., and Yarden, Y. (2005). Phosphorylation of carboxyl-terminal tyrosines modulates the specificity of Sprouty-2 inhibition of different signaling pathways. *J Biol Chem* 280, 9735-9744.

Saenko, V., Rogounovitch, T., Shimizu-Yoshida, Y., Abrosimov, A., Lushnikov, E., Roumiantsev, P., Matsumoto, N., Nakashima, M., Meirmanov, S., Ohtsuru, A., *et al.* (2003). Novel tumorigenic rearrangement, Delta rfp/ret, in a papillary thyroid carcinoma from externally irradiated patient. In *Mutat Res*, (Netherlands), pp. 81-90.

Salmena, L., Carracedo, A., and Pandolfi, P. P. (2008). Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 133, 403-414.

Salminen, A., Kauppinen, A., and Kaarniranta, K. (2012). Emerging role of NF-kappaB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). In *Cell Signal*, (England: 2011 Elsevier Inc), pp. 835-845.

Sansal, I., and Sellers, W. R. (2004). The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 22, 2954-2963.

Santarpia, L., Ye, L., and Gagel, R. F. (2009). Beyond RET: potential therapeutic approaches for advanced and metastatic medullary thyroid carcinoma. In *J Intern Med*, (England), pp. 99-113.

Santoro, M., Melillo, R. M., Carlomagno, F., Fusco, A., and Vecchio, G. (2002). Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. *Ann N Y Acad Sci* 963, 116-121.

- Santoro, M., Melillo, R. M., and Fusco, A. (2006). RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. *Eur J Endocrinol* *155*, 645-653.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* *307*, 1098-1101.
- Sarkisian, C. J., Keister, B. A., Stairs, D. B., Boxer, R. B., Moody, S. E., and Chodosh, L. A. (2007). Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol* *9*, 493-505.
- Sasaki, A., Taketomi, T., Kato, R., Saeki, K., Nonami, A., Sasaki, M., Kuriyama, M., Saito, N., Shibuya, M., and Yoshimura, A. (2003). Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. In *Nat Cell Biol*, (England), pp. 427-432.
- Scheuba, C., Kaserer, K., Weinhausl, A., Pandev, R., Kaider, A., Passler, C., Prager, G., Vierhapper, H., Haas, O. A., and Niederle, B. (1999). Is medullary thyroid cancer predictable? A prospective study of 86 patients with abnormal pentagastrin tests. In *Surgery*, (United States), pp. 1089-1095; discussion 1096.
- Schmid, K. W., and Farid, N. R. (2006). How to define follicular thyroid carcinoma? *Virchows Arch* *448*, 385-393.
- Schmitt, C. A. (2007). Cellular senescence and cancer treatment. In *Biochim Biophys Acta*, (Netherlands), pp. 5-20.
- Schneller, D., Machat, G., Sousek, A., Proell, V., van Zijl, F., Zulehner, G., Huber, H., Mair, M., Muellner, M. K., Nijman, S. M., *et al.* (2011). p19(ARF) /p14(ARF) controls oncogenic functions of signal transducer and activator of transcription 3 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *54*, 164-172.
- Schutzman, J. L., and Martin, G. R. (2012). Sprouty genes function in suppression of prostate tumorigenesis. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, (United States), pp. 20023-20028.
- Scott, R. P., Eketjäll, S., Aineskog, H., and Ibáñez, C. F. (2005). Distinct turnover of alternatively spliced isoforms of the RET kinase receptor mediated by differential recruitment of the Cbl ubiquitin ligase. *J Biol Chem* *280*, 13442-13449.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. In *Cell*, (United States), pp. 593-602.
- Shabana, W., Peeters, E., and De Maeseneer, M. (2006). Measuring thyroid gland volume: should we change the correction factor? In *AJR Am J Roentgenol*, (United States), pp. 234-236.
- Shamma, A., Takegami, Y., Miki, T., Kitajima, S., Noda, M., Obara, T., Okamoto, T., and Takahashi, C. (2009). Rb Regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-ras isoprenylation. *Cancer Cell* *15*, 255-269.

Shao, H., Cheng, H. Y., Cook, R. G., and Twardy, D. J. (2003). Identification and characterization of signal transducer and activator of transcription 3 recruitment sites within the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 63, 3923-3930.

Sharpless, N. E., Bardeesy, N., Lee, K. H., Carrasco, D., Castrillon, D. H., Aguirre, A. J., Wu, E. A., Horner, J. W., and DePinho, R. A. (2001). Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413, 86-91.

Sharpless, N. E., Ramsey, M. R., Balasubramanian, P., Castrillon, D. H., and DePinho, R. A. (2004). The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene* 23, 379-385.

Sherman, S. I. (2003). Thyroid carcinoma. In *Lancet*, (England), pp. 501-511.

Shim, K., Minowada, G., Coling, D. E., and Martin, G. R. (2005). Sprouty2, a mouse deafness gene, regulates cell fate decisions in the auditory sensory epithelium by antagonizing FGF signaling. In *Dev Cell*, (United States), pp. 553-564.

Smith-Hicks, C. L., Sizer, K. C., Powers, J. F., Tischler, A. S., and Costantini, F. (2000). C-cell hyperplasia, pheochromocytoma and sympathoadrenal malformation in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 2B. *EMBO J* 19, 612-622.

Smithgall, T. E., Briggs, S. D., Schreiner, S., Lerner, E. C., Cheng, H., and Wilson, M. B. (2000). Control of myeloid differentiation and survival by Stats. *Oncogene* 19, 2612-2618.

Soares, P., Trovisco, V., Rocha, A. S., Lima, J., Castro, P., Preto, A., Maximo, V., Botelho, T., Seruca, R., and Sobrinho-Simoes, M. (2003). BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. In *Oncogene*, (England), pp. 4578-4580.

Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J. M., Siderovski, D. P., and Mak, T. W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29-39.

Takahashi, M. (2001). The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 361-373.

Takahashi, M., Ritz, J., and Cooper, G. M. (1985). Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* 42, 581-588.

Taketomi, T., Yoshiga, D., Taniguchi, K., Kobayashi, T., Nonami, A., Kato, R., Sasaki, M., Sasaki, A., Ishibashi, H., Moriyama, M., *et al.* (2005). Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia. In *Nat Neurosci*, (United States), pp. 855-857.

Terkeltaub, R., Baird, S., Sears, P., Santiago, R., and Boisvert, W. (1998). The murine homolog of the interleukin-8 receptor CXCR-2 is essential for the occurrence of

neutrophilic inflammation in the air pouch model of acute urate crystal-induced gouty synovitis. *Arthritis Rheum* 41, 900-909.

Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., *et al.* (2008). MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. In *Nature*, (England), pp. 980-984.

Tsavachidou, D., Coleman, M. L., Athanasiadis, G., Li, S., Licht, J. D., Olson, M. F., and Weber, B. L. (2004). SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant. In *Cancer Res*, (United States), pp. 5556-5559.

Vainio, S., and Lin, Y. (2002). Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. In *Nat Rev Genet*, (England), pp. 533-543.

Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27, 693-733.

Vasko, V., Bauer, A. J., Tuttle, R. M., and Francis, G. L. (2007). Papillary and follicular thyroid cancers in children. In *Endocr Dev*, (Switzerland), pp. 140-172.

Velasco, A., Pallares, J., Santacana, M., Gatus, S., Fernandez, M., Domingo, M., Valls, J., Yeramian, A., Encinas, M., Dolcet, X., and Matias-Guiu, X. (2011). Promoter hypermethylation and expression of sprouty 2 in endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 42, 185-193.

Vizioli, M. G., Sensi, M., Miranda, C., Cleris, L., Formelli, F., Anania, M. C., Pierotti, M. A., and Greco, A. (2010). IGFBP7: an oncosuppressor gene in thyroid carcinogenesis. *Oncogene* 29, 3835-3844.

Wajapeyee, N., Kapoor, V., Mahalingam, M., and Green, M. R. (2009). Efficacy of IGFBP7 for treatment of metastatic melanoma and other cancers in mouse models and human cell lines. *Mol Cancer Ther* 8, 3009-3014.

Wajapeyee, N., Serra, R. W., Zhu, X., Mahalingam, M., and Green, M. R. (2008). Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. In *Cell*, (United States), pp. 363-374.

Wan, F., and Lenardo, M. J. (2009). Specification of DNA binding activity of NF-kappaB proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a000067.

Wang, J., Jacob, N. K., Ladner, K. J., Beg, A., Perko, J. D., Tanner, S. M., Liyanarachchi, S., Fishel, R., and Guttridge, D. C. (2009). RelA/p65 functions to maintain cellular senescence by regulating genomic stability and DNA repair. In *EMBO Rep*, (England), pp. 1272-1278.

Wang, J., Thompson, B., Ren, C., Ittmann, M., and Kwabi-Addo, B. (2006). Sprouty4, a suppressor of tumor cell motility, is down regulated by DNA methylation in human prostate cancer. *Prostate* 66, 613-624.

- Wartofsky, L. (2010). Increasing world incidence of thyroid cancer: increased detection or higher radiation exposure? *Hormones (Athens)* 9, 103-108.
- Waterman, H., Katz, M., Rubin, C., Shtiegman, K., Lavi, S., Elson, A., Jovin, T., and Yarden, Y. (2002). A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling. *EMBO J* 21, 303-313.
- Weetman, A. P., Bright-Thomas, R., and Freeman, M. (1990). Regulation of interleukin-6 release by human thyrocytes. *J Endocrinol* 127, 357-361.
- Wells, S. A., and Santoro, M. (2009). Targeting the RET pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 15, 7119-7123.
- Williams, P., Warwick, R., Dyson, M., and Bannister, L. (1995). GRAY. Anatomia, 37 edn: Guanabara Koogan: Rio de Janeiro).
- Wong, E. S., Fong, C. W., Lim, J., Yusoff, P., Low, B. C., Langdon, W. Y., and Guy, G. R. (2002). Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling. *EMBO J* 21, 4796-4808.
- Worby, C. A., Vega, Q. C., Zhao, Y., Chao, H. H., Seasholtz, A. F., and Dixon, J. E. (1996). Glial cell line-derived neurotrophic factor signals through the RET receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271, 23619-23622.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S. W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. In *Nature*, (England), pp. 656-660.
- Yang, G., Rosen, D. G., Zhang, Z., Bast, R. C., Jr., Mills, G. B., Colacino, J. A., Mercado-Uribe, I., and Liu, J. (2006). The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16472-16477.
- Ye, L., Santarpia, L., Cote, G. J., El-Naggar, A. K., and Gagel, R. F. (2008). High resolution array-comparative genomic hybridization profiling reveals deoxyribonucleic acid copy number alterations associated with medullary thyroid carcinoma. In *J Clin Endocrinol Metab*, (United States), pp. 4367-4372.
- Yin, L., Puliti, A., Bonora, E., Evangelisti, C., Conti, V., Tong, W. M., Medard, J. J., Lavoué, M. F., Forey, N., Wang, L. C., *et al.* (2007). C620R mutation of the murine ret proto-oncogene: loss of function effect in homozygotes and possible gain of function effect in heterozygotes. *Int J Cancer* 121, 292-300.
- You, M. J., Castrillon, D. H., Bastian, B. C., O'Hagan, R. C., Bosenberg, M. W., Parsons, R., Chin, L., and DePinho, R. A. (2002). Genetic analysis of Pten and Ink4a/Arf interactions in the suppression of tumorigenesis in mice. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, (United States), pp. 1455-1460.
- Young, A. R., and Narita, M. (2009). SASP reflects senescence. In *EMBO Rep*, (England), pp. 228-230.

Young, B., Lowe, J., Stevens, A., and Heath, J. (2006). *Wheater's Functional Histology -A Text and Colour Atlas*, 5th edn: Chrchill Livingstone).

Yue, P., Zhang, X., Paladino, D., Sengupta, B., Ahmad, S., Holloway, R. W., Ingersoll, S. B., and Turkson, J. (2012). Hyperactive EGF receptor, Jaks and Stat3 signaling promote enhanced. *Oncogene* 31, 2309-2322.

Yusoff, P., Lao, D. H., Ong, S. H., Wong, E. S., Lim, J., Lo, T. L., Leong, H. F., Fong, C. W., and Guy, G. R. (2002). Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. In *J Biol Chem*, (United States), pp. 3195-3201.

Zaremba, A., Schmuecker, U., and Esche, H. (2011). Sprouty is a cytoplasmic target of adenoviral E1A oncoproteins to regulate the receptor tyrosine kinase signalling pathway. In *Virology*, (England), p. 192.

Zhang, J., Gill, A., Atmore, B., Johns, A., Delbridge, L., Lai, R., and McMullen, T. (2011). Upregulation of the signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3). *Int J Clin Exp Pathol* 4, 356-362.

Zhang, R., and Adams, P. D. (2007). Heterochromatin and its relationship to cell senescence and cancer therapy. *Cell Cycle* 6, 784-789.

Zhang, Y., Zhu, W., Wang, Y. G., Liu, X. J., Jiao, L., Liu, X., Zhang, Z. H., Lu, C. L., and He, C. (2006). Interaction of SH2-Bbeta with RET is involved in signaling of GDNF-induced neurite outgrowth. In *J Cell Sci*, (England), pp. 1666-1676.

Zheng, R. Q., Abney, E., Chu, C. Q., Field, M., Grubeck-Loebenstien, B., Maini, R. N., and Feldmann, M. (1991). Detection of interleukin-6 and interleukin-1 production in human thyroid. *Clin Exp Immunol* 83, 314-319.

Annex

ANNEX I: Resultats de l'array de RT-PCR on es mostra l'increment de l'expressió de mRNA de diversos gens reguladors del cicle cel·lular a la línia cel·lular Spry1A.

Fold induction (Vector vs Spry1A)				
gene symbol	array plate#1	array plate #2	average	stdev
ATM	1,2	1,4	1,3	0,089
ATR	1	1	1	0,019
CCNA1	1,3	1	1,1	0,236
CCNA2	0,8	0,7	0,7	0,121
CCNB1	1	0,9	1	0,042
CCNB2	1,1	0,9	1	0,101
CCND1	1	0,9	0,9	0,059
CCND2	UD	UD	UD	UD
CCND3	1	1	1	0,029
CCNE1	1,2	0,7	0,9	0,371
CCNE2	1,2	1	1,1	0,135
CCNH	1	0,9	1	0,033
CDC2	0,9	0,8	0,9	0,113
CDC25A	0,9	1,2	1	0,172
CDK2	1	0,9	0,9	0,083
CDK4	0,8	0,9	0,9	0,043
CDK6	6,2	1,1	3,6	3,606
CDK7	0,9	1	0,9	0,032
CDKN1A	0,9	0,8	0,9	0,056
CDKN1B	1	0,9	0,9	0,129
CDKN2A	2,9	2,7	2,8	0,123
CDKN2B	1,4	-	1,4	0
CDKN2C	UD	UD	UD	UD
CDKN2D	1,1	1	1	0,07
E2F1	0,9	0,9	0,9	0,032
E2F2	1,1	1,1	1,1	0,016
E2F3	1,4	1,4	1,4	0,027
E2F4	1,1	1,1	1,1	0,022
GSK3B	1,2	1,1	1,2	0,114
HDAC1	0,8	0,9	0,8	0,025
HDAC2	1	0,9	1	0,078
HDAC3	1,1	0,7	0,9	0,254
HDAC4	1,1	1	1,1	0,021
HDAC5	1,1	1,1	1,1	0,005
HDAC6	1,3	1,4	1,4	0,033
HDAC7	1	1	1	0,019
HDAC9	1,1	1	1	0,069
PPP2CA	1,1	0,9	1	0,124
RAF1	3,4	3,7	3,6	0,211
RB1	1,1	1,2	1,2	0,058
TGFB1	1	0,9	0,9	0,045
TGFB2	1,9	1,5	1,7	0,279
TGFB3	1,5	1,1	1,3	0,298
TP53	0,7	0,8	0,8	0,038

Annex II: Característiques dels pacients que presentaven MTC.

ID	MTC familial/sporadic	Gender	Date of the birth	Primary/Metastasis	Germline <i>RET</i> mutation
08T31	MTC Sporadic	Male	1949	metastasis	Negative
08T49	MTC Sporadic	Male	1968	primary	Negative
04T245	MTC Sporadic	Male	1926	primary	Negative
710875	MTC Sporadic	Female	1929	primary	Negative
04T235	MTC Sporadic	Female	1938	primary	Negative (E-10,11)
04T238	MTC Sporadic	Male	1944	primary	Negative
04T240	MTC Sporadic	Male	1924	primary	Negative
04T241	MTC Sporadic	Female	1979	primary	Negative
08T32	MTC Familiar	Female	1936	primary	C634R
08T34	MTC Familiar	Male	1973	primary	C634Y
08T38	MTC Familiar	Male	1966	primary	C634R
08T41	MTC Familiar	Male	1968	primary	C618S
08T47	MTC Sporadic	Female	1948	primary	Negative
08T50	MTC Sporadic	Male	1944	primary	Negative (E-10,11)
04T96	MTC Sporadic	Male	1949	primary	Negative
09T87	MTC Sporadic	Female	1949	primary	Negative
09T133	MTC Sporadic	Male	1939	primary	Negative

ID	Somatic <i>RET</i> mutation	TNM	Stage	Metastasis at onset	Location of mtx at onset
08T31	M918T	pT3N1aM1	IV	yes	lymph nodes
08T49	M918T	T3 N1b M1	IV	yes	lymph nodes
04T245	Negative	T3N1M0	III	yes	lymph nodes
710875	M918T	T1N0M0	I	no	-
04T235	Negative	T4N1M0	III	yes	lymph nodes
04T238	M918T	T1N1M0	III	yes	lymph nodes
04T240	M918T	T4N1M0	III	yes	lymph nodes
04T241	M918T	T2N0M0	II	no	-
08T32	Negative	T2 N0 M0	II	no	-
08T34	-	T2N0M0	II	no	-
08T38	-	T3(m)N1M1	IV	yes	lymph nodes, liver
08T41	Negative	T3N1M1	IV	yes	lymph nodes and lung
08T47	M918T	unknown	unknown	unkown	unknown
08T50	Negative	T2N0M0	II	no	-
04T96	M918T	T1N0M0	I	no	-
09T87	M918T	T2N1M0	III	yes	lymph nodes
09T133	Negative	T2N1M0	III	yes	lymph nodes

ID	Mtx during the follow-up	Location of mtx during the follow-up	Time till mtx (months)	Surgery date (primary tumor)	Time of follow-up (no mtx)
08T31	yes	paratracheal	12	2003	40
08T49	no	-	-	2002	10
04T245	yes	pulmonary	36	2000	
710875	unkown	unkown	unkown	2007	
04T235	yes	pulmonary-local	unknown	1989	
04T238	yes	unknown	unknown	1992	
04T240	yes	unknown	unknown	1994	
04T241	no	-	-	1994	120
08T32	no	-	-	2005	24
08T34	no	-	-	unknown	41
08T38	no	-	-	1997	48
08T41	yes	-	0	2002	
08T47	yes	unknown	unknown	2007	-
08T50	no	-	-	2002	25
04T96	no	-	-	2003	10
09T87	yes	lymph nodes	7	2008	
09T133	no	-	-	2008	12

