

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica Clínica



**MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA
SOBREEXPRESIÓN FUNCIONAL DE TLR4 INDUCIDA POR
ONCOGENES PROMOTORES DEL CÁNCER TIROIDEO**

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

por

Bioquímica Victoria Peyret

Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
(CIBICI – CONICET)
Córdoba, Abril de 2018

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. ANA MARÍA MASINI DE REPISO. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

COMISIÓN ASESORA:

Dra. CRISTINA MALDONADO. Facultad de Ciencias Médicas. UNC. Centro de Microscopía Electrónica (CME). Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INICSA - CONICET).

Dra. MARIANA MACCIONI. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI – CONICET).

Dra. MARÍA DEL MAR MONTESINOS. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI – CONICET).

EVALUADOR EXTERNO:

Dra. CARINA MARCELA RIVOLTA. Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología/Cátedra de Genética. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM – CONICET).

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIBICI-CONICET), Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC). El mismo fue llevado a cabo durante el desempeño de la Beca de Postgrado Tipo I otorgada por la Secretaria de Ciencia y Tecnología (SeCyT) de la UNC y la Beca Interna de Finalización de Doctorado otorgada por el CONICET. Los subsidios que financiaron este trabajo fueron otorgados por SeCyT, la Agencia Córdoba Ciencia, el CONICET y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT, FONCYT).

*“No divido al mundo en débiles o fuertes, o exitosos y perdedores,
sino en los que aprenden o no aprenden”.*

Benjamin R. Barber

A mi familia...

RESUMEN

El cáncer de tiroides es la malignidad más común del sistema endócrino. Todos los tipos de carcinomas tiroideos, excepto el carcinoma medular, derivan de las células foliculares. El cáncer diferenciado es la forma más frecuente de las neoplasias tiroideas e incluye el carcinoma papilar (70-80%) y el carcinoma folicular (10-15%), que suelen relacionarse con buen pronóstico. En contraposición, los carcinomas anaplásicos (2-5%) son altamente malignos, invaden rápidamente tejidos adyacentes y metastatizan a distancia. El 70% de los carcinomas papilares (PTCs) posee alteraciones somáticas que comandan la activación de genes efectores de la vía de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), incluyendo mutaciones puntuales de los genes BRAF y RAS, así como rearrreglos cromosómicos que implican al RET y NTRK, siendo el evento genético observado con mayor frecuencia la mutación BRAF^{V600E} (30-80%).

Por otro lado, los receptores tipo toll (TLRs) que se identificaron originalmente en células del sistema inmune, constituyen una familia de moléculas de superficie y citoplasmáticas capaces de reconocer componentes microbianos o moléculas endógenas. Creciente evidencia sugiere que la señalización desregulada de los TLRs promueve señales de supervivencia que favorecen la progresión tumoral. En coincidencia, en el presente trabajo evidenciamos un aumento de la expresión de TLR4 en carcinomas tiroideos diferenciados respecto al tejido tiroideo normal. Hemos identificado un incremento de TLR4 en metástasis a nódulos linfáticos de PTCs respecto a muestras apareadas de tumores primarios. Además, encontramos niveles incrementados de TLR4 en tejidos de PTCs derivados de ratones transgénicos Tg-BRAF^{V600E} (que poseen actividad oncogénica BRAF^{V600E} dirigida específicamente al tejido tiroideo). Observamos que niveles incrementados de expresión de TLR4 se asocian con menor supervivencia libre de enfermedad en pacientes con PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E}. Por otro lado, nuestros resultados indican que la proteína de unión a Ets 1 (ETS1) es un factor de transcripción esencial para inducir la sobreexpresión de TLR4 en dependencia de la vía de señalización de MAPK/ERK estimulada por el oncogén BRAF^{V600E}.

La activación crónica del sistema inmune y la respuesta tisular a través del reconocimiento de patógenos o ligandos endógenos mediado por TLRs, generarían un microambiente rico en factores de crecimiento y de supervivencia que se relaciona con el desarrollo de procesos neoplásicos. Todos los TLRs señalizan a través de la activación del factor de transcripción NF-κB. La actividad de NF-κB está constitutivamente elevada en numerosas neoplasias humanas y generalmente es asociada a mal pronóstico. Se demostró que el comportamiento invasivo y la resistencia a la apoptosis en células tiroideas transformadas por la actividad oncogénica de BRAF^{V600E} son mediados por la activación de NF-κB. En correspondencia, en el presente trabajo hemos evidenciado que la estimulación del receptor TLR4 incrementa la actividad transcripcional de NF-κB e induce la expresión de genes de respuesta inflamatoria, demostrando que la vía de señalización TLR4/MyD88/IκB-α/NF-κB se encuentra funcionalmente conservada en modelos celulares de cáncer de tiroides que albergan la mutación BRAF^{V600E}.

Numerosos reportes han evidenciado una interacción cruzada entre TLR4 y el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), donde agonistas de TLR4 son capaces de activar el señalamiento de EGFR independientemente de su ligando (efecto referido como transactivación). En el presente trabajo hemos identificado que EGFR se encuentra diferencialmente incrementado en PTCs que albergan el oncogén BRAF^{V600E}. Además, demostramos el efecto de transactivación de EGFR a través de la activación de TLR4

en modelos celulares de cáncer tiroideo BRAF^{V600E} positivos. En concordancia, observamos que niveles incrementados de expresión de TLR4 se correlacionan con niveles aumentados de EGFR en pacientes con PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E}. Nuestros resultados sugieren la adquisición de una potencial hipersensibilidad a estímulos endógenos y exógenos para ambos receptores en el cáncer tiroideo, complejizando los efectos mediados por TLR4 en función de los niveles de expresión de EGFR.

En conjunto, nuestros datos indican que la sobreexpresión funcional de TLR4 es una consecuencia de la desregulación de la señalización MAPK/ERK/ETS1 inducida por oncogenes promotores de cáncer tiroideo. Considerando el potencial oncogénico de la activación aberrante de la señalización de NF-κB en la promoción del crecimiento tumoral tiroideo y la asociación de niveles incrementados de TLR4 con tumores más agresivos, nuestros resultados sugieren un rol pro-oncogénico de TLR4 en la tumorigénesis tiroidea, dando la base molecular tanto para el diseño de herramientas diagnósticas capaces de identificar carcinomas tiroideos potencialmente más agresivos como para el desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas que redunden en el beneficio de los pacientes.

ABSTRACT

Thyroid cancer is the most common malignancy of the endocrine system. All types of thyroid carcinomas, except medullary carcinoma, are derived from follicular cells. Differentiated cancer is the most common type of thyroid cancer and includes papillary carcinoma (70-80%) and follicular carcinoma (10-15%), which are usually associated with a good prognosis. In contrast, anaplastic carcinomas (2-5%) are highly malignant tumors and characterized by the presence of local or distant metastatic lesions. 70% of papillary carcinomas (PTCs) have somatic alterations that command the activation of effector genes of the signaling pathway of mitogen-activated protein kinase (MAPKs), including point mutations of the BRAF and RAS genes, as well as chromosomal rearrangements that they involve the RET and NTRK, being the most frequently genetic event the BRAF^{V600E} mutation (30-80%).

The emerging role of Toll-like receptors (TLRs) in the maintenance of tissue homeostasis as critical regulators of inflammatory processes and tissue regeneration response under physiological conditions has led to the identification of aberrant functions of these receptors in different diseases, including inflammatory and infectious disorders, autoimmunity and cancer. Particularly, unregulated TLR signaling has been described in several neoplastic processes associated with exacerbated production of pro-inflammatory cytokines involved in tumor progression. Here, the mechanism underlying TLR4 overexpression in papillary thyroid carcinomas (PTCs) mainly harboring the BRAF^{V600E} mutation was studied. TLR4 was overexpressed in PTCs compared to non-neoplastic thyroid tissue. Moreover, paired clinical specimens of primary PTC and its lymph node metastasis showed a significant upregulation of TLR4 levels in the metastatic tissues. In agreement, conditional BRAF^{V600E} expression in normal rat thyroid cells and mouse thyroid tissue upregulated TLR4 expression levels. Of note, The Cancer Genome Atlas (TCGA) data analysis revealed that BRAF^{V600E}-positive tumors with high TLR4 expression were associated with shorter disease-free survival. Transcriptomic data analysis indicated a positive correlation between TLR4 expression levels and MAPK/ERK signaling activation. Consistently, chemical blockade of MAPK/ERK signaling abrogated BRAF^{V600E}-induced TLR4 expression. A detailed study of the TLR4 promoter revealed a critical MAPK/ERK-sensitive Ets binding-site involved in BRAF^{V600E} responsiveness. Subsequent investigation revealed that the Ets-binding factor ETS1 is critical for BRAF^{V600E}-induced MAPK/ERK signaling-dependent TLR4 gene expression. Together, these data indicate that functional TLR4 overexpression in PTCs is a consequence of thyroid tumor-oncogenic driver dysregulation of MAPK/ERK/ETS1 signaling.

Chronic activation of the immune system and tissue response might generate an inadequate negative regulation of TLRs signal pathways leading to an excessive pro-inflammatory microenvironment that facilitates the promotion of neoplastic processes. Here, functional TLR4 expression was demonstrated in PTC cells by increased NF- κ B transcriptional activity in response to the exogenous TLR4-agonist lipopolysaccharide (LPS). Furthermore, the stimulation of the TLR4 induces the expression of inflammatory response genes, demonstrating that the signaling pathway TLR4/MyD88/I κ B- α /NF- κ B is functionally conserved in thyroid cancer cell models that harbor the BRAF^{V600E} mutation.

Several reports have shown a cross-interaction between TLR4 and the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), TLR4 agonists are able to activate the signaling of EGFR independently of its ligand (effect referred to as transactivation). In the present work we have identified that EGFR is differentially increased in PTCs that harbor the BRAF^{V600E}

oncogene. In addition, we demonstrated the effect of transactivation of EGFR through the activation of TLR4 in BRAF^{V600E} positive thyroid cancer cell models. In concordance, we observed that increased levels of TLR4 expression correlate with increased levels of EGFR in patients with PTCs harboring the BRAF^{V600E} mutation. Our results suggest the acquisition of a potential hypersensitivity to endogenous and exogenous stimuli for both receptors in thyroid cancer, complicating the effects mediated by TLR4 in function of EGFR expression levels.

Taken together, our data indicate that functional overexpression of TLR4 is a consequence of the deregulation of MAPK/ERK/ETS1 signaling induced by oncogenes promoters of thyroid cancer. Considering the oncogenic potential of the aberrant activation of NF- κ B signaling in the promotion of thyroid tumor growth and the association of increased levels of TLR4 with more aggressive tumors, our results suggest a pro-oncogenic role of TLR4 in thyroid tumorigenesis, giving the molecular basis both for the design of diagnostic tools able to identify potentially more aggressive thyroid carcinomas and for the development of new therapeutic modalities that result in the benefit of patients.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA GLÁNDULA TIROIDES	1
1.2. EL CÁNCER DE TIROIDES	4
1.2.1. Epidemiología del cáncer de tiroides	4
1.2.2. Clasificación del cáncer de tiroides	5
1.2.3. Factores de Riesgo	6
1.2.4. Detección y tratamiento del cáncer de tiroides	7
1.2.5. Infiltración leucocitaria del cáncer de tiroides	7
1.2.6. Patogenia molecular del cáncer de tiroides	8
1.2.7. La vía de señalización MAPK	9
1.2.8. La vía de señalización PI3K/AKT	10
1.2.9. Mutaciones en BRAF	10
1.2.10. Mutaciones en RAS	12
1.2.11. Rearreglos RET/PTC	13
1.2.12. Señalización y diferenciación del PTC	14
1.3. RECEPTORES TIPO TOLL	17
1.3.1. El receptor TLR4	18
1.3.2. La vía dependiente de MyD88	19
1.3.3. La vía independiente de MyD88	20
1.3.4. Reguladores negativos de la señalización de TLR4	20
1.3.5. Regulación de la función del factor de transcripción NF- κ B	21
1.4. TLRs Y CÁNCER	26
1.4.1. TLRs como reguladores negativos del cáncer	26
1.4.2. Los TLRs como mediadores de la tumorigénesis	27
1.4.3. TLR4 y Cáncer	27
1.4.4. TLRs y Cáncer de tiroides	28
1.4.5. NF- κ B y Cáncer de tiroides	28
1.5. RECEPTORES ErbBs	30
1.5.1. ErbBs y cáncer	30
1.5.2. ErbBs y sus ligandos en el cáncer de tiroides	32
1.5.3. Transactivación de ErbB por otras vía de señalización	33
1.5.4. Transactivación de EGFR por la señalización de TLRs	34
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	36

3. MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1. Cultivo celular	39
3.2. Animales de laboratorio	40
3.3. Captación de Ioduro	40
3.4. Extracción del ARN total	40
3.5. Inmunohistoquímica	41
3.6. Inmunofluorescencia	42
3.7. Obtención de extractos proteicos totales	42
3.8. Extractos proteicos nucleares y fraccionamiento núcleo-citoplasma	43
3.9. Cuantificación de extractos proteicos	43
3.10. Western blot	43
3.11. Plásmidos	45
3.11.1. Construcciones conteniendo vectores de expresión	45
3.11.2. Construcciones conteniendo elementos de respuesta	45
3.11.3. Construcciones conteniendo regiones promotoras de TLR4	46
3.11.4. Vectores de expresión de normalización	46
3.12. Mutagénesis sitio dirigida	46
3.13. Amplificación y purificación de plásmidos	46
3.14. Ensayos de transfección de plásmidos	47
3.15. Transcripción reversa y PCR convencional y a tiempo real	48
3.16. Silenciamiento de la expresión génica mediante ARN de interferencia	49
3.17. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	50
3.18. Ensayo del cierre de la herida	51
3.19. Gestión de residuos peligrosos	51
3.20. Análisis estadístico	51
4. RESULTADOS	52
4.1. CAPÍTULO I: MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA SOBREENPRESIÓN FUNCIONAL DE TLR4 EN LA CÉLULA TUMORAL TIROIDEA	52
4.1.1. Expresión incrementada de TLR4 en tejidos de neoplasias tiroideas	52
4.1.2. Niveles incrementados de TLR4 se asocian con características tumorales desfavorables en carcinomas papilares tiroideos	58
4.1.3. Oncogenes activantes de la vía de señalización MAPK/ERK inducen la expresión de TLR4	63
4.1.4. Expresión funcional de TLR4 en modelos celulares de cáncer de tiroides	71
4.1.5. La señalización MAPK/ERK regula la expresión de TLR4 en modelos celulares de cáncer de tiroides a través de factores de transcripción ETSs	81

4.I.6. El factor de transcripción ETS1 media la expresión de TLR4 inducida por el oncogén BRAF ^{V600E}	90
4.II. CAPÍTULO II: MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA EXPRESIÓN Y TRANSACTIVACIÓN DE EGFR EN LA CÉLULA TIROIDEA TUMORAL	99
4.II.1. PTCs que albergan la mutación BRAF ^{V600E} poseen expresión incrementada de EGFR	99
4. II.2. Señalización cruzada entre TLR4 y EGFR	109
5. DISCUSIÓN	112
5.I. CAPÍTULO I: MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA SOBREENPRESIÓN FUNCIONAL DE TLR4 EN LA CÉLULA TUMORAL TIROIDEA	112
5.II. CAPÍTULO II: MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA EXPRESIÓN Y TRANSACTIVACIÓN DE EGFR EN LA CÉLULA TIROIDEA TUMORAL	122
6. CONCLUSIONES	126
7. BIBLIOGRAFÍA	129
8. ABREVIATURAS	144
9. AGRADECIMIENTOS	147
10. PUBLICACIONES	149

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA GLÁNDULA TIROIDES

La glándula tiroides es el órgano endocrino más grande del ser humano, con un peso entre 15 y 25 gramos, regula el metabolismo sistémico a través de la producción de hormonas tiroideas. La glándula tiroides del adulto normal está situada en la parte frontal del cuello debajo del cartílago tiroideo y está compuesta por dos lóbulos encapsulados, uno a cada lado de la tráquea, conectados entre sí por un istmo que cruza la tráquea anterior. La tiroides es la única glándula endócrina capaz de almacenar los productos hormonales en una localización extracelular. La unidad funcional de este órgano se denomina folículo tiroideo. Cada folículo está constituido por una capa simple de células epiteliales recubiertas por una membrana basal, rodeando una cavidad central o lumen que contiene un material homogéneo denominado coloide (1) (Figura 1).

Las células foliculares tiroideas son células epiteliales polarizadas. Esta característica es fundamental para la síntesis de hormonas porque condiciona la localización del sistema responsable de la captación de yoduro en la región externa del folículo tiroideo (membrana basal), en contacto con los capilares sanguíneos, mientras que las proteínas involucradas en la producción hormonal se encuentran en la región interna (membrana apical) en contacto con el coloide. Por lo tanto existe un flujo de yoduro desde la membrana basal hasta el lumen del folículo. La membrana apical presenta microvellosidades que se extienden hacia la luz coloidal incrementando la superficie de la célula folicular en contacto con el coloide. Además el tejido tiroideo contiene, en menor número, células parafoliculares o células C, secretoras de la hormona calcitonina involucrada en la regulación de los niveles de calcio en el organismo (1) (Figura 1).

La glándula tiroides sintetiza y secreta las hormonas 3,5,3',5' tetraiodotironina o tiroxina (T_4) y 3,5,3' triiodotironina (T_3). Ambas hormonas son estructuralmente tironinas iodadas compuestas por un anillo fenólico unido mediante una unión éster a una tirosina, conteniendo cuatro o tres átomos de yodo, respectivamente. Además, se secretan pequeñas cantidades de los precursores monoiodotirosina (MIT) y diiodotirosina (DIT) y el compuesto sin actividad biológica 3, 3, 5' triiodotironina o T_3 reversa (rT_3) (2, 3).

La biosíntesis de las hormonas tiroideas, su almacenamiento y su secreción son altamente regulados por diversos mecanismos. La disponibilidad de niveles suficientes de hormonas tiroideas es de vital importancia para el normal desarrollo y la homeostasis del organismo. El almacenamiento de T_4 y T_3 en el coloide folicular sirve como reservorio de estas hormonas. En el control de la adecuada provisión de hormonas tiroideas operan mecanismos hormonales sensibles y específicos. La tirotrópina (TSH) es la hormona fundamental para la regulación morfológica y funcional de la glándula tiroides. El proceso es controlado por un mecanismo clásico de retroalimentación negativa del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. El eje hipotálamo-hipófisis, mediante la liberación de TSH, activa la síntesis y secreción de T_4 y T_3 ante una disminución de los niveles plasmáticos de estas hormonas. Por el contrario, un aumento en la concentración plasmática de T_4 y T_3 ejerce una retroalimentación negativa sobre el sistema hipotálamo-hipófisis (Figura 1). Por otra parte, dentro de la propia célula folicular también operan mecanismos de autorregulación tendientes a mantener constante la producción hormonal (1).

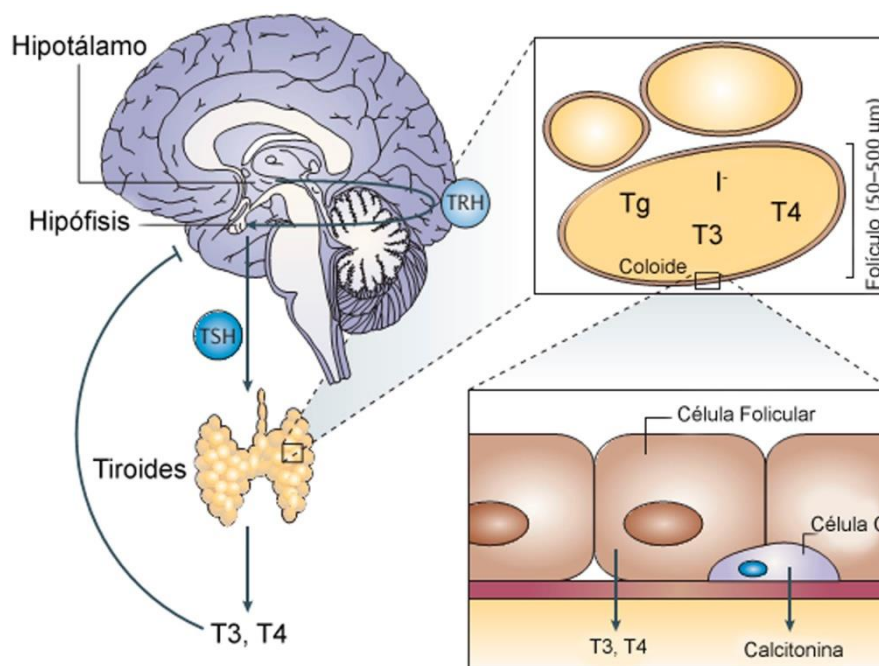


Figura 1. Modelo esquemático de la estructura y función de la glándula tiroides. La glándula tiroides es un órgano en forma de mariposa. Presenta dos lóbulos compuestos por folículos relativamente esféricos (de 50 a 500 µm) revestidos por una única capa de células foliculares epiteliales que albergan el material coloide. Las células C, productoras de calcitonina, se encuentran en la unión del tercio superior y medio de ambos lóbulos tiroideos, y están situadas dentro de los folículos o en una localización parafolicular. Las principales funciones de la tiroides son la síntesis, el almacenamiento y la secreción de hormonas tiroideas, triiodotironina (T₃) y tetraiodotironina (T₄), bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis con retroalimentación negativa ejercido por las hormonas tiroideas. La hormona liberadora de tirotropina (TRH), es secretada por el hipotálamo, para estimular la secreción de la hormona estimulante de tiroides o tirotropina (TSH) en la glándula pituitaria anterior. La TSH estimula a las células foliculares para sintetizar y secretar hormonas tiroideas. La interrupción de la homeostasis de la hormona tiroidea resulta en hipotiroidismo y formación de bocio en respuesta a la mayor secreción de TSH. Tiroglobulina (Tg), Ioduro (I⁻)
Representación esquemática adaptada de *Kondo et al. 2006* (1).

El proceso de producción de hormonas tiroideas involucra tres etapas secuenciales. La primera comprende el transporte de yoduro (I⁻) desde la sangre hacia el interior de la célula folicular a través de su membrana basal mediante el simportador de Na⁺/I⁻ (NIS). La siguiente etapa es la organificación del yoduro, en la cual éste es incorporado a los residuos tirosina de la molécula de tiroglobulina (Tg) con la formación de MIT y DIT. Este proceso es catalizado por la peroxidasa tiroidea (TPO) en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) generado por la oxidasa tiroidea dependiente de NADPH (Duox). Posteriormente tiene lugar la producción de iodo-tironinas mediante la reacción de acoplamiento de MIT y DIT, con formación de T₄ y T₃. Los procesos de organificación y acoplamiento ocurren en la zona apical de la célula folicular más específicamente en la interfase célula-coloide, en el transcurso de la fusión de las vesículas exocíticas que contienen la Tg con la membrana apical de las vellosidades (3) (Figura 2).

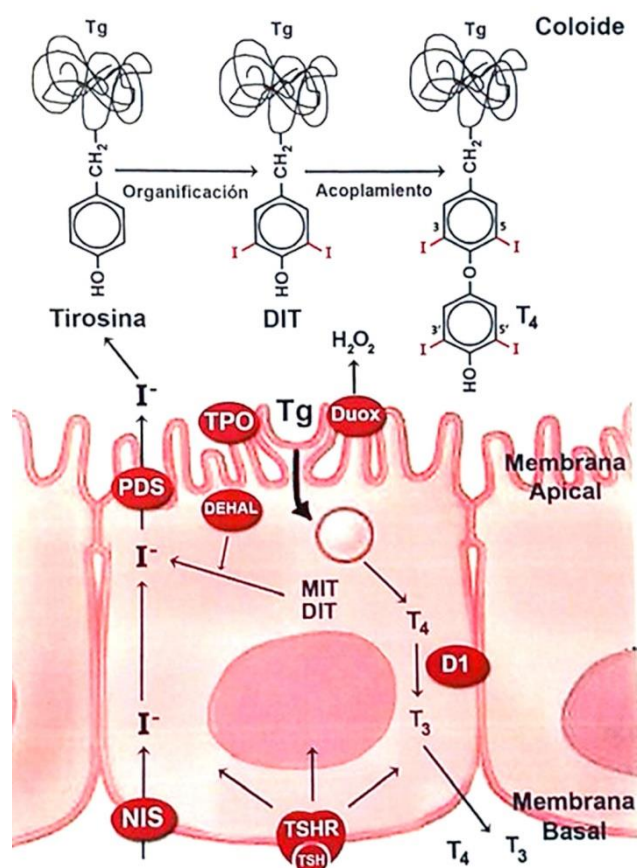


Figura 2. Modelo esquemático de la síntesis y secreción hormonal en la célula folicular tiroidea. El proceso de síntesis de las hormonas tiroideas empieza por la captación de iodo circulante en la sangre en forma de yoduro (I^-). La incorporación del yoduro a través de la membrana basal de la célula folicular tiroidea o tirocito es mediada por el simportador Na^+/I^- (NIS). El eflujo del halógeno hacia el coloide es mediado por pendrina (PDS) en la membrana apical, zona en la cual ocurre la organificación. Este proceso es catalizado por la peroxidasa tiroidea (TPO) en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado por la oxidasa tiroidea dependiente de NADPH (Duox). Durante el proceso de organificación el yoduro es incorporado a residuos tirosinas en la molécula de tiroglobulina (Tg). TPO también actúa en la reacción de acoplamiento de las tirosinas (MIT y DIT) para formar las iodotironinas T_4 y T_3 . Estas hormonas pueden permanecer almacenadas en el material coloide unidas a la Tg, o ser captadas principalmente mediante micropinocitosis del material coloide por parte del tirocito. En lisosomas del tirocito se degrada la Tg y se libera MIT, DIT, T_4 y T_3 . Luego T_4 y T_3 son liberadas al espacio intersticial para ser introducidas a los capilares sanguíneos y linfáticos. Por otra parte, las moléculas de MIT y DIT son deshalogenadas en el interior de las células por las deshalogenasas de iodotironinas (DEHAL), siendo el yoduro liberado reciclado para una próxima síntesis hormonal. La conversión de T_4 a T_3 ocurre mediante la deshalogenación del anillo externo 5' y es catalizada por la desalogenasa de iodotironinas tipo 1 (DIO1) en tejidos periféricos y en menor medida dentro de la glándula tiroidea. Representación esquemática adaptada de la *Tesis Doctoral de la Dra. Magalí Nazar, 2013*.

1.2. EL CÁNCER DE TIROIDES

1.2.1. Epidemiología del cáncer de tiroides

El cáncer de tiroides es una neoplasia relativamente rara, representando aproximadamente el 1 al 5% de todos los cánceres en mujeres y menos del 2% en hombres (4). Sin embargo, el cáncer de tiroides es la neoplasia más prevalente de órganos endócrinos. Afecta a la población en general pero se manifiesta mayoritariamente en pacientes de 20 a 50 años de edad (5) y presenta un porcentaje de muerte relativamente bajo. Sin embargo, la tasa de recurrencia o persistencia es alta en pacientes con esta neoplasia, asociándose con mayor morbilidad (6). La incidencia del cáncer de tiroides está globalmente en aumento, tanto en mujeres como en hombres, manteniendo la relación mujer/hombre en 3:1 (7, 8). Durante las últimas tres décadas (1973 al 2002) la tasa de cáncer de tiroides ha incrementado en todo el mundo, en un 66,7% en mujeres y un 48% en hombres (9). Si bien en la Argentina no existen estadísticas oficiales sobre la incidencia de la enfermedad, la Asociación de pacientes con cáncer de tiroides de la República Argentina (ACTIRA) estima que son diagnosticadas aproximadamente 3000 personas por año. En los Estados Unidos se reportó que el incremento anual medio de la incidencia para el cáncer de tiroides fue del 6,6% desde el 2000 al 2009, siendo este incremento de incidencia el más alto entre todos los tipos de cánceres (10). Además, en un estudio de proyección para diagnóstico de cáncer en los Estados Unidos (11) se reportó que si la tendencia continúa en aumento, la neoplasia tiroidea podría reemplazar al cáncer colorectal liderando el cuarto puesto de diagnóstico de cáncer hacia el año 2030.

La causa del incremento en la incidencia del cáncer de tiroides es actualmente un tema de debate y de discrepancia. Dado que el aumento en la incidencia fue encontrado en poblaciones de todo el mundo, muchos autores coinciden en que este incremento no estaría asociado a una región geográfica ni a diferencias étnicas, de edad, o de sexo (7, 9). Sin embargo, hay quienes no descartan la posibilidad de que **factores hereditarios y factores ambientales** como la cantidad de yodo en la ingesta y radiaciones ionizantes pudieran estar involucrados en la mayor frecuencia de esta neoplasia (7). Por otro lado, hay quienes argumentan que el incremento de la incidencia se debe al **acceso generalizado al diagnóstico por imágenes de alta resolución y a una mejora de estas técnicas diagnósticas**. Por lo tanto, se objeta que la frecuencia observada sea un incremento real sino que existiría una mayor detección de tumores pequeños (microcarcinomas) antes no diagnosticados (7, 12). En concordancia, algunos autores sostienen que la obtención de biopsias por punción aspirativa con aguja fina (PAAF) como método diagnóstico estaría contribuyendo en gran medida a la mayor incidencia reportada, debido a que existe una frecuencia más pronunciada para los microcarcinomas tiroideos (<2 cm de diámetro) (7, 13). Basándose en el hecho de que la tasa de mortalidad permaneció invariable en las últimas décadas (9), hay quienes argumentan que el incremento de la incidencia del cáncer de tiroides podría deberse a un sobrediagnóstico de tumores que no estarían destinados a causar sintomatología ni muerte (7, 12). Sin embargo, estudios epidemiológicos reportaron que la aumentada frecuencia observada podría reflejar mayoritariamente una incrementada incidencia de tumores tiroideos papilares en las últimas décadas, dado que los demás tipos de tumores permanecieron sin alteraciones a lo largo del tiempo (12, 14). En coincidencia con lo anterior, se reportó que la tasa de mutación V600E en el transductor BRAF (BRAF^{V600E}), perteneciente a la familia de proteínas RAF, incrementó significativamente en los últimos 15 años (1991 al 2005), sugiriendo que una mayor tasa de mutación BRAF^{V600E} podría estar contribuyendo al aumento de la incidencia de cáncer de tiroides (15).

1.2.2. Clasificación del cáncer de tiroides

Los nódulos tiroideos pueden deberse a una hiperplasia benigna de células foliculares denominada adenoma tiroideo folicular (FTA) o a una lesión maligna derivada de los dos tipos de células tiroideas endócrinas, células parafoliculares (3% de los casos) o células foliculares (95% de los casos). El cáncer tiroideo medular (MTC) es la única neoplasia tiroidea que no deriva de la célula folicular (5). Las células foliculares pueden dar lugar a cuatro tipos de tumores incluyendo al cáncer papilar tiroideo (PTC, 80% de los casos), el cáncer folicular tiroideo (FTC, 10% de los casos), el cáncer tiroideo pobremente diferenciado (PDTC, 3,5% de los casos) y el cáncer tiroideo anaplásico (ATC, 2% de los casos) (5) (Figura 3).

El PTC y el FTC se clasifican conjuntamente como cáncer tiroideo diferenciado (DTC) ya que estos tumores suelen comportarse de manera indolente y generalmente presentan buen pronóstico, siendo un 85-95% el porcentaje de supervivencia luego de 35 a 40 años de su diagnóstico (5). En contraposición, el PDTC es morfológicamente un tumor intermedio entre el DTC y el ATC que presenta pronóstico severo, especialmente si se diagnostica en etapas avanzadas, con una tasa de supervivencia menor a un 20% luego de 5 años de su diagnóstico (5). Por otra parte, el ATC es una neoplasia altamente agresiva y letal que se presenta dramáticamente e invade rápidamente tejidos adyacentes, siendo su tasa de supervivencia de sólo 6 a 8 meses luego de su detección (16).

Clásicamente los PTCs se subclasifican según sus características histopatológicas y parámetros clínicos. Los subtipos de PTCs incluyen: el PTC convencional o clásico (CPTC), la variante folicular de PTC (FVPTC), PTC de células altas (TCPTC) y otras variantes raras de PTC (5) (Figura 3). Estudios moleculares recientes a través de la utilización de la tecnología de *Next-Generation Sequencing (NGS)* proponen reclasificar los tumores tiroideos en subtipos moleculares ya que de esta manera se reflejarían mejor las propiedades de señalización y de diferenciación (17, 18). Actualmente se invierte gran esfuerzo en proporcionar nuevas perspectivas sobre la biología de los tumores tiroideos y se espera que en un futuro próximo las técnicas moleculares mejoren la precisión del diagnóstico y además se utilicen para la búsqueda de marcadores de pronóstico. En este sentido, el progreso en el entendimiento de las alteraciones genéticas del cáncer de tiroides podría abrir la posibilidad de individualizar el tratamiento de los pacientes, dirigiendo la terapia hacia las vías intracelulares involucradas en la progresión tumoral.

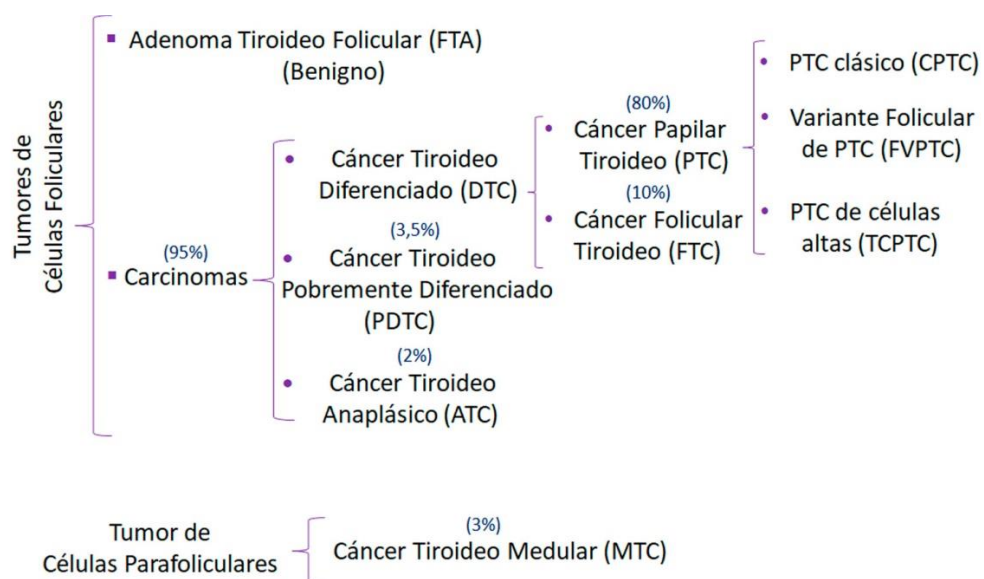


Figura 3. Clasificación de tumores tiroideos. Se resume la clasificación de los tumores tiroideos según las células de los que derivan. Entre paréntesis se indican las abreviaturas comúnmente utilizadas para cada tipo de tumor. En azul se indica el porcentaje de frecuencia.

1.2.3. Factores de Riesgo

El DTC ocurre a cualquier edad, pero el riesgo incrementa más tempranamente en mujeres (40 a 50 años de edad) que en hombres (60 a 70 años de edad), siendo la enfermedad más frecuente en mujeres que en varones con una relación promedio de 3:1, respectivamente (7, 8, 19). La diferente distribución de la incidencia por sexo y por edad indicaría que las hormonas femeninas podrían de alguna manera influir en la carcinogénesis tiroidea. Sin embargo, aún no se definió con claridad el mecanismo por el cual la disminución de los niveles de estrógenos podrían participar en este proceso (1).

Alrededor del 3-10% de los carcinomas tiroideos son de origen familiar. El carcinoma tiroideo se define como familiar cuando dos o más parientes de primer grado están afectados en ausencia de otros síndromes familiares conocidos (20).

La exposición a la radiación es un factor de riesgo comprobado para el cáncer de tiroides, especialmente para el PTC. Las fuentes de radiación incluyen ciertos tratamientos médicos y radiaciones emitidas por accidentes de plantas de energía o armas nucleares (21, 22). Después del accidente de Chernobyl hubo un incremento en la frecuencia de PTC por efecto de la exposición a la radiación, siendo la incidencia más pronunciada en niños. Sin embargo, no está claro porque la tiroides es más susceptible al daño por radiación durante la infancia (23).

Estudios recientes han reportado un riesgo incrementado de cáncer de tiroides en pacientes sobrevivientes al cáncer de mama. Se considera que esta correlación es a causa de efectos relacionados con el tratamiento y/o a las técnicas diagnósticas del cáncer de mama más que por factores de riesgo comunes para ambas neoplasias (24). No obstante estos hallazgos continúan bajo investigación.

Como se mencionó anteriormente, el yoduro es necesario para la síntesis de las hormonas tiroideas. En este sentido, la deficiencia de yodo en la dieta produce proliferación de las células tiroideas por una mayor liberación de TSH, conduciendo a la formación de bocio como un mecanismo compensatorio. Sin embargo, el PTC es más frecuente en regiones ricas en yodo. Por el contrario, la incidencia del FTC en áreas con deficiencia de yodo es mayor que en áreas con dietas ricas en yodo (25). En concordancia, la suplementación con yodo en la dieta de modelos animales para la inducción de cáncer de tiroides provoca un cambio morfológico desde una arquitectura folicular a una arquitectura de tipo papilar, lo cual parecería indicar que el yoduro estaría modulando la morfología tumoral, en lugar de participar como un iniciador tumoral (26). Sin embargo, el preciso rol del yoduro en la carcinogénesis tiroidea no está completamente esclarecido.

El 48% de los PTCs poseen infiltración linfocítica (27), lo cual indicaría que factores inmunológicos podrían estar involucrados en la progresión de estos tumores. La tiroiditis de Hashimoto (una de las principales causas de hipotiroidismo autoinmune) se caracteriza por poseer una respuesta inmune celular con densa infiltración linfocitaria en la glándula tiroides, así como por presentar una respuesta inmune humoral que conduce a la producción de autoanticuerpos contra antígenos tiroideos. Recientemente, a través de un estudio de metaanálisis se investigó la correlación entre el PTC y la tiroiditis de Hashimoto. Los resultados revelaron que la tiroiditis precede con mayor frecuencia al PTC que a enfermedades tiroideas benignas. Sin embargo, se reportó que los pacientes con PTC y

tiroiditis tienen características clinicopatológicas favorables en comparación con los PTC en ausencia de tiroiditis (28).

1.2.4. Detección y tratamiento del cáncer de tiroides

El cáncer de tiroides es comúnmente diagnosticado a través de imágenes utilizando ultrasonido y a través del análisis citológico de una biopsia obtenida mediante PAAF guiada por imágenes. Luego del diagnóstico de cáncer tiroideo la terapéutica consiste en la realización de una cirugía que comprende generalmente la tiroidectomía total con o sin vaciamiento ganglionar cervical y la posterior ablación del tejido remanente y posibles metástasis con yodo radiactivo (generalmente ^{131}I). Además, luego de la tiroidectomía total o parcial, los pacientes son tratados con levotiroxina (T4) sintética tanto para suplir la necesidad de esta hormona como para suprimir la liberación de TSH (terapia de supresión) e intentar de esta manera prevenir el crecimiento del tejido tiroideo remanente, las recurrencias y la progresión del tumor.

Aproximadamente el 30% de los pacientes con DTC avanzado y metastásico son refractarios a la terapia con yodo radioactivo, debido a una reducción de los niveles de expresión de NIS y/o a una disminución de la llegada del *simporter* a la membrana basal de las células foliculares. Por lo tanto, estos pacientes no son susceptibles al tratamiento con ^{131}I . Se propusieron varias terapias alternativas para tumores refractarios a la terapia con ^{131}I , siendo los inhibidores de tirosina quinasa los quimioterapéuticos más comúnmente utilizados (29). Históricamente, los pacientes con tumores tiroideo refractarios a la radioyodo terapia han tenido resultados negativos, en parte porque estos tumores a menudo desarrollan resistencia a la citotoxicidad de los agentes quimioterapéuticos alternativos y debido a la baja eficiencia de estos tratamientos (29). Sin embargo, no se demostró asociación entre la presencia de marcadores moleculares y la respuesta al tratamiento (30-33).

1.2.5. Infiltración leucocitaria del cáncer de tiroides

La inflamación es un reconocida y distintiva característica del cáncer, que generalmente contribuye al desarrollo y la progresión de tumores malignos. Además, la presencia de infiltrado inflamatorio en el tejido tumoral puede representar condiciones pro-inflamatorias que preceden al desarrollo de la malignidad. Existe creciente evidencia del rol que tiene la respuesta inmune local y la inflamación sistémica en la progresión de los tumores y la supervivencia de los pacientes con cáncer (30, 31). Diversos estudios demostraron que un microambiente inflamatorio podría contribuir a la proliferación y supervivencia de células malignas, el escape a la inmunidad adaptativa y la estimulación de la angiogénesis y metástasis (32).

La inflamación se ha implicado en el inicio y la progresión del cáncer de tiroides (33). Se identificaron diferentes tipos de células inflamatorias asociadas a tumores tiroideos. Estas consisten en células del sistema inmune innato (principalmente macrófagos, mastocitos y neutrófilos), y células asociadas al sistema inmune adaptativo (células T y B). En general, las células del sistema inmune innato están ligadas a procesos que promueven la progresión tumoral (34). El análisis de la relación neutrófilo-linfocito en sangre de pacientes con DTC demostró que valores altos de esta relación se correlacionan con un aumento del tamaño tumoral y alto riesgo de recurrencia (33). Además, la presencia de macrófagos asociados a tumores (TAM) se correlacionó con mayor progresión tumoral y metástasis en el PTC y el ATC (35). Por el contrario, el papel del sistema inmune adaptativo es un tema de debate.

Varios estudios han demostrado que pacientes cuyos tumores tiroideos no están infiltrados por linfocitos presentan una tasa alta de recurrencia, sugiriendo que la presencia de linfocitos en el microambiente tumoral puede favorecer el pronóstico de los pacientes (36). Sin embargo, otros investigadores informaron que pacientes con cáncer de tiroides que poseen linfocitos asociados al tumor presentan etapa avanzada de la enfermedad y mayor incidencia de metástasis ganglionar (37). Recientemente se reportó que la presencia de infiltrado linfocitario en el PTC se asocia con una regulación positiva de la respuesta inmune, con producción de citoquinas y con una mayor supervivencia en estos pacientes (27).

1.2.6. Patogenia molecular del cáncer de tiroides

A nivel molecular la patogénesis de los tumores derivados de la célula folicular radica en alteraciones genéticas producto de mutaciones puntuales o rearrreglos cromosomales que originan proteínas con actividad constitutiva (oncogenes) o pérdida de la actividad de supresores tumorales (10). Se identificaron numerosas alteraciones que cumplen un rol fundamental en la tumorigénesis, y la comprensión de estas bases moleculares constituye una gran promesa en el desarrollo de estrategias terapéuticas eficaces para el cáncer de tiroides (29).

El proceso de progresión del carcinoma tiroideo comprende una paulatina acumulación de múltiples alteraciones genéticas, que cooperan sinérgicamente para su oncogenicidad (10). Hace 25 años se propuso por primera vez un modelo molecular de progresión para el cáncer de tiroides, en el que se describe que el DTC progresa secuencialmente hacia el PDTC y el ATC (38). Este modelo de progresión tumoral es sustentado principalmente por la coexistencia de DTCs junto a carcinomas más indiferenciados, así como por la presencia de alteraciones genéticas idénticas en secciones indiferenciadas y bien diferenciadas (38). Actualmente, un creciente número de reportes continúan aportando evidencia que avala el modelo de progresión del cáncer tiroideo (1, 10, 39). Sin embargo, también existen elementos que sustentan que tanto el PDTC como el ATC son neoplasias que pueden ocurrir *de novo* (10, 40).

Los adenomas tiroideos hiperfuncionantes derivan de la proliferación de células foliculares, albergan mutaciones activantes del receptor de TSH (TSHR) y de la subunidad $\alpha 1$ de la proteína G unidora de nucleótidos de guanina (GNAS1) causando activación de la cascada de señalización de AMPc (41). Sin embargo, las mutaciones en TSHR y GNAS1 rara vez son detectadas en neoplasias tiroideas, sugiriendo que la activación constitutiva de la señalización de AMPc por sí sola sería insuficiente para la transformación maligna de la célula folicular tiroidea (1, 10) (Figura 4).

En relación a los DTCs, en las células foliculares ocurren mutaciones o reordenamientos de genes que codifican para efectores de la vía de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y estos oncogenes son requeridos para la transformación maligna de la célula tiroidea. En este sentido, los PTCs poseen un 70% de alteraciones en efectores de la vía de MAPKs, incluyendo mutaciones puntuales en genes BRAF y RAS (42, 43), como así también fusiones cromosómicas que implican tirosinas quinasas como RET (44) y NTRK dando oncogenes quiméricos (45). Estas mutaciones por lo general ocurren como evento mutuamente exclusivo, sugiriendo efectos corriente abajo similares o redundantes (1). Por otro lado, se conoce que el 70-75% de los FTCs albergan mutaciones puntuales en RAS o rearrreglos cromosómicos PAX8/PPARY, siendo también eventos mutuamente excluyentes (46) (Figura 4).

Alteraciones genéticas que involucran la vía de señalización de PI3K/AKT se presentan mayoritariamente en PDTC y rara vez en el DTC (47, 48). Por otro lado,

mutaciones con pérdida de función del gen supresor tumoral TP53, también llamado “guardián del genoma” porque interviene en la reparación del DNA, son eventos cruciales para impulsar la progresión de tumores tiroideos indolentes hacia tumores letales, ya que estas mutaciones están restringidas a tumores agresivos, presentándose en el 17-38% de los PDCs y un 67-88% de los ATCs (1, 49). Adicionalmente, mutaciones activantes del gen que codifica para β -Catenina (CTNNB1) se reportaron exclusivamente en el 21% de PDCs y el 48% de ATCs (Figura 4) (1).

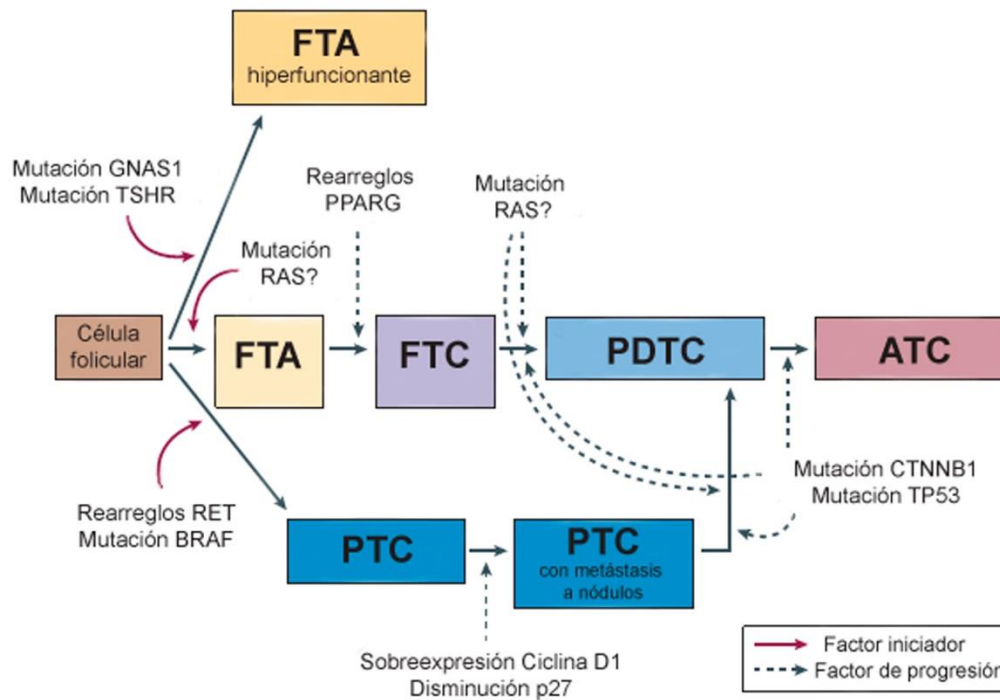


Figura 4. Modelo esquemático de la progresión tumoral tiroidea en múltiples etapas. Se proponen diferentes vías para la progresión de la célula folicular tiroidea, incluyendo al adenoma folicular tiroideo hiperfuncionante (tumor benigno con o sin propensión a la progresión maligna), carcinoma folicular de tiroides (FTC) y carcinoma papilar de tiroides (PTC). Defectos genéticos que resulten en la activación de RAS conjuntamente con la activación de PPAR γ son eventos frecuentes en el desarrollo del FTC. Alteraciones genéticas que resultan en la activación de RET o BRAF representan eventos tempranos y frecuentes en el desarrollo del PTC. La sobreexpresión de la ciclina D1 y la disminución de la expresión del inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina p27 son fuertes predictores de metástasis a ganglios linfáticos del PTC. La mayoría de los carcinomas tiroideos pobremente diferenciados (PDCs) y anaplásicos (ATCs) derivan de carcinomas de tiroides bien diferenciados (DTCs) preexistentes a través eventos genéticos adicionales, incluyendo mutaciones en el gen que codifica β -catenina (CTNNB1), inactivación del gen supresor tumoral p53 (TP53) y mutaciones en RAS. Sin embargo el PDC y el ATC pueden ocurrir *de novo*. Representación esquemática adaptada de Kondo et al. 2006 (1).

1.2.7. La vía de señalización MAPK

La señalización de MAPK es una vía de señalización intracelular que normalmente se activa luego del reconocimiento de factores de crecimiento por receptores con actividad tirosina quinasa (RTK) intrínseca ubicados en la membrana plasmática celular, produciéndose la activación secuencial RTK \rightarrow RAS \rightarrow RAF \rightarrow MEK \rightarrow ERK. La cascada de señalización por MAPK presenta un rol fundamental en la regulación de la proliferación, diferenciación, apoptosis y supervivencia, encontrándose aberrantemente activada en una

gran variedad de neoplasias en humanos. En este sentido, la importancia de la vía de MAPK en la tumorigénesis tiroidea está bien establecida (40). Particularmente en el DTC, la vía MAPK se activa constitutivamente a través de mutaciones puntuales en BRAF y RAS o a través de fusiones cromosómicas de receptores tirosinas quinasas incluyendo los genes RET o NTRK1 (Figura 5), siendo estas alteraciones genéticas requeridas para la transformación maligna de la célula tiroidea (1). Se describió que la transfección de la mutante HRAS^{G12V} o la mutante BRAF^{V600E} inducen inestabilidad genómica en la línea celular tiroidea de rata PCCL3, manifestándose con pérdida de material cromosómico y formación de rearrreglos cromosómicos (50, 51). Por lo tanto, la activación constitutiva de la señalización de MAPK en el cáncer tiroideo podría promover la inestabilidad genómica, causando mutaciones somáticas adicionales y conduciendo así a la progresión tumoral (1).

1.2.8. La vía de señalización PI3K/AKT

En el síndrome de Cowden, un síndrome autosómico dominante, caracterizado por presentar tumores en mama, colon, piel y tumores foliculares tiroideos benignos (FTA) y malignos (FTC), se identificó la inactivación del gen supresor tumoral PTEN (52). PTEN es una lipoproteasa que regula negativamente la señalización de PI3K. Así, los tumores con inactivación de PTEN tienen exacerbada señalización de PI3K, dando como resultado la activación de la serina/treonina quinasa AKT. La activación de AKT fosforila efectores corriente abajo que inhiben la apoptosis, inducen el crecimiento celular, aumentan la captación y utilización de glucosa y aumentan la síntesis de proteínas (53). Sin embargo, también se reportó inactivación de PTEN en tumores tiroideos espontáneos en ausencia de síndrome de Cowden (52). De las tres isoformas de AKT identificadas (AKT1-3), sólo AKT1 y AKT2 se encuentran robustamente expresadas y activadas en el cáncer de tiroides, lo que sugiere un papel importante para estas dos isoformas en la tumorigénesis tiroidea (54). Particularmente en el FTC y el ATC se identificó una amplificación genómica con ganancia en el número de copias de PIK3CA el cual codifica a la subunidad catalítica de PI3K p110 α (55). Otros autores han reportado que las mutaciones PIK3CA son comunes en el ATC pero no en el DTC (47). Además, las mutaciones en RAS también dan activación constitutiva de la señalización de PI3K/AKT particularmente en el FTA y FTC (56) (Figura 4).

La sobreexpresión constitutiva de la isoforma activada de AKT1 en células tiroideas normales da lugar al crecimiento independiente de la presencia de suero y TSH, conduciendo a la resistencia a la muerte celular, aunque la señalización exacerbada de AKT parece no ser suficiente para la transformación maligna de las células tiroideas (57). Estos datos indicarían que adicionales alteraciones genéticas en efectores de otras vías de señalización serían necesarias para el desarrollo del cáncer de tiroides.

1.2.9. Mutaciones en BRAF

El protooncogén BRAF situado en el cromosoma 7q24 codifica para una serina/treonina quinasa perteneciente a la familia de proteínas RAF, que son efectores intracelulares de la vía de señalización de MAPK. Su activación es disparada por la activación de RAS en respuesta al reconocimiento de mitógenos en la membrana celular mediante receptores tirosinas quinasas, y resulta en la fosforilación y estimulación de efectores corriente abajo de la cascada de MAPK.

Las mutaciones con ganancia de función del gen BRAF conducen a la activación aberrante de la señalización de MEK/ERK la cual está implicada en la tumorigénesis de varios cánceres humanos, incluyendo melanoma (70% de prevalencia), cáncer colorectal y

de ovario (15% de prevalencia) (58). Mutaciones en BRAF están presentes en el 30-80% del PTC, en más del 13% del PDTTC y en el 35% del ATC; sin embargo no se identificaron en el FTC (43, 59). Respecto a los PTCs, las mutaciones en BRAF son típicamente halladas en las variantes TCPTC (55-100%) y CPTC (60%), mientras que se reportó una baja prevalencia en la variante FVPTC (7-14%) (60).

Se identificaron más de 40 mutaciones en el gen de BRAF (61). Sin embargo, la mutación de BRAF más prevalente es la T1799A (90% del total) originada por una transversión de timina por adenina en el nucleótido 1799 que se traduce en una sustitución de valina por glutamina en el residuo aminoacídico 600 (V600E) (40). La mutación BRAF^{V600E} produce una disrupción hidrofóbica de la interacción entre residuos del *loop* de activación y residuos en el sitio de unión a ATP que mantienen la conformación inactiva, permitiendo el desarrollo de nuevas interacciones de plegamiento para la quinasa en la estructura del componente catalítico, liderando así la activación constitutiva de la quinasa BRAF y la consecuente estimulación crónica de la señalización de MAPK (51). Otras mutaciones activantes de BRAF son raramente encontradas en el cáncer de tiroides. Solo el 1-2% de los PTCs poseen otras mutaciones en BRAF, incluyendo la mutación puntual K601E (BRAF^{K601E}) y pequeñas inserciones o deleciones alrededor del codón 600 (BRAF V600E+K601del, BRAF V599ins y V600D+FGLAT601-605ins), además BRAF puede dar un rearrreglo cromosomal con AKAP9 dando el oncogén quimérico AKAP9/BRAF (40).

La prevalencia de la mutación BRAF^{V600E} es baja en PTCs inducidos por radiación en adultos, en contraste con los PTCs esporádicos (62). En concordancia, la mutación BRAF^{V600E} no fue un evento significativo en niños post-Chernobyl (0-12%). A diferencia de los PTCs del adulto, los PTCs espontáneos durante la infancia tienen baja prevalencia de la mutación BRAF^{V600E} (20%) (23, 62, 63).

BRAF^{V600E} se expresa en el 36.5% de los microcarcinomas papilares ocultos o microscópicos, sugiriendo que esta mutación es un evento temprano en la carcinogénesis del PTC (64). La expresión de BRAF^{V600E} dirigida a la glándula tiroides en ratones transgénicos induce el desarrollo de tumores con características histológicas compatibles con el PTC humano y además dan progresión a PDTTC. Estos hallazgos develaron la capacidad de la mutación BRAF^{V600E} como iniciador tumoral y promovedor de la progresión de estos tumores hacia fenotipos más agresivos (65). Además, en modelos de xenoinjertos tumorales silenciados para BRAF^{V600E} se demostró que la expresión de este oncogén es un requerimiento necesario para el mantenimiento y el crecimiento del PTC (66). Sin embargo, algunos PTCs humanos presentan heterogeneidad intratumoral en el genotipo BRAF, con una minoría de células albergando BRAF^{V600E} y una mayoría albergando BRAF nativo (67), planteando el dilema del "huevo o la gallina", ya que no se sabe si BRAF^{V600E} inicia la tumorigénesis del PTC o si BRAF^{V600E} ocurre durante el desarrollo de un tumor tiroideo ya iniciado (68). Una posibilidad alternativa es que una vez que el PTC es originado por BRAF^{V600E}, alteraciones oncogénicas secundarias podrían tomar el control para impulsar la tumorigénesis del PTC (68). En contraposición con lo anterior, estudios más recientes donde se determinaron alteraciones genéticas en muestras apareadas de tumores papilares primarios y metástasis a distancia, demostraron alta concordancia en la expresión de oncogenes entre los PTC y sus metástasis, sugiriendo que la mutación BRAF^{V600E} es un evento importante para la progresión tumoral (64, 69, 70).

Cabe destacar que la mutación BRAF^{V600E} es considerada un marcador de mal pronóstico para el PTC ya que se asocia con características tumorales más agresivas como extensión extra tiroidea, estadio avanzado del tumor al momento del diagnóstico y mayor prevalencia de metástasis a ganglio linfático o a distancia (60). Además, la mutación BRAF^{V600E} es útil como predictor de fracaso al tratamiento convencional con yodo radioactivo

y recidiva tumoral (incluso en pacientes con PTC de bajo riesgo) (71) y es considerado un factor predictivo de muerte relacionada al cáncer (72). Asimismo se reportó asociación de la expresión de BRAF^{V600E} en muestras de tumores tiroideos obtenidas por PAAF con mayor probabilidad de recurrencia (73).

Por otro lado, las mutaciones en el promotor de una subunidad catalítica de la enzima Telomerasa, denominada Transcriptasa Reversa de la Telomerasa (TERT), son significativamente más frecuentes en PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E} en comparación con los PTCs que expresan BRAF en estado nativo (74). Además, se identificó que los PTCs BRAF^{V600E} positivos que presentan mutaciones en el promotor de TERT, son sustancialmente más indiferenciados que los tumores BRAF^{V600E} positivos con expresión de TERT en estado nativo (18).

1.2.10. Mutaciones en RAS

La familia de protooncogenes RAS, los cuales están implicados en la tumorigénesis, incluye HRAS (localizado en el cromosoma 11p11), KRAS (localizado en el cromosoma 12p12) y NRAS (localizado en el cromosoma 1p13), (75). Estos genes codifican para proteínas G monoméricas que están situadas en la superficie interna de la membrana celular y participan en la propagación de señales procedentes de la activación de RTK de membrana y receptores acoplados a proteína G triméricas a través de la activación dual de la señalización de MAPK y de PI3K/AKT. Las proteínas RAS tienen actividad GTPasa; en su estado activo se unen a GTP, luego hidrolizan el GTP dando GDP lo cual produce la inactivación del transductor y la finalización de la señalización.

La mayoría de las mutaciones puntuales en RAS causan la pérdida de la actividad GTPasa, permaneciendo constitutivamente activa. Las mutaciones del gen RAS (codones 12, 13 y 61) son comunes en diferentes tipos de tumores humanos (75). Las mutaciones de RAS más comúnmente encontradas en el cáncer de tiroides implican al codón 61 de KRAS y HRAS (60). Tumores tiroideos con mutaciones de RAS son más frecuentes en áreas con dietas deficientes en yodo en comparación con dietas ricas en yodo (76). En contraste, los tumores tiroideos inducidos por radiación presentan baja frecuencia de mutaciones en RAS (77). Es conocido que las mutaciones de RAS ocurren más prevalentemente en neoplasias tiroideas con arquitectura folicular que en lesiones con arquitectura de tipo papilar (78). En este sentido, las mutaciones en RAS están presentes en el 20-40% del FTA, en el 40-50% del FTC, en el 10-20% del PTC y en un 60% del ATC (60, 75). Se reportó que todos los tumores pertenecientes a la subclasificación FVPTC poseen mutaciones en RAS (60).

A pesar que RAS es un clásico activador dual de las vías MAPK y PI3/AKT, en la tumorigénesis tiroidea las mutaciones en RAS activan predominantemente la vía de PI3/AKT (18). La alta prevalencia de mutaciones RAS en el FTA, una lesión presuntamente considerada como premaligna, sugiere que la activación de RAS podría servir como un precursor para el FTC y el FVPTC (10). Sin embargo, estudios con ratones transgénicos que expresan condicionalmente KRAS mutado en la glándula tiroides no dan lugar a la transformación maligna del tejido tiroideo, aunque la co-expresión de KRAS mutado y la delección de PTEN induce rápidamente la formación de FTC agresivos, sugiriendo que alteraciones genéticas adicionales son necesarias para la tumorigénesis del FTC (79). Además las mutaciones en RAS son más prevalentes en PDTCs y ATCs en comparación con DTCs. Estos datos sugieren que las mutaciones en RAS estarían implicadas en el fenómeno de progresión tumoral tiroidea (1).

Numerosos estudios han reportado que las mutaciones de RAS se correlacionan con desdiferenciación tumoral y mal pronóstico (80-82). Además, en el FTC y el PTC se demostró

correlación positiva entre mutaciones RAS y el desarrollo de metástasis, especialmente en hueso (81). No obstante, dado que las mutaciones de RAS también se encuentran en lesiones benignas (FTA), estas mutaciones no deberían ser utilizadas universalmente como marcadores de pronóstico para tumores tiroideos (60).

1.2.11. Rearreglos RET/PTC

El protooncogén RET, está situado en el cromosoma 10q11.2 y codifica un receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa intrínseca con cuatro motivos relacionados a caderina en el dominio extracelular. El receptor nativo RET está altamente expresado en células parafoliculares (o células C) y normalmente no se expresa en células foliculares. Mutaciones en RET con ganancia de función están involucradas en MTCs esporádicos y familiares, los que forman parte de la neoplasia endocrina múltiple (MEN) 2A, MEN2B y el MTC familiar (83). Por el contrario, los oncogenes quiméricos, designados RET/PTC, están implicados en el desarrollo del PTC (84). En el rearreglo RET/PTC, la porción que codifica para el dominio tirosina quinasa de RET es fusionada con varios genes no relacionados. RET/PTC carece de péptido señal y de dominio transmembrana por lo que se expresa en el citoplasma de células foliculares, bajo el control de promotores adquiridos. La dimerización constitutiva de la proteína de fusión da fosforilación de tirosinas independiente de ligando y clásicamente estas oncoproteínas activan las vías de señalización MAPK y PI3K/AKT (1, 18). Se reportaron once tipos de rearreglos de RET/PTC (85). Las fusiones más comúnmente encontradas en el cáncer de tiroides son, RET/PTC1 que se forma por la fusión del gen de CCDC6 (H4) y RET/PTC3 por fusión con el gen NCOA4 (ELE1) (1).

Los rearreglos RET/PTC pueden ocurrir en el FTA benigno, en la subclasificación VFPTC, y en mayor prevalencia en el subtipo CPTC. Se reportaron rearreglos clonales de RET/PTC en el 10-20% del PTC esporádico del adulto. Además, RET/PTC ocurre con alta incidencia en pacientes con PTC producidos por exposición a radiación tanto en niños (50-80%) como en adultos jóvenes (40-70%). RET/PTC1 es la fusión más común y comprende el 60-70% de todos los casos positivos con este tipo de oncogén quimérico, mientras que RET/PTC3 ocurre en el 20-30% (60). La alta incidencia de los rearreglos RET/PTC en PTCs de niños después del accidente de Chernobyl indica un posible rol de la radiación en la génesis de estas traslocaciones génicas (23).

La expresión de RET/PTC1 o RET/PTC3 dirigida a tiroides en ratones transgénicos induce la formación de PTC con características histológicas similares al PTC humano (86, 87) y sólo la expresión condicional de RET/PTC3 da fenotipo metastásico (87). Estos resultados indican que estos oncogenes quiméricos podrían ser iniciadores tumorales del cáncer de tiroides y además evidencian un potencial más agresivo de tumores que albergan a RET/PTC3 (86). En adición, se reportó alta frecuencia de rearreglos RET/PTC en microcarcinomas subclínicos (77%), indicando que RET/PTC podría ser un evento temprano en la carcinogénesis tiroidea (88). Por otro lado, se reportó gran heterogeneidad de rearreglos RET/PTC en algunos PTCs, indicando que RET/PTC podría ser un evento relativamente tardío (68). Sin embargo, otra interpretación alternativa de este hallazgo es que distintos y múltiples reordenamientos podrían participar en la transformación maligna multifocal a partir de lesiones benignas (68).

La correlación entre los reordenamientos RET/PTC y el pronóstico del PTC sigue siendo poco clara. La baja prevalencia de expresión de RET/PTC1 en el PDTC y el ATC sugiere que este oncogén se asocia con un comportamiento menos agresivo y además podría indicar que RET/PTC1 no tiene un rol importante para la progresión del cáncer tiroideo (89).

No obstante, existen evidencias de que tumores que expresan RET/PTC3 pueden ser propensos a sufrir desdiferenciación y dar un fenotipo metastásico (87, 90).

1.2.12. Señalización y diferenciación del PTC

Los principales oncogenes mutuamente excluyentes promotores del PTC son la mutación BRAF^{V600E}, mutaciones en RAS (KRAS, HRAS y NRAS) y los rearrreglos cromosómicos RET/PTC y NTRK. Es conocido que los tumores que albergan la mutación BRAF^{V600E} no responden a la retroalimentación negativa ejercida por ERK fosforilado (pERK) sobre dímeros de RAF nativo, dando como resultado una robusta y sostenida activación de la señalización de MAPK (Figura 5). Por el contrario, tumores impulsados por mutaciones en RAS y principalmente fusiones NTRK responden a la realimentación que ejerce pERK sobre dímeros de RAF, con lo cual se produce una activación menor de la señalización de MAPK; además estos tumores activan marcadamente la señalización de PI3K/AKT (Figura 5). Se sugirió que la activación diferencial de estas vías de señalización podría ser la responsable de profundas diferencias fenotípicas de la clasificación del PTC (91) (Figura 5).

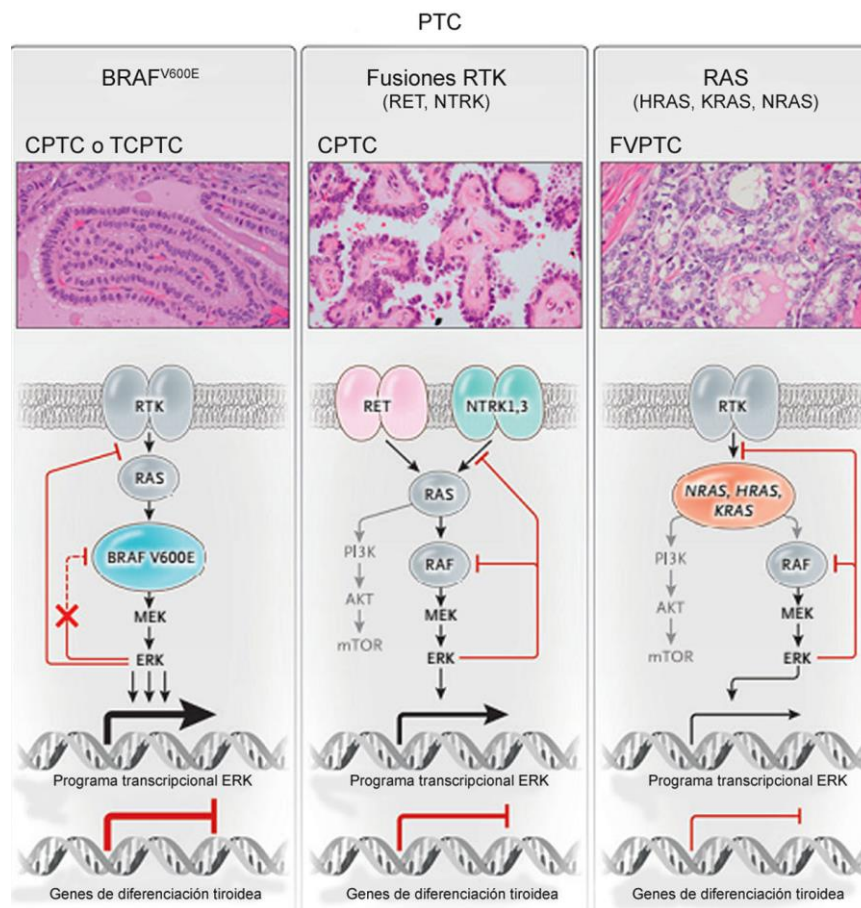


Figura 5. Consecuencia funcional de mutaciones promotoras de PTC. En el panel superior se muestran imágenes representativas de cortes histológicos de PTCs coloreados con hematoxilina eosina. Se indican los oncogenes más prevalentes de las diferentes variantes histológicas de PTC. CPTC: PTC convencional o clásico; TCPTC: PTC de células altas; FVPTC: variante folicular de PTC. En el panel inferior, las mutaciones en BRAF y RAS y los rearrreglos de RTKs activan la vía de señalización de MAPKs pero en diferentes grados. La vía de señalización de MAPKs está marcadamente activada en PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E}, porque esta oncoproteína señala como monómero y no responde al efecto de retroalimentación negativa ejercido por pERK. Por el contrario, el flujo de la señalización de MAPKs a través de rearrreglos de RTKs o mutaciones RAS es atenuado por la

retroalimentación negativa ejercida por pERK sobre monómeros RAF. La activación de la vía de señalización PI3K/AKT inducida por rearrreglos de RTKs o mutaciones RAS no sufre efectos de retroalimentación negativa. La expresión de los genes necesarios para la captación y el metabolismo de yodo (que son genes característicos del estado diferenciado tiroideo) son inhibidos en gran proporción por la señalización de MAPKs; lo cual explicaría, al menos en parte, el menor grado de diferenciación de PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E} respecto a PTCs portadores de mutaciones en RAS o rearrreglos de RTKs. Representación esquemática adaptada de Fahiminiya *et al.* 2016 (92).

Mediante el proyecto Atlas Del Genoma del Cáncer (TCGA, por sus siglas en inglés), que ofrece el secuenciamiento del exoma de 496 PTCs, se desarrolló un *score* BRAF^{V600E}-RAS para cuantificar el alcance de los perfiles de expresión génica en el PTC (18). El *score* BRAF^{V600E}-RAS demostró que existe una marcada diferencia en el patrón de expresión génica entre tumores que albergan la mutación BRAF^{V600E} y tumores con mutaciones de RAS, proponiéndose así la denominación de tumores con “comportamiento BRAF^{V600E}” o tumores con “comportamiento RAS” para el PTC humano (18) (Figura 6). La distinción morfológica entre la variante CPTC y la variante FVPTC se validó a nivel molecular por la investigación realizada en el TCGA. Así, los PTCs con arquitectura folicular -FVPTC- fueron clasificados con “comportamiento RAS”. Además, basándose en la expresión de un número de genes tiroideos, los autores desarrollaron un *score* de diferenciación que permitió evidenciar que los FVPTCs tienen un perfil de expresión génica similar a la tiroides normal, mientras que los CPTCs muestran menor evidencia de diferenciación tiroidea con niveles bajos de expresión de genes en el *score* de diferenciación. Los PTCs del grupo con “comportamiento RAS” representan una sola entidad; por el contrario, los PTCs con “comportamiento BRAF^{V600E}” parecen representar un grupo heterogéneo compuesto por un subconjunto de tumores bien diferenciados y un subconjunto de tumores con menor diferenciación que además poseen mutaciones activantes en el promotor de TERT (18, 93). Así, a nivel oncogénico todas las mutaciones BRAF distintas de BRAF^{V600E} exhibieron “comportamiento RAS”, incluyendo a BRAF^{K601E} e inserciones y deleciones alrededor del codón 600 de BRAF. Esta observación fue consistente con la incrementada frecuencia de BRAF^{K601E} en el subtipo FVPTC con arquitectura folicular. Todos los rearrreglos cromosómicos de BRAF exhibieron “comportamiento BRAF^{V600E}”. Casi todas las fusiones RET/PTC tuvieron “comportamiento BRAF^{V600E}” y las fusiones de NTRK fueron en gran medida neutrales mostrando tanto “comportamiento BRAF^{V600E}” como “comportamiento RAS”.

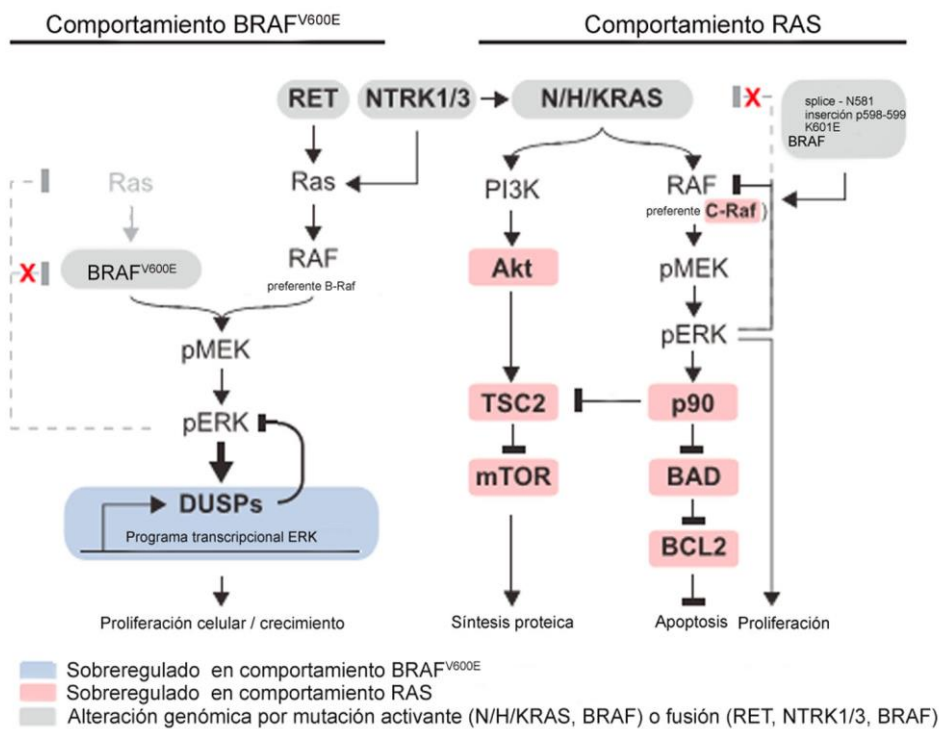


Figura 6. Modelo esquemático de la señalización de PTC con "comportamiento BRAF^{V600E}" o con "comportamiento RAS". Las vías de señalización MAPK y PI3K/AKT son diferencialmente activadas en el PTC con "comportamiento BRAF^{V600E}" y con "comportamiento RAS". Por un lado, los tumores con "comportamiento BRAF^{V600E}" dan fuerte activación de la señalización de MAPK ya que BRAF^{V600E} es activo como monómero e insensible a la retroalimentación negativa ejercida por pERK. Estos comprenden a PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E} y la mayoría de los rearrreglos cromosomales RET/PTC. Por otro lado, los tumores con "comportamiento RAS" dan fuerte activación de la señalización de PI3K/AKT y moderada activación de MAPK ya que los dímeros de CRAF y BRAF nativo son susceptibles a la retroalimentación ejercida por pERK, este grupo comprende los PTCs que albergan mutaciones en RAS (N/H/KRAS), mutaciones de BRAF diferentes a la mutación BRAF^{V600E} (principalmente BRAF^{K601E}) y diferentes inserciones y deleciones en BRAF. Los PTCs que albergan rearrreglos NTRK presentan tanto "comportamiento BRAF^{V600E}" como "comportamiento RAS". Representación esquemática adaptada de *The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network, 2014* (18).

La patogénesis de los tumores tiroideos es relativamente sencilla en comparación con la patogénesis de otros tipos de cánceres. Particularmente, el PTC tiene una de las densidades mutacionales más bajas de los cánceres estudiados mediante el secuenciamiento del exoma completo a través de la tecnología NGS (92). Como se mencionó anteriormente la gran mayoría de los tumores tiroideos derivados de la célula folicular resultan de alteraciones genéticas somáticas que originan oncogenes o genes supresores tumorales (1). Sin embargo, las vías de señalización que favorecen tanto el inicio como la progresión de estos tumores aún no están completamente esclarecidas y continúan bajo investigación. Gran cantidad de evidencia indica una asociación entre la sobre-activación de la señalización de receptores tipo toll (TLRs) y la progresión de diversos tipos de tumores (94). En este sentido, en el presente trabajo de tesis doctoral abordaremos el estudio de la expresión y funcionalidad del receptor TLR4 como así también su potencial rol durante la carcinogénesis y la progresión tumoral tiroidea.

1.3. RECEPTORES TIPO TOLL

La inflamación es la respuesta que genera el organismo para eliminar estímulos perjudiciales, así como un proceso para reparar y proteger al tejido del daño (95). La inflamación es causada por diversos factores como infecciones microbianas, injurias tisulares y el infarto de tejidos. Normalmente la respuesta inflamatoria debe estar estrechamente regulada para finalizar rápidamente luego que el daño tisular ha sido reparado. Sin embargo, la sobreproducción de citoquinas por parte de las células inmunes y no inmunes en infecciones con ciertos patógenos puede ser fatal (96).

El sistema inmune en mamíferos tiene dos componentes clásicamente diferenciados que cooperan para proteger al huésped contra infecciones microbianas, la inmunidad innata y la inmunidad adquirida o adaptativa. En particular, el sistema inmune innato está conformado por distintos módulos funcionales que han evolucionado en el desarrollo de diferentes formas de protección contra patógenos y constituye la primera línea de defensa frente a microorganismos invasores (97). El sistema inmune innato es el principal contribuyente en la respuesta inflamatoria aguda inducida por infección microbiana o por daño tisular. Además, la inmunidad innata es importante para la activación de la inmunidad adquirida. A pesar que las células del sistema inmune innato, incluyendo macrófagos y células dendríticas (DC), juegan un importante papel en la respuesta inflamatoria, se propuso que células no inmunes tales como células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos también participarían en el proceso inflamatorio (96). La presencia de microorganismos es detectada por una familia de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), capaces de reconocer estructuras conservadas entre las especies microbianas, llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los PRRs son también responsables de reconocer moléculas endógenas liberadas de células dañadas, denominadas patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) (98). En la actualidad, se identificaron cinco clases de PRRs en mamíferos incluyendo proteínas transmembrana denominadas receptores tipo toll (TLRs) y receptores de lectina tipo C (CLRs), proteínas citoplasmáticas como los receptores similares al gen inducible por ácido retinoico (RLRs), el receptor similar a AIM2 (ALRs) y receptores similares a NOD (NLRs). Cabe destacar que los PRRs se expresan no sólo en células inmunes sino también en células no inmunes (96, 99).

Los TLRs fueron descubiertos inicialmente en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* como moduladores de la polarización dorsoventral durante el desarrollo embrionario, aunque posteriormente se los reconoció como eslabones fundamentales en la inmunidad innata de la mosca contra infecciones bacterianas y micóticas (100, 101). La familia TLRs está bien caracterizada y es responsable de detectar patógenos invasores presentes en el exterior celular, en endosomas intracelulares y en lisosomas (102). Los TLRs se caracterizan por tener repeticiones ricas en leucina en sus extremos N-terminales, un dominio transmembrana y un dominio intracitoplasmático homólogo al receptor de IL-1 en la región C-terminal (103). Hasta la fecha se identificaron 10 TLRs funcionales en humanos y 12 TLRs en ratones (96, 99). Gran cantidad de evidencia indica que los TLRs tienen un importante papel en la reparación de tejidos y en la inflamación inducida por lesiones tisulares. Los ligandos de TLRs pueden ser componentes microbianos (ligandos exógenos) o moléculas derivadas del propio huésped (ligandos endógenos) (94).

Los TLRs se localizan en la superficie celular o en compartimentos intracelulares tales como el retículo endoplásmico (ER), endosomas, lisosomas o endolisosomas. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10 están presentes en la membrana plasmática, mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se encuentran principalmente en la membrana de diferentes compartimentos intracelulares. La localización de estos receptores parece estar en estrecha

relación con el tipo de ligando que son capaces de reconocer y además es crítica para prevenir el contacto y el reconocimiento de moléculas propias que podrían causar autoinmunidad. TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen ácidos nucleicos derivados de virus y bacterias, así como ácidos nucleicos endógenos en contextos patógenos. Al respecto, TLR3 reconoce ARN de doble cadena (dcARN) viral y ARN de interferencia (siARN) derivados de células dañadas, TLR7 y TLR8 reconocen ARN de simple cadena (scARN) de virus y bacterias, mientras que TLR9 reconoce ADN viral rico en motivos CpG-DNA no metilados. Mientras que TLR10 en ratones es un pseudogen no funcional debido a la inserción de un codón stop, en humanos este receptor si es funcional. Hasta hace un tiempo, no se conocían ligandos para TLR10, pero recientemente se reportó que este receptor colabora con TLR2 en reconocer ligandos de la *Listeria* y además es capaz de sensar el virus Influenza A. TLR2 forma heterodímeros con TLR1 y TLR6 para dar los complejos TLR1/TLR2 y TLR6/TLR2, respectivamente. Los complejos de TLR2 reconocen una amplia variedad de PAMPs incluyendo lipoproteínas, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, zimosan, manano y tGPI-mucina. TLR5 reconoce flagelina de bacterias. Por su parte, el TLR4 es el miembro de la familia de TLRs mejor caracterizado dada su capacidad de reconocer la endotoxina bacteriana lipopolisacárido (LPS) y además una gran variedad de moléculas endógenas (99, 104).

Los TLRs reclutan diferencialmente miembros de adaptores conteniendo dominios TIR como TIRAP/MAL, MyD88, TRAM y TRIF. Todos los TLRs, a excepción de TLR3, son capaces de activar la vía “dependiente de MyD88” para señalar a través de NF- κ B y MAPKs e inducir genes que codifican a citoquinas pro-inflamatorias. La proteína TIRAP/MAL recluta MyD88 a través de los dominios TIR de los TLRs que se encuentran tanto en la superficie celular como en endosomas, mientras que TRIF es únicamente reclutado por TLR3 y TLR4 para promover una vía de señalización alternativa “independiente de MyD88” o denominada “dependiente de TRIF” para activar IRF3, NF- κ B y MAPKs e inducir la producción de interferón tipo I (INF-I) y citoquinas pro-inflamatorias. TRAM es selectivamente reclutado por TLR4, pero no por TLR3. Es conocido que TLR3 sólo es capaz de unirse a TRIF luego de su fosforilación en dos residuos tirosinas del dominio citoplasmático mediante la participación de dos tirosinas quinasas, EGFR y Btk como se menciona más adelante (30, 99) .

1.3.1. El receptor TLR4

El TLR4 fue el primer homólogo a la proteína Toll de *Drosophila* en ser descubierto en mamíferos (101). TLR4 presenta un dominio extracelular de 608 aminoácidos, un único dominio transmembrana y un dominio intracelular de 187 aminoácidos. Aunque clásicamente se describe una localización y función de TLR4 en el reconocimiento de LPS en la membrana plasmática, se demostró que este receptor puede residir en el aparato de Golgi siendo completamente funcional en diferentes tipos de células con diferenciación epitelial, como células intestinales, endoteliales, pulmonares o prostáticas (105). Aunque el reconocimiento de la endotoxina puede ocurrir efectivamente en el aparato de Golgi se requiere previamente la internalización de LPS (106). Además se describió que TLR4 puede estar localizado en la membrana de vesículas endocíticas, posiblemente por su internalización luego de su activación (107).

Se describió que ratones C3H/HeJ toleran dosis letales de LPS y poseen respuestas inflamatorias alteradas, debido a que tienen una mutación inactivante en la región conservada del dominio intracelular de TLR4. Además, ratones mutantes C57BL/10ScCr que

son homocigotas para una mutación en TLR4 con pérdida de función también toleran altas dosis de LPS(108).

La proteína MD-2, que carece de regiones transmembrana e intracelular, se asocia con el dominio extracelular de TLR4 para formar el complejo TLR4/MD-2, el cual es necesario para el reconocimiento a LPS (Figura 9). La asociación física de TLR4 con MD-2 en la superficie celular es un requisito previo para la activación inducida por el ligando (109). El proceso de reconocimiento a LPS comienza con su interacción con el complejo TLR4/MD-2 y culmina con la señal de activación transmitida por TLR4. Recientemente se resolvió la estructura del complejo TLR4/MD-2 por cristalografía proponiéndose tres mecanismos diferentes para el reconocimiento de LPS. Se sugirió que el reconocimiento de LPS puede ser llevado a cabo por monómeros del complejo TLR4/MD-2 con su posterior dimerización o directamente LPS podría ser reconocido a través de dímeros de complejos TLR4/MD-2 preformados con dos posibles conformaciones estructurales (110). Luego del reconocimiento del ligando el dímero de complejos TLR4/MD-2 adquiere una conformación adecuada para el reclutamiento de moléculas adaptadoras intracelulares capaces de activar dos diferentes vías de señalización. TLR4 es el único miembro conocido de la familia de TLRs capaz de activar tanto la vía “dependiente de MyD88” como la vía “independiente de MyD88” (111). Estudios en macrófagos deficientes de MyD88, demostraron que la vía “dependiente de MyD88” es responsable principalmente de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, mientras que la vía “independiente de MyD88” media principalmente la síntesis de interferones tipo I y en consecuencia la estimulación de genes inducibles por interferón (111).

1.3.2. La vía dependiente de MyD88

Luego de la activación de TLR4 por unión al ligando, la proteína TIRAP conecta el dominio TIR en la región C-terminal de TLR4 con el dominio TIR presente en MyD88. MyD88 induce el reclutamiento de miembros de la familia de quinasas IRAK formando un complejo comúnmente referido como Mydosoma (Figura 7). Durante la formación del Mydosoma, IRAK4 fosforila y activa a IRAK1, que luego es autofosforilado en varios sitios y se libera de MyD88. IRAK1 se asocia con el dominio RING-E3 ubiquitina ligasa de TRAF6. TRAF6 ubiquitinado junto con las enzimas UBC13 y UEV1A conjugadas promueve la poliubiquitinación tanto del propio TRAF6 como del complejo de la proteína quinasa TAK1. TAK1 es miembro de la familia de MAPKKK y forma un complejo con las subunidades regulatorias TAB1, TAB2 y TAB3, que interaccionan con las cadenas poliubiquitinadas generadas por TRAF6 para dirigir la activación de TAK1. Luego TAK1 activa dos vías de señalización diferentes que lideran la activación de los inhibidores de I κ B (IKKs), denominados como complejo IKK y la vía de MAPKs. El complejo IKK está compuesto por las subunidades IKK α , IKK β y NEMO (también llamada IKKY). TAK1 se une al complejo IKK a través de sus cadenas de ubiquitina y fosforila a IKK β . El complejo IKK activo fosforila a la proteína inhibitoria de NF- κ B, I κ B- α , que luego sufre degradación proteosómica, permitiendo que las subunidades de NF- κ B trasloquen al núcleo para inducir la expresión de genes pro-inflamatorios. La activación de TAK1 también resulta en la activación de miembros de la familia de MAPK, como ERK1/2, p38 y JNK; esta última media la activación de miembros de la familia de factores de transcripción de la proteína activadora 1 (AP-1) para regular la respuesta pro-inflamatoria (99, 111, 112) (Figura 7).

1.3.3. La vía independiente de MyD88

Luego de la activación de TLR4 por unión al ligando, la proteína TRAM conecta el dominio TIR en la región C-terminal de TLR4 con el dominio TIR presente en el adaptador TRIF. TRIF interacciona con TRAF6 y TRAF3. TRAF6 recluta la quinasa RIP-1, que a su vez interacciona y activa al complejo TAK1, conduciendo a la activación de NF- κ B y MAPKs que median la inducción de citoquinas pro-inflamatorias. En contraste, TRAF3 recluta a las quinasas, TBK1 e IKKi junto con NEMO para fosforilar a IRF3. Subsecuentemente, IRF3 forma un dímero para traslocar al núcleo e inducir la expresión de genes INF tipo I (99) (Figura 7). Cabe destacar que si bien la vía “independiente de MyD88” es un proceso capaz de activar la señalización de NF- κ B se describió que la cinética de este proceso es más lenta que la de la activación “dependiente de MyD88” (111, 112).

En resumen, la activación de las cascadas de señalización de TLR4 conduce a la fosforilación y activación de diferentes factores de transcripción capaces de generar modificaciones en el patrón de expresión génica. Entre los principales factores de transcripción involucrados se encuentra AP-1, IRF3 y NF- κ B (111, 112) (Figura 7).

1.3.4. Reguladores negativos de la señalización de TLR4

La señalización dependiente e independiente de MyD88 es regulada negativamente por un gran número de moléculas a través de varios mecanismos, previniendo o finalizando así la respuesta que de lo contrario tendría consecuencias desfavorables relacionadas a la inmunidad exacerbada y enfermedades inflamatorias. La activación de la vía “dependiente de MyD88” es suprimida por ST2825, SOCS1, y Cbl-b; mientras que la activación de la vía “dependiente de TRIF” es suprimida por SARM y TAG. Tales moléculas se asocian con MyD88 o TRIF, respectivamente, evitando su unión a moléculas corriente abajo de la señalización de TLR4. Se sabe que la activación de TRAF3 es regulada negativamente por SOCS3 y DUBA, mientras que TRAF6 es blanco de un gran número de moléculas inhibitorias tales como A20, USP4, CYLD, TANK, TRIM38 y SHP-1. La activación de TAK1 es inhibida por TRIM30 α y A20. La activación del factor de transcripción NF- κ B es suprimida por Bcl-3, I κ BNS, Nurr1, ATF3 y PDLIM2, y la activación de IRF3 está regulada negativamente por Pen1 y RAUL (Figura 7). Por otra parte, la estabilidad del ARNm que codifica moléculas involucradas en estas vías de señalización está regulada por numerosos micro ARNs (miRNAs) (99).

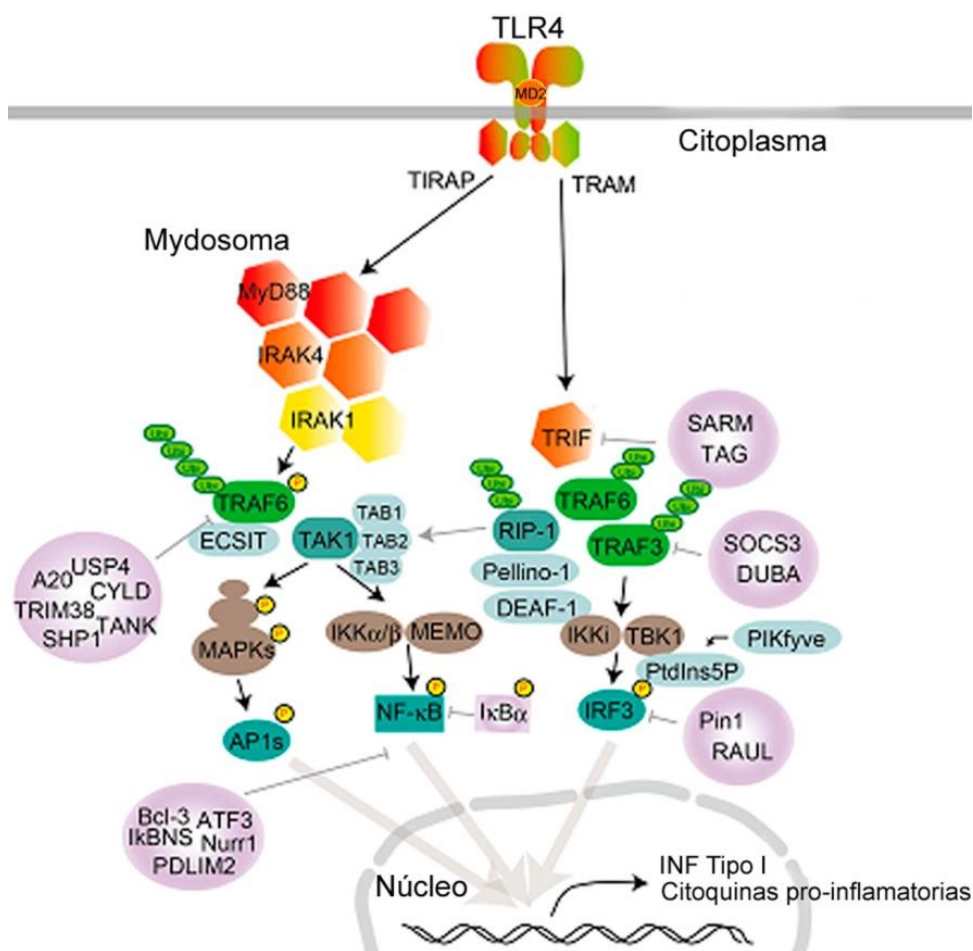


Figura 7. Señalización de TLR4. La activación de TLR4 gatilla la homodimerización del complejo TLR4/MD-2 e inicia la señalización corriente abajo a través de dos proteínas adaptadoras, MyD88 y TRIF. TIRAP conduce la señal desde TLR4 hacia MyD88 y TRAM media la señal desde TLR4 hacia TRIF. En la vía “dependiente de MyD88”, la activación de TLR4 induce la formación del Mydosoma, que contiene MyD88 y las quinasas IRAKs. La activación de IRAK1 induce la activación de TRAF6 a través de su poliubiquitinación. TAK1 conduce a la activación de MAPKs y del complejo IKK. La activación de MAPKs estimula al factor de transcripción AP-1, mientras que la activación de IKK induce la fosforilación de I κ B- α produciendo la liberación y activación del factor de transcripción NF- κ B. En la vía “independiente de MyD88” o “dependiente de TRIF”, la activación de TLR4 induce la activación de TRIF. TRIF activa y recluta TRAF6 y TRAF3. TRAF6 recluta RIP-1, que activa al complejo TAK1 para la activación de MAPK y NF- κ B. Además, la activación de RIP-1 regula la ubiquitinación de Pellino-1, el cual regula la activación de IRF3 por la unión a DEAF-1. TRAF3 recluta TBK1 e IKKi para la fosforilación de IRF3. La activación de PtdIns5P por PIKfyve facilita la formación del complejo entre TBK1 e IRF3. Además, varios reguladores negativos modulan la señalización de TLR4, inhibiendo la formación de complejos y la ubiquitinación. MyD88 es suprimido por ST2825, NRDP-1, SOCS1 y Cbl-b; TRIF es suprimido por SARM y TAG; TRAF3 es suprimido por SOCS3 y DUBA; TRAF6 es suprimido por A20, USP4, CYLD, TANK, TRIM38 y SHP. La actividad de NF- κ B es suprimida por Bcl-3, I κ BNS, Nurr1, ATF3 y PDLIM2, mientras que IRF3 es negativamente regulado por Pin1 y RAUL. Representación esquemática adaptada de *Kawasaki et al. 2014* (99)

1.3.5. Regulación de la función del factor de transcripción NF- κ B

El factor de transcripción NF- κ B fue identificado hace 30 años (113) como un factor de transcripción capaz de unirse a la región potenciadora presente en el intrón del gen de la

cadena liviana kappa de inmunoglobulinas en células de linaje B, dando origen a su nombre (114).

Los miembros de la familia de NF- κ B son factores de transcripción de expresión ubicua estructuralmente relacionados y desempeñan un rol esencial en diferentes procesos fisiológicos, mediando la respuesta inflamatoria, desarrollo, diferenciación celular, proliferación y apoptosis (115). En mamíferos, la familia NF- κ B consta de cinco miembros ampliamente caracterizados: p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), RelA (p65), RelB y c-Rel que comparte homología N-terminal con el oncogén v-Rel (113). Los factores de transcripción de la familia de NF- κ B reconocen la secuencia consenso palindrómica 5'- GGGRNWYYCC -3' (N: cualquier base, R: purina, W: adenina o timina, Y: pirimidina) en el ADN, denominada " κ B", que se encuentra en promotores de genes blancos para la señalización de NF- κ B (113). Los miembros de la familia Rel ejercen su mecanismo de acción mediante la formación de homodímeros (con la excepción de RelB) o heterodímeros. El complejo activo más prevalente y mejor caracterizado en diferentes sistemas celulares es el heterodímero conformado por p65 y p50, siendo p65 el principal efector y la subunidad de la familia Rel más estudiada de la vía de señalización de NF- κ B (116). Estudios realizados en macrófagos deficientes de p65 han demostrado la importancia de esta subunidad en relación a la respuesta pro-inflamatoria contra agentes patógenos, observándose un severo déficit en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a la estimulación inducida por LPS e INF- γ (117).

Las distintas subunidades de la familia NF- κ B comparten una región conservada evolutivamente en la región N-terminal de 300 aminoácidos denominado dominio de homología Rel (RHD), el cual presenta tres funciones: reconocimiento y unión a secuencias específicas del ADN, dimerización y unión a proteínas inhibitorias (Figura 8) (113, 118). El RHD contiene dos subdominios con plegamiento barril-beta similar al plegamiento de las inmunoglobulinas. El subdominio N-terminal reconoce específicamente el ADN y se asemeja al dominio de unión al ADN de p53. El subdominio C-terminal tiene residuos hidrofóbicos que forman interfaces inhibitorias para la unión a proteínas. Los dominios se unen en una bisagra que se adhiere a ambos lados del sitio κ B afín a través de la ranura mayor del ADN. Luego del dominio RHD existe una secuencia de localización nuclear (NLS). Las cinco proteínas de la familia Rel se clasifican en dos clases. En primer lugar, p50 y p52 provienen de proteínas precursoras, p105 (NF- κ B1) y p100 (NF- κ B2), respectivamente; estos factores de transcripción poseen en la región C-terminal repeticiones de Ankirina (AnkR) que son escindidas post-transcripcionalmente. En segundo lugar, RelA, RelB y c-Rel son sintetizados como proteínas maduras con dominios de transactivación (TAD) en sus regiones C-terminales. Los heterodímeros que contienen TAD son activadores transcripcionales, mientras que p50 y p52 cuando se encuentran como homodímeros actúan como represores; alternativamente estos factores pueden asociarse con los miembros que contienen un dominio TAD u otra proteína capaz de reclutar co-activadores funcionando así como activadores transcripcionales. Dado que las distintas combinaciones de dímeros pueden reconocer diferentes variantes de sitios κ B con diferentes afinidades, se pueden generar diversos patrones de regulación de genes a partir de esta familia de factores de transcripción (113, 118).

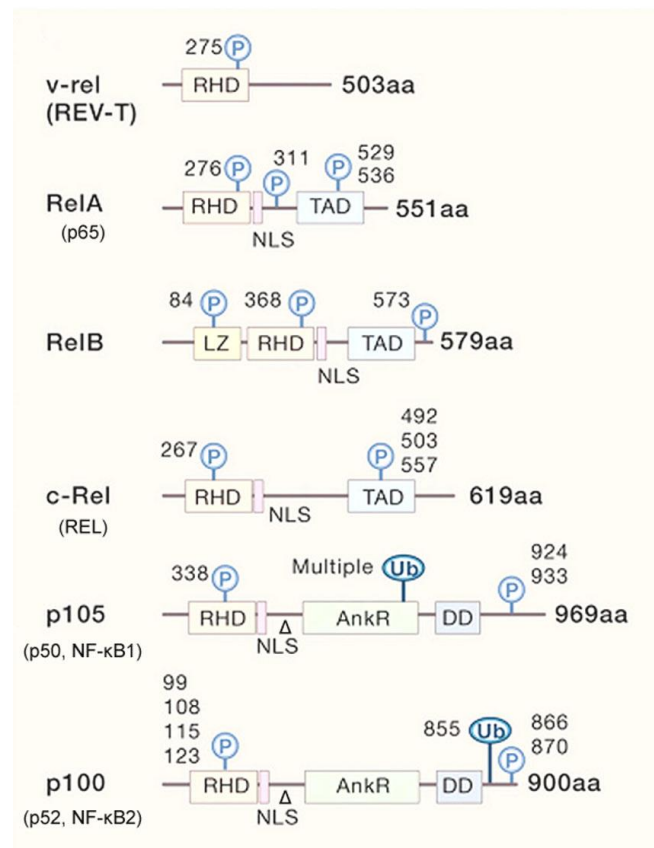


Figura 8. Familia de factores de transcripción NF-κB. Representación esquemática de los miembros de la familia NF-κB, indicando los diferentes dominios en su estructura. La Nomenclatura alternativa se indica entre paréntesis. RDH, dominio de homología Rel. NLS, secuencia de localización nuclear. Se indica el sitio de procesamiento de los precursores p100 y p105 dando origen a la formación de p50 y p52, respectivamente (Δ). TAD, dominio de transactivación. p105 y p100 tienen cinco o siete repeticiones en tándem de ankirina. (AnkR). DD, dominio de muerte (*death domain*). LZ, cierre de leucina. Se muestran sitios de regulación de la fosforilación (P) y de ubiquitinación (Ub). Esquema adaptado de *Zhang 2017* (113).

En células no estimuladas, NF-κB reside latente e inactivo en el citoplasma debido a la unión de un conjunto de proteínas inhibitoras que comprenden la familia de inhibidores de κB (IκB). Esta familia de proteínas se compone de tres grupos funcionales: las proteínas IκB-α, IκB-β e IκB-ε, las porciones C-terminales de las proteínas precursoras p100 (IκBδ) y p105 (IκBγ) y las proteínas IκB atípicas (IκB-ζ, IκBNS o NF-κBδ y Bcl-3). Las IκBs se caracterizan por contener cinco o siete dominios de AnkR en el extremo C-terminal. Las AnkRs forman un motivo de 33 aminoácidos que constituyen asociaciones proteína-proteína que se extienden como hélices capaces de unirse a NF-κB cubriendo el NLS fundamental para el tráfico de NF-κB entre el citoplasma y el núcleo. La región C-terminal de p100 y p105 que contiene las AnkRs de las regiones similares a IκB experimentan una proteólisis limitada para formar p52 y p50 que luego traslocan al núcleo. El control bioquímico de la localización nuclear vía IκB tiene dos consecuencias estratégicas: 1) proporciona el principal punto de control para la expresión génica inducida por NF-κB. 2) permite que complejos preformados de NF-κB sean liberados instantáneamente al activarse la vía, proporcionando un interruptor molecular rápido para las respuestas a patógenos o estímulos pro-inflamatorios.

En respuesta a un estímulo sentido por TLR4, se puede activar la vía de señalización tanto dependiente como independiente de MyD88 desencadenando modificaciones post-traduccionales particularmente con fosforilación y ubiquitinación de los IKKs. El complejo

regulador IKK luego puede direccionar la activación de la señalización a través de la “vía clásica o canónica” o a través de la “vía alternativa o no-canónica”.

Para la “vía clásica”, el complejo IKK que tiene actividad serina/treonina quinasa activa fosforilando específicamente proteínas I κ B para conducir su posterior degradación. Esto hace que los dímeros de NF- κ B activamente transiten hacia el núcleo para inducir la expresión génica. La haloenzima citosólica IKK contiene una subunidad reguladora llamada "modificador esencial de NF- κ B" (NEMO, también llamado IKKY/Fip-3 /IKKAP), y dos subunidades de quinasa, IKK α e IKK β (también conocidas como IKK-1 e IKK-2). NEMO es una subunidad no catalítica que fija IKK α e IKK β en un halocomplejo regulador y se requiere para reacciones de ubiquitinación que generan oligomerización de proteínas y señalización (113, 119, 120) (Figura 9).

Recientemente se describieron varias vías alternativas para la activación de la señalización de NF- κ B (121). Mientras que la “vía clásica” responde rápidamente luego de estímulos pro-inflamatorios, generalmente las vías alternativas tienen una cinética más lenta pero más sostenida en el tiempo. La “vía alternativa” más conocida involucra la activación de la quinasa inductora de NF- κ B (NIK) que fosforila complejos de IKK α conduciendo el procesamiento de la subunidad p100 y la posterior translocación hacia el núcleo de dímeros RelB/p52. A pesar de la similitud estructural entre IKK α e IKK β , IKK β es la quinasa dominante en la activación de la “vía clásica” de NF- κ B, fosforilando I κ Bs, mientras que IKK α tiene un rol parcialmente redundante en la inducción de la “vía clásica” y se asocia a la activación de la “vía alternativa” que conduce a la producción de dímeros de p52 (113, 119, 120) (Figura 9).

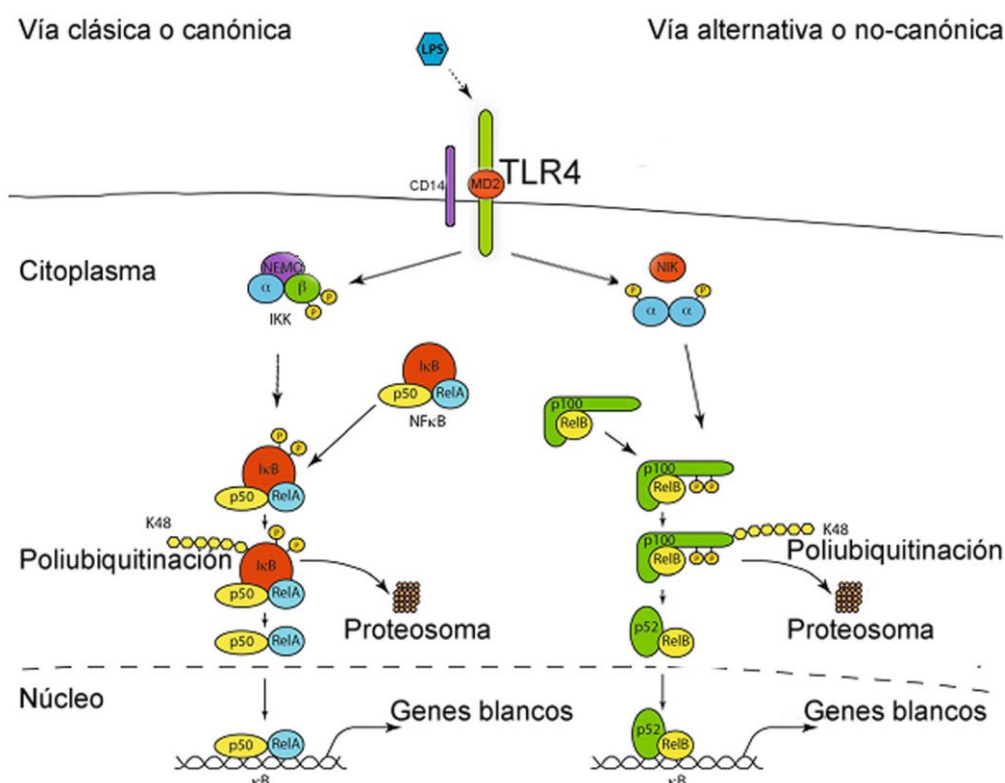


Figura 9. Vías de transducción de señales de NF- κ B. En la “vía clásica o canónica”, los dímeros p50/RelA son retenidos en el citoplasma por la interacción con una molécula I κ B. La unión de un ligando a TLR4 recluta adaptadores al dominio citoplasmático del mismo y las moléculas adaptadoras reclutan a su vez un complejo IKK que se activa en el proceso. El complejo IKK activo fosforila a I κ B, que luego de su poliubiquitinación es degradado en el proteosoma, liberando a NF- κ B

para su translocación hacia el núcleo donde ejerce sus efectos sobre genes blancos. La “vía alternativa o no-canónica” más conocida origina principalmente la activación de los complejos p100/RelB. En esta vía, la unión del receptor a su ligando conduce la activación de una quinasa inductora de NF- κ B (NIK), la cual activa un complejo IKK que sólo contiene subunidades IKK α . Este complejo fosforila a la subunidad p100, desencadenando su degradación parcial y la liberación del complejo p52/RelB, el cual trasloca al núcleo para ejercer sus efectos sobre genes blancos. Esquema adaptado de *Hoesel et al. 2013 (122)*.

1.4. TLRs Y CÁNCER

La inflamación es una respuesta adaptativa desencadenada por una variedad de condiciones, incluyendo infecciones y lesiones, así como sutiles alteraciones en la homeostasis de los tejidos. La presencia de leucocitos dentro de los tumores fue observada en 1863 por Rudolf Virchow, quién propuso por primera vez un posible vínculo entre la inflamación y el cáncer (123). En la actualidad, el rol de la inflamación en la tumorigénesis está generalmente bien aceptado. Sólo una minoría de todos los cánceres (5-10%) son causados por mutaciones germinales, mientras que la gran mayoría (90-95%) están vinculados a mutaciones somáticas y factores ambientales. En general las causas del desarrollo del cáncer por factores ambientales están asociadas de alguna manera a un proceso inflamatorio crónico (30, 31). El 18% de los cánceres en humanos son atribuibles a procesos inflamatorios en respuesta a diferentes infecciones (124). La obesidad puede contribuir a un estado hiperinflamatorio general, siendo el 14-20% de los cánceres atribuido a esta condición (30). Además, la injuria tisular a través de diferentes agentes cancerígenos ambientales puede desencadenar inflamación local pro-tumorigénica (125).

Los mediadores pro-inflamatorios son secretados no solo por las células hematopoyéticas infiltrantes del tumor (inflamación extrínseca) sino también por células epiteliales, estromales y endoteliales (inflamación intrínseca). La inflamación intrínseca inducida por el propio cáncer está presente en todos los tumores, incluso en aquellos que no se originan de un tejido inflamado (31, 126). Numerosos trabajos demostraron que la proteína adaptadora MyD88 contribuye a la carcinogénesis en distintos modelos de cáncer, incluyendo el cáncer de piel, hígado, páncreas y colon, actuando corriente abajo de la familia de TLRs o de IL-1R (126). En contraposición, MyD88 tiene un rol protector en la carcinogénesis producida por virus oncogénicos y en la carcinogénesis de colon inducida por dextrano sulfato de sodio (DSS) (126).

Las respuestas a procesos inflamatorios tienen un rol dual. Por un lado pueden proporcionar señales pro-tumorigénicas, y por otro también pueden contribuir a la respuesta inmune antitumoral (31, 94, 104). En este sentido, los TLRs también ejercen un papel dual en el cáncer. Se cree que la amplitud y duración de la activación de TLRs pueden tener un impacto crítico en el efecto resultante. La activación crónica y de bajo grado de TLRs generalmente favorece el desarrollo de un estado pro-inflamatorio pro-tumoral, mientras que la activación terapéutica con altas dosis de ligandos para TLRs habitualmente promueve una respuesta antitumoral. Además, la gran cantidad de resultados contradictorios en la literatura indicaría que la función de los TLRs en el cáncer es dependiente del órgano que afecte, del contexto y del tipo de ligando que se exprese (30, 104). Como consecuencia de la estrecha relación entre los TLRs y el cáncer existe un creciente interés en el desarrollo de terapias diseñadas tanto para estimular como para inhibir la función de estos receptores o sus vías intracelulares de señalización (127).

1.4.1. TLRs como reguladores negativos del cáncer

En el siglo XIX, Coley observó que inyecciones repetidas de una mezcla de toxinas bacterianas servía como un eficiente agente terapéutico antitumoral (128). Posteriormente, Shear y Turner describieron que el LPS era la toxina microbiana con propiedad antitumoral del efecto observado por Coley *et al.* (129). La administración de diferentes ligandos purificados para TLRs demostró tener potentes efectos anticancerígenos tanto en ratones como en humanos. La actividad antitumoral de los agonistas de TLRs puede ser mediada por diversos mecanismos. En este sentido, altas dosis de agonistas especialmente de TLR3, TLR7,

TLR5 y TLR9 tienen efectos antitumorales principalmente por conducir a la apoptosis de células tumorales y de células del microambiente tumoral. Además, la activación de TLRs puede causar la regresión tumoral a través de un aumento en la permeabilidad vascular que permite una mejor llegada de agentes quimioterapéuticos como así también un mayor reclutamiento de leucocitos en el tumor y en consecuencia una incrementada muerte de células tumorales por acción de células *natural killer* (NK) y linfocitos T citotóxicos (94, 104).

1.4.2. Los TLRs como mediadores de la tumorigénesis

La activación crónica del sistema inmune y la respuesta tisular a través del reconocimiento de patógenos o ligandos endógenos mediadas por TLRs generaría un microambiente rico en factores de crecimiento y supervivencia que está relacionado con el desarrollo de procesos neoplásicos (31, 130). La función aberrante de TLRs en las células tumorales se asoció a mayor supervivencia y progresión del tumor, evasión del sistema inmune y resistencia a la apoptosis. Por otro lado, ratones deficientes para la señalización de TLRs (ratones MyD88^{-/-}) son más resistentes al desarrollo de algunos tumores inducidos experimentalmente (131). Particularmente, la estimulación crónica y en bajas dosis con ligandos de TLR4 y TLR2 presenta efectos pro-tumorales, principalmente a través de la generación de un ambiente pro-inflamatorio mediado por la activación de la señalización de NF- κ B, que favorece el crecimiento tumoral y previene la apoptosis (94, 104).

1.4.3. TLR4 y Cáncer

Ratones deficientes de TLR4 (ratones TLR4^{-/-}) se encuentran significativamente protegidos contra el desarrollo de cáncer de colon inducido químicamente con DSS, demostrando que la señalización de TLR4 es crítica para la carcinogénesis de colon en la colitis crónica (132). A la inversa, se demostró que ratones transgénicos que sobreexpresan TLR4 constitutivamente en células intestinales a través del promotor de villin, un gen específico de intestino (ratones villin-TLR4) son significativamente más susceptibles al desarrollo de colitis aguda y de neoplasias asociadas a colitis (133). Además, recientes resultados indicaron que la señalización exacerbada de TLR4 en ratones villin-TLR4 afecta la composición de la microbiota y promueve el riesgo de colitis transmisible (134).

Cabe destacar que la expresión funcional de TLR4 se demostró en cáncer humano de mama, próstata, pulmón, ovario y colon (135, 136). La activación de TLR4 en cáncer de pulmón induce la expresión de la citoquina inmunosupresora TGF- β y factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) e interleuquina-8 (IL-8) (137). Estudios realizados en células epiteliales derivadas de cáncer de próstata muestran que la estimulación de TLR4 promueve la secreción de TGF- β y de VEGF dependiente de la activación de NF- κ B (138). Sin embargo, existen discrepancias en relación a la sobrevida de la célula tumoral en respuesta a la activación de TLR4 en distintos modelos celulares. El señalamiento de TLR4 mejora la sobrevida de células de cáncer de ovario (136, 139) y promueve la capacidad invasiva de células de cáncer de colon (140). Por el contrario, estudios en tumores pituitarios demostraron que la activación de TLR4 inhibe el crecimiento tumoral (141).

Aunque TLR4 fue descrito como un gen altamente polimórfico, sólo se asociaron algunos polimorfismos de TLR4 con incrementado riesgo para el desarrollo de ciertas neoplasias derivadas de células epiteliales. Particularmente, el polimorfismo rs4986790 en el gen de TLR4 fue identificado como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico en pacientes infectados con *Helicobacter pylori* (142). Los polimorfismos

rs10116253 y rs1927911 se asociaron con menor riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico (143), mientras que los polimorfismos rs4986790, rs4986791, y rs10759932 parecen estar positivamente asociados al desarrollo de cáncer gástrico (144). Además, el polimorfismo rs11536889 localizado en la región 3' no traducida (3' UTR) del gen de TLR4 se asoció con incrementado riesgo para el desarrollo de cáncer de próstata y de colon (145, 146).

1.4.4. TLRs y Cáncer de tiroides

En relación a la expresión de TLRs en el tejido tiroideo, Harri *et al.* (147) demostraron expresión de TLR3 en células tiroideas normales y su funcionalidad mediante la estimulación con dcARN como agonista del receptor. Dichos autores observaron una marcada sobreexpresión de TLR3 en tirocitos de pacientes con la enfermedad autoinmune de Hashimoto (tiroiditis con infiltrado linfocitario) pero no en muestras de pacientes con la enfermedad autoinmune de Graves (anticuerpos estimulantes del receptor de TSH) (147). Posteriormente, McCall *et al.* (148) evidenciaron incrementada expresión de TLR3 en tejidos de PTC en comparación con el tejido tiroideo normal, el FTC o el ATC. Además, el tratamiento con dcARN de la línea celular NPA-87 derivada de PTC estimuló la proliferación y migración celular (148).

En trabajos previos, nuestro grupo demostró la expresión funcional del receptor TLR4 en la membrana plasmática de la célula folicular tiroidea y se identificó la presencia de todos los componentes del complejo de reconocimiento de LPS (149). Utilizando LPS como agonista exógeno de TLR4, comprobamos que la señalización de NF- κ B juega un rol central en la inducción de la expresión de genes marcadores de diferenciación tiroidea (150, 151). Por otra parte, Hagström *et al.* (152) reportaron una correlación significativa entre el incremento de niveles proteicos de TLR4 y el potencial metastásico en el FTC humano. En concordancia, Dang *et al.* (153) observaron expresión incrementada de TLR4 en el PTC humano. Además, estos autores demostraron que la estimulación con ácido hialurónico de bajo peso molecular (LMW-HA), un ligando endógeno de TLR4, induce proliferación y migración en la línea celular W3 derivada de PTC (153). Cabe destacar que hasta el momento los mecanismos responsables que regulan la expresión diferencial de TLRs en células tumorales continúan si ser dilucidados. Este interrogante motivó abordar, en este trabajo de tesis, el estudio del mecanismo molecular por el cual se sobreexpresa el receptor TLR4 en el cáncer de tiroides.

En relación a los polimorfismos de TLRs, hasta la fecha sólo dos trabajos describieron asociación entre polimorfismos de TLRs e incremento de riesgo para el desarrollo de tumores tiroideos. Kim *et al.* (154) informaron una significativa asociación entre el polimorfismo rs11466653 en el gen de TLR10 con un riesgo aumentado para el desarrollo de PTC de pequeño tamaño (microcarcinoma). Además, Kim *et al.* (155) reportaron una asociación entre los polimorfismos rs3804099 y rs3804100 en el gen de TLR2 con tumores tiroideos bilaterales.

1.4.5. NF- κ B y Cáncer de tiroides

Numerosos trabajos han evidenciado una importante participación de NF- κ B en procesos pro-tumorigénicos. La actividad de NF- κ B está constitutivamente elevada en muchos tipos de tumores humanos y se ha asociado con pobre pronóstico (122, 156). En el año 1997 Visconti *et al.* (157) describieron que NF- κ B está constitutivamente activo en diferentes líneas celulares provenientes de distintos tipos de carcinomas tiroideos. Se describió que las proteínas oncogénicas BRAF, RAS y RET/PTC pueden inducir la activación

de NF- κ B en el DTC y el MTC, mientras que fue evidenciada una desregulación constitutiva de la actividad de NF- κ B en el ATC (158). En este sentido, el oncogén RET necesita de NF- κ B para ejercer su actividad transformadora en la línea celular TT derivada de MTC (159). Además el comportamiento invasivo y la resistencia a la apoptosis en células tiroideas transformadas por la actividad oncogénica de BRAF^{V600E} son mediados por la activación de NF- κ B (160). Asimismo, la activación constitutiva de la vía de señalización PI3K/AKT debida a la inactivación de PTEN acelera la progresión del cáncer de tiroides tras el aumento de la actividad de NF- κ B (161). Por el contrario, la inhibición de NF- κ B a través de la supresión de la fosforilación de I κ B- α en la línea FRO, derivada de ATC incrementa la susceptibilidad a diferentes quimioterapéuticos, generando apoptosis y bloqueo de la actividad oncogénica (162). En estrecha relación, el polimorfismo rs2233406 en el gen NFKBIA que codifica para I κ B- α se asoció a un microambiente pro-inflamatorio dependiente de la secreción de IL-1 β , favoreciendo la progresión de tumores tiroideos derivados de células foliculares (163).

Estudios realizados en células tumorales tiroideas describieron que la actividad de NF- κ B disminuye la eficiencia de la terapia con radioyodo. Sin embargo, el mecanismo por el cual NF- κ B ejerce dicho efecto aún no se ha dilucidado (164). En coincidencia, varios inhibidores de la vía de señalización de NF- κ B inducen efectos antiproliferativos y/o apoptóticos, especialmente en combinación con radioiodoterapia o quimioterapia. Estos resultados sugieren que NF- κ B podría ser un blanco prometedor para el tratamiento del cáncer avanzado de tiroides (165).

Numerosos reportes describieron que la estimulación de TLR4 a través de la utilización de agonistas específicos redundaba en la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en ausencia de su ligando (mecanismo referido comúnmente como transactivación). Por otra parte, recientemente se demostró que la expresión de EGFR es necesaria para la activación de la señalización de NF- κ B a través de la estimulación de TLR4 (166). Este hallazgo motivó el abordaje, en este trabajo, del estudio de la expresión de EGFR y su potencial transactivación en respuesta a la estimulación de TLR4 en células tumorales tiroideas.

1.5. RECEPTORES ErbBs

La familia de proteínas ErbB que pertenece al grupo de receptores tirosina quinasa, recibió su nombre por su homología con el oncogén v-erbB del virus de la eritroblastosis aviar. Esta familia de receptores consta de cuatro miembros, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (también conocido como ErbB1, EGFR1 o HER1), el ErbB2 (HER2 o Neu), el ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). Estos receptores juegan un importante papel en la activación y regulación de una variedad de respuestas, que van desde la proliferación, diferenciación o apoptosis a la migración y adhesión celular (167). Los cuatro receptores humanos tienen en común un dominio de unión al ligando extracelular con alta homología estructural, una única hélice transmembrana y una porción citoplasmática que contiene una región conservada con actividad tirosina quinasa aunque difiere funcionalmente. Luego de la unión de sus ligandos específicos a los dominios extracelulares estos receptores forman homo y/o heterodímeros, conduciendo su auto y transfosforilación por la actividad tirosina quinasa intrínseca sobre residuos específicos en sus dominios intracitoplasmáticos. La familia de ligandos que se unen a los receptores ErbB se divide en tres grupos. El primer grupo incluye el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante (TGF)- α , anfiregulina (AR) y epigen (EPG), que se unen específicamente al EGFR. El segundo grupo incluye a betacelulina (BTC), el factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina (HB-EGF) y epiregulina (EPR), que presentan doble especificidad, dado que se unen tanto a EGFR como a ErbB4. El tercer grupo, constituido por las neuregulinas (NRG), forma dos subgrupos sobre la base de su capacidad para unir ErbB3 y ErbB4 (NRG-1 y NRG-2) o sólo ErbB4 (NRG-3 y NRG-4) (168, 169). Sólo el EGFR y ErbB4 son completamente funcionales en términos de unión a ligando y actividad quinasa. ErbB2 carece de dominio de unión a ligando, pero aporta una potente actividad quinasa al heterodimerizar con cualquiera de los demás ErbB conocidos. ErbB3 tiene una actividad quinasa alterada, y es considerada como una pseudoquinasa ya que requiere obligadamente de la actividad quinasa de sus socios de heterodimerización para su activación. El heterodímero de ErbB2/ErbB3 es el par más potente para la señalización mitogénica de la familia de ErbB. Numerosos informes demostraron que ErbB2 sólo puede homodimerizar cuando está mutado, funcionando como un receptor constitutivamente activo con potencial oncogénico (169, 170). Tras la unión a ligandos, los receptores diméricos se vuelven catalíticamente activos y los dominios citoplasmáticos fosforilados en diferentes residuos sirven de sitios de acoplamiento para una gran variedad de moléculas adaptadoras intracelulares cuyo reclutamiento conduce a la activación de múltiples vías intracelulares que controlan diversos programas genéticos (168). La señalización corriente abajo controlada por la activación de ErbB incluye principalmente la vía PI3K-Akt-mTOR y la vía RAS-RAF-MEK-ERK. Asimismo, la señalización ErbB puede activar otras moléculas efectoras tales como PLC γ , STATs y Src (169). En adición, los receptores ErbB activan factores de transcripción tales como c-fos, c-jun, c-myc, STAT, NF- κ B y miembros de la familia de ETSs (171). Así, la activación de ErbB regula una vasta variedad de eventos fisiológicos incluyendo proliferación celular, apoptosis, angiogénesis, adhesión celular y motilidad, desarrollo embrionario y organogénesis (169).

1.5.1. ErbBs y cáncer

Numerosos artículos han publicado el rol de los ErbB y sus ligandos en la proliferación y supervivencia de células tumorales humanas. Los receptores ErbB pueden sufrir distintas alteraciones genéticas con ganancia de función como mutaciones en los

dominios tirosina quinasa, formas truncadas, amplificación génica o sobreexpresión en ausencia de amplificación génica (171). Se describió que la supervivencia de numerosas células cancerosas es estrictamente dependiente de la forma mutante o de la sobreexpresión de miembros de la familia de ErbB. Como consecuencia, se estudia extensamente la inhibición de miembros de la familia de ErbB como posibles dianas para la reducción del crecimiento y progresión tumoral. A menudo terapias con moléculas específicas de bajo peso molecular, inhibidores tirosina quinasa o anticuerpos neutralizantes son eficientes en el tratamiento contra el cáncer (172-174). Además, las terapias combinadas de inhibidores de ErbB con agentes que bloquean otras vías de señalización que controlan la proliferación o apoptosis celular son posibilidades terapéuticas prometedoras para un futuro ya que podrían ampliar el alcance del tratamiento antitumoral (175, 176).

EGFR se encuentra frecuentemente sobreexpresado y/o mutado en el cáncer humano. De hecho, se observó que aproximadamente el 30% de los tumores sólidos incluyendo al cáncer humano de mama, colorectal, de células no pequeñas de pulmón (NSCLC), pancreático, gástrico, de cabeza y cuello, tiroides y renal, poseen alteraciones genéticas en EGFR con ganancia de función que generalmente se asocian con mal pronóstico (177). En la mayoría de los tumores el EGFR se sobreexpresa más frecuentemente a causa de una amplificación focal del gen que lo codifica, pero también puede sufrir sobreexpresión en ausencia de amplificación génica. Sin embargo, la activación de EGFR de manera ligando independiente puede deberse a mutaciones somáticas en el receptor, liderando una actividad tirosina quinasa constitutiva con una activación persistente corriente abajo de las vías de señalización oncogénicas (177). Mutaciones en EGFR con ganancia de función ocurren en el 10-15% de pacientes caucásicos con NSCLC y en el 30-40% de pacientes asiáticos con NSCLC (168). Recientemente se reportó una localización nuclear de EGFR junto con algunos de sus ligandos como EGF y TGF- α , en diferentes tipos de células tumorales, incluyendo el cáncer de mama, epidermal, vejiga, ovario, cavidad oral, pulmones, tiroides y páncreas. De este modo, el EGFR nuclear se comporta como regulador transcripcional, tirosina quinasa nuclear y co-regulador al interactuar con otras proteínas nucleares. Además, EGFR puede experimentar translocación a diferentes organelas, como mitocondrias, donde presenta funciones diferentes a su actividad más conocida como receptor tirosina quinasa de membrana plasmática (178).

La expresión de ErbB2 en carcinomas primarios humanos es generalmente más restringida en comparación con el EGFR. La sobreexpresión de ErbB2 está frecuentemente asociada con la amplificación génica, aunque la sobreexpresión en ausencia de amplificación génica también fue observada (171). La sobreexpresión de ErbB2 se encuentra principalmente en el cáncer de mama ya que el 15–20% de estos tumores sobreexpresan ErbB2. En este sentido, numerosos reportes indican que el cáncer de mama metastásico ErbB2 positivo se correlaciona con una mayor agresividad, mal pronóstico y menor tiempo de supervivencia (167, 175). Además, se demostró que otros tumores, incluyendo cáncer de páncreas, vejiga, pulmón, colon, endometrial y cervical sobreexpresan ErbB2 (175). El gen ErbB2 no suele estar mutado en los carcinomas, sin embargo, se demostraron mutaciones de ErbB2 en el 10% de pacientes con NSCLC (171).

Los niveles y la frecuencia de expresión de ErbB3 en carcinomas humanos son generalmente comparables a los de EGFR. La expresión de ErbB3 fue demostrada en cáncer de mama, colon, gástrico, próstata, vejiga, tiroides y páncreas (171). ErbB3 forma predominantemente un heterodímero con ErbB2. El heterodímero ErbB2/ErbB3 funciona como una unidad oncogénica debido a que es el dímero de señalización más activo de la familia ErbB en el cáncer (168, 175). Se reportaron dos poblaciones tumorales del cáncer de mama que se distinguen por sus niveles de expresión de ErbB3, con niveles altos (60% de los

tumores) y con niveles bajos (40% de los tumores) de expresión. La sobreexpresión de ErbB3 se encuentra en tumores ErbB2 positivos, correlacionándose con un potencial más agresivo en este tipo de cáncer (179, 180). A pesar de que las mutaciones en ErbB3 son poco frecuentes, se describieron mutaciones en ErbB3 en el 10% del cáncer gástrico y de colon (180) y en un bajo porcentaje de melanomas (181).

La participación de ErbB4 en la carcinogénesis es la menos estudiada. Se describieron al menos cuatro isoformas diferentes de ErbB4 como consecuencia de *splicing* alternativo de su ARNm (182). Se demostró expresión de ErbB4 en cáncer de mama, ovárico, esofágico, próstata, vesical y pancreático (171). ErbB4 tiene funciones oncogénicas y supresoras de tumores. En cáncer de mama y próstata la expresión de este receptor está generalmente asociada con mejor pronóstico y fenotipo más diferenciado (167, 171), mientras que la sobreexpresión de ErbB4 en cáncer de colon se asocia a un rol pro-tumorigénico (175).

1.5.2. ErbBs y sus ligandos en el cáncer de tiroides

La glándula tiroides normal sintetiza EGF y este factor es capaz de inducir proliferación de células tiroideas *in vitro*. A diferencia de la TSH, EGF promueve el crecimiento inhibiendo a su vez la expresión de genes de diferenciación específicos de tiroides. Se comprobó que EGF induce la migración y la invasión del PTC y del FTC *in vivo* e *in vitro* (183-185). Se describió una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de EGF y recurrencia en el PTC humano, por lo que EGF fue propuesto como predictor de agresividad para estos carcinomas (186). Por otro lado, la estimulación de células de ATC humano con HB-EGF promueve el crecimiento celular y la capacidad invasiva *in vitro* (187). Respecto al TGF- α , las células tiroideas foliculares normales lo expresan débilmente, mientras que el 66% de los nódulos tiroideos hiperplásicos y todos los FTA, PTC, FTC y MTC expresan abundantes niveles de TGF- α . Además, se observó un aumento en paralelo de la expresión de EGFR en estos tejidos, sugiriendo un potencial *loop* autocrino *in vivo* (188).

A diferencia de otros tumores malignos humanos que se caracterizan por la presencia de mutaciones activantes del dominio tirosina quinasa de EGFR, se detectaron mutaciones de EGFR en una minoría de carcinomas tiroideos, sugiriendo que la activación de la señalización de EGFR puede ser impulsada por la regulación positiva de su transcripción y/o traducción génica, más que por mutación genómica (189). La expresión de EGFR está aumentada principalmente en el PDTC y el ATC en comparación con el tejido tiroideo normal (189, 190). La sobreexpresión de EGFR en células tumorales tiroideas sugiere una mayor sensibilidad a EGF y otros ligandos que se asocia con la pérdida de diferenciación que conduce la transición hacia un fenotipo de crecimiento independiente de TSH, invasivo y quimiorresistente (191). Por lo tanto, la sobreexpresión de EGFR se definió como un marcador molecular de dediferenciación y de progresión en carcinomas tiroideos (189). Los ATCs responden moderadamente al tratamiento con inhibidores de la activación del EGFR, indicando que la función del receptor se encuentra conservada en estas neoplasias (192). Por otro lado, la sobreexpresión de EGFR fue descrita en el PTC, en correlación con una etapa tumoral avanzada y características patológicas adversas, por lo que el incremento en el nivel de EGFR podría servir como un importante biomarcador de PTC agresivo, particularmente en el PTC BRAF^{V600E} positivo (190). Experimentos con células tiroideas de rata PCCL3 transformadas con los oncogenes quiméricos RET/PTC1 y RET/PTC3 demostraron una interacción molecular funcional entre RET y EGFR que contribuye a la activación de la quinasa RET necesaria para el crecimiento inducido por RET/PTC, indicando que EGFR podría ser un atractivo blanco terapéutico en el PTC inducido por rearrreglos

RET/PTC (193). Mediante inmunohistoquímica, se observó expresión citoplasmática de EGF y EGFR en el PTC, mientras que la tinción nuclear de EGFR estuvo prácticamente ausente (194). La marcada presencia de EGFR en el citoplasma fue significativamente asociada con riesgo incrementado de recurrencia tumoral en el PTC (195). A la inversa, la positividad nuclear para EGF y principalmente EGFR fue una característica particular tanto del FTA como del FTC. Esta diferencial localización de la sobreexpresión de EGFR en carcinomas tiroideos sugirió que el papel que desempeña EGF en el control del crecimiento difiere entre el PTC y el FTC (194). Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos responsables de la sobreexpresión de EGFR en el cáncer de tiroides.

Se observaron niveles incrementados de expresión de los transcritos de ErbB2 y ErbB3 en el PTC en comparación con tejido tiroideo normal, sugiriendo que la expresión del heterodímero ErbB2/ErbB3 podría correlacionarse con mayor agresividad en el PTC (196). Además, niveles incrementados de ARNm de ErbB2 y ErbB3 se correlacionaron con metástasis a ganglios linfáticos en el PTC (196, 197). En correlación, se demostró inmunotinción positiva para ErbB2 en PTC y negativa en FTA y FTC (198). Estudios en células tumorales tiroideas que albergan el oncogén BRAF^{V600E} demostraron que la utilización de inhibidores de BRAF o de la vía de señalización MEK/ERK producen una sobreexpresión de ErbB2 y ErbB3 que reactiva la vía de señalización de MAPK y AKT como un mecanismo contraregulatorio (199). Por lo tanto, la terapia combinada de inhibidores contra BRAF/MEK y HER es una posibilidad terapéutica prometedora para el PTC BRAF^{V600E} positivo (200).

Se comprobaron niveles bajos de expresión de ErbB4 en el ATC (201), mientras que la expresión de ErbB4 fue observada en el 70% del PTC (196). Estudios realizados en células foliculares tiroideas de rata FRTL-5 transformadas con el oncogén KRAS demostraron niveles altos de expresión del receptor ErbB4 y su ligando Neuregulina-1 (NRG1). Además el tratamiento de estas células transformadas con anticuerpos neutralizantes para NRG1 redujo un 50% la proliferación celular, evidenciando en el sobrenadante la presencia del ligando, el cual activa de manera autocrina a ErbB4 y heterodímeros ErbB2/ErbB4 (202).

1.5.3. Transactivación de ErbB por otras vía de señalización

Los receptores ErbB también pueden ser transactivados por otras clases de receptores de membrana. La transactivación de ErbB se caracteriza por una rápida fosforilación de tirosinas de los dominios citoplasmáticos y la posterior activación corriente abajo de las vías de señalización. Estos receptores se transactivan por la fosforilación ejercida por otras quinasas o a través de su autofosforilación en respuesta a una actividad quinasa aumentada. El primer mecanismo es independiente de ligando y es utilizado por ejemplo por la tirosina quinasa Janus 2 (Jak2), la cual fosforila dominios tirosinas citoplasmáticos de EGFR (Y1068 o Y1092) o de ErbB2 (Y694 o Y699) (171, 203). Del mismo modo la familia del Src fosforila algunos residuos tirosinas de EGFR involucrados en la actividad tirosina quinasa intrínseca (Y1016, Y1068, Y1092 o Y1110), mientras que otras tirosinas (Y869, Y915, Y944 o Y1125) fueron identificadas como sitios de fosforilación únicos para la familia Src en el EGFR (203). El segundo mecanismo fue bien definido para agonistas de receptores acoplados a proteína G (GPCR), tales como endotelina-1, bombesina, trombina y ácido lisofosfatídico (204, 205). Estos ligandos, al unirse a los GPCR, inducen una estimulación rápida de metaloproteinasas que producen la escisión de precursores de ligandos tipo EGF, aumentando la disponibilidad de los mismos para activar consecutivamente a los receptores ErbB (171).

1.5.4. Transactivación de EGFR por la señalización de TLRs

Recientemente se comprobó que la participación de EGFR es esencial para la activación del señalamiento TLR3. EGFR tiene la capacidad de unirse directamente a dímeros de TLR3 activados por dcARN dentro de endosomas, en cooperación con las proteínas Src y Btk, gatillando la fosforilación secuencial de dos residuos tirosinas específicos de TLR3 necesarios para la unión del adaptor TRIF y la consecuente activación corriente debajo de la señalización (99, 206, 207).

Por otro lado, numerosos reportes describieron una interacción cruzada entre EGFR y TLR4, demostrando que la estimación de TLR4 a través de diferentes agonistas específicos redundante en la activación EGFR en diversas células tumorales y no tumorales. Al respecto, se demostró que la señalización de TLR4 transactiva a EGFR mediante los dos mecanismos clásicamente conocidos de transactivación para receptores ErbB: a través de la transfosforilación del receptor independiente de ligando y mediado por proteínas citoplasmática transductoras con actividad quinasa (107, 166, 208-211) o en respuesta a la activación de metaloproteasas que generan una rápida liberación de ligandos de EGFR en la superficie celular (209, 212, 213).

Recientemente EGFR fue reconocido como un miembro efector de una nueva vía de señalización “no-canónica” para el receptor TLR4 (121) (Figura 10). Sin embargo, el mecanismo por el cual EGFR forma parte de la vía de señalización de TLR4 aún no está bien esclarecido. Existen reportes donde se demuestra una interacción física entre los receptores en la membrana citoplasmática y en vesículas endocíticas (107, 208), mientras que en trabajos más recientes se describe que la transactivación de EGFR por activación de TLR4 se debe a la participación de quinasas de la familia de Src como transductores intermediarios y no a una co-localización de ambos receptores (166, 214, 215).

La participación de EGFR como transductor de una vía “no-canónica” de TLR4 adquirió importancia al demostrarse que la señalización de TLR4 a través de NF- κ B requiere de la actividad quinasa de EGFR, dado que la inhibición de EGFR por distintas estrategias metodológicas impide la activación de NF- κ B en respuesta a la activación de TLR4 tanto *in vitro* como *in vivo* (166, 210, 216). Avalando la participación de EGFR en el mecanismo de transducción de TLR4, se demostró que la administración de inhibidores de EGFR protege a ratones del shock séptico inducido por LPS (216). Asimismo, los inhibidores de EGFR Gefitinib y Erlotinib reducen el daño pulmonar y promueven una mayor supervivencia en los modelos de sepsis en ratas (211). Por otro lado, se demostró que el tratamiento con Erlotinib bloquea las respuestas pro-inflamatorias y proliferativas después de la lesión hepática inducida por LPS (217). Además, el inhibidor de EGFR, AG1478 reduce la fibrosis y la inflamación en la enfermedad cardíaca relacionada con la obesidad y la lesión renal inducida por hiperlipidemia (214, 215).

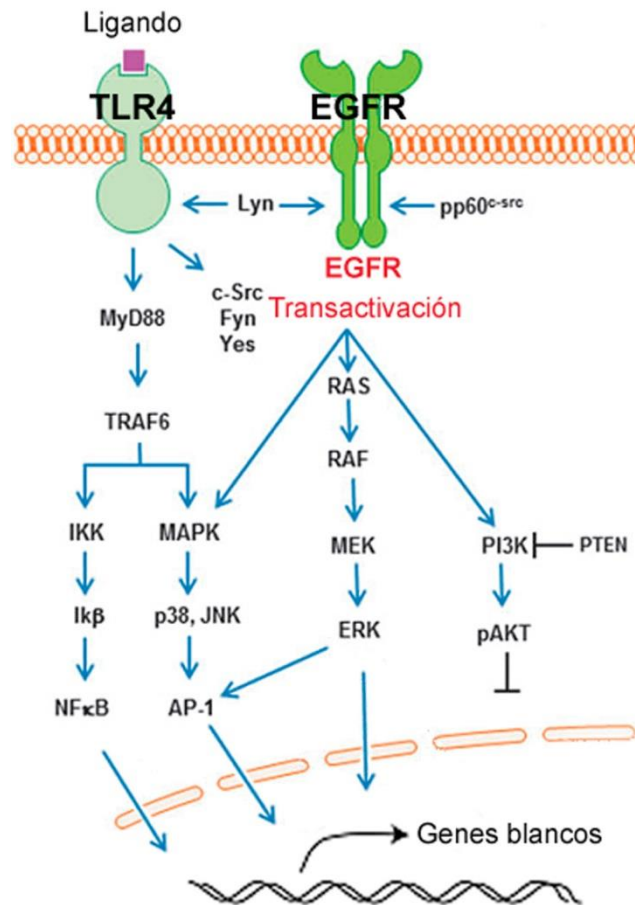


Figura 10. Señalización de TLR4 en respuesta a la unión de un ligando a través de la vía clásica o a través de la interacción cooperativa con EGFR. Mediante la vía “dependiente de MyD88” se activan en paralelo NF- κ B, MAPKs, p38/JNK, AP-1. Las vías colaterales o “no-canónicas” implican varias quinasas de la familia Src y la transactivación del EGFR, activando principalmente a MAPKs, p38/JNK, AP-1 y AKT. Esquema adaptado de *McKeown-Longo and Higgins, 2017* (121).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La gran mayoría de los tumores tiroideos derivados de la célula folicular resultan de alteraciones genéticas somáticas que originan oncogenes o genes supresores tumorales (1). El 70% de los PTCs poseen alteraciones génicas que lideran la activación constitutiva de la vía de señalización de MAPK/ERK incluyendo mutaciones puntuales de los genes BRAF y RAS, así como rearrreglos cromosómicos que implican al RET y NTRK, siendo el evento genético observado con mayor frecuencia (30-80%) la mutación BRAF^{V600E} (92). Sin embargo, alteraciones adicionales deben cooperar desregulando múltiples vías de señalización durante la progresión tumoral. En este sentido, actualmente se invierte gran esfuerzo en dilucidar las vías de señalización que favorecen tanto el inicio como la progresión de estos tumores.

El emergente rol de los TLRs en el mantenimiento de la homeostasis como reguladores críticos del proceso inflamatorio y la respuesta de regeneración de tejidos en condiciones fisiológicas ha llevado a la identificación de funciones aberrantes de estos receptores en diferentes enfermedades, incluyendo desordenes inflamatorios e infecciosos, autoinmunidad y cáncer (94, 218). La señalización desregulada de TLRs se identificó en varios procesos neoplásicos, asociados con producción exacerbada de citoquinas pro-inflamatorias involucradas en la progresión tumoral (94, 218, 219). En efecto, ratones deficientes para la señalización de TLRs son más resistentes al desarrollo de distintos modelos de cáncer de piel, hígado, páncreas y colon (126). A la inversa, ratones transgénicos que sobreexpresan constitutivamente TLR4 en la vellosidad intestinal son más susceptibles al desarrollo de cáncer de colon (133). En este sentido, la estrecha relación entre la función desregulada de TLRs y la progresión tumoral ha establecido la base molecular para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a TLRs o a sus vías de señalización (104, 127).

La activación crónica del sistema inmune y la respuesta tisular podría generar una inadecuada regulación de las vías de señalización de TLRs llevando a la producción de un microambiente pro-inflamatorio que facilita la progresión de procesos neoplásicos (31, 130). En el cáncer de pulmón la señalización de TLR4 induce la expresión de citoquinas inmunosupresoras y pro-angiogénicas (137). Estudios en cáncer de próstata mostraron que la activación de TLR4 promueve la secreción de citoquinas pro-angiogénicas en respuesta a la señalización de NF- κ B (138). Sin embargo, existen discrepancias en relación a la sobrevivencia de la célula tumoral en respuesta a la activación de TLR4 en distintos modelos celulares. El señalamiento de TLR4 mejora la sobrevivencia de células de cáncer de ovario (139) y promueve la capacidad invasiva de células de cáncer de colon (140). Por el contrario, estudios en tumores pituitarios demostraron que la activación de TLR4 inhibe el crecimiento tumoral (141).

En relación a TLR4, nuestro grupo demostró expresión funcional de TLR4 en tirocitos murinos normales (149). Además, utilizando el agonista exógeno de TLR4, LPS demostramos que la señalización de NF- κ B induce la expresión de genes marcadores de diferenciación tiroidea (150, 151). Por otra parte, la expresión funcional de TLR4 se demostró en cáncer de próstata, mama, pulmón, ovario y colon (135, 136). Hagström *et al.* (152) reportaron una correlación significativa entre niveles altos de expresión de TLR4 y el potencial metastásico en FTCs. Dang *et al.* (153) demostraron que TLR4 se encuentra abundantemente expresado en PTCs y que la estimulación de la línea celular W3 de PTC con ácido hialurónico, un ligando endógeno de TLR4, promueve la proliferación y la migración celular. Sin embargo, hasta el presente los mecanismos responsables que regulan la expresión diferencial de TLR4 en células tiroideas tumorales continúan si ser dilucidados.

Por otra parte, el 30% de los tumores sólidos presentan alteraciones genéticas en EGFR con ganancia de función que generalmente se asocian con mal pronóstico (177). En el cáncer de tiroides, se observó que el nivel de expresión de EGFR incrementa con la pérdida de diferenciación tisular, encontrándose niveles altos de este receptor en tumores anaplásicos (189). Por ello, la sobreexpresión de EGFR fue propuesta como marcador de progresión tumoral (189). Una función no clásica del receptor TLR4 es su capacidad de modificar la actividad de otros receptores de membrana (121). Varios reportes han demostrado una interacción cruzada entre TLR4 y EGFR, originando la secreción de metaloproteasas y factores de crecimiento que favorecen la migración celular (107, 208). Recientemente, se reportó que TLR4 necesita de la expresión funcional de EGFR para señalar a través de NF- κ B (166, 216).

En base a los antecedentes existentes la hipótesis de este trabajo plantea que en el contexto de la transformación tumoral tiroidea determinada por la presencia de proteínas oncogénicas, clásicamente involucradas en la activación de la señalización de MAPK/ERK, se produciría una sobreexpresión del receptor TLR4 en la membrana plasmática, cuya estimulación favorecería la promoción tumoral mediante la activación de vías de señalización claves para la carcinogénesis tiroidea. El estudio pondrá especial énfasis en la vía de señalización del factor de transcripción NF- κ B, considerando su potencial pro-oncogénico en el desarrollo de la neoplasia tiroidea (158) y su participación como el principal regulador de la expresión génica en respuesta a la activación de TLR4 (220). Además se contempla evaluar si existe una relación funcional entre la sobreexpresión de TLR4 y EGFR en la célula tiroidea tumoral.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la sobreexpresión y funcionalidad de TLR4, así como la regulación de la expresión del receptor EGFR y su transactivación en respuesta a la activación de TLR4 en la célula tiroidea tumoral. Se utilizará como principal modelo la carcinogénesis tiroidea inducida por la expresión del oncogén BRAF^{V600E} debido a que esta mutación se encuentra en aproximadamente el 50% de los tumores papilares que constituyen cerca del 80% de las neoplasias tiroideas diagnosticadas (221).

Con esta finalidad, se abordaron los siguientes objetivos específicos:

CAPÍTULO I: MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA SOBREENPRESIÓN FUNCIONAL DE TLR4 EN LA CÉLULA TUMORAL TIROIDEA

- 4.1.1.** Estudiar la expresión de TLR4 en neoplasias tiroideas.
- 4.1.2.** Investigar el impacto de la sobreexpresión de TLR4 sobre características tumorales desfavorables en el PTC.
- 4.1.3.** Evaluar la expresión de TLR4 en respuesta a la presencia de los principales oncogenes activantes de la vías de señalización MAPK/ERK (BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3).
- 4.1.4** Analizar la funcionalidad del receptor TLR4 en respuesta a la activación inducida por el ligando LPS en modelos celulares de cáncer tiroideo que albergan la mutación BRAF^{V600E}.

4.I.5. Investigar la vía de señalización y factores de transcripción involucrados en la regulación de la sobreexpresión de TLR4.

4.I.6. Determinar la participación del factor de transcripción ETS1 en la regulación de la sobreexpresión de TLR4 inducida por el oncogén BRAF^{V600E}.

CAPÍTULO II: MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA EXPRESIÓN Y TRANSACTIVACIÓN DE EGFR EN LA CÉLULA TIROIDEA TUMORAL

4.II.1. Estudiar la expresión de EGFR en respuesta a la actividad oncogénica de BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3.

4.II.2. Investigar cambios en la fosforilación de EGFR en respuesta a la activación de TLR4 en células tumorales tiroideas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

Las líneas celular tiroidea de rata Fisher PCCL3 fue provista por el Dr. Roberto Di Lauro (Università degli Studi di Napoli Federico II, Naples, Italy). Las líneas celulares PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 derivadas de la línea celular PCCL3, fueron generosamente provistas por el Dr. Fagin (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA). Dichas líneas celulares fueron cultivadas de manera similar a la descrita (222). Como medio de crecimiento se utilizó una mezcla de proporciones idénticas de Medio Eagle Modificado por Dulbecco y nutrientes F12 (DMEM/F12) (Hyclone, Logan, UT, USA), suplementado con 5 % v/v de suero de ternero inactivado por calor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; USA), 1 mUI/ml TSH bovina (generosamente provista por el Dr. Albert F. Parlow, National Hormone and Peptide Program, Harbor-UCLA Medical Center - Torrance, CA, USA), 10 µg/ml insulina bovina y 5 µg/ml de transferrina bovina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 2 µmol/ml de glutamina y la combinación de antibióticos (100 U/ml penicilina G, 100 µg/ml estreptomina) (Sigma Aldrich). Las líneas celulares fueron mantenidas en medio de selección con 300 µg/ml de G418 y 100 µg/ml de Higromicina B (Sigma Aldrich). La expresión de los oncogenes BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3 de los sistemas TET-ON de células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3, respectivamente fueron inducidas luego del tratamiento con 1 µg/ml de doxiciclina (Dox, un antibiótico del grupo de las tetraciclinas) (Sigma-Aldrich) durante 48 hs al menos que se indique lo contrario. Los cultivos celulares se realizaron en condiciones de esterilidad en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ en aire a 37°C.

La línea celular tiroidea humana no tumoral Nthy-ori 3-1, la línea celular humana BCPAP derivada de PTC (BRAF^{V600E} positiva) y la línea celular humana 8505c derivada de ATC (BRAF^{V600E} positiva) fueron generosamente provistas por el Dr. Massimo Santoro (Università degli Studi di Napoli Federico II, Naples, Italy). La línea celular humana KTC2 derivada de ATC (BRAF^{V600E} positiva) fue generosamente provista por la Dra. Edna Kimura (Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil). Todas las líneas celulares humanas fueron cultivadas en DMEM con alto contenido en glucosa 4,5 g/l, suplementado con 10 % v/v de suero bovino fetal inactivado por calor (Natocor, Córdoba, Argentina), 2 µmol/ml de glutamina y la combinación de antibióticos (100 U/ml penicilina G, 100 µg/ml estreptomina y 50 µg/ml gentamicina) (Sigma-Aldrich). Los cultivos celulares se realizaron en condiciones de esterilidad en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ en aire a 37°C.

Las células fueron subcultivadas a razón 1:8, se sembraron en placas de cultivo de 100 o 60 mm o en placas de pocillos múltiples de 6, 24 y 48 según el esquema experimental y se cultivaron hasta llegar a un 60-70 % de confluencia en medio de crecimiento. Todas las líneas celulares fueron utilizadas antes del pasaje número 20. El tratamiento con doxiciclina (Dox) se realizó en medio de crecimiento. Células que fueron transfectadas transitoriamente, luego de la transfección se cultivaron en medio de crecimiento de idéntica composición pero conteniendo un 1 % v/v de suero de ternero o suero bovino fetal para disminuir la proliferación celular. La criopreservación de los cultivos celulares fue efectuada en vapor de nitrógeno líquido en una solución conteniendo 50 % de medio de crecimiento, 45 % de suero bovino fetal y 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO).

Las líneas celulares Nthy-ori 3-1 y BCPAP fueron autenticadas utilizando el kit PowerPlex Fusion System (Promega) para la genotipificación en el Centro de Excelencia en Procesos y Productos de Córdoba (Córdoba, Argentina).

Se obtuvieron inhibidores químicos de los siguientes proveedores: PLX4032 (Selleck Chemicals - Houston, TX, USA), BAY 11-7082 (Sigma-Aldrich) and U0126 (Cell Signaling Technology - Danvers, MA, USA). La endotoxina Lipopolisacárido (LPS) de E. coli 055:B5 fue comprada en Sigma-Aldrich.

3.2. Animales de laboratorio

Ratones FVB/N *Wild type* (WT) (referidos como ratones “controles”) y ratones FVB/N transgénicos Tg-BRAF^{V600E} (referidos como ratones “BRAF^{V600E}”), fueron generosamente provistos por el Dr. Fagin (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, USA) y se manipularon durante una pasantía de la tesista en el Instituto de Ciencias Biomédicas (University of São Paulo, São Paulo-Brazil). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Animal de la Universidad de São Paulo (São Paulo, Brazil).

Los ratones FVB/N transgénicos Tg-BRAF^{V600E} expresan el gen que codifica BRAF^{V600E} humano bajo el control del promotor de tiroglobulina dirigiendo la activación oncogénica únicamente al tejido tiroideo. Estos animales fueron obtenidos a través de la cruce Tg-BRAF^{V600E} con WT. Las camadas obtenidas fueron tipificadas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional para la detección del transgen (Tg-BRAF^{V600E}). Cada experimento se realizó utilizando grupos de ratones transgénicos Tg-BRAF^{V600E} y ratones WT de una misma camada a las 5, 12 y 30 semanas de edad.

3.3. Captación de Ioduro

El procedimiento utilizado fue similar al descrito (223) con ligeras modificaciones para ser adaptados a nuestro sistema. Las células en cultivo sembradas en placas múltiples de 24 pocillos fueron incubadas en solución salina balanceada de Hank (HBSS) [140 mM Mal, 5,4 mM KCl, 1,3 M CaCl₂, 0,4 mM Mg₂SO₄, 0,5 mM MgCl₂, 0,4 mM Na₂HPO₄, 0,44 mM KH₂HPO₄, 5,55 mM glucosa, 10 mM Hepes (pH 7,5)], suplementado con 20 μM KI y 25 mCi ¹²⁵I⁻/mol I⁻ (PerkinElmer, Boston, MA) (350 μl/pocillo) a 37°C durante 40 min. Finalizado el período de incubación fueron lavadas 2 veces con HBSS frío a fin de eliminar la radioactividad no incorporada. El ¹²⁵I⁻ incorporado por las células fue extraído mediante la incubación con etanol frío al 95 % durante 20 min a 4°C y la radiación fue determinada mediante un contador gamma Wallc Wizard 1470 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Los resultados fueron expresados como pmol de ioduro por μg de ADN celular (pmol I⁻/ μg ADN).

El contenido de ADN celular para la normalización de los resultados fue evaluado en base a procedimientos descritos con pequeñas modificaciones (224). Luego de la extracción etanólica, el contenido celular no extraído se sometió a precipitación con ácido tricloroacético al 5 % durante 20 min a 4°C. El material precipitado se incubó con difenilamina (0,714 % p/v difenilamina, 70 % v/v ácido acético, 1,4 % v/v ácido sulfúrico, 0,0036 % v/v acetaldehído a temperatura ambiente durante 12-16 hs. Posteriormente, el complejo coloreado se evaluó espectrofotométricamente a 595 nm. La concentración de ADN presente fue calculada por comparación con una curva testigo de ADN de esperma de salmón. La solución testigo (1 μg/μl) fue preparada disolviendo ADN de esperma de salmón altamente polimerizado en NaOH 5 mM y posterior dilución con 1 volumen de HClO₄ 1 M e incubación a 70 °C hasta clarificación completa.

3.4. Extracción del ARN total

El procedimiento de extracción de ARN total de líneas celulares en cultivo fue realizado en base al método descrito (225). Para cada punto experimental se utilizó una cápsula de cultivo de 60 mm de diámetro. Las células adheridas fueron lisadas con 1 ml/cápsula de solución desnaturalizante TRIzol (Invitrogen Life Technologies). Se adicionó 0,2 ml de cloroformo por ml de lisado, la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 seg, se incubó 5 min a temperatura ambiente y fue centrifugada a 12.000 xg durante 15 min a 4°C. El ARN presente en la fase acuosa superior fue recuperado y precipitado con igual volumen de isopropanol centrifugando a 12.000 xg durante 15 min a 4°C. Luego el precipitado se lavó con etanol al 75 % v/v, centrifugando a 8.000 xg durante 15 min a 4°C. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante 15-30 min y finalmente fue disuelto en agua libre de nucleasas. Posteriormente se procedió a la evaluación de la concentración de la solución de ARN mediante la lectura de su absorbancia a 260 nm mediante el uso del lector de placa BioTek (Life Science). Se determinó la relación de absorbancia 260 y 280 nm para valorar la calidad de la muestra obtenida. La integridad del material extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.

La extracción de ARN total a partir de tejidos tiroideos de ratones fue realizado en base al método descrito (226). Para cada punto experimental de ratones Tg-BRAF^{V600E} se utilizó la glándula tiroidea proveniente de un único ratón, mientras que para cada punto experimental de ratones controles se utilizó un pool de glándulas tiroideas provenientes de 2 o 3 ratones. El tejido tiroideo fue disgregado mediante la utilización de un homogeneizador vidrio-teflón utilizando por cada glándula tiroidea 1 ml de solución desnaturalizante TRIzol (Invitrogen Life Technologies). A continuación el procedimiento de extracción del ARN se realizó de forma similar a lo descrito anteriormente para las líneas celulares en cultivo.

3.5. Inmunohistoquímica

Se analizó la expresión proteica de TLR4 y ETS1 utilizando *microarrays* de tejidos tiroideos humanos de origen comercial (US Biomax, Rockville, MD, USA). Además, la expresión proteica de TLR4 y EGFR se evaluó en muestras de tejidos tiroideos provenientes de ratones Tg-BRAF^{V600E} y WT. Diluciones: 1:100 anti-TLR4, 1:50 anti-EGFR y 1:50 anti-ETS1.

Las glándulas tiroideas obtenidas a partir de ratones fueron fijadas en buffer conteniendo 10 % formalina en PBS, embebidas en parafina y cortadas en secciones de 5 µm para su examen histológico o marcación inmunohistoquímica. Tanto para las muestras contenidas en los *microarrays* como para las muestras obtenidas de ratones, se procedió de la siguiente manera: se indujo la **desparafinización por calor** y la **recuperación antigénica en citrato de sodio 10 mM (pH 6) a 95°C**. La actividad peroxidasa endógena fue agotada mediante tratamiento con 3 % v/v H₂O₂ en metanol. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con 5 % v/v suero de caballo en TBS. Posteriormente **se incubó en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario disuelto en TBS + 0,5 % BSA (5 µg/ml anti-TLR4 y 5 µg/ml anti-EGFR)**. **Las secciones de tejidos fueron incubadas con un anticuerpo secundario biotilado** (Santa Cruz Biotechnology - Santa Cruz, CA, USA) **y el complejo ABC** (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). **Se realizó la incubación con el sustrato cromogénico 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich) durante aproximadamente 15 min a temperatura ambiente**. Luego, los tejidos marcados fueron **contra-coloreados con hematoxilina y montados con 1,3-dietil-8-fenilxantina** (Fluka, Milwaukee, WI, USA). Como **control negativo, el anticuerpo primario específico fue reemplazado por 5 µg/ml de IgG purificada de igual isotipo** (Santa Cruz Biotechnology).

Las imágenes digitales fueron capturadas a 400x de magnificación, utilizando microscopía óptica (Nikon Eclipse TE2000-U. Nikon Instruments, Japan). Los niveles de

expresión proteica se expresaron (en unidades arbitrarias) como “densidad de tinción” y se calcularon realizando el cociente de la cuantificación de la intensidad de tinción de DAB por el número de células de las secciones histológicas, para así corregir las diferencias en la arquitectura del tejido. La intensidad de tinción DAB y el número de núcleos observados en un área seleccionada al azar de cada tejido se cuantificó utilizando el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud - Bethesda, MD, EUA).

3.6. Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas a baja densidad sobre cubreobjetos de 11 mm recubiertos con poli-L-lisina (BD BioCoat, San Jose, CA, USA). Luego del tratamiento recibido, las células fueron fijadas en paraformaldehído al 2 % en PBS durante 15 min. Se permeabilizó en solución de permeabilización durante 10 min [PBS (pH 7,4), 0,1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,2 % BSA, 0,1 % Triton X-100. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó en solución de bloqueo durante 10 min [PBS (pH 7,4), 0,1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,2 % BSA]. La incubación con anticuerpos primarios se realizó en solución de bloqueo durante 2 hs a temperatura ambiente (diluciones: 1:100 anti-TLR4, 1:100 anti-EGFR, 1:500 anti-NIS, 1:50 anti-ETS1, 1:50 anti-p65, 1:50 anti-BRAF). Los cubreobjetos se lavaron 3 veces cada 10 min con solución de bloqueo y se procedieron a incubar durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (dilución: 1:500), ya sea anti-IgG de cabra, ratón o conejo conjugados con Alexa 488 o 594 (molecular Probes, Eugene, OR, USA). Se realizaron 3 lavados cada 10 min con solución de bloqueo y los núcleos fueron teñidos con 1 µg/ml de 49,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) durante 5 min. Posteriormente, se procedió a montar los cubreobjetos en portaobjetos utilizando FluorSave (EMD Millipore - Temecula, CA, USA). En los experimentos se realizaron controles incluyendo la omisión de los anticuerpos primarios.

Las muestras fueron examinadas y fotografiadas a 1000x de aumento con microscopio invertido de epifluorescencia (Leica Microsystems - Buffalo Grove, IL, USA). Los niveles de expresión proteica se expresaron (en unidades arbitrarias) como “densidad de tinción” y se calcularon realizando el cociente de la integración de la intensidad de fluorescencia por el número de células de cada campo microscópico. La integración de la intensidad de fluorescencia y el número de núcleos observados en un área seleccionada al azar de cada preparado se cuantificó utilizando el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud - Bethesda, MD, EUA).

3.7. Obtención de extractos proteicos totales

Para la obtención de extractos proteicos totales se utilizó una cápsula de cultivo de 60 mm de diámetro para cada punto experimental y se procedió tal como fue descripto (227, 228). Las células adheridas a las placas se despegaron mecánicamente en PBS, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 100 µl de buffer para lisados totales celulares [50 mM Hepes (pH 7), 2 mM MgCl₂, 250 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,1 % Nonidet 40] suplementado con inhibidores de proteasas (1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Pepstatina A, 10 µg/ml Aprotinina, 10 µg/ml Leupeptina) y se incubó durante 15 min en hielo. Para el análisis de proteínas fosforiladas se añadió un coctel comercial de inhibidores de fosforilasas (1 µg/ml) (SigmaAldrich). Posteriormente, se centrifugó a 10.000 xg durante 5 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se conservó a -80°C.

3.8. Extractos proteicos nucleares y fraccionamiento núcleo-citoplasma

El procedimiento para la obtención de la fracción proteica nuclear consiste en la lisis hipotónica para liberar el contenido del citoplasma seguido de una extracción con alta cantidad de sal y se realizó tal como fue descrito con mínimas modificaciones (229, 230). Para cada punto experimental se utilizó una cápsula de 100 mm de diámetro. Las células adheridas a la placa de cultivo fueron despegadas mecánicamente en PBS frío, centrifugadas y resuspendidas en 400 μ l de buffer A [10 mM Hepes (pH 7,9), 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 % NP-40, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF] Luego de incubar 15 min en hielo se mezcló vigorosamente por vortex y se centrifugó a 10.000 xg a 4°C durante 5 min. La fracción sobrenadante fue recuperada como extracto citoplasmático, mientras que el *pellet* (material sedimentado) fue resuspendido en buffer A, nuevamente centrifugado a modo de lavado, resuspendido en 50 μ l de buffer C [20 mM Hepes (pH 7,9), 10 % glicerol, 420 mM NaCl, 1,5 mM $CaCl_2$, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF] e incubado por 30 min en hielo. Los restos celulares se removieron por centrifugación a 10.000 xg a 4°C y la fracción sobrenadante conteniendo proteínas nucleares fue recuperada como extracto nuclear.

3.9. Cuantificación de extractos proteicos

La cuantificación proteica de los diferentes extractos obtenidos se realizó mediante la técnica de Bradford (231) utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

3.10. Western blot

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y el análisis ulterior por inmuno-marcación fueron realizados como se describió previamente (232) con ligeras modificaciones, utilizando el sistema Mini-Protean 3 o 4 (Bio-Rad, Hércules, CA, USA).

Dependiendo de la proteína a analizar, se utilizaron entre 25 a 50 μ g de proteínas provenientes de extractos totales u obtenidos de fraccionamientos núcleo-citoplasma. Dichos extractos se prepararon en buffer de siembra [62 mM Tris (pH 6,8), 10 % v/v glicerol anhidro, 2 % p/v SDS, 0,1 M DTT, 0,004 % azul de bromofenol] y fueron hervidos en baño termostático a 100°C durante 5 min para permitir la desnaturización y reducción de las proteínas, enfriadas en hielo, e inmediatamente sembradas en el gel resolutive (al 6, 10 o 12 % dependiendo del tamaño de la proteína en estudio). Como buffer de corrida fue empleada una solución conteniendo 192 mM glicina, 25 mM Tris (pH 8,8) y 0,1 % SDS. La corrida electroforética se realizó a 100 V constante durante períodos variables (2-3 hs). Una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m de poro (Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania) en buffer de transferencia conteniendo 192 mM glicina, 25 mM Tris (pH 8,8) y 20 % metanol. La transferencia se realizó a una diferencia de potencial constante de 100 V (250-350 mA, 30-40 W) durante 60-75 min.

Posteriormente las membranas fueron coloreadas con Rojo Ponceau (0,1 % Rojo Ponceau en solución acuosa al 5 % de ácido acético) para controlar el proceso de transferencia. Los sitios inespecíficos de la membrana fueron bloqueados por incubación en solución de bloqueo [100 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, 5 % p/v de leche descremada ó 5 % p/v de BSA] durante 60 min a temperatura ambiente bajo agitación permanente. Las membranas bloqueadas fueron incubadas con los anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas de interés diluidos en solución de bloqueo (según se indica en

la Tabla 1) durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Luego, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween [100 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20] 3 veces por 5 min a temperatura ambiente a fin de eliminar el exceso de anticuerpo primario. La inmunodetección del anticuerpo primario se realizó por incubación con un anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo capaz de reconocer el isotipo del anticuerpo primario utilizado diluido en TBS-Tween durante 90 min a temperatura ambiente bajo agitación suave y protegidos de la luz. El exceso de anticuerpo secundario fue eliminado mediante 3 lavados con TBS-Tween cada 5 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Las bandas reactivas fueron visualizadas y obtenidas por el sistema de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR Biotechnology - Lincoln, NE, USA). El control de siembra de iguales proporciones de proteínas fue realizado mediante el *stripping* de las membranas de nitrocelulosa, el posterior bloqueo de la membrana y la incubación con el anticuerpo primario utilizado como control de carga (especificado en cada experimento). La integración de la intensidad de fluorescencia fue determinada mediante el software de análisis de imágenes ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados

Proteína	Especie	Proveedor	Catálogo	Isotipo	Dilución
TLR4	Humano	Abcam	ab-22048	Ratón	1:500
TLR4	Humano	Santa Cruz	sc-16240	Ratón	1:500
EGFR	Humano	Abcam	ab-52894	Conejo	1:1000
pEGFR (Tyr 1068)	Humano	Cell Signaling	3777	Conejo	1:500
pEGFR (Tyr 1173)	Humano	Abcam	ab-5652	Conejo	1:500
ETS1	Humano	Santa Cruz	sc-350	Conejo	1:500
pERK	Humano	Santa Cruz	sc-7383	Ratón	1:500
ERK	Humano	Santa Cruz	sc-94	Conejo	1:500
BRAF	Humano	Santa Cruz	sc-166	Conejo	1:500
HRAS	Humano	Santa Cruz	sc-520	Conejo	1:500
GAPDH	Humano	Santa Cruz	sc-25778	Conejo	1:500
p65 (C22B4)	Humano	Cell Signaling	4764	Conejo	1:1000
NIS	Rata	N. Carraco	-	Conejo	1:3000
α Actina	Aviar	Santa Cruz	sc-47778	Ratón	1:1000
α Tubulina	Humano	Sigma	T6074	Ratón	1:1000
PARP-1	Humano	Santa Cruz	sc-7150	Conejo	1:1000

En la tabla se indica para cada proteína la especie del epítipo utilizado en la generación del anticuerpo y su isotipo (todos reconocen de forma cruzada la misma proteína expresada en

rata y ratón), el proveedor de cada anticuerpo, el número de catálogo y la dilución empleada en los ensayos de western blot.

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados.

Proteína	Especie	Proveedor	Catálogo	Isotipo	Dilución
IRDye 680 RD	Ratón	LI-COR Biotechnology	P/N 925-68070	Cabra	1:15000
IRDye 800 CW	Conejo	LI-COR Biotechnology	P/N 925-32211	Cabra	1:15000

En la tabla se indica para cada anticuerpo secundario la especie del epítotope utilizado en la generación del mismo, su proveedor, el número de catálogo, su isotipo y la dilución empleada en los ensayos de western blot.

3.11. Plásmidos

3.11.1. Construcciones conteniendo vectores de expresión

Los vectores de expresión conteniendo el ADNc humano de BRAF^{V600E} y BRAF WT (233) fueron gentilmente provistos por la Dra. Pilar Santisteban (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Madrid, España). El vector de expresión conteniendo el ADNc humano de ETS1 (#86099) fue comprado en Addgene (Cambridge, MA, USA).

La construcción dominante negativa conteniendo la secuencia codante murina de TLR4 carente del dominio TIR en el vector de expresión con resistencia a puomicina pZero, denominada Δ 670-835 TLR4 fue adquirida (InvivoGen, San Diego, CA, USA) y gentilmente facilitada por la Dra. Mariana Maccioni (Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

La construcción con función dominante negativa denominada Δ 152-296 MyD88 correspondiente al ADNc humano del adaptor intracelular MyD88 carente de la región aminoacídica 152 a 296 presentes en la secuencia carboxilo terminal clonado en el vector de expresión pcDNA3.1 (234) fue desinteresadamente enviada por el Dr. Moshe Arditi (Department of Pediatrics, Division of Pediatrics Infectious Diseases, Cedars-Sinai Medical Center, USA).

El constructo denominado I κ B- α AA fue creado en nuestro laboratorio durante la tesis doctoral del Dr. Juan Pablo Nicola a través de la remoción por mutagénesis sitio dirigida de las serinas 32 y 36 del ADNc murino de I κ B- α , generando una molécula I κ B- α insensible a la fosforilación y posterior activación, resultando en una mutante con características de dominante negativa.

3.11.2. Construcciones conteniendo elementos de respuesta

El elemento de respuesta a NF- κ B conteniendo 5 sitios consenso de unión κ B acoplado a la secuencia que codifica al gen de luciferasa (5x κ B-Luc) fue comprada en Clontech (Mountain View, CA, USA) y gentilmente compartida por el Dr. Michael F. Smith Jr. (Digestive Health Center of Excellence and Department of Microbiology, University of Virginia Health System, USA).

El elemento de respuesta a ETS conteniendo 3 sitios consenso de unión Ets acoplado a la secuencia que codifica el gen de luciferasa (3x Ets^d-Luc) fue realizado en nuestro laboratorio durante el período del presente trabajo de tesis en colaboración con el Dr. Juan

Pablo Nicola. Dicho vector artificial contiene tres copias en tándem de la región flanqueante al sitio de unión a Ets distal del promotor de TLR4 de ratón como se detalla: AAAATATGTTCCCTCTAGTCTGA (el sitio consenso Ets se indica subrayado), corriente arriba del promotor core del adenovirus E1B. La presencia del constructo generado fue confirmada mediante secuenciamiento directo (Macrogen, Seúl, Korea).

3.11.3. Construcciones conteniendo regiones promotoras de TLR4

Para el análisis de la actividad del promotor de TLR4 se emplearon vectores conteniendo deleciones de la región del promotor de TLR4 de ratón. La deleción comprendida entre -608 a +223 pb (-608/+223 pTLR4-Luc), entre -336 a +223 pb (-336/+223 pTLR4-Luc), entre -104 a +223 pb (-104/+223 pTLR4-Luc) y entre +52 a +223 pb (+52/+223 pTLR4-Luc) fueron descritas anteriormente (235). Estos constructos fueron gentilmente donados por el Dr. Thierry Roger (Infectious Disease Service, Departament of Internal Medicine, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Suiza). En la descripción de las construcciones se considera +1 al primer nucleótido en el cual comienza la transcripción.

3.11.4. Vectores de expresión de normalización

El control de normalización de la eficiencia de transfección se realizó con la utilización del plásmido conteniendo el promotor de citomegalovirus (CMV) acoplado al gen de la enzima β -galactosidasa (pCMV- β -gal) (Promega Madison, WI, USA). Como control negativo se utilizó el vector reportero vacío pGL3-Basic (Promega).

3.12. Mutagénesis sitio dirigida

La interrupción del sitio consenso Ets distal (Ets^d) contenido en la secuencia del vector -336/+223 pTLR4-Luc de ratón se realizó mediante la utilización del kit de mutagénesis sitio-dirigida QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA, USA) siguiendo las instrucciones y recomendaciones provistas por el fabricante.

En la construcción del vector Ets^dmt -336/+223 pTLR4-Luc donde el sitio consenso para factores de transcripción ETS fue alterado, se utilizó un par de *primers* complementarios donde se colocó la secuencia mutada respecto a la secuencia *wild type* presente en el plásmido -336/+223 pTLR4-Luc a mutar. La secuencia de *primers* conteniendo la triple mutación puntual del sitio Ets (la secuencia modificada se indica subrayada en la secuencia del *primer*) se detalla: (S) 5'-TGGGTTTTAATCTCTAGCATTGTGAGAAAATATGTAGTTCTAGTCTGAAACATCCA- 3'. La mutación inactiva el sitio consenso Ets^d presente entre los nucleótidos -297 y -290 de la región promotora del promotor de TLR4. La presencia de la mutación generada fue confirmada mediante secuenciamiento directo (Macrogen, Seúl, Korea).

3.13. Amplificación y purificación de plásmidos

Los diferentes plásmidos fueron incorporados a células bacterianas competentes *Escherichia coli* cepa XL1-blue (*E. coli* XL1-blue) sensibles a ampicilina (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Las colonias transformadas fueron seleccionadas por su resistencia al mencionado antibiótico. Las bacterias se amplificaron y los plásmidos fueron purificados por la técnica de lisis alcalina (236).

Para la preparación de las células competentes, una colonia de la cepa bacteriana *E. coli* XL1-blue fue crecida en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) a 37°C durante toda la noche

y en agitación. Una alícuota de este cultivo fue inoculada a 100 ml de LB y crecida hasta su fase logarítmica (DO_{600} 0,375). El cultivo bacteriano fue alicuotado en tubos, enfriados en hielo y centrifugado a 1.500 xg durante 15 min a 4°C. El *pellet* de bacterias fue resuspendido e incubado en hielo durante 30 min en solución de $CaCl_2$ fría [75 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES (pH 6,7), 55 mM $MgCl_2$, 250 mM KCl]. Las células competentes fueron nuevamente centrifugadas a 1.500 xg durante 10 min a 4°C y resuspendidas en solución de $CaCl_2$. Consecutivamente, se adicionó 1 volumen de glicerol al 30 % frío y las células bacterianas competentes fueron finalmente alicuotadas y almacenadas a -70°C.

La etapa de transformación se realizó incubando 50 μ l de células competentes *E. coli* XL1-blue con el constructo de interés (10-100 ng) durante 30 min en hielo y posteriormente se realizó un golpe de calor a 42°C durante 90 seg. Las bacterias transformadas fueron crecidas en medio LB no selectivo durante 60 min a 37°C en agitación. Alícuotas de este cultivo (o bien el cultivo completo) fueron sembradas en medio LB sólido selectivo (100 μ g/ml de ampicilina) y cultivadas a 37°C durante 12-16 hs a fin de obtener las colonias bacterianas que incorporaron al plásmido.

La extracción y purificación del ADN plasmídico se realizó utilizando el método de lisis alcalina. De manera resumida, una colonia del cultivo sólido de la etapa anterior fue seleccionada cuidadosamente y cultivada en 10 ml de medio selectivo (100 μ g/ml de ampicilina) a 37°C en agitación durante toda la noche. Una alícuota de ese cultivo fue inoculada en 200 ml de medio LB selectivo e incubada a 37°C en agitación durante 12-16 hs. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado y las células bacterianas fueron resuspendidas en solución de resuspensión [50 mM glucosa, 25 mM Tris (pH 8), 10 mM EDTA] y lisadas en un volumen de solución de lisis (0,2 M NaOH, 1 % SDS) durante 5 min. Finalmente la mezcla fue neutralizada en un volumen de solución de neutralización (3 M acetato de potasio, 11,5 % ácido acético) mezclando por inversión e incubando en hielo por 30 min. Posteriormente se centrifugó a fin de eliminar los restos celulares y el ADN cromosomal. El sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico fue precipitado con 0,5 volúmenes de alcohol isopropílico y seguidamente centrifugado. El precipitado conteniendo el ADN fue resuspendido en solución TE [10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA] y mezclado con 1 volumen de buffer de unión (clorhidrato de guanidina 6 M). A fin de purificar el ADN, la mezcla fue eluída a través de una columna conteniendo un compacto de tierras de diatomeas (10 ml de tierras de diatomeas 50 mg/ml en buffer de unión). La columna fue lavada con 20 ml de alcohol isopropílico 80 % y el ADN fue eluído en TE. El material plasmídico resultante fue cuantificado mediante su absorbancia a 260 nm en el lector de placa BioTek (Life Science), la calidad del plásmido se evaluó mediante la relación de absorbancias 260/280 nm, y su integridad se chequeó por electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio.

3.14. Ensayos de transfección de plásmidos

Las líneas celulares fueron transfectadas de manera transiente mediante el reactivo Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific), siguiendo protocolos y recomendaciones indicadas por el fabricante. Se utilizaron cultivos en placas de 60 mm, de 24 o 48 pocillos dependiendo del número de células necesario para cada punto experimental. A tal fin, células adherentes fueron transfectadas a una densidad del 80 a 90 % de confluencia en medio de cultivo OptiMEM (Invitrogen). Las células se incubaron con los complejos ADN/Lipofectamina durante 4 a 6 hs. Finalizado ese período, el medio OptiMEM fue reemplazado por el medio de crecimiento requerido por cada línea celular pero reducido en suero (1 % v/v).

El día posterior a la transfección se realizaron los tratamientos correspondientes utilizando el medio de crecimiento reducido en suero (1 % v/v) durante el tiempo evaluado. Finalizado el tratamiento, el cultivo celular adherente fue lavado con PBS y las células lisadas en buffer de lisis pasivo (Promega, Madison, WI, USA) a razón de 80 μ l buffer/ pocillo de placa de 24 o 48 pocillos. Luego de 20 min de incubación a temperatura ambiente bajo agitación suave se procedió a la medición de la actividad de luciferasa *firefly* y β -galactosidasa.

Para la medición de la actividad de luciferasa *firefly* se utilizó el reactivo comercial “*luciferase reporter assay system*” (Promega, Madison, WI, USA) y se siguió el protocolo y las recomendaciones descriptas por el fabricante. La cuantificación de la señal luminiscente se registró mediante el equipo luminómetro TD-20/20 (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA). La actividad de β -galactosidasa fue determinada por el método espectrofotométrico incubando 20 μ l del lisado celular y 150 μ l de la solución conteniendo el sustrato [1,4 mg/ml o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido, 120 mM Na_2HPO_4 , 80 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 100 mM 2-mercaptoetanol (pH 7,5)] durante 1 a 3 hs (hasta el desarrollo de color) a 37°C. La absorbancia de las muestras fue realizada a 420 nm mediante el uso del lector de placa BioTek (Life Science).

En cada experimento la actividad del promotor se evaluó como el cociente entre la actividad del reportero (luciferasa) del promotor del gen en estudio y la actividad del reportero control (β -galactosidasa), posteriormente dicho cociente se expresó como veces de inducción generada por el tratamiento sobre la actividad del promotor en células en estado basal, considerando arbitrariamente su actividad como 1.

3.15. Transcripción reversa y PCR convencional y a tiempo real

La reacción de transcripción reversa (RT) se realizó a partir de 2 o 3 μ g de ARN total (según se trate de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional o a tiempo real (qPCR), respectivamente) en base a la metodología descripta (223).

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 20 μ l conteniendo 1X buffer de PCR, 1,5 mM MgCl_2 , 0,5 μ M de *primer* sentido, 0,5 μ M de *primer* antisentido, 0,25 mM de cada dNTP, 1 U Taq-polimerasa y 2 μ l de ADNc. El perfil térmico fue: 94°C 4 min; 94°C 30 seg, 60°C 30 seg, 72°C 1 min (32-40 ciclos); 72°C 10 min. Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 2 % y observados mediante tinción con bromuro de etidio. Como controles negativos se utilizó agua libre de RNAsas y DNAsas en lugar del producto de RT y reacciones donde no se adicionó la enzima transcriptasa reversa en la RT del ARN. Estos controles se realizaron principalmente en la puesta a punto de la técnica para cada par de *primers* utilizados. La especificidad de los productos fue confirmada mediante secuenciamiento génico (Macrogen, Seúl, Korea).

La amplificación por qPCR se realizó mediante una adaptación de la PCR convencional utilizando “*Syber Green*” como reportero. Las reacciones de la amplificación fueron realizadas en el termociclador ABI Prism 7500 detection system (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) en volúmenes de 15 μ l conteniendo buffer de PCR, 1,5 mM MgCl_2 , 0,3 μ M de *primer* sentido, 0,3 μ M de *primer* antisentido, 0,25 mM de cada dNTP, 0,5 U Taq-polimerasa, 1:40000 *Syber Green* (Molecular Probes), 30 nM Rox (Roche Applied Science, Indianápolis, IN, USA) y 1 μ l de ADNc. El perfil térmico fue: 94°C 4 min; 94°C 32 seg, T° de *annealing* 32 seg, 72°C 1 min (40 ciclos); 94°C 1 min, T° de *annealing* 1 min, 94°C 1 min. La medición de la señal emitida por *Syber Green* y ROX en cada ciclo fue realizada en la etapa de extensión. La cuantificación de los cambios relativos en la expresión del gen de interés respecto al gen de expresión constitutiva β -actina, usado como control interno, fue

realizada mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (237). Para cada par de *primers* bajo las condiciones ensayadas se observó la presencia de un solo pico en la curva de disociación, indicando que un solo producto de PCR fue generado en la reacción. La identidad se evaluó mediante la observación del tamaño previsto del amplicon mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % y secuenciamiento génico (Macrogen, Seúl, Korea).

Los reactivos utilizados de RT y PCR fueron obtenidos en (Promega, Madison WI, USA), mientras que los *primers* fueron adquiridos en Sigma-Genosys (Houston, TX, USA).

Tabla 3. Secuencias de *primers* utilizadas para PCR convencional y PCR a tiempo real.

Gen	Especie	Secuencia (5'-3')	Amplicón	T° An
TLR4	Humano	(S) CCAAGAACCTGGACCTGAGC (AS) TCTGGATGGGGTTTCCTGTC	180	60
TLR4	Rata	(S) CCAAGAACCTAGATCTGAGC (AS) TCTTGATAGGGTTTCCTGTC	180	55
TLR4	Ratón	(S) CCAAGAACATAGATCTGAGC (AS) TCTGGATAGGGTTTCCTGTC	180	60
EGFR	Humano	(S) GTGCAACCAGCAACAATTCC (AS) GATAGACAGGATTCTGCACAGAGC	216	57
EGFR	Rata	(S) GTATAGCTCCGATCCCACCAG (AS) GGGATTTTGATAATGCAGGTCTC	181	60
EGFR	Ratón	(S) GTGCAACTAGCAACAATTCC (AS) GATAGACAGGGTTCTGCACAGAGC	210	60
β Actina	Humano	(S) ACTCTTCCAGCCTTCCTTCC (AS) GTTGGCGTACAGGTCTTTGC	109	60
β Actina	Rata	(S) CTACAATGAGCTGCGTGTGG (AS) GGGCACAGTGTGGGTGAC	223	60
β Actina	Ratón	(S) CAGCTTCTTTGCAGCTCCTT (AS) CACGATGGAGGGGAATACAG	157	60
IL-6	Humano	(S) GGATGCTTCCAATCTGGATTCAATGAG (AS) CGCAGAATGAGATGAGTTGTCATGTCC	290	60
IL-6	Rata	(S) GAGCATTGGAAGTTGGGGTAGG (AS) CGCAGAATGAGATGAGTTGTCATGTCC	109	60
iNOS	Humano	(S) TGGCAGCATCAGAGGGGACC (AS) GCAGGACAGGGGACCACATCGAA	104	60
iNOS	Rata	(S) CTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAG (AS) GGACCATCTCCTGCATTTCTTCC	137	60
pTLR4 - 365/- 24	Rata	(S) GAGAGAGGTCTATTGCCCATG (AS) AGCGTTTGCTGACCAGCTTC	342	60

En la tabla se indica para cada gen la secuencia de los primers utilizados en orientación 5'-3', el tamaño del amplicon y la temperatura de *annealing* utilizada en la amplificación (T° An). S: sentido, AS: antisentido.

3.16. Silenciamiento de la expresión génica mediante ARN de interferencia

Para el silenciamiento de ETS1 en células PC/BRAF^{V600E} se utilizó ARN de interferencia pequeño (siRNA) blanco específico para ETS1 de rata (siETS1), adquirido en Santa Cruz Biotechnology (n° de catálogo sc-156062). Como control negativo se utilizó una secuencia de siRNA no relacionada (sin blanco teórico o scrambled: siSCR adquirido en Dharmacon (Lafayette, CO, USA; n° de catálogo D-001206-13).

Células PC/BRAF^{V600E} cultivadas en placas de 24 pocillos a una confluencia de 80 a 90 % fueron transfectadas en medio OptiMEM con 10-50 nM de siRNA utilizando Lipofectamina RNAiMAX (Thermo-Fisher Scientific - Waltham, MA, USA) de acuerdo a las indicaciones especificadas por el fabricante. Luego de 4 a 6 hs de la transfección se sustituyó el OptiMEM por medio de crecimiento reducido en suero (1 %) y se realizaron los tratamientos especificados en cada experimento. La eficiencia del silenciamiento se monitoreó midiendo la expresión proteica de ETS1 mediante western blot en células transfectadas con el siSCR y el siETS1 a distintos tiempos.

3.17. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Los ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina fueron realizados como tal como fue descrito (238). Para la obtención de extractos nucleares se utilizó una cápsula de cultivo de 100 mm de diámetro para cada punto experimental. Finalizado el tiempo de tratamiento con doxiciclina (Dox) (1 µg/ml), se adicionó sobre el medio de cultivo formaldehído a una concentración final de 1 % v/v y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y agitación suave. La fijación se detuvo mediante la adición de glicina a una concentración final de 125 mM. Las células aún adheridas a la placa de cultivo fueron lavadas 2 veces con PBS suplementado con PMSF 1 mM y posteriormente fueron despegadas mecánicamente en la misma solución. Los núcleos fueron purificados como se describió previamente, resuspendidos en buffer de lisis nuclear [50 mM Tris (pH 8), 10 mM EDTA, 1 % SDS] conteniendo inhibidores de proteasas e incubados durante 10 min en hielo. El ADN genómico fue fragmentado mediante sonicación en fragmentos promedios de 500 a 1000 pb y posteriormente centrifugados a 10.000 xg. El sobrenadante fue diluido a una razón 1:5 en buffer de dilución para inmunoprecipitación [50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 % Triton X-100, 5 mM EDTA, 0,5 % Nonidet P-40, 150 mM NaCl] para disminuir la concentración de SDS, e incubado con Proteína A/G Plus Agarosa (Santa Cruz Biotechnology) saturada con esperma de salmón durante 30 min a 4°C con rotación permanente. La cromatina fragmentada proveniente de 2x10⁶ células se incubó con 2 µg de anticuerpo policlonal anti-ETS1 (sc-350, Santa Cruz Biotechnology) o la misma cantidad de IgG de conejo como control durante toda la noche a 4°C en rotación permanente. Posteriormente los complejos inmunes formados fueron precipitados con Proteína A/G Plus Agarosa saturada con esperma de salmón durante 4 hs a 4°C en rotación permanente. Los complejos inmunoprecipitados fueron lavados 4 veces en buffer de lavado [0,1 % SDS, 1 % Triton X-100, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 % Nonidet P-40, 150 mM NaCl], 2 veces con buffer de lavado de alta concentración salina [0,1 % SDS, 1 % Triton X-100, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl] y una vez con TE [10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA]. El ADN inmunoprecipitado fue purificado mediante la utilización de Chelex-100 (Bio-Rad, Hércules, CA, USA). Para la cuantificación del ADN presente en los inmunoprecipitados se utilizó qPCR como se describió anteriormente. Para el cálculo de las veces relativas del incremento en la unión se empleó la siguiente fórmula considerando la relación señal-ruido normalizada a la cantidad inicial de ADN: veces relativas de incremento = $2^{-[(Ct.input - Ct.target) - (Ct.input - Ct.mock)]}$. Las secuencias de *primers* utilizadas en la amplificación por qPCR se indican en la Tabla 3, referidos como pTLR4 -365/-24.

3.18. Ensayo del cierre de la herida

Las células crecidas en monocapas a un 80-90 % de confluencia fueron cultivadas en medio de crecimiento pero al 0,1 % v/v de SFB por 24 hs. Posteriormente, se realizó la disrupción de las monocapas celulares con ayuda de un tip produciendo una “herida”, realizando consecutivos lavados con PBS para eliminar las células en suspensión. Posteriormente, se realizó el tratamiento con LPS (10-1000 ng/ml) en medio de crecimiento pero al 0,1 % v/v de SFB. Se tomaron fotos por diferentes períodos de tiempo (24-48 hs) en una misma zona de la herida (6 heridas por experimento independiente). La repoblación del área libre fue determinada por densitometría mediante el software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

3.19. Gestión de residuos peligrosos

Se realizó en base a la normativa institucional, provincial y nacional establecidas en relación a la gestión de residuos peligrosos, Ley Nacional n° 24051: Residuos Peligrosos y documentos complementarios (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Presidencia de la Nación), Ley Provincial n° 8973 (Agencia Córdoba Ambiente) y Resolución HCD 336/05 Gestión de Residuos Peligrosos (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba).

3.20. Análisis estadístico

Los resultados se muestran como media \pm DS o media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes, según como se indique en cada figura. El análisis de diferencias múltiples entre grupos fue realizado por Análisis de Varianza (one-way ANOVA). Como post-test se utilizó el Test de Comparaciones Múltiples Newman-Keuls. La comparación entre dos grupos se realizó utilizando el test t de Student para muestras no apareadas o a través del test no paramétrico Mann-Whitney.

La cuantificación de las inmunohistoquímicas fue analizada por el test no paramétrico Kruskal-Wallis con el test de comparación múltiple post hoc de Dunn. Los análisis de correlación utilizando los datos moleculares derivados del atlas del genoma del PTC (18) fueron realizados utilizando el coeficiente de correlación de Spearman's y el análisis de supervivencia libre de enfermedad se realizó utilizando el test Mantel-Cox.

Los test estadísticos fueron realizados mediante la utilización del software Prism 3.0 (GraphPad Software - La Jolla, CA, USA). Los valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

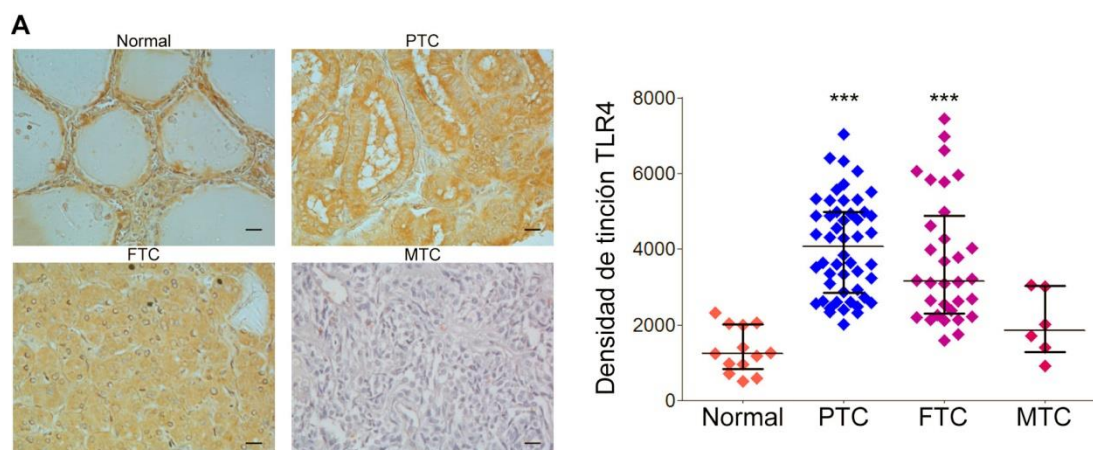
4.1. CAPÍTULO I: MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA SOBREEXPRESIÓN FUNCIONAL DE TLR4 EN LA CÉLULA TUMORAL TIROIDEA

4.1.1. Expresión incrementada de TLR4 en tejidos de neoplasias tiroideas

4.1.1.1. Los niveles proteicos de TLR4 se encuentran incrementados en cortes histológicos de carcinomas tiroideos diferenciados

Como se mencionó anteriormente la expresión funcional de TLRs en células tumorales se relaciona con mayor supervivencia y progresión tumoral, evasión a la vigilancia del sistema inmune y resistencia a la apoptosis. Particularmente, la expresión funcional de TLR4 se demostró en distintos tipos celulares, incluyendo células de cáncer de mama, próstata, ovario y colon (135, 136). En base a estos antecedentes se decidió estudiar los niveles de expresión de TLR4 en diferentes neoplasias tiroideas. Para ello, se procedió a evaluar mediante inmunohistoquímica la expresión proteica de TLR4 en muestras clínicas de tiroides (*microarrays* de tejidos tiroideos humanos de origen comercial, US Biomax, Rockville, MD, USA).

En primer lugar, se evaluó el nivel de TLR4 en tejidos tiroideos humanos normales (n=13) y en procesos tiroideos neoplásicos, incluyendo carcinomas papilares (PTCs) (n=50), carcinomas foliculares (FTCs) (n=32) y carcinomas medulares (MTCs) (n=6). En concordancia con observaciones previas (149, 152, 153), la expresión de TLR4 fue detectada en tirocitos normales (Figura 11 A). Como se muestra en la cuantificación de la densidad de tinción, los niveles proteicos de TLR4 fueron significativamente mayores ($P < 0,0001$) en el PTC y FTC en comparación con el tejido tiroideo normal, sin evidenciarse diferencias estadísticamente significativas entre estos tipos de tumores (Figura 11 A). Sin embargo, los MTCs no presentaron cambios significativos en los niveles proteicos de TLR4 respecto al tejido tiroideo normal (Figura 11 A). Estos resultados fueron reproducidos al evaluar la expresión proteica de TLR4 en ensayos independientes utilizando otro anticuerpo anti-TLR4 (Figura 11 B). Cabe destacar que en todos los tejidos tiroideos la inmunopositividad para TLR4 se circunscribió principalmente a las células foliculares, mientras que la tinción fue prácticamente indetectable en células estromales y en el escaso infiltrado linfocitario observado.



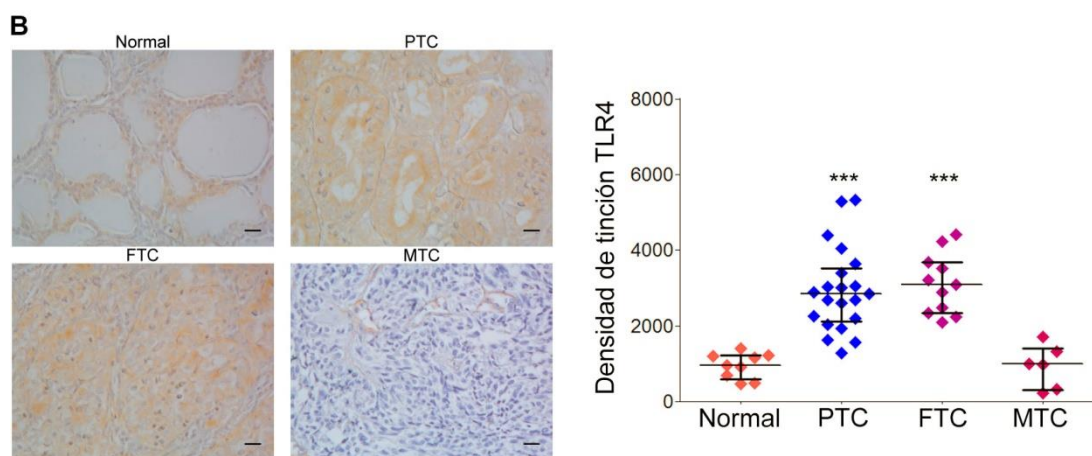


Figura 11. TLR4 se sobreexpresa en carcinomas tiroideos diferenciados. Imágenes representativas de cortes histológicos de origen comercial (US Biomax), a 400x de magnificación, correspondientes a tejidos tiroideos sometidos a tinción por inmunohistoquímica utilizando (A) anticuerpo policlonal de cabra anti-TLR4 (sc-16240, Santa Cruz Biotechnology) y (B) anticuerpo monoclonal de ratón anti-TLR4 (ab-22048, Abcam). Las barras de escala representa 20 μ m. **A)** Tiroides normal (n=13), PTCs (n=50), FTCs (n=32), y MTCs (n=6). **B)** Tiroides normales (n=9), PTCs (n=21), FTCs (n=11), y MTCs (n=6). La cuantificación de los niveles proteicos de TLR4 se expresa relativa al número de células de las secciones de tejidos (paneles derechos). Los resultados se muestran como mediana y rango intercuartil. *** $P < 0,0001$ vs tejido normal (*Kruskal-Wallis test, Dunn's test*).

Con el objetivo de corroborar los resultados anteriores, se evaluó la expresión proteica de TLR4 mediante inmunohistoquímica en muestras apareadas (n=4) conteniendo secciones de tejido tumoral y del respectivo tejido normal adyacente. Como se esperaba, la cuantificación de la densidad de tinción de TLR4 fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en las secciones de tejidos tiroideos neoplásicos con respecto al tejido normal adyacente (Figura 12).

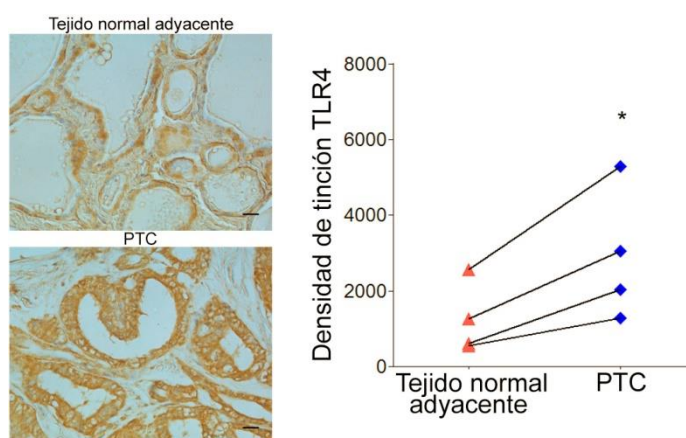


Figura 12. TLR4 se sobreexpresa en PTCs respecto al tejido normal adyacente. Imágenes representativas de cortes histológicos de origen comercial (US Biomax), a 400x de magnificación, correspondientes a muestras apareadas (n=4) de tejido normal adyacente y PTC sometidos a tinción por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo policlonal de cabra anti-TLR4 (sc-16240, Santa Cruz Biotechnology). Las barras de escala representan 20 μ m. La cuantificación de los niveles proteicos de TLR4 se expresa relativa al número de células en las secciones de tejidos (panel derecho). * $P < 0,05$ (*Paired t test*).

El sistema “TNM” de estadificación para tumores sólidos malignos es ampliamente utilizado en la clínica y describe la etapa tumoral en códigos alfanuméricos. La letra “T” representa el tamaño del tumor primario y si se evidencia invasión a tejido cercano, la letra “N” describe si se demuestra invasión a ganglios linfáticos cercanos, mientras que la letra “M” refiere la presencia de metástasis tumoral a distancia (239). Con el objetivo de establecer si existe una relación entre la expresión de TLR4 y los diferentes estadios TNM en PTCs y FTCs, se dividió las muestras de tumores aportadas por el *microarray* (US Biomax), en diferentes grupos de acuerdo al estadio TNM informado por el fabricante y se comparó los niveles proteicos de TLR4 determinados mediante inmunohistoquímica entre los diferentes grupos.

Las muestras tumorales incluidas en el *microarray* presentaban diferentes estadios T (T2, T3 y T4), indicando que el tamaño y/o la extensión tumoral es mayor cuanto mayor es el número reportado después de la letra T. Además, todas las muestras tumorales aportadas en el *microarray* provinieron de pacientes que no evidenciaban invasión tumoral a ganglios linfáticos ni metástasis a distancia, dando los estadios N0 y M0, respectivamente. En concordancia con los resultados anteriores, la densidad de tinción de TLR4 para todos los grupos (con diferentes estadios TNM) de PTCs (Figura 13 A) y FTCs (Figura 13 B) fue significativamente mayor respecto a los niveles de TLR4 en el tejido normal. Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas en la inmunotinción de TLR4 entre los distintos grupos en función del TNM tanto para PTCs como FTCs (Figura 13). Esta falta de correlación podría deberse en parte a las características de los pacientes, ya que la población de tumores aportados en el *microarray* era bastante homogénea para la clasificación TNM, siendo todos N0 y M0, difiriendo sólo en el estadio T.

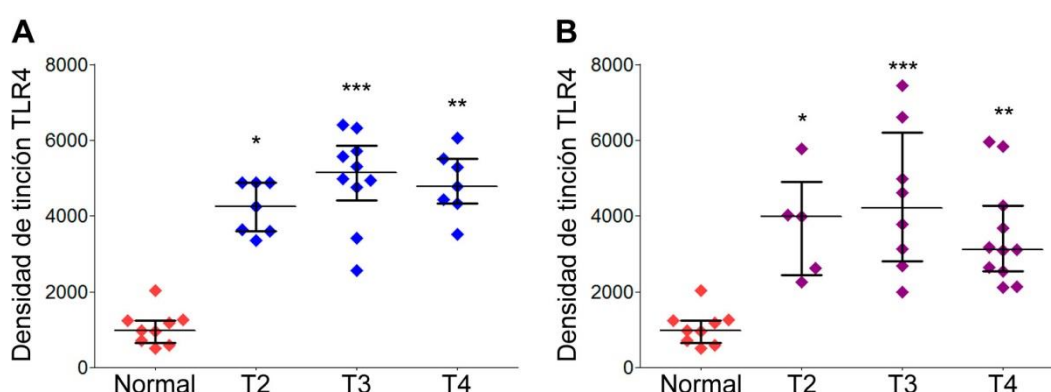


Figura 13. La expresión de TLR4 no varía en función del estadio TNM de PTCs y FTCs. Análisis de la expresión proteica de TLR4 en cortes histológicos sometidos a tinción por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo policlonal de cabra anti-TLR4 (sc-16240, Santa Cruz Biotechnology) en función de la estadificación TNM para PTCs (A) y FTCs (B). Todos los carcinomas tiroideos evaluados fueron N0 y M0. La cuantificación de los niveles proteicos de TLR4 se expresa relativa al número de células en las secciones de tejidos. Los resultados se muestran como mediana y rango intercuartil. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ vs tejido normal (Kruskal-Wallis test, Dunn's test).

4.1.1.2. Los niveles proteicos de TLR4 se encuentran incrementados en cortes histológicos de metástasis de PTCs en nódulos linfáticos

Con el fin de establecer si existe expresión diferencial de TLR4 entre PTCs primarios y sus metástasis a nódulos linfáticos, se evaluó la expresión proteica de TLR4 mediante inmunohistoquímica en muestras apareadas (n=8) conteniendo secciones de tejidos de PTCs primarios y sus correspondientes metástasis a nódulos linfáticos. Sorprendentemente, el

análisis de la densidad de inmunotinción de TLR4 evidenció un incremento significativo ($P < 0,05$) de la expresión de TLR4 en los tejidos metastásicos con respecto al tejido del tumor primario (Figura 14).

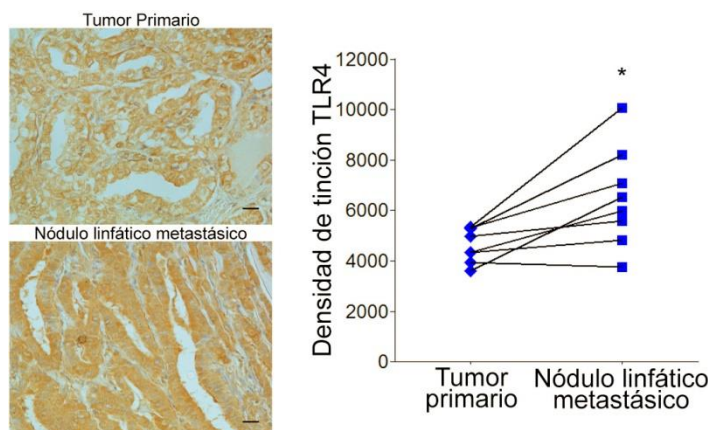


Figura 14. TLR4 se sobreexpresa en metástasis a nódulos linfáticos de PTCs respecto al tumor primario. Imágenes representativas de cortes histológicos de origen comercial (US Biomax), a 400x de magnificación, correspondientes a muestras apareadas ($n=8$) de tumor primario (PTC) y metástasis a nódulo linfático evaluados por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo policlonal de cabra anti-TLR4 (sc-16240, Santa Cruz Biotechnology). Las barras de escala representan 20 μm . La cuantificación de los niveles proteicos de TLR4 se expresa relativa al número de células en las secciones de tejidos (panel derecho). * $P < 0,05$ (*Paired t test*).

Como se comentó previamente, el cáncer diferenciado es la forma más común de cáncer de tiroides e incluye el PTC (70-80% de los casos) y el FTC (10-15% de los casos) (5). Si bien los resultados obtenidos a partir del análisis de *microarrays* de tejidos tiroideos evidenciaron expresión incrementada de TLR4 en PTCs y FTCs (Figura 11 A y B), decidimos continuar el estudio de la sobreexpresión de TLR4 focalizándonos sólo en el PTC dado que constituye la neoplasia tiroidea más prevalente.

En las siguientes secciones se describirán análisis bioinformáticos comparativos en muestras apareadas y estudios combinados de correlación utilizando los datos transcriptómicos de PTCs aportados por dos importantes bases de datos: el proyecto Del Atlas del Genoma del Cáncer (*The Cancer Genome Atlas*, TCGA), que ofrece el secuenciamiento del exoma completo (obtenido por NGS) de 496 PTCs junto al tejido normal adyacente de 59 de los casos (<http://cancergenome.nih.gov/>); y el estudio de la Expresión Génica Omnibus (*Gene Expression Omnibus*, GEO), que ofrece el perfil de expresión génica (obtenido por *microarrays*) de 49 PTCs junto al tejido normal adyacente de 45 de los casos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

4.1.1.3. Los niveles de ARNm de TLR4 se encuentran incrementados en muestras de PTCs

A partir de los datos moleculares derivados de la plataforma del TCGA ($n=59$) y la plataforma GSE33630 de GEO ($n=45$) se realizó un análisis comparativo de la expresión de TLR4 en muestras apareadas de tejido tumoral y el respectivo tejido normal adyacente. Como se evidenció para la expresión proteica, los niveles de ARNm de TLR4 fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) en los PTCs respecto al tejido tiroideo no tumoral adyacente (Figura 15 A y B).

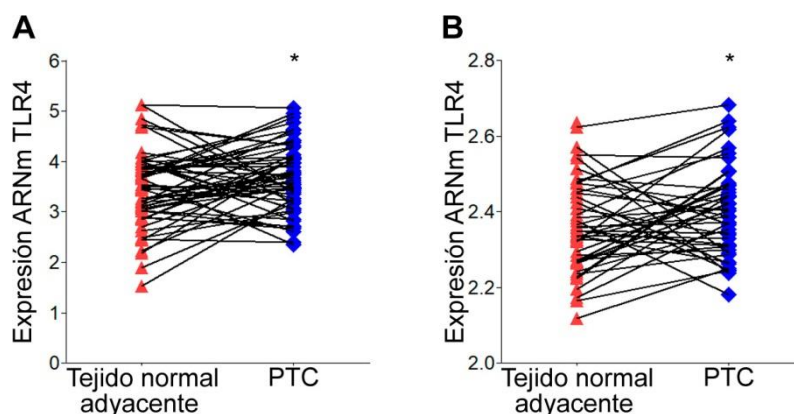


Figura 15. TLR4 se sobreexpresa en PTCs respecto al tejido normal adyacente. Análisis de la expresión de ARNm de TLR4 en muestras apareadas de tejido normal adyacente y PTC. **A)** Datos transcriptómicos de ARNseq se obtuvieron del *TCGA* (n=59). **B)** Datos transcriptómicos de *microarrays* se obtuvieron de la plataforma GSE33630 de *GEO* (n=45). * $P < 0,05$ (*Paired t test*).

4.1.1.4. Los niveles de ARNm de TLR4 no están asociados a la expresión diferencial de oncogenes en el PTC

La patogénesis de los tumores tiroideos radica en alteraciones genéticas producto de mutaciones puntuales o rearrreglos cromosomales que originan proteínas con actividad constitutiva (oncogenes) o la pérdida de la actividad de supresores tumorales. Estudios genéticos realizados en PTCs reportaron una frecuencia alta (70%) de alteraciones somáticas activantes de genes que codifican efectores de la vía de señalización de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs) incluyendo mutaciones puntuales en los genes BRAF y RAS, como así también fusiones cromosómicas involucrando tirosinas quinasas incluyendo RET y NTRK (17). Estas mutaciones casi siempre son mutuamente excluyentes, sugiriendo efectos corriente abajo similares o redundantes (95). Además, la falta de superposición entre fusiones RET/PTC y mutaciones BRAF y RAS indicaría que un único golpe oncogénico a lo largo de la vía de MAPKs proporciona suficiente activación de esta vía de señalización, que combinada con otros cambios llevarían a la transformación maligna de la célula folicular tiroidea (65). En base a estos antecedentes, se decidió estudiar si existe expresión diferencial de TLR4 entre PTCs que alberguen diferentes oncogenes. Para ello, se realizó un análisis bioinformático combinado de la expresión de ARNm de TLR4 en función de los oncogenes promotores de PTC más prevalentes, mediante la utilización de datos provistos por el *TCGA*.

En primer lugar se dividió los datos moleculares de pacientes con PTCs aportados por el *TCGA* en diferentes grupos de acuerdo a la expresión diferencial de conocidos oncogenes promotores de cáncer tiroideo. Luego se seleccionaron los grupos de tumores más representativos, con un número mayor a 10 pacientes ($n > 10$) y se procedió a examinar la expresión de ARNm de TLR4 entre los diferentes grupos de tumores. Como se muestra en la Figura 16 A no se evidenciaron diferencias significativas en la expresión de ARNm de TLR4 entre los grupos de tumores que albergan diferentes oncogenes, incluyendo mutaciones y fusiones cromosómicas. Sin embargo, se observó gran heterogeneidad en la expresión de TLR4 entre tumores que albergan un mismo oncogén (Figura 16 A). Por otro lado, es ampliamente conocido que la mutación BRAF^{V600E} es la mutación más frecuente del PTC, confiriendo peor pronóstico comparando con otros oncogenes (240). En consecuencia, se decidió dividir los datos transcriptómicos de PTCs en dos grupos de acuerdo a si contienen la mutación BRAF^{V600E} (n=234) o si no poseían dicha mutación (BRAF WT) (n=130) y luego se

evaluó la expresión de ARNm de TLR4 en ambos grupos. En concordancia con los resultados anteriores, no se evidenciaron cambios significativos en la expresión de ARNm de TLR4 entre pacientes BRAF^{V600E} y pacientes BRAF WT (Figura 16 B). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de TLR4 en el PTC podría estar regulada por una misma vía de señalización y que los niveles de expresión de TLR4 podrían depender del grado de activación de esa hipotética vía señalización, independientemente del origen de su estimulación.

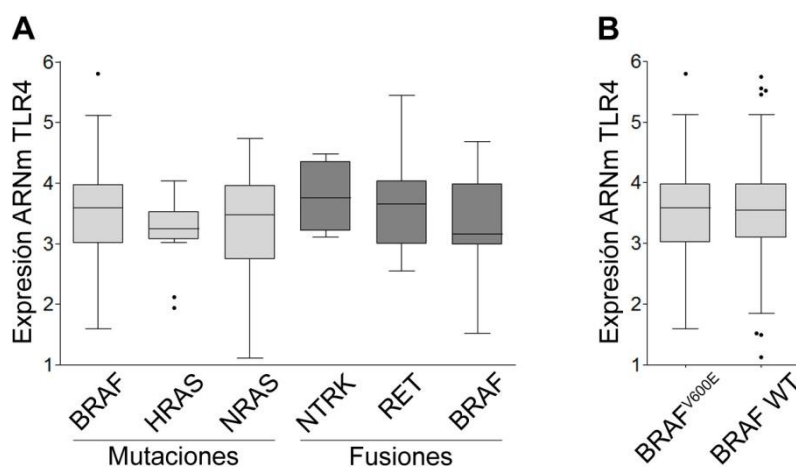


Figura 16. La expresión de TLR4 no varía en función la expresión de oncogenes promotores de cáncer de tiroides. **A)** Análisis de la expresión de ARNm de TLR4 en función de los oncogenes promotores tumorales más comúnmente identificados en el PTC, incluyendo mutaciones puntuales en BRAF (n=234), HRAS (n=14) y NRAS (n=34), como así también fusiones cromosómicas de tirosinas quinasa incluyendo NTRK (n=10), RET (n=32) y BRAF (n=12). **B)** Análisis de la expresión de ARNm de TLR4 en PTCs que expresan el oncogén BRAF^{V600E} (n=234) y PTCs con expresión de BRAF en estado nativo (BRAF WT) (n=130). Se grafica mediana y rango intercuartil. Datos transcriptómicos de ARNseq se obtuvieron del TCGA.

4.1.1. Conclusiones

Nuestros resultados indican que TLR4 es altamente expresado en PTCs y FTCs. En concordancia, hallamos incrementada expresión de TLR4 a nivel proteico y de ARNm en muestras apareadas de PTCs respecto al tejido normal adyacente. De manera interesante, evidenciamos mayor expresión proteica de TLR4 en muestras apareadas de metástasis a nódulos linfáticos de PTCs respecto a los tumores primarios. Además, demostramos que los PTCs no presentan expresión diferencial de ARNm de TLR4 en función de los oncogenes que albergan, sugiriendo que la sobreexpresión de TLR4 en el PTC podría estar regulada por una misma vía de señalización que respondería a la estimulación por diferentes oncogenes.

4.1.2. Niveles incrementados de TLR4 se asocian con características tumorales desfavorables en carcinomas papilares tiroideos

4.1.2.1. La activación exacerbada de la vía de señalización MAPK/ERK se correlaciona con niveles incrementados de ARNm de TLR4 en el PTC

La base de datos del *TCGA* ofrece la valoración de un parámetro denominado “*ERK score*” (18). Dicho *score* fue creado para determinar el grado de activación de ERK (y MAPK), otorgando un valor promedio para la expresión del ARNm de 52 genes oportunamente seleccionados por ser blancos de la inhibición de MEK en una línea celular BRAF^{V600E} positiva de melanoma (241). La utilización del *ERK score* cobró gran importancia al develar que PTCs portadores de la mutación BRAF^{V600E} presentan una activación de la vía MAPK/ERK más robusta y sostenida en el tiempo que tumores con mutaciones en RAS (18). Se reportó que la activación diferencial de la vía de MAPK/ERK en PTCs podría deberse a un mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por ERK fosforilado (pERK) en efectores corriente arriba de la vía de señalización (242) (Figura 5). Es conocido que el oncogén BRAF^{V600E} es un efector insensible a la retroalimentación ejercida por pERK, por lo tanto tumores que albergan esta mutación presentarían sobreactivación de la señalización MAPK/ERK (242) (Figura 5). En base a lo anterior, nos propusimos investigar si la expresión de TLR4 varía en función del grado de activación de la vía de señalización MAPK/ERK en PTCs. Para ello, a partir de los datos moleculares aportados por el *TCGA* se realizó un análisis bioinformático de correlación entre la expresión de ARNm de TLR4 y el *ERK score*.

Sorprendentemente, demostramos una correlación positiva estadísticamente significativa ($r_s=0,1280$, $P=0,0189$) entre los niveles de ARNm de TLR4 y la activación de ERK (Figura 17 A) al utilizar los datos moleculares otorgados por el *TCGA* de los PTCs que albergan los oncogenes clásicamente involucrados en la activación de la señalización de MAPK/ERK ($n=336$), oportunamente seleccionados en el análisis anterior (Figura 16 A). Adicionalmente, a partir de los 52 genes seleccionados en el estudio del *TCGA*, se realizó la valoración del *ERK score* utilizando los datos moleculares de la plataforma GSE33630 de *GEO* ($n=49$) para realizar el mismo análisis de correlación entre la expresión de ARNm de TLR4 y el grado de activación de ERK. De manera similar, evidenciamos una correlación positiva estadísticamente significativa ($r_s=0,3071$, $P=0,0318$) entre los niveles de ARNm de TLR4 y el *ERK score* (Figura 17 B). En su conjunto, estos resultados sugieren que la sobreactivación de la vía de señalización MAPK/ERK podría ser un evento involucrado para conducir la expresión de TLR4 en el PTC.

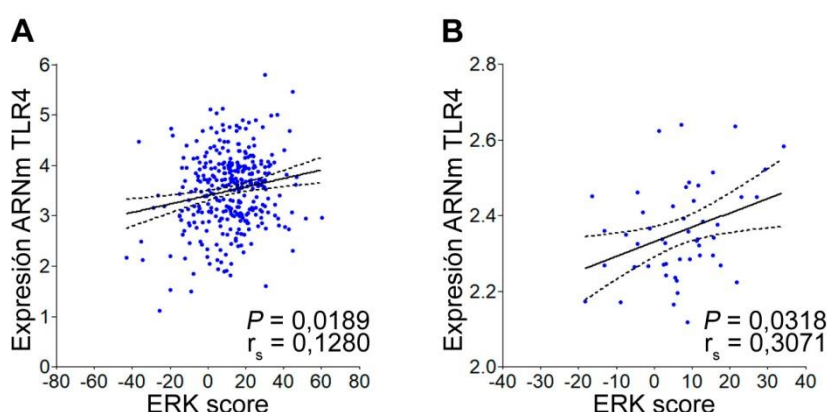


Figura 17. Correlación positiva entre los niveles de ARNm de TLR4 y la activación de ERK. Análisis de correlación entre la expresión de ARNm de TLR4 y el *score* de activación de ERK en PTCs. **A)** Datos

transcriptómicos de ARNseq se obtuvieron del TCGA (n=336). $P=0,0189$ (*Spearman's correlation test*). **B)** Datos transcriptómicos de *microarrays* se obtuvieron de la plataforma GSE33630 de GEO (n=49). $P=0,0318$ (*Spearman's correlation test*). El ERK score fue calculado en base al valor promedio de la expresión de 52 genes para evaluar la activación de la vía de señalización MAPK/ERK.

Complementariamente se realizó un análisis comparativo de la activación de ERK en muestras apareadas de tejido tumoral y el respectivo tejido normal adyacente a partir de los datos moleculares aportados por el TCGA (n=59). En acuerdo con la bibliografía, demostramos que la actividad de ERK es significativamente mayor ($P<0,0001$) en PTCs respecto al tejido tiroideo no tumoral adyacente (Figura 18 A). Resultados similares ($P<0,0001$) fueron obtenidos al realizar el mismo análisis comparativo utilizando los datos moleculares otorgados por la plataforma GSE33630 de GEO (n=45) (Figura 18 B), validando de esta manera la determinación del ERK score en la población de PTCs de esta base de datos.

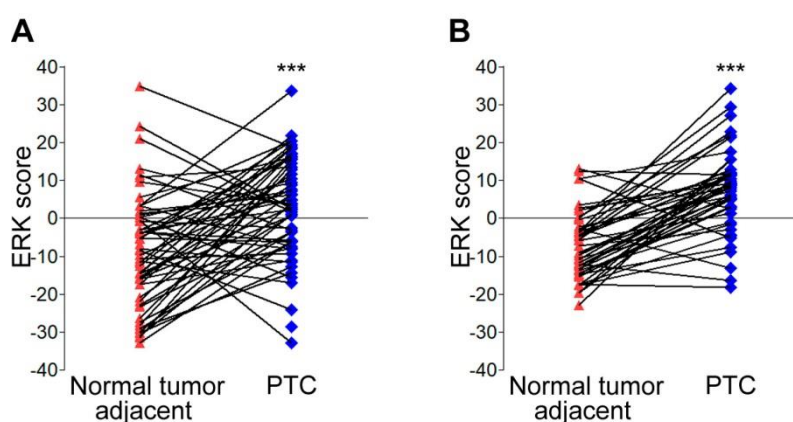


Figura 18. La actividad de ERK se encuentra incrementada en PTCs respecto al tejido normal adyacente. Análisis del ERK score en muestras apareadas de tejido normal adyacente y PTC. **A)** Datos transcriptómicos de ARNseq se obtuvieron del TCGA (n=59). * $P<0,0001$ (*Paired t test*). **B)** Datos transcriptómicos de *microarrays* se obtuvieron de la plataforma GSE33630 de GEO (n=45). * $P<0,0001$ (*Paired t test*). El ERK score fue calculado en base al valor promedio de la expresión de 52 genes para evaluar la activación de la vía de señalización MAPK/ERK.

4.1.2.2. Niveles incrementados de ARNm de TLR4 se correlacionan con mayor grado de diferenciación tiroidea en PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E}

La pérdida de diferenciación de la célula tiroidea juega un papel central en la progresión del cáncer de tiroides. La valoración de un parámetro denominado “score de diferenciación” otorgado por el TCGA (18), evalúa el grado de diferenciación tiroidea, confiriendo un score promedio para la expresión del ARNm de 16 genes relacionados al metabolismo y la función tiroidea normal. Si bien los PTCs se clasifican como tumores diferenciados, la utilización del score de diferenciación cobró gran relevancia al revelar que tumores portadores de la mutación BRAF^{V600E} son robustamente más indiferenciados que tumores que presentan diferentes mutaciones en RAS. Además, tumores BRAF^{V600E} positivos que presentan mutaciones en el promotor de una subunidad catalítica de la enzima Telomerasa, denominada Transcriptasa Reversa de la Telomerasa (TERT), son aún más indiferenciados que los tumores BRAF^{V600E} positivos con expresión de TERT en estado nativo. Estos hallazgos sugieren que dentro de la clasificación de PTCs, aquellos tumores que albergan conjuntamente la mutación BRAF^{V600E} y mutaciones en el promotor de TERT serían

potencialmente más agresivos (18). En base a estos antecedentes, se decidió estudiar si la expresión de TLR4 varía en función del grado de diferenciación en PTCs. Para ello, a partir de los datos moleculares de PTCs aportados por el TCGA (18) se realizó un análisis bioinformático de correlación entre la expresión de ARNm de TLR4 y el score de diferenciación en tumores que albergan la mutación BRAF^{V600E} con o sin mutaciones en el promotor de TERT.

En acuerdo con la bibliografía, demostramos que la gran mayoría de los tumores que albergan la mutación BRAF^{V600E} pertenecen a la categoría de tumores más indiferenciados (valores negativos de score) (Figura 19 A y B). El análisis de correlación entre los niveles de expresión de TLR4 y el score de diferenciación arrojó una asociación positiva no significativa ($r_s=0,1262$, $P=0,0736$) en el grupo de PTCs que alberga la mutación BRAF^{V600E} con expresión de TERT en estado nativo ($n=202$) (Figura 19 A). Esta falta de significancia estadística podría deberse a la homogeneidad del score de diferenciación en este conjunto de tumores. Cabe mencionar que no se encontraron diferencias significativas al realizar un análisis comparativo entre los niveles de ARNm de TLR4 de PTCs BRAF^{V600E} positivos con mutaciones en el promotor de TERT ($n=32$) y PTCs BRAF^{V600E} positivos con expresión de TERT en estado nativo ($n=202$) (datos no mostrados). Sin embargo, al realizar en análisis de correlación entre la expresión de ARNm de TLR4 y el score de diferenciación en la población completa de PTCs BRAF^{V600E} positivos ($n=234$) observamos una asociación positiva estadísticamente significativa ($r_s=0,1436$, $P=0,0302$) (Figura 19 B). Estos resultados pusieron en evidencia que la expresión de TLR4 es mayor en PTCs BRAF^{V600E} positivos más diferenciados y sugirieron que la sobreexpresión de TLR4 podría ocurrir en etapas iniciales de la tumorigénesis del PTC.

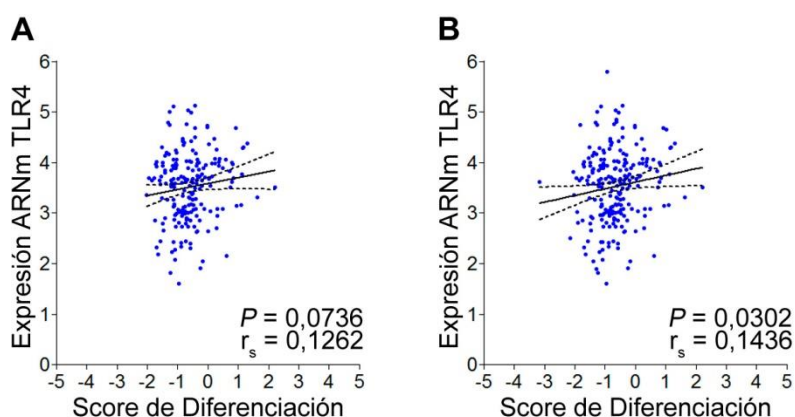


Figura 19. Correlación positiva entre los niveles de ARNm de TLR4 y el grado de diferenciación tiroidea en PTCs BRAF^{V600E} positivos. Análisis de correlación entre la expresión de ARNm de TLR4 y el score de diferenciación para: **A)** PTCs que albergan el oncogén BRAF^{V600E} con expresión de TERT en estado nativo exclusivamente ($n=202$). $P=0,0736$ (*Spearman's correlation test*). **B)** PTCs que albergan el oncogén BRAF^{V600E} con o sin mutaciones en el promotor de TERT ($n=234$). $P=0,0302$ (*Spearman's correlation test*). Datos transcriptómicos de ARNseq se obtuvieron del TCGA. El score de Diferenciación fue calculado en base al valor promedio de la expresión de 16 genes para evaluar el estado de desdiferenciación tiroidea.

4.1.2.3. Los niveles de ARNm de TLR4 no varían en función del predictor de pronóstico MACIS en PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E}

El sistema de estimación de pronóstico MACIS para el PTC es un método de estadificación ampliamente utilizado en la clínica. Asigna un score a los principales factores adversos involucrados y utiliza la suma de los scores para calcular el pronóstico. La letra "M"

describe si se presenta metástasis a distancia; la letra “A” se refiere a la edad al momento del diagnóstico del PTC; la letra “C” se refiere a si se realizó resección quirúrgica completa del tumor; la letra “I” describe si hubo invasión en áreas circundantes al cuello; la letra “S” hace referencia al tamaño tumoral. Dado que los PTCs son tumores bien diferenciados, la mayoría de los pacientes que presentan esta neoplasia pertenecen a la categoría de bajo riesgo (con un MACIS score menor a 6) (243) en comparación con los tumores anaplásicos y generalmente no presentan recidivas luego de la cirugía resectiva para el tumor. En base a lo anterior, nos propusimos investigar si la expresión de TLR4 varía en función del pronóstico en PTCs. Para ello, a partir de los datos moleculares aportados por el TCGA se realizó un análisis bioinformático de correlación entre la expresión de ARNm de TLR4 y el MACIS score, utilizando el grupo de tumores que albergan la mutación BRAF^{V600E}, sin mutaciones en el promotor de TERT. Cabe aclarar que se decidió excluir los tumores BRAF^{V600E} positivos con mutaciones en el promotor de TERT dado que estos tumores presentan un comportamiento tumoral diferente con menor grado de diferenciación tiroidea (18).

Observamos una asociación positiva no significativa ($r_s=0,1039$, $P=0,1548$) entre los niveles de ARNm de TLR4 y el predictor de pronóstico MACIS (Figura 20) en la población de PTCs BRAF^{V600E} positivos ($n=212$). La falta de significancia estadística podría deberse a las características de los pacientes, ya que los valores de MACIS score aportados en el TCGA eran bastante homogéneos y en su mayoría pertenecientes a la categoría de bajo riesgo (valores de score menores a 6).

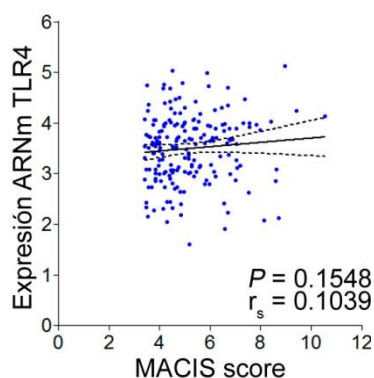


Figura 20. La expresión de TLR4 no varía en función del predictor de pronóstico MACIS. Análisis de correlación de la expresión de ARNm de TLR4 y el MACIS score en PTCs que albergan el oncogén BRAF^{V600E} ($n=212$) (con expresión de TERT en estado nativo). $P=0,1548$ (Spearman's correlation test). Los datos transcriptómicos de ARNseq y los valores de MACIS score se obtuvieron del TCGA.

4.1.2.4. Niveles incrementados de ARNm de TLR4 se asocian con una menor sobrevida libre de enfermedad en pacientes con PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E}

La sobrevida libre de enfermedad es un dato clínico ampliamente utilizado que indica el tiempo transcurrido en el cual un paciente que fue sometido a una cirugía para la resección de un tumor no presenta enfermedad detectable. Dado que la base de datos del TCGA ofrece la valoración de la supervivencia libre de enfermedad dentro de los datos aportados, nos propusimos investigar si existe una asociación entre los niveles de ARNm de TLR4 y este parámetro.

En primer lugar, antes de realizar el análisis de correlación se excluyó los tumores que presentaban mutaciones en el promotor de TERT. Seguidamente y dado que la expresión de TLR4 es muy heterogénea en PTCs BRAF^{V600E} positivos (Figura 16), se decidió

dividir este grupo de tumores en dos subgrupos de acuerdo a si presentaban valores de expresión de ARNm de TLR4 por encima o por debajo de la mediana de la población para luego comparar la supervivencia libre de enfermedad entre estos dos nuevos subgrupos. De manera interesante, el subgrupo de pacientes cuyo tumores mostraban niveles altos de expresión de TLR4 (n=88) presentó menor supervivencia libre de enfermedad respecto al subgrupo de pacientes que mostraban niveles bajos de expresión de TLR4 (n=97) (TLR4^{Alto}=26,63 meses vs TLR4^{Bajo}=31,24 meses, $P=0,0071$) (Figura 21). Estos resultados sugieren que la incrementada expresión de TLR4 podría constituir un potencial marcador de agresividad en PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E}.

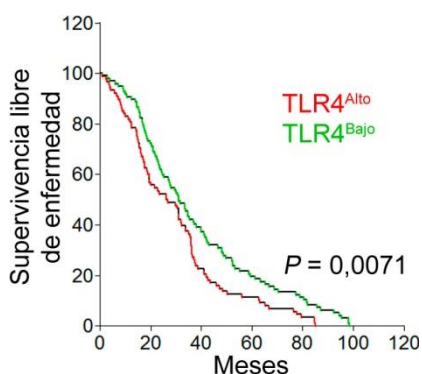


Figura 21. Pacientes con PTCs BRAF^{V600E} positivos que expresan niveles altos de TLR4 presentan menor supervivencia libre de enfermedad. Análisis de supervivencia libre de enfermedad en pacientes cuyos tumores albergan en oncogén BRAF^{V600E} (con expresión de TERT en estado nativo) con niveles de ARNm de TLR4 bajos (TLR4^{Bajo}, n=97) o altos (TLR4^{Alto}, n=88). $P=0,0071$ (Mantel-Cox test). Los datos transcriptómicos de ARNseq y los valores de supervivencia libre de enfermedad se obtuvieron del TCGA.

4.1.2. Conclusiones

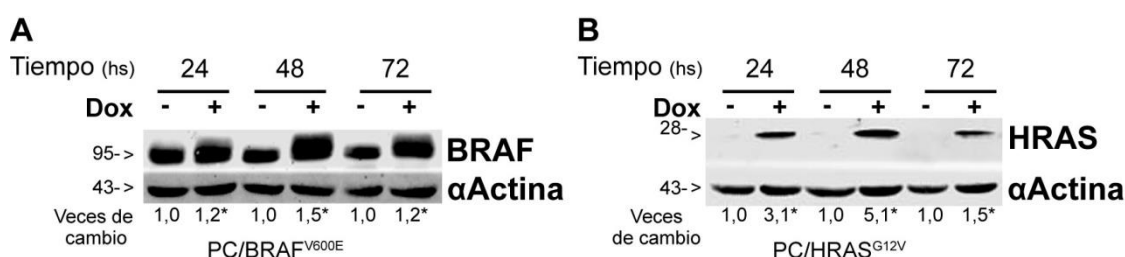
Hemos demostrado una asociación positiva entre niveles aumentados de ARNm de TLR4 y la activación de MAPK/ERK, sugiriendo que la sobreexpresión de TLR4 podría estar comandada por la sobre-activación de la señalización MAPK/ERK inducida por diferentes oncogenes en el PTC. Evidenciamos que niveles incrementados de ARNm de TLR4 se asocian con mayor grado de diferenciación tiroidea al estudiar la población de PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E} (con o sin mutaciones en el promotor de TERT), sugiriendo que la expresión de TLR4 es mayor en tumores más diferenciados. Sin embargo, hemos encontrado que pacientes con PTCs BRAF^{V600E} positivos (con el promotor de TERT en estado nativo) que expresaban niveles altos de ARNm de TLR4 presentaron menor supervivencia libre de enfermedad en comparación con pacientes con tumores que mostraron niveles bajos del receptor. Además, hemos observado una modesta asociación positiva entre la expresión de TLR4 y el predictor de pronóstico MACIS. Estos resultados sugieren que el incremento de la expresión de TLR4 podría servir como un indicador de peor pronóstico o como marcador de agresividad en PTCs que alberguen la mutación BRAF^{V600E}.

4.1.3. Oncogenes activantes de la vía de señalización MAPK/ERK inducen la expresión de TLR4

Como se comentó anteriormente, la activación de la vía RET-RAS-BRAF-MEK-ERK es crítica para la iniciación y/o progresión tumoral en el PTC (244). En este sentido, las alteraciones moleculares más prevalentes incluyen la mutación BRAF^{V600E} (40-45%), mutaciones en RAS (10-20%) (NRAS^{Q61K}, HRAS^{G12V} y KRAS^{G12D}) y fusiones cromosomales de RET (10-20%) (RET/PTC1 y RET/PTC3) (60). A través del análisis de la base de datos TCGA, hemos demostrado niveles altos de ARNm de TLR4 en PTCs, respecto al tejido tiroideo no tumoral adyacente (Figura 15), sin evidenciar diferencias significativas entre grupos de tumores que albergan diferentes oncogenes (Figura 16). Estos resultados sugirieron que la sobreexpresión de TLR4 podría estar regulada por una vía común en el PTC. En consecuencia, decidimos continuar el estudio de la sobreexpresión de TLR4 focalizándonos sólo en tumores que albergan los oncogenes más prevalentes del PTC. Para ello, se realizaron diferentes ensayos *in vitro* utilizando la línea celular tiroidea de rata PCCL3 modificada para la expresión condicional en respuesta a doxiciclina de las siguientes oncoproteínas: BRAF^{V600E} (células PC/BRAF^{V600E}), HRAS^{G12V} (células PC/HRAS^{G12V}) y RET/PTC3 (células PC/PTC3).

4.1.3.1. Expresión condicional de oncogenes en modelos celulares de PTC

Como primer abordaje metodológico para corroborar el funcionamiento de los sistemas celulares inducibles se semicuantificó la expresión de BRAF y HRAS mediante ensayos de western blot a partir de extractos proteicos totales de células PC/BRAF^{V600E} y PC/HRAS^{G12V} tratadas por diferentes períodos de tiempo con doxiciclina. Efectivamente el tratamiento con esta tetraciclina, durante todos los tiempos ensayados, indujo un aumento significativo de la expresión proteica de BRAF y HRAS (Figura 22 A y B). Complementariamente, mediante ensayos de inmunofluorescencia se semicuantificó la expresión proteica de BRAF en células PC/BRAF^{V600E} tratadas con doxiciclina durante 48 hs. Nuevamente, se observó un incremento significativo de la expresión proteica de BRAF en células tratadas con la droga (Figura 22 C). En su conjunto estos resultados demostraron un funcionamiento satisfactorio de los modelos celulares para la expresión condicional de las oncoproteínas BRAF^{V600E} y HRAS^{G12V}. Además, se demostró mayor inducción de la expresión de los oncogenes luego de 48 hs de tratamiento con doxiciclina respecto a 24 o 72 hs (Figura 22 A y B). Por consiguiente, se decidió fijar el tiempo de tratamiento con doxiciclina para futuras determinaciones en 48 hs (al menos que se indique lo contrario).



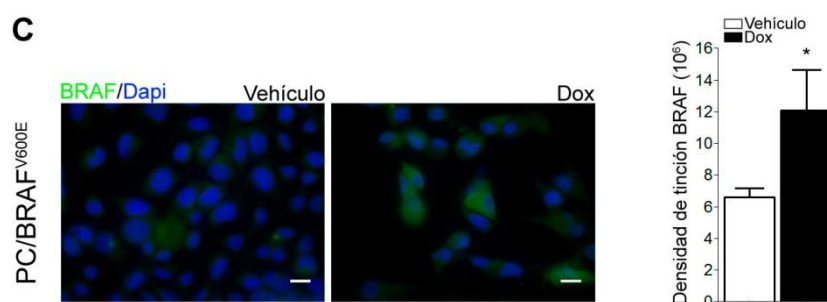


Figura 22. El tratamiento con doxiciplina induce la expresión proteica de BRAF^{V600E} y HRAS^{G12V} en modelos celulares de PTC. A) y B) Western Blots realizados a partir de extractos proteicos totales de células PC/BRAF^{V600E} y PC/HRAS^{G12V}, respectivamente. Se muestran niveles de expresión de BRAF (95 kDa) y HRAS (21 kDa) en respuesta al tratamiento con doxiciplina (Dox) (1 µg/ml) por diferentes tiempos. αActina (43 kDa) fue utilizada como control de carga. La cuantificación de los niveles proteicos de BRAF y RAS se expresan relativa al nivel de expresión de αActina. El nivel proteico de BRAF y RAS de células no tratadas se definió arbitrariamente como 1. Los resultados se muestran como veces de cambio con respecto a la expresión de BRAF o HRAS en células no tratadas. * $P < 0,05$ (*unpaired Student's t test*). La imagen mostrada es representativa de tres experimentos realizados de manera independiente (n=2). C) Imágenes de inmunofluorescencia representativas evaluando la expresión proteica de BRAF (sc-166, Santa Cruz Biotechnology) en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E} inducida por doxiciplina (Dox) (1 µg/ml) durante 48 hs. Se muestra la superposición de imágenes obtenidas para la marcación inmunofluorescente de BRAF (verde) y la marcación fluorescente del núcleo con Dapi (azul). Las barras de escala representan 10 µm. La cuantificación de los niveles proteicos de BRAF se expresa relativa al número de células por campo microscópico (panel derecho). Los resultados se muestran como media ± DS. * $P < 0,05$ vs células tratadas con vehículo (*unpaired Student's t test*). El gráfico mostrado es representativo de tres experimentos realizados de manera independiente (n=6).

Estudios realizados sobre líneas celulares diferenciadas de tiroides demostraron que la expresión de los oncogenes BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3 promueven la pérdida de marcadores de diferenciación como la acumulación de yoduro y la transición epitelio-mesénquima (245, 246). Se reportó que la pérdida de la capacidad de acumular yoduro se debe a una disminución de la expresión proteica del transportador de Na⁺/I⁻ (NIS) en la membrana plasmática de la célula tiroidea o a causa de una relocalización celular del transportador (245-247). En este sentido, mediante ensayos de captación de yodo radioactivo (¹³¹I) y análisis de inmunofluorescencia se decidió evaluar la dediferenciación de la célula tiroidea inducida por la expresión condicional de los oncogenes BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3.

En primer lugar, se evaluó el efecto de la expresión de los diferentes oncogenes sobre la captación de yoduro. Para ello, células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 en estado basal (cultivadas 4 días en medio de cultivo carente de TSH y reducido en suero) fueron incubadas con doxiciplina (en presencia de TSH). Según lo esperado, se evidenció una disminución de la captación de yoduro luego de la inducción de la expresión de los oncogenes mediante el tratamiento con doxiciplina en las tres líneas celulares estudiadas (Figura 23 A). A modo de control, se utilizó perclorato (ClO₄⁻), inhibidor competitivo del transporte de yoduro mediado por NIS.

En consecuencia, se decidió evaluar si la disminución de la captación de yoduro se debe a una disminución de los niveles proteicos de NIS y/o a una redistribución de la proteína. Para ello, mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta estudiamos la expresión y localización celular de NIS en respuesta al tratamiento con doxiciplina en las líneas celulares PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3. Como se especulaba, la inducción de

la expresión de los oncogenes mediante el tratamiento con la tetraciclina produjo una redistribución de NIS desde la membrana plasmática hacia el citoplasma celular en las tres líneas celulares evaluadas (Figura 23 B). Además, el nivel de expresión proteica de NIS fue significativamente menor luego del tratamiento con doxiciclina en la línea celular PC/PTC3 (Figura 23 B). Sin embargo, no se evidenciaron cambios significativos en la expresión proteica de NIS, a los tiempos estudiados, en las líneas PC/BRAF^{V600E} y PC/HRAS^{G12V} (Figura 23 B). En su conjunto, estos resultados demostraron un satisfactorio funcionamiento de los modelos celulares ya que se confirmó la pérdida de la diferenciación de la célula tiroidea mediada por la expresión condicional de los oncogenes en estudio.

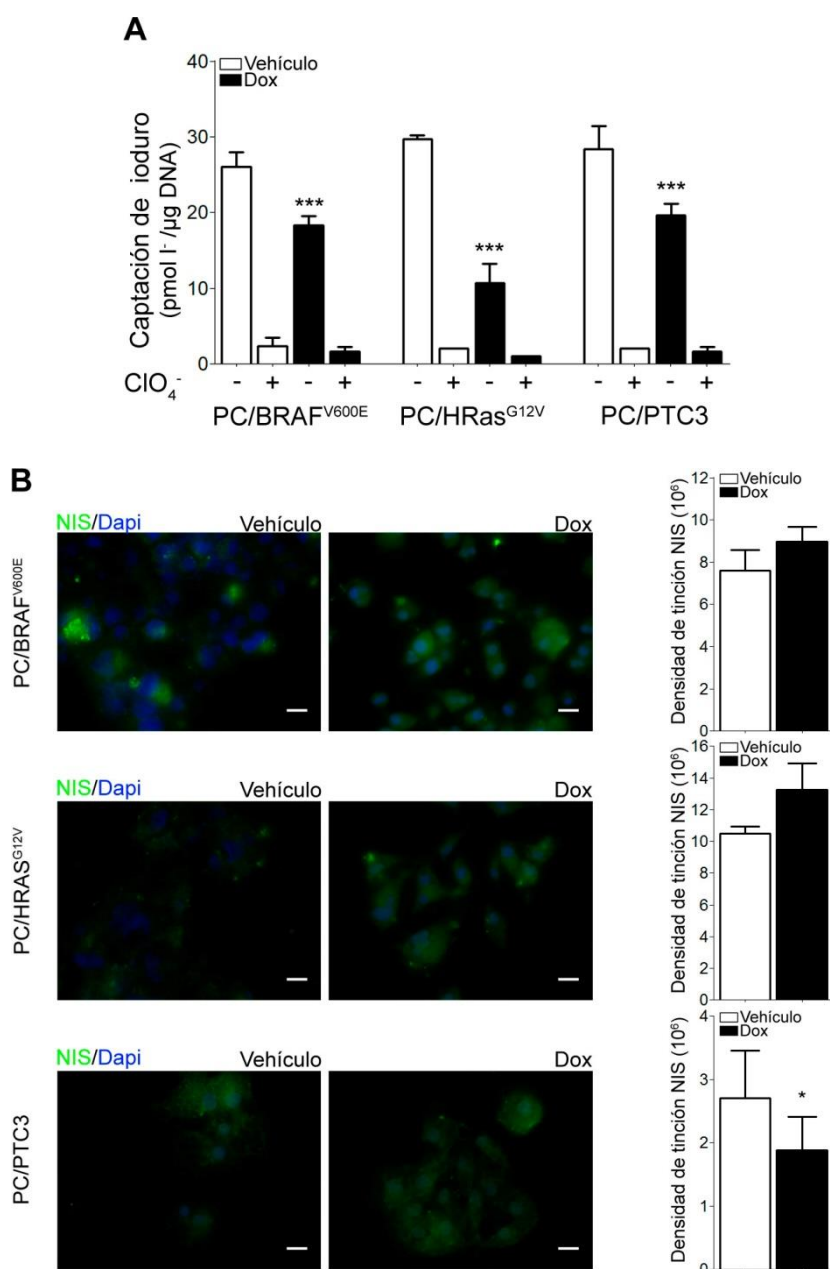


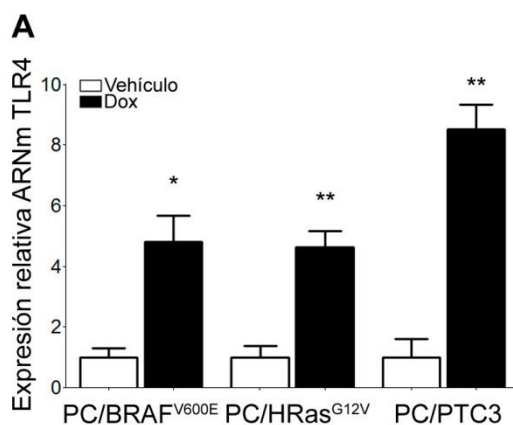
Figura 23. La expresión condicional de oncogenes disminuye la captación de yoduro e induce una redistribución de NIS en modelos celulares de PTC. A) Análisis de la captación de yoduro en células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3. Células en estado basal fueron tratadas con doxiciclina (Dox) (1 µg/ml) durante 48 hs. El Perclorato (ClO₄⁻) (80 µmol/l) se utilizó como inhibidor competitivo del transporte de yoduro mediado por NIS. Los resultados (media ± DS) se expresan en pmoles de yoduro/µg de ADN (pmol I⁻/µg ADN) y corresponden a un experimento representativo de dos

experimentos independientes (n=4). *** $P < 0,001$ vs células tratadas con vehículo (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*). **B)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia evaluando la expresión proteica de NIS en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} o RET/PTC3 inducida por doxiciclina (Dox) (1 µg/ml) durante 48 hs. Se muestra la superposición de imágenes obtenidas para la marcación inmunofluorescente de NIS (verde) y la marcación fluorescente del núcleo con Dapi (azul). La cuantificación de los niveles proteicos de NIS se expresa relativa al número de células por campo microscópico (paneles derechos). Los resultados se muestran como media ± SEM y corresponden a dos experimentos independientes (n=6). * $P < 0,05$ vs células tratadas con vehículo (*unpaired Student's t test*).

4.1.3.2. La expresión condicional de oncogenes promotores de PTC induce la expresión de TLR4

Para investigar el efecto de la expresión de los oncogenes más prevalentes del PTC sobre la expresión de TLR4, se evaluaron los cambios en los niveles de ARNm de TLR4 en respuesta a la inducción de la expresión de las oncoproteínas mediante análisis de RT-PCR a tiempo real. Sorprendentemente, células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 tratadas con doxiciclina mostraron un incremento significativo de los niveles de ARNm de TLR4 (Figura 24 A). Cabe mencionar, a modo de control, que no se evidenciaron cambios significativos en los niveles de ARNm de TLR4 luego del tratamiento con doxiciclina en células PCCL3 nativas que no contienen expresión de genes heterólogos (datos no mostrados).

Adicionalmente, se semicuantificó la expresión proteica de TLR4 mediante ensayos de western blot a partir de extractos proteicos totales de células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 tratadas o no con doxiciclina. La expresión de TLR4 fue detectada en condiciones basales en todas las líneas celulares (Figura 24 B). Coincidentemente, demostramos que la expresión de los oncogenes en estudio incrementa significativamente los niveles proteicos de TLR4 (Figura 24 B). De manera similar, la transfección transiente de un vector de expresión para el oncogén BRAF^{V600E} en la línea tiroidea humana no tumoral Nthy-ori 3-1 durante un período de 48 hs incrementó significativamente los niveles de expresión proteica de TLR4 en comparación con células transfectadas con un vector vacío (Figura 24 B). La determinación de la fosforilación de ERK (pERK) se utilizó como control de la señalización gatillada por los oncogenes en estudio (Figura 24 B). Sin embargo, el modesto incremento de pERK en células PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 tratadas con doxiciclina, como se mencionó anteriormente, podría estar asociado a un efecto de retroalimentación negativa de la vía de señalización en estas células (Figura 5).



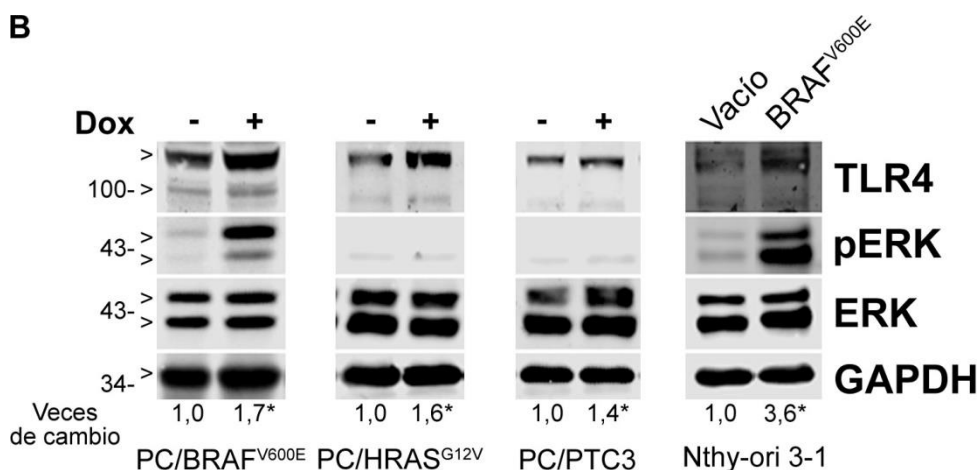


Figura 24. La expresión condicional de oncogenes incrementa los niveles de expresión de TLR4 en modelos celulares de PTC. A) Evaluación de los niveles de ARNm de TLR4 por RT/qPCR. El ARN total se extrajo de células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 tratadas o no con doxiciclina (Dox) (1 µg/ml) durante 48 hs. Los niveles de ARNm de TLR4 se grafican relativamente a la expresión de β-Actina. Los resultados (media ± DS) se indican como veces de cambio con respecto al ARNm de TLR4 de células tratadas con vehículo. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs células tratadas con vehículo (*unpaired Student's t test*). El gráfico mostrado es representativo de tres experimentos realizados de manera independiente (n=3). **B)** Western Blots realizados a partir de extractos proteicos totales de células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V}, PC/PTC3 y Nthy-ori 3-1. Se muestran niveles de expresión de TLR4 (130/110 kDa) en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} o RET/PTC3 inducida por doxiciclina (Dox) (1 µg/ml) durante 48 hs o en respuesta a la transfección transiente del vector de expresión para BRAF^{V600E} humano durante 48 hs. La fosforilación de ERK (pERK) (42/44 kDa) indica la señalización gatillada por los oncogenes. GAPDH (37 kDa) fue utilizada como control de carga. La cuantificación de los niveles proteicos de TLR4 se expresa relativa al nivel de expresión de GAPDH. El nivel de expresión de TLR4 en células no tratadas o células Nthy-ori 3-1 transfectadas con el vector vacío se definió arbitrariamente como 1. Los resultados se expresan como veces de cambio con respecto a la expresión de TLR4 en células no tratadas o en células transfectadas con el vector vacío. * $P < 0,05$ vs células no tratadas o células transfectadas con el vector vacío (*unpaired Student's t test*). La imagen mostrada es representativa de tres experimentos realizados de manera independiente (n=2).

La expresión proteica de TLR4 fue identificada principalmente en la membrana plasmática de sistemas celulares fenotípicamente respondedores a su ligando exógeno LPS (248). Sin embargo, en diferentes líneas celulares o tejidos capaces de responder a la endotoxina se demostró una localización intracelular del mencionado receptor (135).

Mediante inmunofluorescencia indirecta en células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 no permeabilizadas, se estudió la expresión de TLR4. En el análisis microscópico se observó tinción positiva de TLR4, sugiriendo una localización confinada a la membrana plasmática tanto en células en condiciones basales como en células tratadas con doxiciclina (Figura 25). Además, como se especulaba, se evidenció un incremento significativo de la expresión proteica de TLR4 luego de la expresión condicional de los oncogenes mediante el tratamiento con doxiciclina (Figura 25).

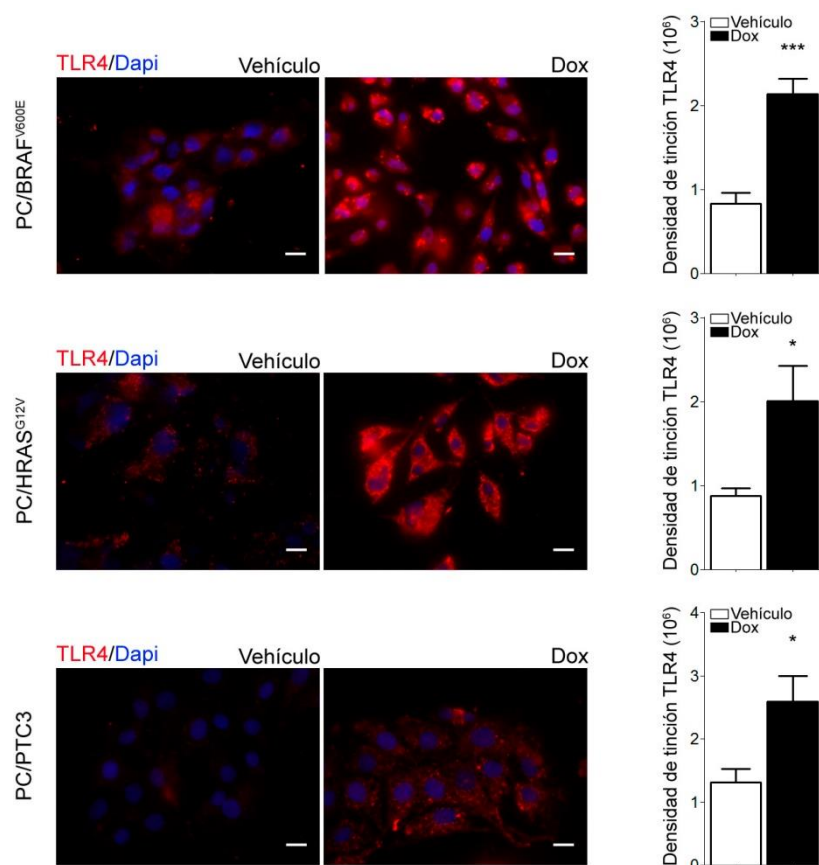


Figura 25. La expresión condicional de oncogenes incrementa los niveles proteicos de TLR4 en la membrana plasmática en modelos celulares de PTC. Imágenes representativas de inmunofluorescencia evaluando la expresión proteica de TLR4 (ab-22048, Abcam) en condiciones no permeabilizadas en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} o RET/PTC3 inducida por doxiciclina (Dox) (1 µg/ml) durante 48 hs. Se muestra la superposición de imágenes obtenidas para la marcación inmunofluorescente de TLR4 (rojo) y la marcación fluorescente del núcleo con Dapi (azul). Las barras de escala representan 10 µm. La cuantificación de los niveles proteicos de TLR4 se expresa relativa al número de células por campo microscópico (paneles derechos). Los resultados se muestran como media ± SEM y corresponden a tres experimentos independientes (n=6).* $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$ vs células tratadas con vehículo (*unpaired Student's t test*).

4.1.3.3. Los PTCs desarrollados en ratones transgénicos con expresión de BRAF^{V600E} en la célula folicular tiroidea presentan niveles incrementados de TLR4

Como se mencionó anteriormente, la mutación más frecuente del PTC es la mutación BRAF^{V600E}, la cual confiere peor pronóstico en comparación con otros oncogenes (18). Un número creciente de reportes demuestran que BRAF^{V600E} se correlaciona con metástasis, recurrencia tumoral (249) y mayor mortalidad (250). Además, BRAF^{V600E} estimula más activamente la vía de invasión dependiente de MEK a través de la expresión de metaloproteinasas de matriz en comparación con RET/PTC, lo que en parte, podría explicar el fenotipo más agresivo (245). Se cree que la mutación BRAF^{V600E} ocurre tempranamente en el desarrollo del PTC ya que está presente en microcarcinomas papilares que constituyen una etapa temprana de este tipo de cáncer (251). En correlación, el desarrollo de ratones transgénicos Tg-BRAF^{V600E} con expresión de BRAF^{V600E} dirigida específicamente a células tiroideas (bajo el control del promotor de tiroglobulina) promueve el desarrollo de PTC con características morfológicas y fenotípicas similares al PTC humano y además dan progresión a PDTTC. La utilización de este modelo de PTC demostró que el oncogén BRAF^{V600E} podría

servir como un iniciador tumoral y que a su vez promueve la progresión tumoral hacia un fenotipo indiferenciado (65). En base a estos antecedentes, se decidió evaluar el impacto de la actividad oncogénica de BRAF^{V600E} sobre la expresión de TLR4 *in vivo*, utilizando ratones transgénicos Tg-BRAF^{V600E}.

En primer lugar, se obtuvieron cortes de tejido tiroideo de ratones transgénicos para la expresión de BRAF^{V600E} y ratones controles no transgénicos de la misma camada a diferentes edades (5, 12 y 30 semanas) y se procedió a evaluar mediante inmunohistoquímica la expresión proteica de TLR4. En concordancia con los resultados obtenidos a partir de *microarrays* de tejidos tiroideos humanos (Figura 11 A y B), demostramos niveles incrementados de TLR4 en todos los PTCs provenientes de ratones transgénicos en comparación con el tejido tiroideo normal de ratones controles a las mismas semanas de edad (datos no mostrados). Sin embargo, el mayor incremento de la densidad de tinción de TLR4 se evidenció en los PTCs provenientes de ratones transgénicos de 5 semanas de edad (Figura 26 A). Complementariamente, evaluamos la expresión de ARNm de TLR4 mediante PCR a tiempo real a partir de muestras de PTCs de ratones transgénicos (n=8) y tejidos tiroideos de ratones controles (n=7) de las mismas camadas a las 5 semanas de edad. De acuerdo con lo obtenido en la expresión proteica de TLR4, observamos un incremento significativo en los niveles de ARNm de TLR4 en los PTCs de ratones transgénicos en comparación con el tejido normal tiroideo de ratones controles (Figura 26 B). En conjunto, estos resultados sugieren que la sobreexpresión de TLR4 podría ser un evento que ocurre en etapas tempranas de la iniciación tumoral del PTC. Además, el progresivo descenso de la expresión de TLR4 observado en PTCs de ratones transgénicos a edades avanzadas (datos no mostrados) sugiere que la sobreexpresión de TLR4 podría estar en dependencia continua de la actividad oncogénica de BRAF^{V600E}. Estos hallazgos podrían explicarse debido a la limitante particular de este modelo animal de PTC ya que a medida que el tumor progresa la dediferenciación tiroidea produce una disminución de la actividad del promotor de tiroglobulina y en consecuencia provoca el descenso de los niveles de expresión de BRAF^{V600E} (65).

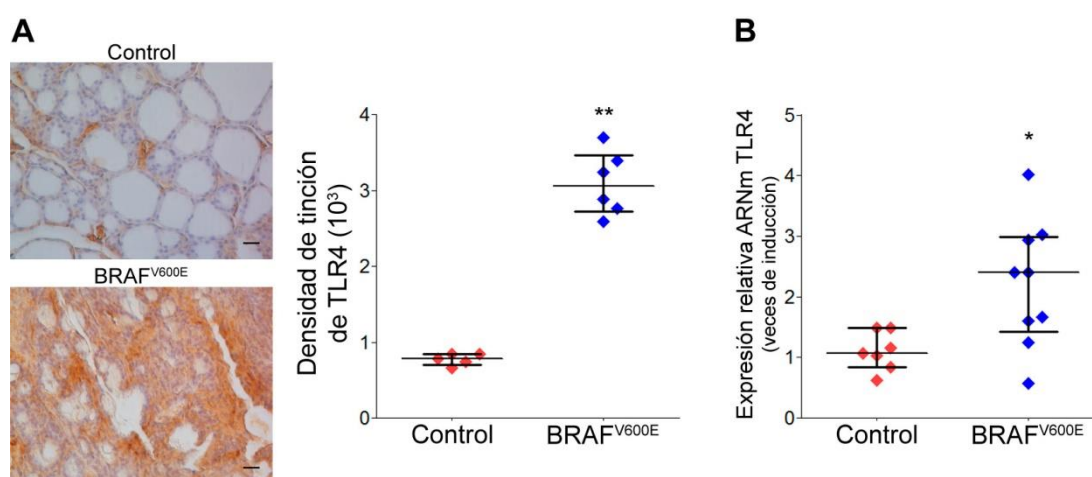


Figura 26. La expresión de BRAF^{V600E} dirigida al tejido tiroideo de ratones transgénicos incrementa los niveles de expresión de TLR4. A) Imágenes representativas de cortes histológicos, a 400x de magnificación, correspondientes a tejidos tiroideos de ratones controles (n=5) y ratones transgénicos (Tg-BRAF^{V600E}) (n=6) de 5 semanas de edad, mostrando los niveles de expresión proteica de TLR4 evaluados por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-TLR4 (ab-22048, Abcam). Las barras de escala representan 20 μ m. La cuantificación de los niveles proteicos de TLR4 se expresa relativa al número de células de las secciones de tejidos (panel derecho). Los resultados se muestran como mediana y rango intercuartil. *** $P < 0,001$ vs control

(*Mann-Whitney t test*). **B)** Evaluación de los niveles de ARNm de TLR4 por RT/qPCR. El ARN total se extrajo de tejidos tiroideos de ratones controles (n=7) y ratones transgénicos (Tg-BRAF^{V600E}) (n=8) de 5 semanas de edad. Los niveles de ARNm de TLR4 se grafican relativos a la expresión de β -Actina. La cuantificación de los niveles de ARNm de TLR4 se expresa como mediana y rango intercuartil y se indica como veces de cambio con respecto al ARNm de TLR4 de ratones controles. * p<0.05 vs control (*Mann-Whitney t test*).

4.1.3. Conclusiones

Nuestros resultados demostraron que los oncogenes promotores de cáncer de tiroides más prevalentes inducen el incremento de la expresión proteica y de ARNm de TLR4 *in vitro*. En correlación, hemos demostrado que TLR4 está altamente expresado en tumores tiroideos en un modelo murino de PTC BRAF^{V600E} positivo.

4.1.4. Expresión funcional de TLR4 en modelos celulares de cáncer de tiroides

4.1.4.1. La expresión condicional de oncogenes promotores de PTC induce la activación de la vía de señalización de NF- κ B

Como se mencionó anteriormente, la señalización de NF- κ B desempeña un importante rol sobre la carcinogénesis tiroidea a través de su contribución a la inhibición de la apoptosis (158), la inducción de un estado inflamatorio crónico (158, 252) y la promoción de la invasividad tumoral (253). Se describió que las proteínas oncogénicas RET/PTC, RAS y BRAF pueden inducir la activación de NF- κ B en carcinomas tiroideos, reportándose además actividad constitutiva de NF- κ B particularmente en tumores tiroideos anaplásicos (158). Sin embargo, el mecanismo por el cual incrementa la actividad de NF- κ B en tumores tiroideos aún no fue definido. En base a estos antecedentes, se decidió evaluar la activación de NF- κ B en función de la expresión condicional de los oncogenes en los modelos celulares de PTC. Para ello, células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 fueron transfectadas transientemente con un vector de respuesta a la actividad de NF- κ B (5x κ B-Luc) y luego se realizó el tratamiento con doxiciclina durante 48 hs. Como se especulaba, la inducción de la expresión de los oncogenes mediante la utilización de la tetraciclina produjo un incremento significativo de la actividad transcripcional del vector (Figura 27). Estos resultados confirmaron que los oncogenes BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3 producen la activación de la vía de señalización de NF- κ B.

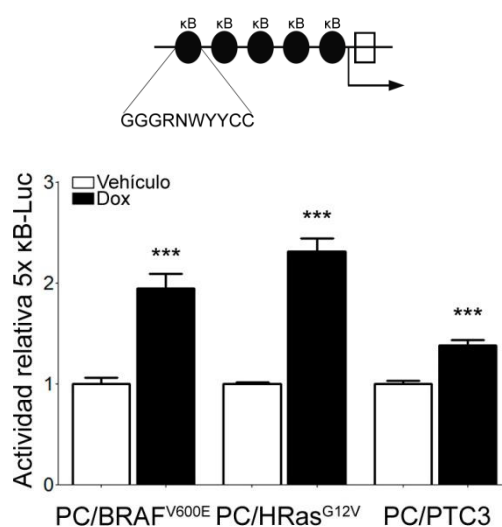


Figura 27. La expresión condicional de oncogenes incrementa la actividad de la señalización de NF- κ B en modelos celulares de PTC. Células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 fueron transfectadas con el vector reportero de la actividad de NF- κ B (5x κ B-Luc) (panel superior) 5'- GGGRNWWYYCC -3' (N: cualquier base, R: purina, W: adenina o timina, Y: pirimidina). Se cotransfectó el vector de expresión de β -galactosidasa (β -gal) para normalizar los resultados. Luego de la transfección, las células fueron incubadas con doxiciclina (Dox) (1 μ g/ml) durante 48 hs. La cuantificación de la actividad de luciferasa se expresa relativa a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados (media \pm SEM) se indican como veces de cambio con respecto a la actividad transcripcional de células tratadas con vehículo y corresponden a cuatro experimentos independientes (n=3). *** P<0,001 vs células tratadas con vehículo (*unpaired Student's t test*).

Adicionalmente, mediante inmunofluorescencia demostramos que la inducción de la expresión del oncogén BRAF^{V600E} mediante el tratamiento con doxiciclina en células

PC/BRAF^{V600E} produce el reclutamiento nuclear de la subunidad p65, sin modificación de los niveles proteicos totales (Figura 28).

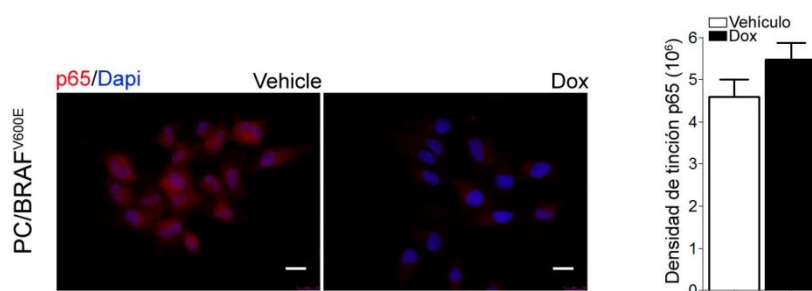


Figura 28. La expresión condicional del oncogén BRAF^{V600E} induce el reclutamiento nuclear de p65. Imágenes representativas de inmunofluorescencia evaluando la expresión proteica de p65 (#4764, Cell Signaling) en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E} inducida por doxiciclina (Dox) (1 µg/ml) durante 48 hs. Se muestra la superposición de imágenes obtenidas para la marcación inmunofluorescente de p65 (rojo) y la marcación fluorescente del núcleo con Dapi (azul). Las barras de escala representan 10 µm. La cuantificación de los niveles proteicos de p65 se expresa relativa al número de células por campo microscópico (panel derecho). Los resultados se muestran como media ± SEM y corresponden a dos experimentos realizados de manera independiente (n=6).

4.1.4.2. La señalización de TLR4 potencia la activación de NF-κB inducida por el oncogén BRAF^{V600E}

Todos los TLRs señalizan a través de la activación del factor de transcripción NF-κB (254). Para investigar si la señalización de TLR4 contribuye a la actividad transcripcional de NF-κB en células que expresan el oncogén BRAF^{V600E}, se evaluó la activación de NF-κB mediante el clásico experimento de ensayo de reportero en respuesta al tratamiento con doxiciclina y/o LPS. De igual manera que en el experimento anterior, se transfectó transientemente el vector 5x κB-Luc en células PC/BRAF^{V600E}. Luego las células fueron incubadas con doxiciclina por 48 hs y durante las últimas 24 hs de tratamiento se incubó con LPS y el inhibidor específico de NF-κB, BAY 11-7082. Como era esperado, se observó un incremento significativo de la actividad transcripcional del vector reportero en respuesta al tratamiento con doxiciclina (Figura 29). Sorprendentemente, la estimulación de TLR4 mediante el tratamiento con LPS potenció significativamente la activación de NF-κB inducida por el oncogén BRAF^{V600E} (Figura 29). Se observó una inhibición significativa del efecto de LPS en presencia de BAY 11-7082, confirmando la participación de NF-κB como mediador de la señalización inducida por la activación de TLR4. Sin embargo, células en condiciones basales no incrementaron la actividad transcripcional del reportero luego del tratamiento con LPS (Figura 29), posiblemente debido a la baja expresión de TLR4 en la membrana celular de esta línea celular en condiciones basales (Figura 25). Si bien el propio oncogén BRAF^{V600E} es capaz de señalizar a través de NF-κB por un mecanismo aún desconocido, este resultado demuestra que la estimulación de TLR4 potencia la activación de la vía de señalización de NF-κB en células que albergan la mutación BRAF^{V600E}.

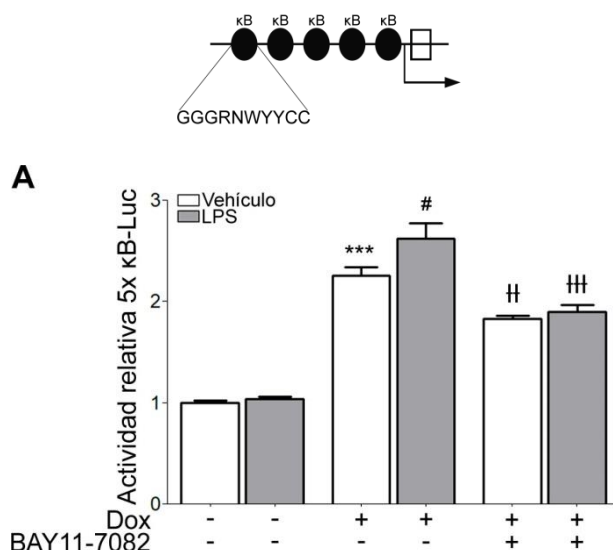


Figura 29. Células PC/BRAF^{V600E} responden a la activación de TLR4 potenciando la señalización de NF-κB. A) Células PC/BRAF^{V600E} fueron transfectadas con el vector reportero de la actividad de NF-κB (5x κB-Luc) (panel superior) 5'- GGGRNWWYCC -3' (N: cualquier base, R: purina, W: adenina o timina, Y: pirimidina). Se cotransfectó el vector de expresión de β-galactosidasa (β-gal) para normalizar los resultados. Luego de la transfección, las células fueron incubadas con doxiciclina (Dox) (1 μg/ml) por 48 hs y con LPS (1000 ng/ml) y BAY 11-7082 (4 μM) durante las últimas 24 hs del tratamiento. El inhibidor de NF-κB, BAY 11-7082 fue utilizado como control de especificidad de la activación de la vía de señalización. La cuantificación de la actividad de luciferasa se expresa relativa a la actividad de β-galactosidasa. Los resultados (media ± DS) se indican como veces de cambio con respecto a la actividad transcripcional de células tratadas con vehículo. *** $P < 0,001$ vs células tratadas con vehículo, # $P < 0,05$ vs misma condición en ausencia de LPS, † $P < 0,01$ y ‡ $P < 0,001$ vs misma condición en ausencia de BAY 11-7082 (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*). El gráfico mostrado es representativo de tres experimentos realizados de manera independiente (n=4).

Con el propósito de reforzar las observaciones anteriores se decidió evaluar si la señalización de TLR4 induce la expresión de genes blancos conocidos de la señalización de NF-κB en células que expresan el oncogén BRAF^{V600E}. Para ello, células PC/BRAF^{V600E} fueron incubadas con doxiciclina por 48 hs y durante las últimas 24 hs del tratamiento con LPS y el inhibidor BAY 11-7082. Luego se extrajo el ARN total y mediante análisis de RT-PCR en tiempo real se determinaron los niveles de expresión de ARNm de interleuquina 6 (IL-6) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), dos genes que dependientes de NF-κB. En correlación con el incremento de la actividad transcripcional de NF-κB inducido por la activación de TLR4, el tratamiento con LPS indujo un aumento significativo de los niveles de ARNm de IL-6 e iNOS en células que expresan el oncogén BRAF^{V600E} (Figura 30 A y B). Además, la inducción de la expresión de IL-6 e iNOS fue revertida por el tratamiento con el inhibidor BAY 11-7082 (Figura 30 A y B), confirmando la participación de NF-κB como mediador de la inducción de la expresión de estos genes.

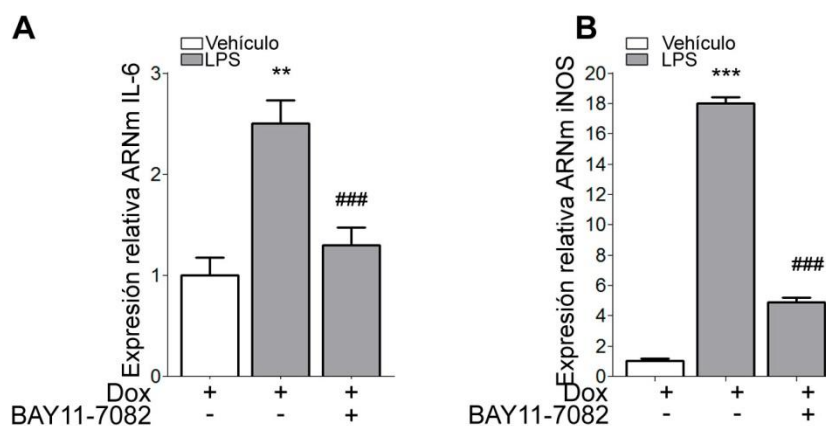


Figura 30. Células PC/BRAF^{V600E} responden a la activación de TLR4 induciendo la expresión de genes blancos de la señalización de NF-κB. Evaluación de los niveles de ARNm de IL-6 (A) e iNOS (B) por RT/qPCR. El ARN total se extrajo de células PC/BRAF^{V600E} tratadas con doxiciclina (Dox) (1 μg/ml) por 48 hs. El tratamiento con LPS (1000 ng/ml) y BAY 11-7082 (4 μM) se realizó durante las últimas 24 hs. El inhibidor de NF-κB, BAY 11-7082 fue utilizado como control de especificidad de la activación de la vía de señalización. Los niveles de ARNm de IL-6 e iNOS se grafican relativamente a la expresión de β-Actina. Los resultados (media ± DS) se indican como veces de cambio con respecto al ARNm de IL-6 e iNOS en células tratadas con vehículo. ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ vs células tratadas con vehículo. ### $P < 0,001$ vs misma condición en ausencia del inhibidor (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*). Los gráficos mostrados son representativos de tres experimentos realizados de manera independiente (n=3).

4.1.4.3. TLR4 se expresa en líneas tumorales tiroideas humanas que albergan la mutación BRAF^{V600E}

Como se mencionó anteriormente, el oncogén BRAF^{V600E} es el evento genético observado con mayor frecuencia (45-55%) en los PTCs (221). La mutación BRAF^{V600E} no fue identificada en pacientes con FTC, sin embargo se encuentra en el 20-25% de los ATCs posiblemente originados de PTCs preexistentes (5). Por tal motivo se decidió estudiar la expresión funcional de TLR4 en células humanas derivadas de PTC (BCPAP) y ATC (8505c y KTC2) que albergan la mutación BRAF^{V600E} (confirmada mediante secuenciación génica). Para ello, en primer lugar se determinó la expresión proteica de TLR4 en las tres líneas tumorales tiroideas mediante ensayos de western blot. Se utilizó como control positivo proteínas totales purificadas de células PC/BRAF^{V600E} tratadas o no con doxiciclina. Observamos una robusta expresión de TLR4 en todas las líneas tumorales analizadas (Figura 31). Sorprendentemente, la expresión basal de TLR4 fue significativamente mayor en las líneas anaplásicas (8505c y KTC2) respecto a la línea de tumor papilar (BCPAP) (Figura 31). No se hallaron diferencias en los niveles de expresión de BRAF entre las líneas tumorales humanas; sin embargo se evidenció un significativo incremento de la fosforilación de ERK (pERK) basal en ambas líneas anaplásicas (Figura 31), sugiriendo una vez más que la expresión de TLR4 podría estar asociada a una activación exacerbada de la vía de MAPK/ERK.

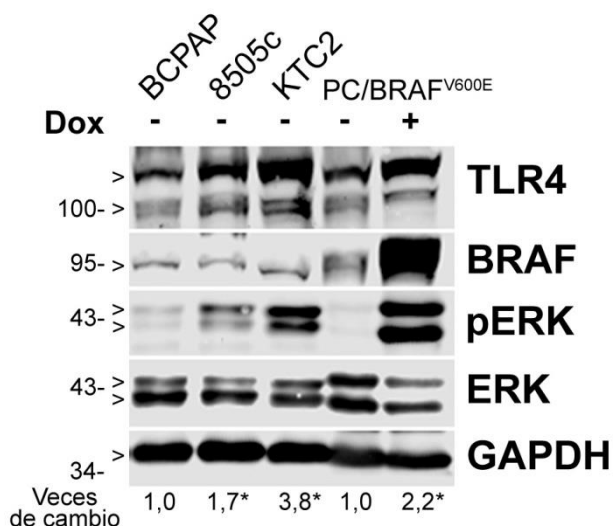


Figura 31. TLR4 se expresa en líneas tumorales tiroideas humanas BRAF^{V600E} positivas. Western Blot realizado a partir de extractos proteicos totales de células BCPAP, 8505c y KTC2 en estado basal. Se muestran los niveles de expresión de TLR4 (130/110 kDa). Se utilizó como control positivo la línea celular PC/BRAF^{V600E} tratada o no con doxiciclina (Dox) (1 µg/ml) durante 48 hs. La fosforilación de ERK (pERK) (42/44 kDa) indica la señalización gatillada por el oncogén. GAPDH (37 kDa) fue utilizada como control de carga. La cuantificación de los niveles proteicos de TLR4 se expresa relativa al nivel de expresión de GAPDH. El nivel de expresión de TLR4 en células BCPAP o en células PC/BRAF^{V600E} no tratadas se definió arbitrariamente como 1. Los resultados se expresan como veces de cambio (media ± DS) con respecto a la expresión de TLR4 en células BCPAP o en PC/BRAF^{V600E} no tratadas. * $P < 0,05$ vs células BCPAP (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*). * $P < 0,05$ vs células PC/BRAF^{V600E} no tratadas (*unpaired Student's t test*). La imagen mostrada es representativa de tres experimentos realizados de manera independiente (n=2).

4.1.4.4. La activación de TLR4 induce la vía de señalización de NF-κB en células BCPAP de PTC humano

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de TLR4 en células BCPAP de PTC humano portadoras de la mutación BRAF^{V600E}, se evaluó la activación de NF-κB mediante el clásico experimento de ensayo de reportero en respuesta a LPS. Además, se decidió evaluar la participación de los principales adaptadores intracelulares de la vía de NF-κB en el efecto desencadenado por LPS a través de la utilización de diferentes construcciones que codifican a proteínas con propiedades de dominantes negativas capaces de suplantar a las proteínas endógenas de la vía de señalización. Experimentalmente, células BCPAP fueron transfectadas de forma transiente con: el vector reportero de NF-κB (5x κB-Luc), un vector vacío, dos construcciones que expresan proteínas dominantes negativas incapaces de inducir señalización: Δ670-835 TLR4 (presenta el extremo carboxilo terminal deletado) y Δ152-296 MyD88 (presenta el motivo de unión a TLR4 deletado), y un vector de expresión codificando la mutante IκB-α AA (carente de las serinas 32 y 36 insensible a la fosforilación/degradación). Luego de un período de 24 hs, las células transfectadas fueron tratadas con LPS y BAY 11-7082 durante 24 hs. Como se especulaba, la estimulación con LPS (100 y 1000 ng/ml) mostró una inducción significativa de la actividad transcripcional del constructo 5x κB-Luc (Figura 32), confirmando la funcionalidad del receptor TLR4 en esta línea celular. Por otro lado, la especificidad del ensayo fue verificada por la inhibición de la activación de la señalización de NF-κB utilizando BAY 11-7082 (Figura 32). Además, como se puede observar en la Figura 32, en presencia de las proteínas dominantes negativas Δ670-

835 TLR4 y $\Delta 152-296$ MyD88 y la mutante $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ AA el tratamiento con LPS fue incapaz de inducir la señalización de NF- κB . En su conjunto, estos resultados sugirieron que la vía de señalización TLR4/MyD88/ $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ /NF- κB se encuentra funcionalmente conservada en esta línea celular de PTC humano.

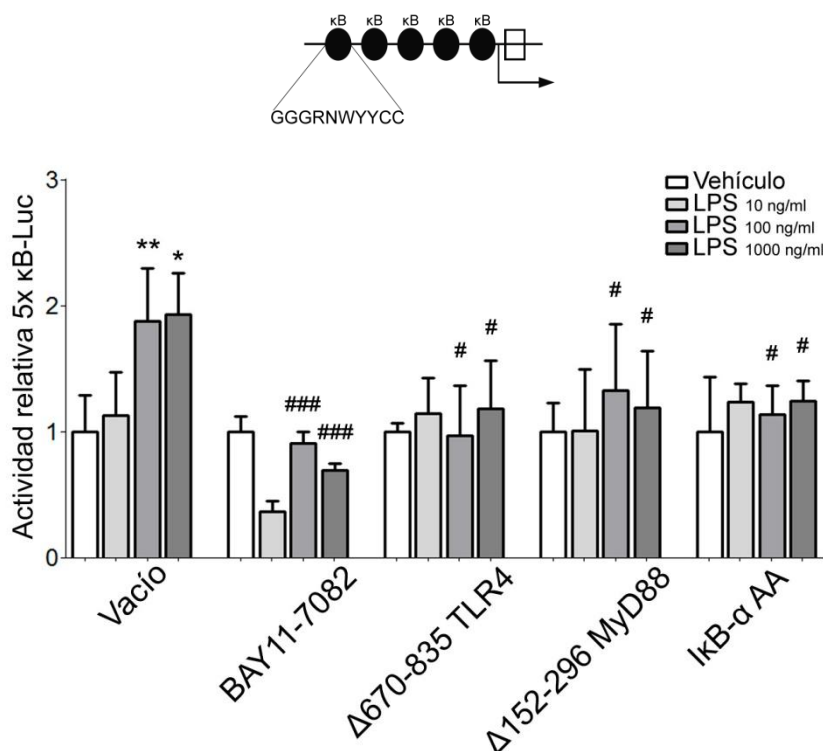


Figura 32. La activación de TLR4 induce la señalización de NF- κB en células BCPAP. Células BCPAP fueron transfectadas con el vector 5x κB -Luc (panel superior) 5'- GGGRNWWYYCC -3' (N: cualquier base, R: purina, W: adenina o timina, Y: pirimidina), el vector vacío, vectores de expresión para las dominantes negativas de TLR4 y MyD88 ($\Delta 670-835$ TLR4 y $\Delta 152-296$ MyD88) y el vector de expresión para la mutante de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ insensible a la fosforilación/degradación ($\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ AA). Se cotransfectó el vector de expresión de β -galactosidasa (β -gal) para normalizar los resultados. Luego de 24 hs de la transfección, las células fueron incubadas con LPS a concentraciones crecientes (10-1000 ng/ml) y BAY 11-7082 (4 μM) durante 24 hs. La cuantificación de la actividad de luciferasa se expresa relativa a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados (media \pm DS) se indican como veces de cambio con respecto a la actividad de células tratadas con vehículo en las mismas condiciones. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs células transfectadas con el vector vacío y tratadas con vehículo, # $P < 0,05$ y ### $P < 0,001$ vs misma condición en células transfectadas con el vector vacío (one-way ANOVA, Newman-Keuls test). El gráfico mostrado es representativo de tres experimentos realizados de manera independiente (n=4).

Adicionalmente, en células BCPAP se evaluó si la señalización de TLR4 induce la expresión de genes blancos para la señalización de NF- κB . Para ello, células BCPAP fueron incubadas con LPS y el inhibidor BAY 11-7082 durante 24 hs, luego se extrajo el ARN total y mediante análisis de RT-PCR a tiempo real se determinaron los niveles de expresión de ARNm de IL-6 e iNOS. Como era de esperar, el tratamiento con LPS indujo un incremento significativo de los niveles de ARNm de IL-6 e iNOS (Figura 33 A y B). Estos resultados están en correlación con el incremento de la actividad transcripcional de NF- κB en respuesta a la activación de TLR4 (Figura 32). Además, se confirmó la participación de NF- κB como mediador de la inducción de la expresión de estos genes ya que el tratamiento con BAY 11-7082 revirtió el efecto observado (Figura 33 A y B).

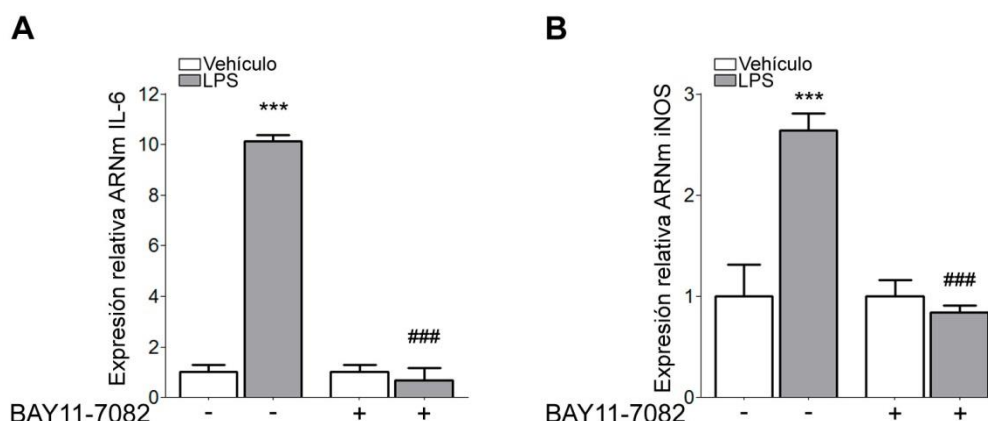


Figura 33. La activación de TLR4 incrementa los niveles de ARNm de IL-6 e iNOS en células BCPAP. Evaluación de los niveles de ARNm de IL-6 (A) e iNOS (B) por RT/qPCR. El ARN total se extrajo de células BCPAP incubadas con LPS (1000 ng/ml) y BAY 11-7082 (4 μ M) durante 24 hs. El inhibidor de NF- κ B, BAY 11-7082 fue utilizado como control específico de la activación de la vía de señalización. Los niveles de ARNm de IL-6 e iNOS se grafican relativamente a la expresión de β -Actina. Los resultados (media \pm DS) se indican como veces de cambio con respecto al ARNm de células tratadas con vehículo y corresponden a un experimento representativo de tres experimentos realizados de manera independiente (n=3). *** $P < 0,001$ vs células tratadas con vehículo, ### $P < 0,001$ vs células tratadas con LPS (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*).

4.1.4.5. La señalización de TLR4 activa la vía de señalización de NF- κ B en células 8505c y KTC2 de ATC humano

Para investigar si células derivadas ATC humano que albergan la mutación BRAF^{V600E} responden a la estimulación de TLR4, se extendió la evaluación de la activación de la vía de señalización de NF- κ B en respuesta a LPS utilizando las líneas celulares 8505c y KTC2. Para ello, células 8505c y KTC2 fueron transfectadas de forma transiente con el vector reportero de la actividad de NF- κ B (5x κ B-Luc) y constructos que codifican a proteínas con actividad dominante negativa de igual manera que se realizó en la línea celular BCPAP. La estimulación con LPS (10-1000 ng/ml) en ambas líneas celulares incrementó significativamente la actividad transcripcional de constructo 5x κ B-Luc, mientras que este efecto fue impedido al utilizar el inhibidor BAY 11-7082 y al expresar las mutantes no funcionales de TLR4, MyD88 e I κ B- α , anteriormente mencionadas (Figura 34) Estos resultados sugirieron que la vía de señalización TLR4/MyD88/I κ B- α /NF- κ B también se encuentra funcionalmente conservada en estas líneas de ATC humano.

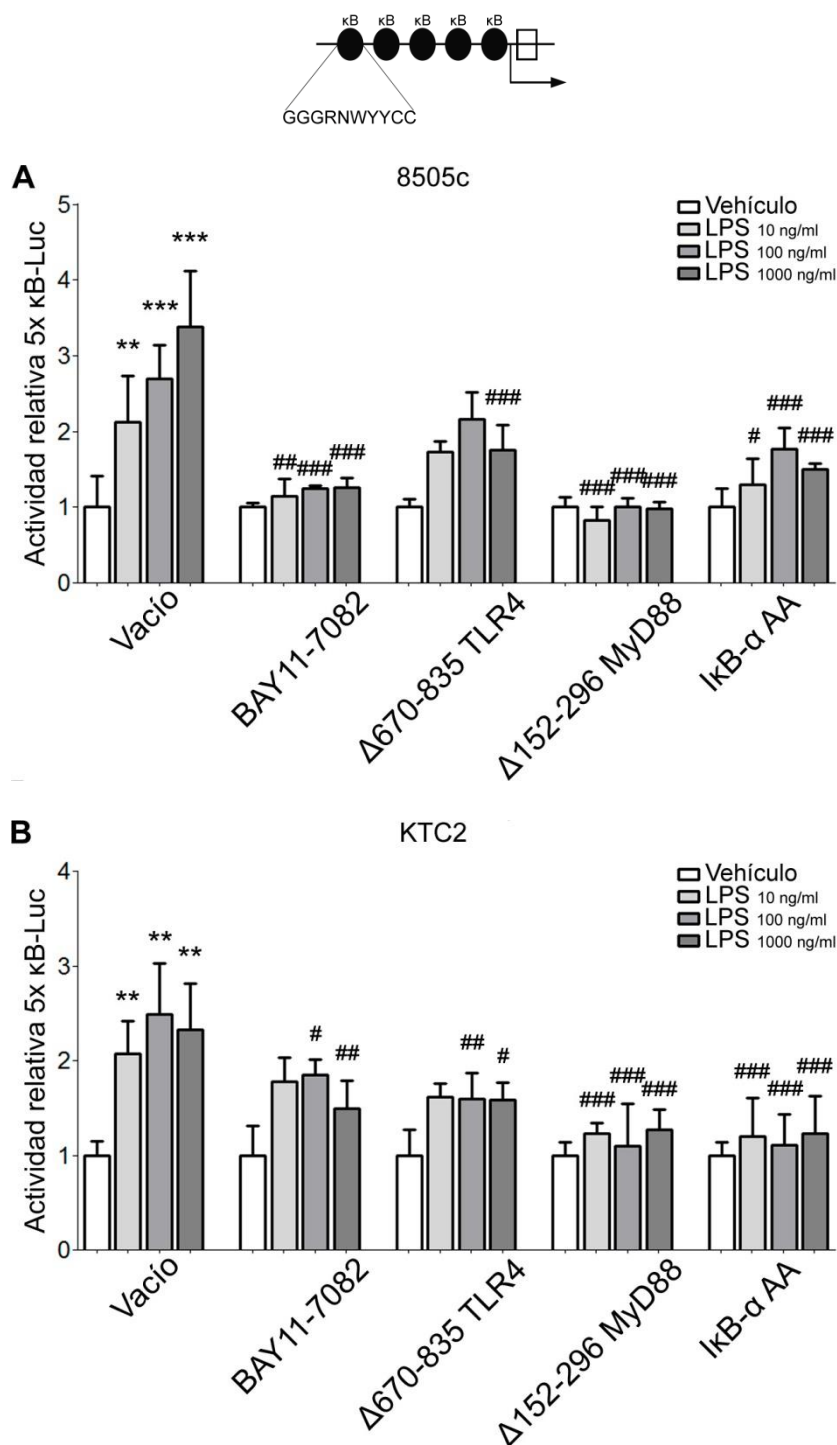
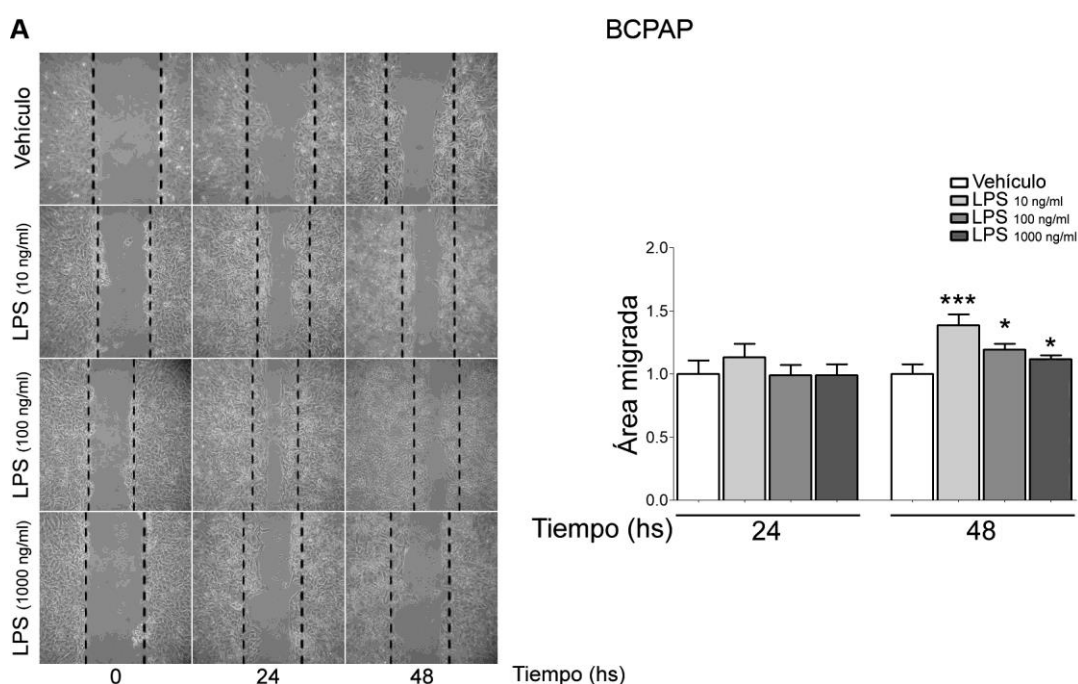


Figura 34. La activación de TLR4 induce la señalización de NF-κB en células 8505c y KTC2. Células 8505c (**A**) y KTC2 (**B**) fueron transfectadas con el vector 5x κB-Luc (panel superior) 5'- GGGRNWWYYCC -3' (N: cualquier base, R: purina, W: adenina o timina, Y: pirimidina), el vector vacío, vectores de expresión para las dominantes negativas de TLR4 y MyD88 (Δ670-835 TLR4 y Δ152-296 MyD88) y el vector de expresión para la mutante de IkB-α insensible a la fosforilación/degradación (IkB-α AA). Se cotransfectó el vector de expresión de β-galactosidasa (β-gal) para normalizar los resultados. Luego de 24 hs de la transfección, las células fueron incubadas con LPS a concentraciones crecientes (10-1000 ng/ml) y BAY 11-7082 (4 μM) durante 24 hs. La cuantificación de la actividad de luciferasa se expresa relativa a la actividad de β-galactosidasa. Los resultados (media ± DS) se indican como veces de cambio con respecto a la actividad de células tratadas con vehículo y en las mismas condiciones. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs células tratadas con vehículo, # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ vs células transfectadas con el vector vacío tratadas con LPS (*one-way ANOVA*, *Newman-Keuls test*). Los gráficos mostrados son representativos de dos experimentos realizados de manera independiente ($n=4$).

4.1.4.6. La señalización de TLR4 incrementa la migración celular en líneas tumorales tiroideas humanas con actividad oncogénica BRAF^{V600E}

La capacidad de un tumor en generar metástasis depende entre otros factores de la capacidad de la célula tumoral de degradar tejido extracelular, migrar, invadir y generar angiogénesis. La expresión del oncogén BRAF^{V600E} en la célula tumoral tiroidea se asoció con una mayor producción de metaloproteinasas e invasión celular dependiente de la activación de la vía de señalización de NF- κ B (160). En este sentido, se decidió evaluar la migración celular mediante ensayos de cierre de la herida (*wound-healing assays*). Experimentalmente, células BCPAP y 8505c se cultivaron en monocapa hasta alcanzar un 80-90% de confluencia. Posteriormente se realizaron heridas sobre la monocapa y se adicionó al medio de cultivo LPS y mitomicina como inhibidor de la proliferación celular. El cierre de la herida se evaluó en función del tiempo, obteniendo imágenes del cultivo por microscopía óptica. Como se observa en la Figura 35, el tratamiento con LPS produjo un incremento significativo de la migración celular en ambas líneas celulares evidenciada por un área de migración mayor. Estos resultados sugieren que la estimulación de TLR4 podría ser un evento importante en el inicio de los procesos de invasión y metástasis tumoral. Además, el incremento de la migración fue más pronunciado en la línea celular anaplásica 8505c (Figura 35 B), posiblemente debido a que esta línea presenta mayores niveles basales del receptor de TLR4.



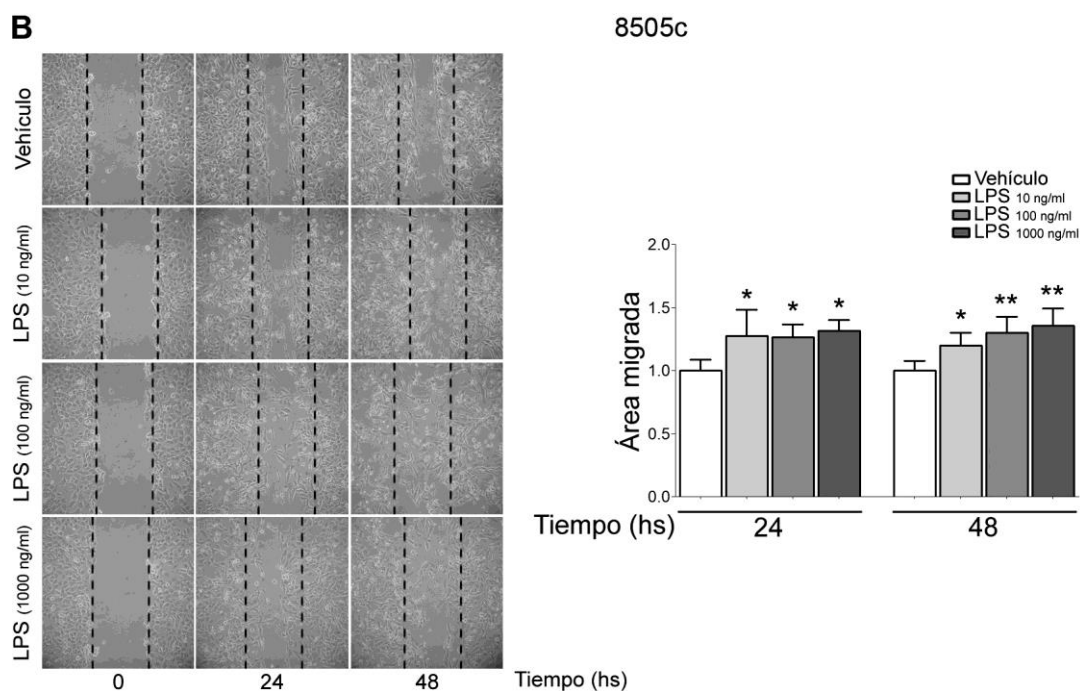


Figura 35. La activación de TLR4 incrementa la migración celular en las líneas BCPAP y 8505c. Imágenes representativas de ensayos del cierre de la herida en células BCPAP (A) y 8505c (B). Se muestra el área migrada en respuesta al tratamiento con LPS a concentraciones crecientes (10-1000 ng/ml) durante diferentes períodos de tiempo (24 y 48 hs). Para todas las condiciones se utilizó mitomicina (75 μ g/ml) como inhibidor de la proliferación celular. Los resultados (media \pm DS) se indican como veces de cambio con respecto a la migración de células tratadas con vehículo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs células tratadas con vehículo (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*). Los gráficos mostrados son representativos de dos experimentos realizados de manera independiente ($n=6$).

4.1.4. Conclusiones

En consistencia con informes anteriores (158), hemos demostrado que los oncogenes BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3 incrementan la actividad transcripcional de NF- κ B. De manera interesante, evidenciamos que la estimulación con un agonista de TLR4 potencia la actividad transcripcional de NF- κ B inducida por el oncogén BRAF^{V600E} y promueve la expresión de genes de respuesta pro-inflamatoria. Además, nuestros resultados indicaron que la activación de la señalización de NF- κ B a través de la estimulación de TLR4 ocurre principalmente a través de la vía “dependiente de MyD88” en modelos celulares humanos de cáncer de tiroides BRAF^{V600E} positivos. En concordancia, comprobamos que la activación de la señalización de TLR4 produce un incremento de la capacidad migratoria en estos modelos celulares de cáncer tiroideo. En su conjunto, nuestros hallazgos demuestran que en tumores tiroideos que albergan la mutación BRAF^{V600E} el receptor TLR4 es funcional y su señalización podría tener un potencial rol pro-metastásico.

4.1.5. La señalización MAPK/ERK regula la expresión de TLR4 en modelos celulares de cáncer de tiroides a través de factores de transcripción ETSs

4.1.5.1. La expresión condicional de oncogenes promotores de PTC incrementa la expresión de TLR4 a través de la señalización de MAPK/ERK

Como se mencionó anteriormente, el oncogén BRAF^{V600E} conduce la activación constitutiva de la vía de señalización MAPK/ERK al fosforilar directamente a MEK dirigiendo la transformación de la célula folicular tiroidea (10, 255). Para esclarecer si la vía de señalización MAPK/ERK está involucrada en la regulación de la sobreexpresión de TLR4 en respuesta a la acción del oncogén BRAF^{V600E}, se evaluó el efecto de los inhibidores específicos de BRAF^{V600E} (PLX4032) y MEK1/2 (UO126) sobre la expresión de TLR4 en células PC/BRAF^{V600E}. Para ello, se semicuantificó la expresión proteica de TLR4 mediante ensayos de western blot a partir de extractos proteicos totales de células PC/BRAF^{V600E} tratadas o no con doxiciclina por 48 hs y con los inhibidores PLX4032 y UO126 durante las últimas 16 hs, dado que a tiempos mayores estas drogas ocasionan un efecto rebote con incrementos contradictorios de ERK fosforilado (pERK) (256). Por consiguiente, se realizó el análisis del nivel de pERK para evaluar tanto la inducción de la actividad oncogénica de BRAF^{V600E} mediante el tratamiento con la tetraciclina, como para chequear la efectividad de la inhibición de la señalización de MAPK/ERK en respuesta al tratamiento con PLX4032 y UO126 (Figura 36 A). Como se especulaba, tanto la inhibición de BRAF^{V600E} como la de MEK1/2 produjo una disminución significativa de la sobreexpresión del receptor TLR4 en respuesta al tratamiento con doxiciclina (Figura 36 A). Adicionalmente, se determinó el nivel de expresión de ARNm de TLR4 mediante ensayos de RT-PCR a tiempo real realizados a partir de extractos de ARN total de células PC/BRAF^{V600E} tratadas o no con doxiciclina y los inhibidores químicos PLX4032 y UO126. En concordancia, el tratamiento con los mencionados inhibidores redujo significativamente la sobreexpresión del ARNm de TLR4 en respuesta al tratamiento con doxiciclina (Figura 36 A B). En su conjunto, estos resultados estarían en correlación con los hallazgos obtenidos a través del análisis de los datos aportados por el TCGA y GEO donde se demostró una asociación positiva entre la expresión de ARNm de TLR4 y la activación de MAPK/ERK (Figura 17).

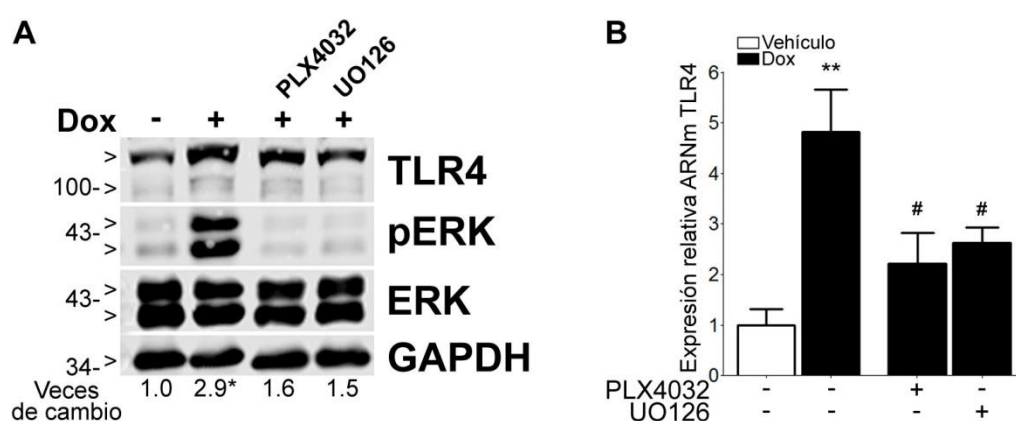


Figura 36. La señalización de MAPK/ERK regula la expresión de TLR4 en respuesta a la expresión condicional de BRAF^{V600E}. A) Western Blot realizado a partir de extractos proteicos totales de células PC/BRAF^{V600E}. Se muestran niveles de expresión de TLR4 (130/110 kDa) en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E} inducida por doxiciclina (Dox) durante 48 hs y al tratamiento con los inhibidores químicos PLX4032 o UO126 durante 16 hs. pERK (42/44 kDa) indica la señalización inducida por el oncogén y su inhibición. GAPDH (37 kDa) fue utilizada como control de carga. La cuantificación de los

niveles proteicos de TLR4 se expresa relativa al nivel de expresión de GAPDH. El nivel de expresión de células no tratadas se definió arbitrariamente como 1. Los resultados se expresan como veces de cambio con respecto a la expresión de TLR4 en células no tratadas. * $P < 0,05$ vs células no tratadas (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*). La imagen mostrada es representativa de tres experimentos realizados de manera independiente ($n=2$). **B**) Evaluación de los niveles de ARNm de TLR4 por RT/qPCR a partir de células PC/BRAF^{V600E}. Se muestran niveles de expresión de ARNm de TLR4 en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E} inducida por doxiciclina (Dox) durante 48 hs y al tratamiento con los inhibidores químicos PLX4032 o UO126 durante 16 hs. Los niveles de ARNm de TLR4 se grafican relativamente a la expresión de β -Actina. Los resultados (media \pm DS) se indican como veces de cambio con respecto al ARNm de TLR4 de células tratadas con vehículo. ** $P < 0,01$ vs células tratadas con vehículo y # $P < 0,05$ vs células tratadas con Dox (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*). El gráfico mostrado es representativo de tres experimentos realizados de manera independiente ($n=3$).

Dado que los oncogenes HRAS^{G12V} y RET/PTC3 también son capaces de activar constitutivamente la vía de señalización MARK/ERK, dirigiendo la transformación de la célula folicular tiroidea (18), se decidió evaluar si la sobreexpresión de TLR4 en respuesta a la expresión de los oncogenes HRAS^{G12V} y RET/PTC3 involucra esta vía de señalización. Para ello, del mismo modo que para las células PC/BRAF^{V600E}, se evaluó el efecto los inhibidores PLX4032 y UO126 sobre los niveles de expresión de ARNm de TLR4 en células PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 bajo el tratamiento con doxiciclina. Como se esperaba, el tratamiento con UO126 para la inhibición de MEK1/2 redujo la sobreexpresión de la expresión de ARNm de TLR4 en respuesta al tratamiento con doxiciclina en ambas líneas celulares (Figura 37 A y B). De acuerdo a lo esperado, el tratamiento con PLX4032 no tuvo efecto en la sobreexpresión del ARNm de TLR4 inducida por la tetraciclina (Figura 37 A y B), debido a que las líneas PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 expresan BRAF en estado nativo y el inhibidor PLX4032 es específico para la variante mutada de la oncoproteína.

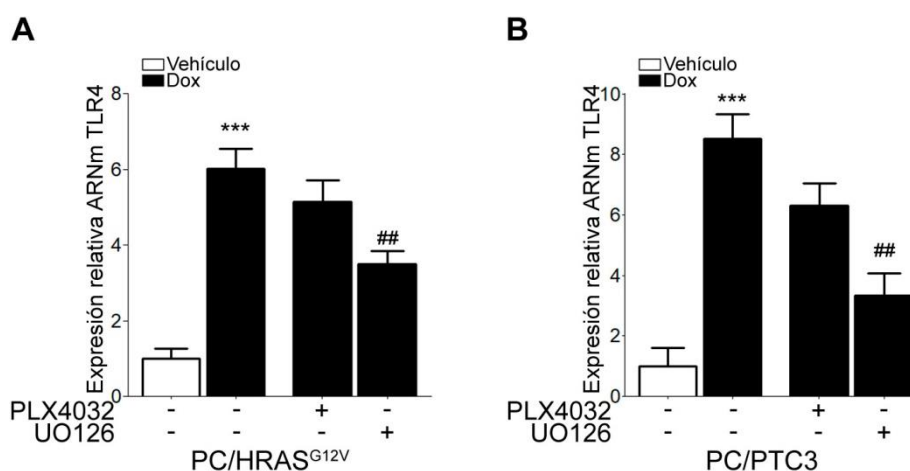


Figura 37. La señalización de MAPK/ERK regula la expresión de TLR4 en respuesta a la expresión condicional de HRAS^{G12V} y RET/PTC3. Evaluación de los niveles de ARNm de TLR4 por RT/qPCR a partir de células PC/HRAS^{G12V} (A) y PC/PTC3 (B). Se muestran niveles de expresión de ARNm de TLR4 en respuesta a la expresión de HRAS^{G12V} y RET/PTC3 inducido por doxiciclina (Dox) durante 48 hs y a PLX4032 y UO126 durante 16 hs. Los niveles de ARNm de TLR4 se grafican relativamente a la expresión de β -Actina. Los resultados (media \pm DS) se indican como veces de cambio con respecto al ARNm de TLR4 de células tratadas con vehículo. *** $P < 0,001$ vs células tratadas con vehículo y ## $P < 0,05$ vs células tratadas con Dox (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*). Los gráficos mostrados son representativos de tres experimentos realizados de manera independiente ($n=3$).

4.1.5.2. El oncogén BRAF^{V600E} a través de la señalización de MAPK/ERK regula la expresión de TLR4 en líneas tumorales tiroideas humanas

Para confirmar si la activación de la señalización de MAPK/ERK regula los niveles de expresión de TLR4 en células tumorales tiroideas humanas, el estudio del efecto de los inhibidores PLX4032 y UO126 se extendió utilizando las líneas tumorales BRAF^{V600E} positivas BCPAP, 8505c y KTC2. Para ello, mediante ensayos de western blot se analizó el nivel proteico de TLR4 a partir de extractos proteicos totales de las diferentes líneas celulares tratadas con PLX4032 y UO126 durante 16 hs. En coincidencia con los hallazgos anteriores, el tratamiento con los mencionados inhibidores químicos mostró una disminución significativa de los niveles proteicos de TLR4 en todas las líneas celulares evaluadas (Figura 38). Cabe mencionar que en la línea celular KTC2 se evidenció un efecto rebote (con un contradictorio aumento de pERK) durante el tratamiento con PLX4032; Sin embargo, no se vio afectada la inhibición de la expresión de TLR4 al tiempo ensayado.

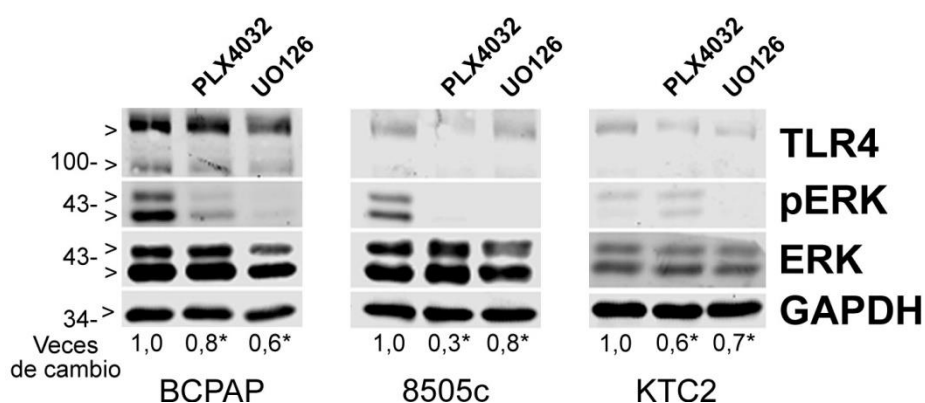


Figura 38. El oncogén BRAF^{V600E} regula la expresión proteica de TLR4 a través de la señalización de MAPK/ERK en células tumorales tiroideas humanas. Western Blots realizados a partir de extractos proteicos totales de células BCPAP, 8505c y KTC2. Se muestran niveles de expresión de TLR4 (130/110 kDa) en respuesta al tratamiento con los inhibidores químicos PLX4032 o UO126 durante 16 hs. La fosforilación de ERK (pERK) (42/44 kDa) fue utilizada para evaluar la inhibición de la señalización de MAPK/ERK en respuesta a los inhibidores. GAPDH (37 kDa) fue utilizada como control de carga. La cuantificación de los niveles proteicos de TLR4 se expresa relativa al nivel de expresión de GAPDH. El nivel de expresión de células no tratadas se definió arbitrariamente como 1. Los resultados se expresan como veces de cambio con respecto a la expresión de TLR4 en células no tratadas. * $P < 0,05$ vs células no tratadas (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*). La imagen mostrada es representativa de tres experimentos realizados de manera independiente ($n=2$).

Adicionalmente, se evaluó el efecto de PLX4032 y UO126 sobre los niveles de ARNm de TLR4 mediante ensayos de RT-PCR a tiempo real en células BCPAP y KTC2. En concordancia, el tratamiento con los inhibidores químicos disminuyó significativamente los niveles de ARNm de TLR4 en ambas líneas celulares (Figura 39). En su conjunto, estos resultados refuerzan la participación de la señalización MAPK/ERK en la regulación de la expresión de TLR4 inducida por el oncogén BRAF^{V600E}.

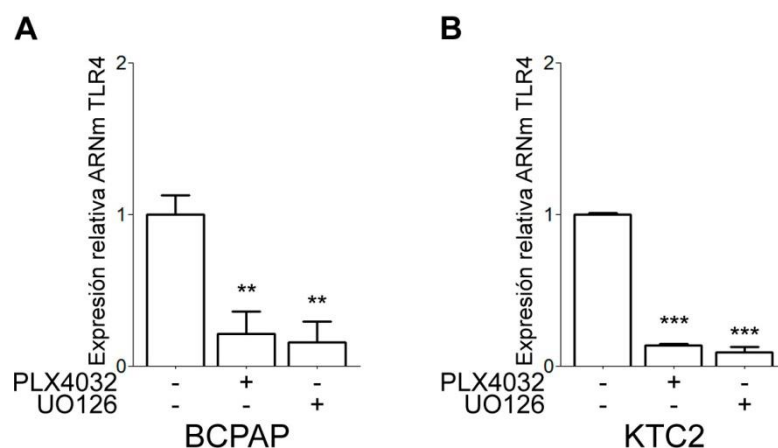


Figura 39. El oncogén BRAF^{V600E} regula la expresión de ARNm de TLR4 a través de la señalización de MAPK/ERK en células tumorales tiroideas humanas. Evaluación de los niveles de ARNm de TLR4 por RT/qPCR a partir de células BCPAP (A) y KTC2 (B). Se muestran niveles de expresión de ARNm de TLR4 en respuesta al tratamiento con los inhibidores químicos PLX4032 o UO126 durante 16 hs. Los niveles de ARNm de TLR4 se grafican relativamente a la expresión de β -Actina. Los resultados (media \pm DS) se indican como veces de cambio con respecto al ARNm de TLR4 de células no tratadas ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs células no tratadas (*one-way ANOVA*, *Newman-Keuls test*). Los gráficos mostrados son representativos de tres experimentos realizados de manera independiente (n=3).

4.1.5.3. La expresión condicional de oncogenes promotores de PTC induce la expresión transcripcional de TLR4

Roger *et al.* (235) caracterizaron el promotor de TLR4 en macrófagos de ratones. Estos autores describieron que la secuencia comprendida entre los nucleótidos -608 y +1 contiene varios sitios putativos de unión al ADN para factores de transcripción. Al respecto, dentro de la región que mantiene la actividad transcripcional basal del promotor (comprendida en la región -336/+1), identificaron cuatro sitios consensos de unión para factores de transcripción de la familia de proteínas de unión a Ets (ETSs) y un sitio consenso de unión para la familia de proteínas activadoras 1 (AP-1). Además, identificaron un motivo de unión para la familia de factores de transcripción GATA dentro de una región que reprime la actividad del promotor (comprendida en la región -500/-336). Por otro lado, demostraron experimentalmente que dos de los sitios consenso para ETSs (comprendida en la región -336/-104) eran necesarios para la actividad basal del promotor; el sitio consenso distal Ets (Ets^d) de esta región resultó ser esencial para la transcripción del gen, mientras que el sitio Ets proximal (Ets^p) aportó aproximadamente el 50% a la actividad basal del promotor.

En acuerdo con Roger *et al.* (235) la alineación y comparación de la región promotora de TLR4 de diferentes especies (humano, rata y ratón) mostró gran conservación de la secuencia y posicionamiento de diferentes elementos *cis*, independientemente de su localización respecto al sitio de inicio de la transcripción y la región promotora mínima (Figura 40). Las secuencias consenso Ets^p (posición -115 pb) y AP-1 (posición -140 pb) identificadas en el promotor de TLR4 de ratón se hallaron fuertemente conservadas en rata y humano. Sin embargo, la secuencia consenso Ets^d (posición -292 pb) se halló conservada sólo en rata (Figura 40).

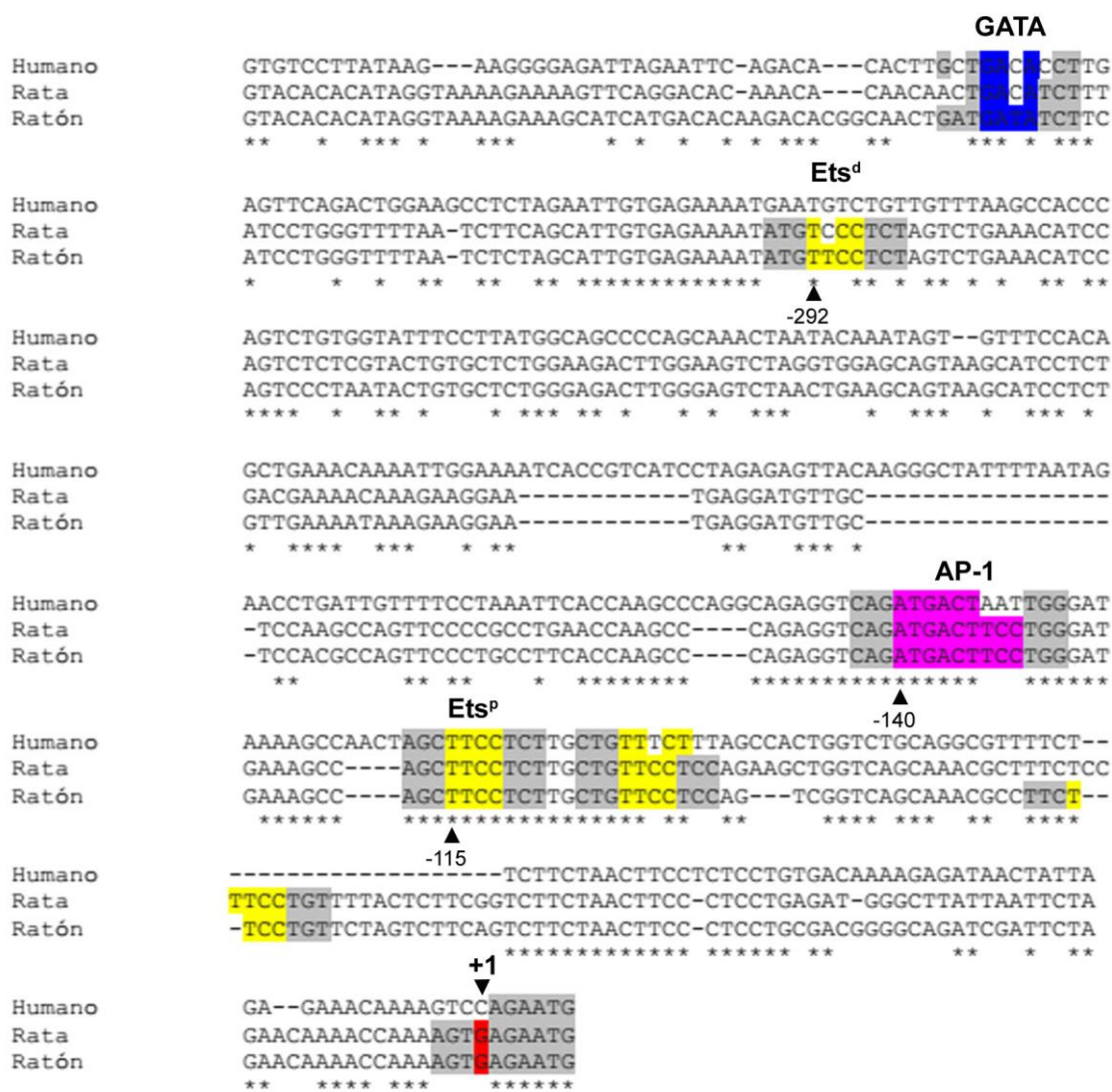


Figura 40. Análisis de alineación de las regiones promotoras de TLR4. Comparación de las secuencias del promotor de TLR4 de humano rata y ratón. La alineación de las bases se realizó mediante el programa informático *ClustalW2 Multiple Sequence Alignment (MUSCLE)* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Los recuadros grises demarcan secuencias que flanquean regiones conservadas de sitios consensos de unión al ADN para factores de transcripción. Los recuadros en colores destacan los sitios consenso para distintas familias de factores de transcripción: ETSs en amarillo, AP-1 en violeta y GATA en azul. En rojo se indica la posición +1 como el primer nucleótido comprendido en el sitio del inicio de la transcripción. Las posiciones -115, -140 y -292 indican el último nucleótido de las secuencias consenso Ets^P, AP-1 y Ets^d, respectivamente en el promotor de ratón.

Para dilucidar si la aquí demostrada sobreexpresión de TLR4 mediante la inducción de la expresión de oncogenes activadores de la vía de señalización MAPK/ERK involucra un mecanismo a nivel transcripcional, se decidió evaluar la actividad transcripcional de delecciones secuenciales del promotor de TLR4 de ratón (dirigiendo la transcripción del gen de luciferasa) en células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3, fundamentando este procedimiento la gran homología entre las secuencias de rata y ratón, identificada mediante el análisis de alineación de las regiones promotoras de TLR4 en estas especies (Figura 40).

Para ello, las células inducibles fueron transfectadas transientemente con los vectores conteniendo diferentes constructos del promotor de TLR4 (Figura 41) y luego

fueron tratadas o no con doxiciclina durante 48 hs. De manera interesante, los constructos -336/+223 y -608/+223 del promotor de TLR4 mostraron un incremento significativo de la actividad transcripcional en respuesta a la inducción de la expresión de los diferentes oncogenes ensayados (Figura 41). Sin embargo, la expresión de los oncogenes no tuvo efecto en la actividad transcripcional de los constructos +52/+223 y -104/+223 (Figura 41). El segmento -608/+223 mostró un incremento menor de la actividad transcripcional respecto al segmento -336/+223, posiblemente debido a la existencia de algún elemento regulatorio negativo contenido entre las bases -608 y -336 que disminuye el efecto de elementos regulatorios positivos contenidos entre las bases -336 y -104 (Figura 41).

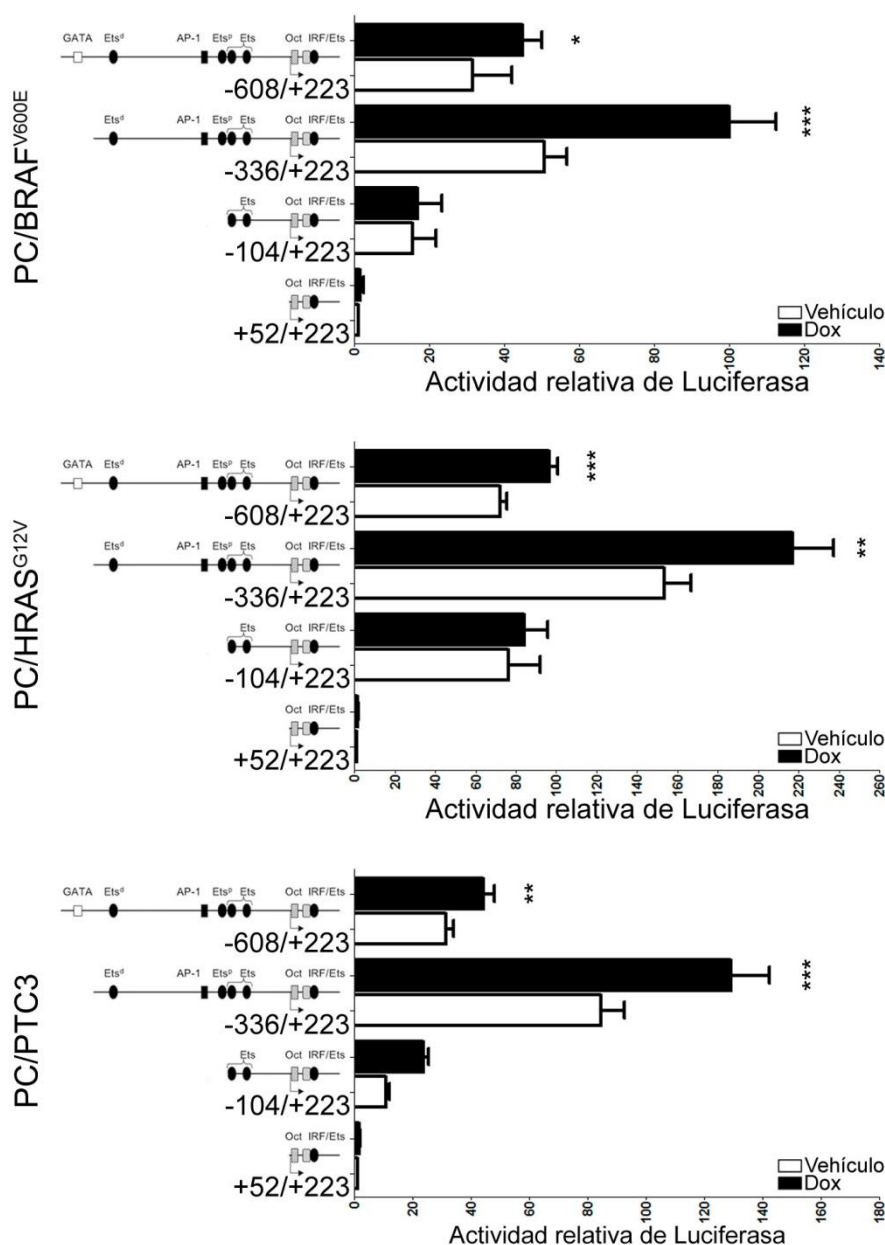


Figura 41. La expresión condicional de oncogenes promotores de PTC incrementa la actividad transcripcional del promotor de TLR4. Actividad relativa de delecciones secuenciales del promotor de TLR4 dirigiendo la transcripción del gen de luciferasa (paneles izquierdos) en células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 transfectadas con los constructos indicados. Se cotransfectó el vector de expresión de β-galactosidasa (β-gal) para normalizar los resultados. Luego de la transfección, las células fueron incubadas con doxiciclina (Dox) durante 48 hs. La cuantificación de la actividad de luciferasa se expresa relativa a la actividad de β-galactosidasa. Los resultados (media ± SEM) se

indican como veces de cambio con respecto a la actividad transcripcional de células transfectadas con el vector +52/+223 tratadas con vehículo y corresponden a tres experimentos independientes (n=4). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs misma condición en ausencia de Dox (*one-way ANOVA*, *Newman-Keuls test*).

4.1.5.4. El sitio de unión Ets distal es crucial para inducir la expresión transcripcional de TLR4 en respuesta a la expresión condicional de oncogenes promotores de PTC

Para investigar si el sitio Ets^d estaría involucrado en el incremento de la actividad transcripcional del promotor de TLR4 en respuesta a los oncogenes BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3 se evaluó la actividad transcripcional del constructo -336/+223 portando una sustitución de tres pares de bases en el core del sitio consenso de unión Ets^d (Ets^d mt -336/+223) como se muestra en el esquema de la figura 42, obtenido mediante mutagénesis sitio dirigida. De forma similar a lo observado anteriormente, evidenciamos un incremento de la actividad transcripcional del segmento -336/+223 inducido por la expresión condicional de los oncogenes (Figura 42). Sorprendentemente, la mutación del sitio Ets^d redujo significativamente el incremento de la actividad del promotor de TLR4 inducida por la expresión de los oncogenes (Figura 42). Cabe destacar que la mutación del sitio Ets^d redujo significativamente la expresión basal del promotor en células PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 (Figura 42 B y C); mientras que la expresión basal del vector Ets^d mt -336/+223 no mostró cambios significativos en la línea PC/BRAF^{V600E} (Figura 42 A).

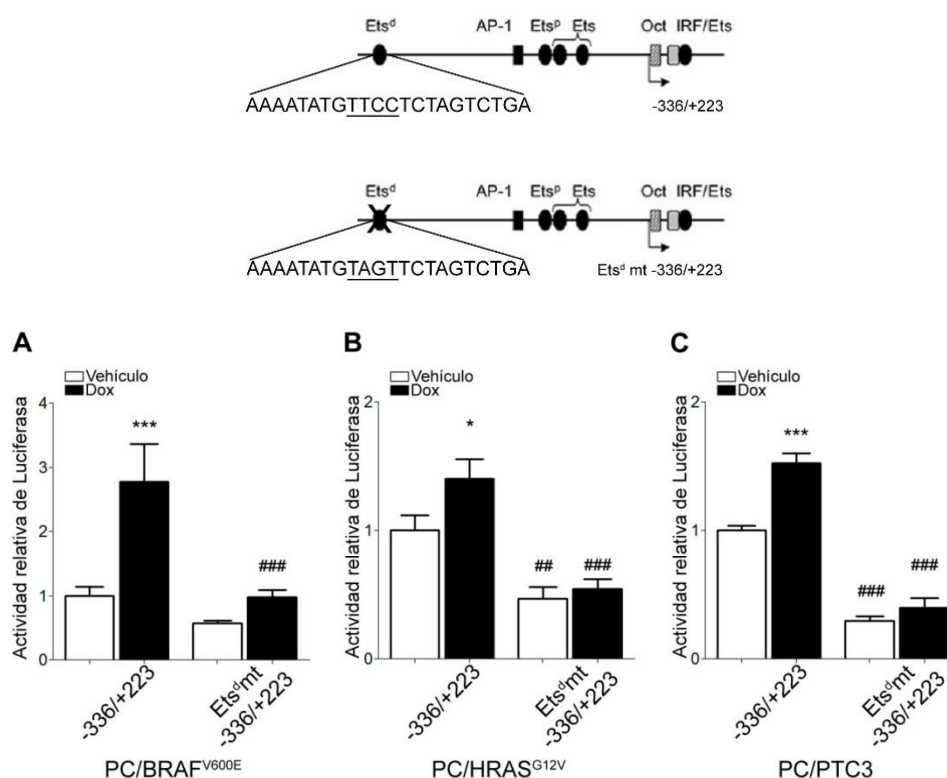


Figura 42. El sitio de unión Ets^d es crucial para inducir la actividad transcripcional de TLR4 en respuesta a la expresión condicional de oncogenes promotores de PTC. Actividad relativa de luciferasa de los vectores -336/+223 y Est^d mt -336/+223 (panel superior) en células PC/BRAF^{V600E} (A), PC/HRAS^{G12V} (B) y PC/PTC3 (C) transfectadas con los vectores indicados. Se cotransfectó el vector de expresión de β -galactosidasa (β -gal) para normalizar los resultados. Luego de la transfección, las células fueron incubadas con doxiciplina (Dox) durante 48 hs. La cuantificación de la actividad de luciferasa se expresa relativa a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados (media \pm SEM) se

indican como veces de cambio con respecto a la actividad de células transfectadas con el constructo -336/+223 tratadas con vehículo consideradas arbitrariamente como 1 y corresponden a cinco experimentos independientes (n=4). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs células tratadas con vehículo. ### $P < 0,01$, #### $P < 0,001$ vs misma condición en células transfectadas con el constructo -336/+223 (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*).

A fin de reforzar nuestras observaciones, construimos un vector reportero artificial (esquema Figura 43) conteniendo tres copias consecutivas del sitio Ets^d y las regiones flanqueantes presentes en el promotor de TLR4 de ratón dirigiendo la transcripción del gen de luciferasa (denominado en este trabajo de tesis 3x Ets^d-Luc). Como se muestra en la Figura 43, la expresión de los oncogenes BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3 en respuesta al tratamiento con doxiciclina durante 48 hs indujo la actividad transcripcional del reportero 3x Ets^d-Luc en células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3, respectivamente. Estos resultados indicarían que en presencia de la actividad de estos oncogenes se induce la activación y/o expresión de algún factor de transcripción perteneciente a la familia de ETS capaz de unirse al sitio consenso Ets^d del promotor de TLR4 e inducir su expresión a nivel transcripcional.

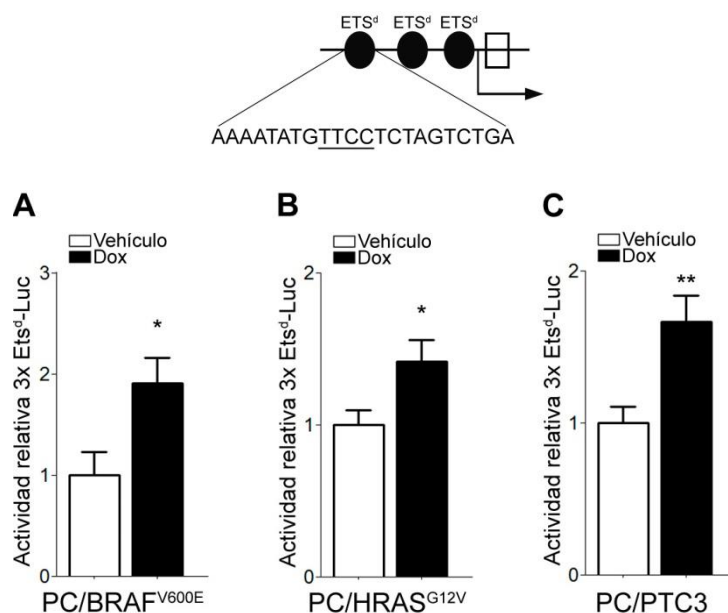


Figura 43. La expresión condicional de oncogenes promotores de PTC incrementa la actividad transcripcional del reportero trimérico para Ets^d. Células PC/BRAF^{V600E} (A), PC/HRAS^{G12V} (B) y PC/PTC3 (C) fueron transfectadas con el vector reportero para la actividad de ETSs (3x Ets^d-Luc) (panel superior). Se cotransfectó el vector de expresión de β -galactosidasa (β -gal) para normalizar los resultados. Luego de la transfección, las células fueron incubadas con doxiciclina (Dox) (1 μ g/ml) durante 48 hs. La cuantificación de la actividad de luciferasa se expresa relativa a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados (media \pm SEM) se indican como veces de cambio con respecto a la actividad de células tratadas con vehículo y corresponden a tres experimentos independientes (n=4). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs células tratadas con vehículo (*unpaired Student's t test*).

Como se mencionó anteriormente, el análisis de alineación de las regiones promotoras de TLR4 (Figura 40) no evidenció homología en humano con el sitio Ets^d de ratón (posición -292 pb). Sin embargo, el promotor de TLR4 humano mostró gran homología con un sitio Ets en la posición -103 y el sitio Ets^p en la posición -115 pb de ratón. Roger *et al.* (235) sugirieron que la actividad del promotor de TLR4 en humano está regulada por elementos localizados cerca del sitio del inicio de la transcripción, por lo tanto los dos sitios putativos Ets identificados en nuestro análisis podrían tener importancia en la regulación

transcripcional de este gen en humano. A pesar de las diferencias evidenciadas en la alineación de las regiones promotoras de TLR4 hemos comprobado actividad transcripcional basal del vector -336/+223 del promotor de TLR4 de ratón en las células humanas BCPAP, 8505c y KTC2 (Figura 44). En consonancia con las observaciones anteriores, estos resultados demostraron que en las líneas celulares de cáncer tiroideo humano se expresan factores de transcripción de la familia de ETSs capaces de estimular la expresión del constructo. Por otro lado, la actividad transcripcional basal de la variante mutada (Ets^d mt -336/+223) en estas células tumorales fue significativamente menor que el promotor nativo (Figura 44), demostrando la importancia del sitio Ets^d para la activación del vector.

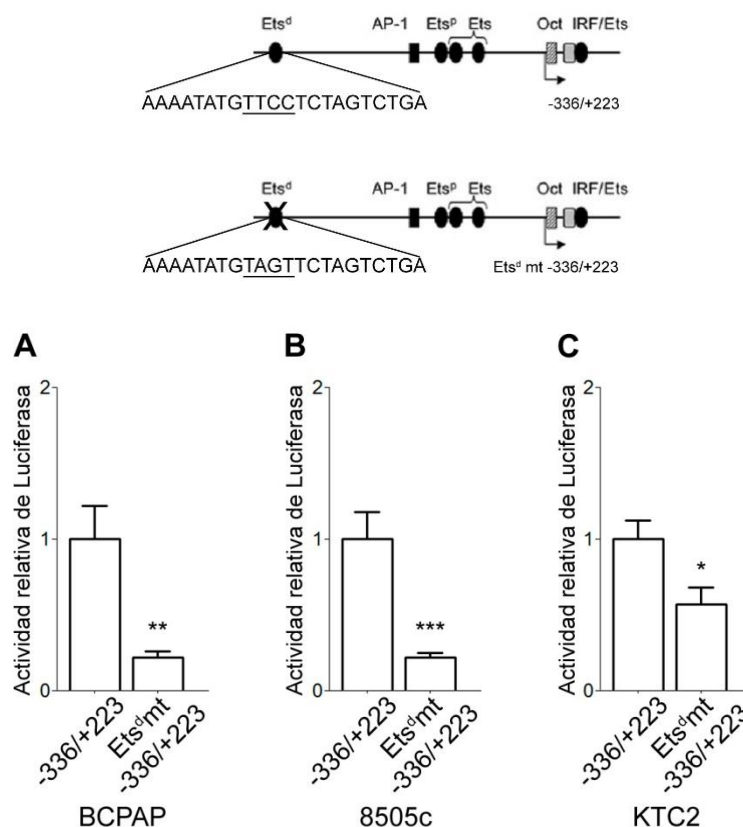


Figura 44. El sitio de unión Ets^d es crucial para la transcripción del promotor de TLR4 en líneas tumorales tiroideas humanas. Células BCPAP (A), 8505c (B) y KTC2 (C) fueron transfectadas con los vectores -336/+223 y Ets^d mt -336/+223 (panel superior) durante 48 hs. Se cotransfectó el vector de expresión de β -galactosidasa (β -gal) para normalizar los resultados. La cuantificación de la actividad de luciferasa se expresa relativa a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados (media \pm SEM) se indican como veces de cambio con respecto a la actividad de células transfectadas con el vector -336/+223 y corresponden a tres experimentos independientes (n=4). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs células transfectadas con el vector -336/+223 (*unpaired Student's t test*).

4.1.5 Conclusiones

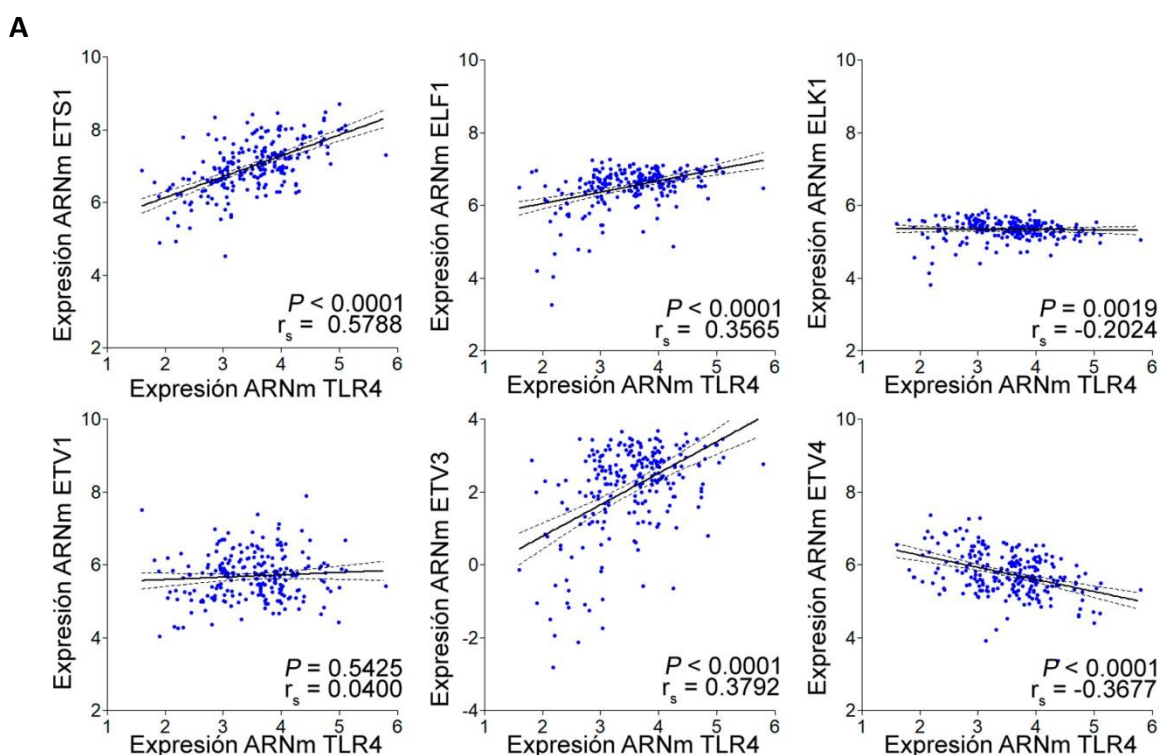
A través de diferentes estrategias metodológicas, hemos demostrado que la sobreexpresión de TLR4 es una consecuencia de la sobre-activación de la vía de señalización MAPK/ERK inducida por diferentes oncogenes promotores de cáncer de tiroides. Además, nuestros hallazgos indicaron que los oncogenes activantes de MAPK/ERK inducen la expresión de TLR4 a través de un mecanismo, al menos en parte, a nivel transcripcional involucrando un sitio de unión para factores de transcripción de la familia de ETSs en el promotor de TLR4.

4.1.6. El factor de transcripción ETS1 media la expresión de TLR4 inducida por el oncogén BRAF^{V600E}

4.1.6.1. Niveles incrementados de TLR4 se correlacionan con niveles aumentados de ETS1 en el PTC

Los ETSs son una familia de factores de transcripción que comparten una secuencia conservada de aproximadamente 85 aminoácidos llamada dominio de unión al ADN Ets (257). Hasta la fecha se identificaron 28 ETSs en humano (258). Distintos ETSs están involucrados en una gran variedad de funciones incluyendo diferenciación, proliferación, migración, apoptosis y angiogénesis (259).

A fin de esclarecer qué factores de transcripción de la familia de ETS son requeridos para la sobreexpresión de TLR4 en PTCs, se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica para determinar qué miembros de la familia de ETSs están frecuentemente sobreexpresados en tumores sólidos. De esta manera, se seleccionaron ocho ETSs y luego se realizaron análisis bioinformáticos de correlación entre el nivel de ARNm de los ETSs seleccionados y el ARNm de TLR4, mediante los datos aportados por *TCGA* y la plataforma GSE33630 de *GEO*. Cabe mencionar que el estudio realizado con datos del *TCGA* fue restringido sólo a tumores que albergan al oncogén BRAF^{V600E}, dado que es la mutación más prevalente de esta plataforma (n=234), mientras que en el estudio realizado con datos de *GEO* se utilizó la población completa de tumores (n=49) dado el pequeño número de muestreo de esta base de datos. Aunque se evidenció correlación positiva con los factores ELF1, ETV3 y GABPA y correlación negativa con ETV4 y ELK1 (Figura 45 A y B), el factor ETS1 mostró la mayor asociación positiva con los niveles de ARNm de TLR4 ($r_s=0,5788$, $P<0,0001$) (Figura 45 A y B), sugiriendo un potencial rol de ETS1 en la sobreexpresión de TLR4 en el PTC. Estos hallazgos están avalados por las observaciones de Kim *et al.* (260) quienes describieron que los niveles de ARNm de ETS1 incrementan en PTCs que albergan el oncogén BRAF^{V600E}.



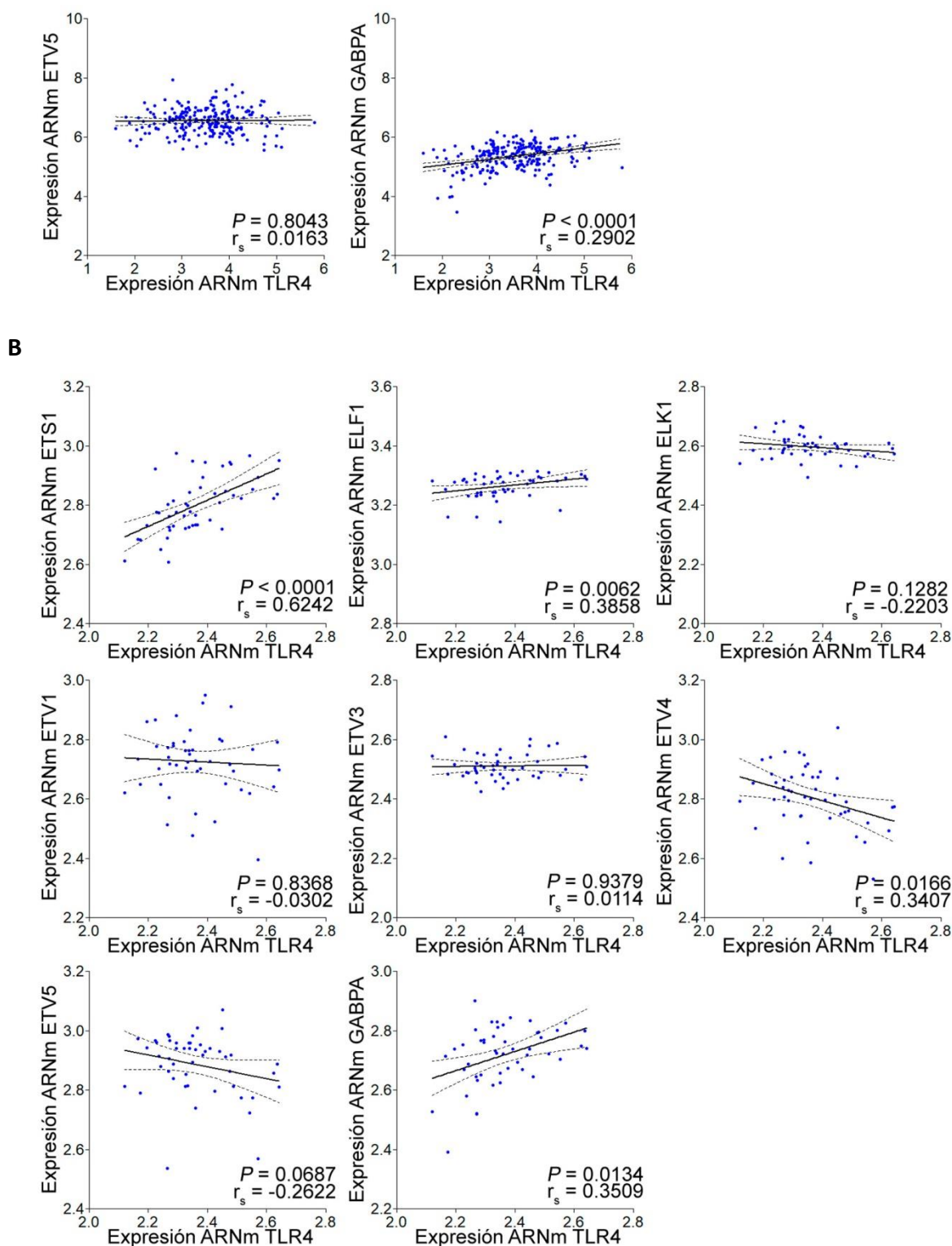


Figura 45. Análisis de correlación entre el nivel de ARNm de diferentes ETSs en función del ARNm de TLR4 en PTCs. Se grafica el análisis de correlación entre la expresión de ARNm de TLR4 y de diferentes ETSs **A)** Datos transcriptómicos de ARNseq se obtuvieron del TCGA (n=234) (*Spearman's correlation test*). **B)** Datos transcriptómicos de *microarrays* se obtuvieron de la plataforma GSE33630 de GEO (n=49) (*Spearman's correlation test*).

Adicionalmente, exploramos la expresión proteica de ETS1 por inmunohistoquímica en uno de los *microarray* de tejidos tiroideos humanos del mismo número de catálogo que el utilizado para determinar la expresión proteica de TLR4 (Figura 11 A). Como era esperado,

la cuantificación de la densidad de tinción de los niveles proteicos de ETS1 fue significativamente mayor ($P < 0,0001$) en el PTC ($n=24$) en comparación con el tejido tiroideo normal no apareado ($n=9$) (Figura 46 A). Además la observación microscópica demostró que la tinción de ETS1 estaba localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células tumorales. Por otro lado, el análisis de correlación entre los niveles proteicos de TLR4 y ETS1 en tejidos de PTCs equivalentes ($n=24$), demostró una correlación positiva estadísticamente significativa ($r_s=0,5317$, $P=0,0075$) (Figura 46 B). Estos hallazgos refuerzan una potencial participación de ETS1 en la regulación de la expresión de TLR4 en el PTC.

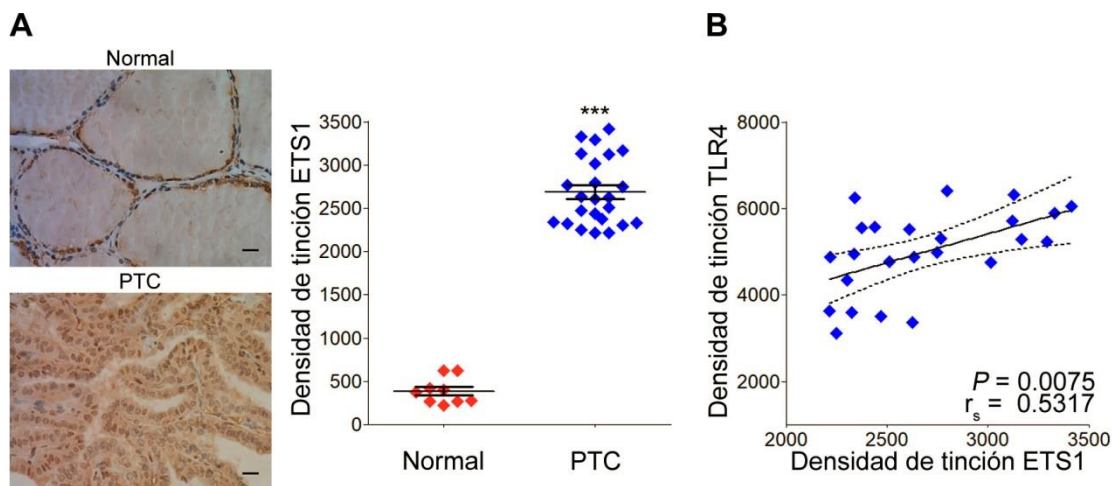


Figura 46. Niveles proteicos incrementados de ETS1 se correlacionan con niveles proteicos aumentados de TLR4 en PTC. A) Imágenes representativas de cortes histológicos de origen comercial (US Biomax), a 400x de magnificación, correspondientes a tejidos tiroideos normales ($n=9$) y PTCs ($n=24$) sometidos a tinción por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-ETS1 (sc-350, Santa Cruz Biotechnology). Las barras de escala representan 20 μm . La cuantificación de los niveles proteicos de ETS1 se expresa relativa al número de células de las secciones de tejidos (panel derecho). Los resultados se muestran como mediana y rango intercuartil. *** $P < 0,001$ vs tejido normal (*Mann Whitney test*). **B)** Análisis de correlación entre la expresión proteica de TLR4 y ETS1, evaluadas por inmunohistoquímica en tejidos de PTCs equivalentes ($n=24$). $P=0,0075$ (*Spearman's correlation test*).

4.1.6.2. El oncogén BRAF^{V600E} a través de la activación de la señalización de MAPK/ERK regula los niveles de expresión de ETS1 en modelos celulares de cáncer de tiroides

A fin de evaluar si la actividad del oncogén BRAF^{V600E} regula los niveles de ETS1 en células tiroideas, nos propusimos analizar la acumulación de ETS1 a nivel nuclear en células PC/BRAF^{V600E} estimuladas con doxiciclina, considerando que dicho factor reside normalmente en el núcleo celular (259). Finalizado el tratamiento la expresión proteica a nivel nuclear y citoplasmática fue evaluada mediante ensayos de western blot utilizando fracciones nucleares purificadas como se describe en Materiales y Métodos. Como se esperaba, nuestros resultados demostraron un aumento de la acumulación nuclear de ETS1 en células tratadas con doxiciclina para la inducción de la expresión de BRAF^{V600E} (Figura 47 A). Adicionalmente, mediante inmunofluorescencia indirecta se estudió la expresión y localización celular de ETS1 en células PC/BRAF^{V600E} tratadas con doxiciclina. Nuevamente, evidenciamos un incremento significativo de los niveles proteicos de ETS1 y acumulación nuclear de este factor de transcripción luego del tratamiento con la tetraciclina (Figura 47 B).

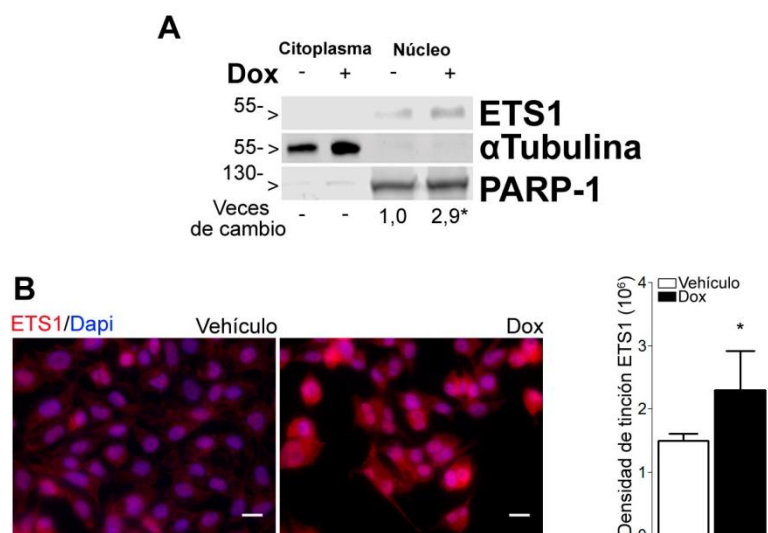


Figura 47. La expresión condicional del oncogén BRAF^{V600E} incrementa los niveles proteicos nucleares de ETS1. **A)** Western Blot realizado a partir de extractos proteicos del fraccionamiento núcleo/citoplasma de células PC/BRAF^{V600E}. Se muestran los niveles de expresión de ETS1 (50 kDa) en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E} inducida por doxiciclina (Dox) (1 μ g/ml) durante 48 hs. La equivalencia en la cantidad de proteína sembrada fue analizada mediante la presencia de la proteína nuclear PARP-1 (110 kDa). La inmunomarcación negativa para la proteína citoplasmática α Tubulina (55 kDa) demostró ausencia de contaminación citoplasmática en la preparación nuclear. La cuantificación de los niveles proteicos nucleares de ETS1 se expresa relativa al nivel de expresión de PARP-1. El nivel de expresión en células no tratadas se definió arbitrariamente como 1. Los resultados se expresan como veces de cambio con respecto a la expresión de ETS1 en células no tratadas. * $P < 0,05$ vs células no tratadas (*unpaired Student's t test*). **B)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia evaluando la expresión proteica de ETS1 (sc-350, Santa Cruz Biotechnology) en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E} inducida por doxiciclina (Dox) (1 μ g/ml) durante 48 hs. Se muestra la superposición de imágenes obtenidas para la marcación inmunofluorescente de ETS1 (rojo) y la marcación fluorescente del núcleo con Dapi (azul). Las barras de escala representan 10 μ m. La cuantificación (media \pm DS) de los niveles proteicos de ETS1 se expresa relativa al número de células por campo microscópico (panel derecho). * $P < 0,05$ vs células tratadas con vehículo (*unpaired Student's t test*). El gráfico mostrado es representativo de dos experimentos realizados de manera independiente (n=6).

Se describió que la señalización RAS/RAF/MEK/ERK incrementa la actividad transcripcional de algunos ETSs a través de la fosforilación ejercida por MAPK/ERK (259). Para dilucidar si la vía de señalización de MAPK/ERK estaría involucrada en la regulación de la expresión de ETS1 en respuesta al oncogén BRAF^{V600E}, se evaluó el efecto de los inhibidores PLX4032 y UO126 sobre la expresión de ETS1 en células PC/BRAF^{V600E} bajo tratamiento con doxiciclina, como así también en las líneas de carcinomas tiroideos humanos BRAF^{V600E} positivas BCPAP, 8505c y KTC2. Todas las líneas celulares fueron incubadas con los inhibidores químicos durante 16 hs; mientras que la línea celular PC/BRAF^{V600E} fue previamente tratada con doxiciclina durante 48 hs. Finalizado el tratamiento, se realizó la extracción de proteínas totales y se analizó la expresión proteica de ETS1 mediante ensayos de western blot. Nuevamente la inducción de la expresión del oncogén BRAF^{V600E} mediante el tratamiento con la tetraciclina indujo un incremento significativo de los niveles de ETS1 en células PC/BRAF^{V600E} (Figura 48). Sin embargo, la inhibición química de BRAF^{V600E} y MEK1/2 mediante el tratamiento con PLX4032 y UO126,

respectivamente revirtió la inducción de la expresión de ETS1 ejercida por BRAF^{V600E} en células PC/BRAF^{V600E} (Figura 48). Además, el tratamiento con los inhibidores químicos redujo significativamente los niveles proteicos basales de ETS1 en las células de carcinomas tiroideos humanos (Figura 48). Cabe mencionar que en la línea celular 8505c se evidenció un efecto rebote (con un contradictorio aumento de pERK) durante el tratamiento con PLX4032; Sin embargo no se vio afectada la inhibición de la expresión de ETS1 al tiempo ensayado. En su conjunto, estos resultados demuestran que la expresión de ETS1 está regulada por la activación de la señalización MAPK/ERK estimulada por el oncogén BRAF^{V600E} en células tumorales que albergan a esta mutación.

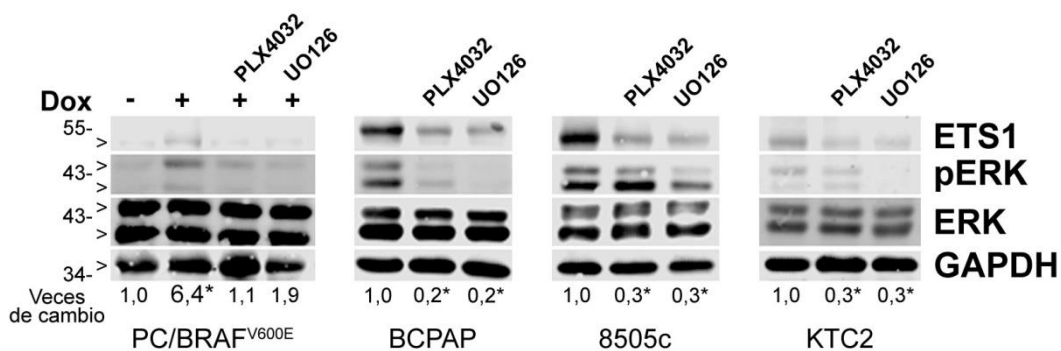


Figura 48. La señalización de MAPK/ERK regula la expresión de ETS1 en respuesta a BRAF^{V600E} en modelos celulares de cáncer de tiroides. Western Blots realizados a partir de extractos proteicos totales de células PC/BRAF^{V600E}, BCPAP, 8505c y KTC2. Se muestran los niveles de expresión de ETS1 (50 kDa) en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E} inducida por doxiciclina (Dox) durante 48 hs (células PC/BRAF^{V600E}) y en respuesta al tratamiento con los inhibidores químicos PLX4032 o UO126 durante 16 hs en todas las líneas celulares. La fosforilación de ERK (pERK) (42/44 kDa) fue utilizada para evaluar la inhibición de la señalización de MAPK/ERK en respuesta a los inhibidores. GAPDH (37 kDa) fue utilizada como control de carga. La cuantificación de los niveles proteicos nucleares de ETS1 se expresa relativa al nivel de expresión de GAPDH. El nivel de expresión de células no tratadas se definió arbitrariamente como 1. Los resultados se expresan como veces de cambio con respecto a la expresión de ETS1 en células no tratadas. * $P < 0,05$ vs células no tratadas (*one-way ANOVA*, *Newman-Keuls test*). Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de manera independiente (n=2).

4.1.6.3. El silenciamiento de la expresión de ETS1 impide la sobreexpresión de TLR4 inducida por BRAF^{V600E}

Los resultados obtenidos a partir del análisis de datos del transcriptoma derivado de TCGA arrojaron una asociación positiva entre los niveles de ARNm de TLR4 y ETS1 en tumores BRAF^{V600E} positivos (Figura 45). Además, demostramos que ETS1 es modulado por la actividad oncogénica de BRAF^{V600E} a través de MAPK/ERK. Por consiguiente, se decidió evaluar la participación de ETS1 en la regulación de la expresión de TLR4 en nuestro modelo de PTC *in vitro*. Para ello, valiéndonos de la tecnología de ARN de interferencia (siRNA) se silenció específicamente la expresión de ETS1 y posteriormente se evaluó el nivel de expresión del ARNm de TLR4 como así también la actividad transcripcional del constructo -336/+223 del promotor de TLR4 en células PC/BRAF^{V600E} induciendo la expresión del oncogén BRAF^{V600E} con doxiciclina.

Experimentalmente, células PC/BRAF^{V600E} fueron transfectadas transientemente con un siRNA no relacionado control (siSCR) o un *smart-pool* conteniendo tres secuencias de siRNA específicas para ETS1 (siETS1). Mediante análisis de western blot se evaluó el nivel de

ETS1 para corroborar la eficiencia del silenciamiento. Observamos una significativa reducción de la expresión de ETS1 en función del tiempo al transfectar las células con siETS1, determinando las 48 hs post-transfección como el tiempo necesario para un máximo silenciamiento (Figura 49 A). Por el contrario, no se observó efecto alguno sobre la expresión de ETS1 en presencia del siSCR utilizado como control (Figura 49 A).

Posteriormente, se evaluó el efecto funcional de la ausencia de ETS1 sobre la expresión de ARNm de TLR4 inducida por la actividad oncogénica de BRAF^{V600E} en células PC/BRAF^{V600E}. Nuevamente, la inducción de la expresión de oncogén BRAF^{V600E} a través del tratamiento con doxiciclina durante 48 hs indujo un incremento significativo de los niveles de ARNm de TLR4 en células transfectadas con siSCR (Figura 49 B). De manera interesante, el silenciamiento génico de ETS1 mediante la transfección del siETS1 previno el incremento de los niveles de ARNm de TLR4 inducidos por el oncogén BRAF^{V600E} (Figura 49 B). Adicionalmente, se evaluó la actividad transcripcional del constructo -336/+223 del promotor de TLR4 en células PC/BRAF^{V600E} silenciadas para ETS1. En concordancia con los resultados anteriores, el silenciamiento de ETS1 mediante la transfección del siETS1 previno el incremento de la actividad transcripcional del segmento -336/+223 del promotor de TLR4 en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E} (Figura 49 C). Estos resultados demostraron que la inducción de TLR4 mediada por el oncogén BRAF^{V600E} requiere de la participación del factor de transcripción ETS1.

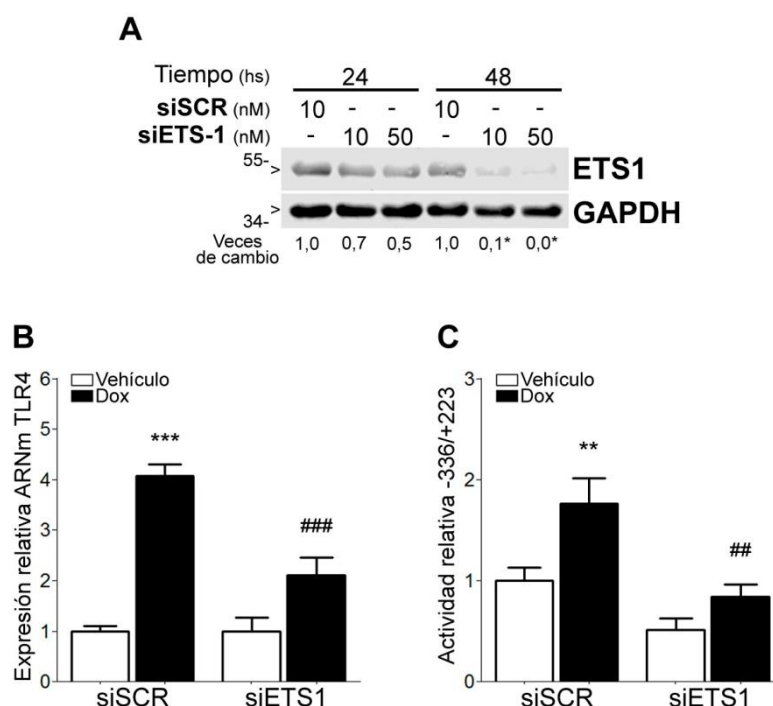


Figura 49. El silenciamiento de la expresión proteica de ETS1 impide el incremento de la expresión de TLR4 inducida por BRAF^{V600E}. **A)** Western Blot realizado a partir de extractos proteicos totales de células PC/BRAF^{V600E}. Se muestran niveles de expresión de ETS1 (50 kDa) en respuesta a la transfección de un siRNA no relacionado control (siSCR, D-001206-13) o un *smart-pool* conteniendo tres secuencias de siRNA específicas para ETS1 (siETS1, sc-156062) a distintas concentraciones por diferentes tiempos. GAPDH (37 kDa) fue utilizada como control de carga. La cuantificación de los niveles proteicos de ETS1 se expresa relativa al nivel de expresión de GAPDH. El nivel de ETS1 de células transfectadas con siSCR se definió arbitrariamente como 1. Los resultados se expresan como veces de cambio con respecto al nivel de ETS1 en células transfectadas con siSCR. * $P < 0,05$ vs células transfectadas con siSCR (*one-way ANOVA*, *Newman-Keuls test*). La imagen es representativa de dos experimentos realizados de manera independiente ($n=2$). **B)** Evaluación de los niveles de ARNm de

TLR4 por RT/qPCR. El ARN total se extrajo de células PC/BRAF^{V600E} transfectadas con el siSCR o el siETS1 (10 ng/ml) en ausencia o presencia de doxiciclina (Dox) (1 µg/ml) durante 48 hs. Los niveles de ARNm de TLR4 se grafican relativamente a la expresión de β-Actina. Los resultados (media ± DS) se indican como veces de cambio con respecto al ARNm de TLR4 de células transfectadas con siSCR y tratadas con vehículo y son representativos de tres experimentos realizados de manera independiente (n=3). *** $P < 0,05$ vs misma condición en ausencia de Dox. #### $P < 0,01$ vs misma condición en células transfectadas con siSCR (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*). **C**) Células PC/BRAF^{V600E} fueron transfectadas con el constructo -336/+223-Luc, el siSCR o el siETS1 (10 ng/ml) y el vector de expresión de β-galactosidasa (β-gal) para normalizar los resultados. Luego de la transfección, las células fueron incubadas o no con doxiciclina (Dox) (1 µg/ml) durante 48 hs. La cuantificación de la actividad de luciferasa se expresa relativa a la actividad de β-galactosidasa. Los resultados (media ± SEM) se indican como veces de cambio con respecto a la actividad de células transfectadas con siSCR y tratadas con vehículo y corresponden a dos experimentos independientes (n=5). ** $P < 0,01$ vs misma condición en ausencia de Dox. ## $P < 0,01$ vs misma condición en células transfectadas con siSCR (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*).

4.1.6.4. La sobreexpresión de ETS1 incrementa la expresión de TLR4 en células tiroideas normales

A fin de reforzar los resultados anteriores, se evaluó el efecto de la transfección de un vector de expresión para ETS1 sobre los niveles de expresión de TLR4 en la línea celular tiroidea normal de rata Fisher PCCL3. Para ello, células PCCL3 fueron transfectadas transientemente durante 48 hs con el vector de expresión conteniendo el ADNc humano de ETS1 y posteriormente se evaluó el nivel proteico de TLR4 como así también la actividad transcripcional del constructo -336/+223 del promotor de TLR4. Como se especulaba, la sobreexpresión de ETS1 indujo un incremento significativo de los niveles proteicos de TLR4 (Figura 50 A) y de la actividad transcripcional del constructo -336/+223 del promotor del gen de TLR4 (Figura 50 B).

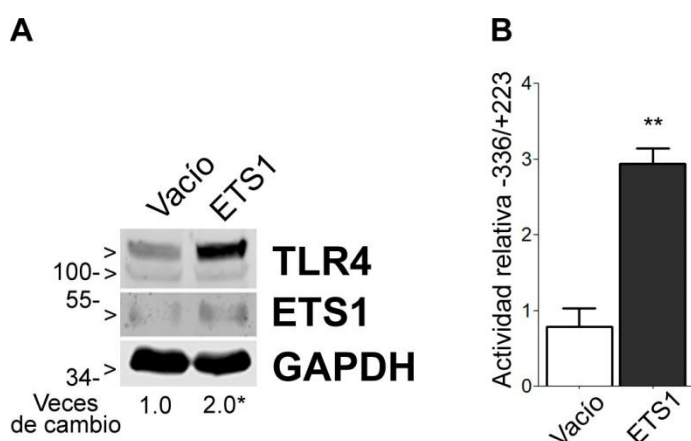
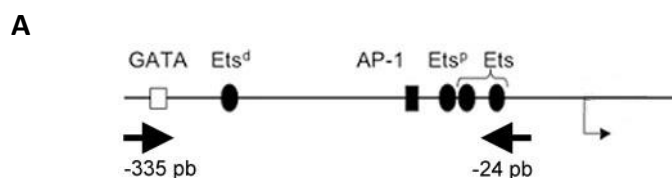


Figura 50. La sobreexpresión de ETS1 induce la expresión de TLR4 en células PCCL3. **A)** Western Blot realizado a partir de extractos proteicos totales de células PCCL3. Se muestran niveles de expresión de TLR4 (130/110 kDa) en respuesta a la transfección del vector de expresión conteniendo el ADNc humano de ETS1 (#86099) por 48 hs. GAPDH (37 kDa) fue utilizada como control de carga. La cuantificación de los niveles proteicos de TLR4 se expresa relativa al nivel de expresión de GAPDH. El nivel de expresión de células transfectadas con el vector vacío se definió arbitrariamente como 1. Los resultados se expresan como veces de cambio con respecto a la expresión de TLR4 en células transfectadas el vector vacío. * $P < 0,05$ vs células transfectadas con el vector vacío (*unpaired Student's t test*). La imagen es representativa de dos experimentos realizados de manera independiente (n=2). **B)** Células PCCL3 fueron transfectadas durante 48 hs con el constructo -

336/+223-Luc, el vector vacío o el vector de expresión para ETS1 y el vector de expresión de β -galactosidasa (β -gal) para normalizar los resultados. La cuantificación de la actividad de luciferasa se expresa relativa a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados (media \pm SEM) se indican como veces de cambio con respecto a la actividad de células transfectadas con el vector vacío y corresponden a dos experimentos independientes (n=3). ** $P < 0,01$ vs vs células transfectadas con el vector vacío (*unpaired Student's t test*).

4.1.6.5. ETS1 interacciona con la región promotora -365/-24 de TLR4

Habiendo determinado la participación de ETS1 en la inducción de la expresión de TLR4 mediada por el oncogén BRAF^{V600E} se decidió continuar evaluando el mecanismo molecular por el cual ETS1 promueve la expresión de TLR4. Para ello examinamos la asociación directa “*in vivo*” entre ETS1 y la secuencia -365/-24 del promotor de TLR4 de rata utilizando la metodología inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Para ello, células PC/BRAF^{V600E} fueron estimuladas o no con doxiciplina durante 24 hs y posteriormente la cromatina entrecruzada y sonicada fue inmunoprecipitada utilizando un anticuerpo policlonal dirigido hacia ETS1, experimentalmente testeado para su utilización en ChIP (261). El contenido de ADN presente en los inmunoprecipitados fue analizado mediante PCR a tiempo real utilizando primers específicos que abarcan la secuencia -365/-24 del promotor de TLR4 de rata (Figura 51 A). Cabe aclarar, que si bien anteriormente demostramos que el sitio consenso de unión a Ets distal (Ets^d) localizado entre las bases -240 y -236 (relativo al sitio de iniciación de la transcripción) del promotor de TLR4 de rata (Figura 40) es crítico para la inducción de la sobreexpresión de TLR4 en respuesta a la actividad oncogénica de BRAF^{V600E} (Figura 42), no fue posible diseñar primers que flanqueen esta pequeña región debido a la gran repetitividad de bases en esta zona del genoma. Por lo tanto, se decidió construir un par de primers abarcando una secuencia mayor a la deseada, comprendiendo el segmento entre -365/-24 que abarca los cuatro sitios consenso putativos para Ets. Corroborando los hallazgos anteriores, el análisis cuantitativo del contenido de ADN en los inmunoprecipitados mostró que el tratamiento con doxiciplina indujo un enriquecimiento de la secuencia amplificada por el par de primers mencionado anteriormente (Figura 51 B). Para descartar amplificaciones inespecíficas, se realizó la inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo IgG de ratón no relacionado. Bajo esta condición, establecida como control negativo, no se observó amplificación de la secuencia en estudio, indicando que la asociación ETS1-ADN es específica. Estos resultados en conjunto sugieren que la señalización de BRAF^{V600E}/MAPK/ERK incrementa directamente los niveles de expresión de ETS1 y su unión al promotor de TLR4 modulando en consecuencia la expresión génica de TLR4.



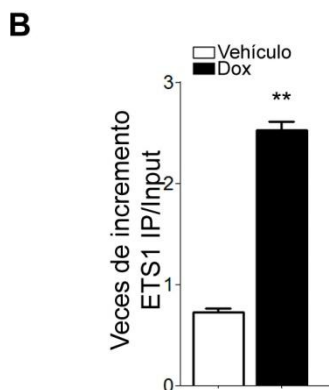


Figura 51. La expresión condicional de BRAF^{V600E} induce el reclutamiento de ETS1 en el promotor de TLR4. A) Se muestra una representación esquemática del promotor de TLR4 en rata. Las posiciones indicadas son relativas al sitio de inicio del primer exón codante para TLR4. Se indica la región amplificada por los primers utilizados en el experimento de CHIP y la localización de los diferentes elementos cis presentes en la región promotora. B) Ensayo de CHIP para la determinación de la unión de ETS1 a la región -365/-24 del promotor de TLR4 en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E} mediante el tratamiento con doxiciplina (Dox) (1 mg/ml) en células PC/BRAF^{V600E}. Los resultados (media \pm SEM) se expresan como veces de incremento (ETS1 IP/Input total) utilizando unidades arbitrarias. El gráfico es representativo de tres experimentos independientes (n=4). El cálculo de las veces de incremento fue realizado de acuerdo a la ecuación veces de cambio = $2^{-[(Ct.input - Ct.target) - (Ct.input - Ct.mock)]}$. ** $P < 0,01$ vs células tratadas con vehículo (*unpaired Student's t test*).

4.1.6. Conclusiones

A través de análisis bioinformático de correlación identificamos que entre la extensa familia de factores de transcripción ETSs, el mediador ETS1 presenta la mayor asociación positiva con los incrementados niveles de ARNm de TLR4. En correspondencia, demostramos que niveles aumentados de ETS1 se correlacionan con incrementados niveles proteicos de TLR4 en tejidos de PTCs equivalentes. En estrecha relación, evidenciamos que ETS1 está altamente expresado en PTCs respecto al tejido tiroideo normal. En coincidencia, nuestros estudios *in vitro* demostraron que el oncogén BRAF^{V600E} a través de la vía de señalización MAPK/ERK regula los niveles de expresión de ETS1. Además, revelamos que el silenciamiento de ETS1 previene el incremento de la expresión de TLR4 inducido por el oncogén BRAF^{V600E}. A la inversa, la sobreexpresión de ETS1 induce la expresión de TLR4 en células tiroideas normales. Por otra parte, los ensayos de CHIP corroboraron que ETS1 podría ser un regulador transcripcional para la expresión de TLR4 corriente abajo de la señalización de MAPK/ERK inducida por el oncogén BRAF^{V600E}.

4.II. CAPÍTULO II: MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA EXPRESIÓN Y TRANSACTIVACIÓN DE EGFR EN LA CÉLULA TIROIDEA TUMORAL

4.II.1. PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E} poseen expresión incrementada de EGFR

4.II.1.1. Expresión diferencial de ARNm de EGFR en PTCs que albergan diferentes oncogenes

Como se mencionó anteriormente, numerosos trabajos han demostrado que la señalización a través de NF- κ B mediada por la activación de TLR4 requiere la transactivación de EGFR (166, 210, 216), demostrando que la expresión de EGFR representa un evento clave para la señalización de TLR4 (166). Además se describió que los niveles de expresión de EGFR se encuentran incrementados en tumores tiroideos más indiferenciados con respecto al tejido normal y a carcinomas tiroideos humanos bien diferenciados (141). De este modo, la sobreexpresión de EGFR es actualmente considerada un marcador pronóstico adverso en el cáncer tiroideo (189). En base a estos antecedentes, en primer lugar se decidió estudiar si existe expresión diferencial de EGFR entre PTCs que alberguen diferentes oncogenes. Para ello, se realizó un análisis bioinformático combinado para la expresión de ARNm de EGFR en función de los oncogenes promotores comúnmente expresados en PTC, mediante la utilización de la base de datos del TCGA (18).

De manera similar a lo realizado para el análisis de TLR4, se dividió los datos transcriptómicos de PTCs aportados por el TCGA en diferentes grupos de acuerdo a la expresión diferencial de oncogenes, seleccionándose sólo los grupos de tumores con un número de pacientes mayor a 10 ($n > 10$) y se procedió a evaluar la expresión de ARNm de EGFR entre los diferentes grupos. En todos los PTCs se evidenciaron niveles altos de expresión de ARNm de EGFR. Sin embargo, los niveles de expresión de EGFR se encontraron significativamente incrementados en tumores que contienen mutaciones en BRAF respecto a tumores que presentan mutaciones en HRAS y NRAS, como así también respecto a tumores que contienen fusiones cromosómicas de los genes de NTRK, RET y BRAF (Figura 52 A). Por otro lado, dado que la mutación BRAF^{V600E} es la mutación más frecuente del PTC (18), se decidió dividir la muestra de tumores papilares en dos grupos de acuerdo a si albergaban la mutación BRAF^{V600E} ($n=234$) o si no poseían mutaciones en BRAF (BRAF WT) ($n=130$) y luego se evaluó la expresión de ARNm de EGFR entre ambos grupos. En concordancia con los resultados anteriores, se evidenció un incremento significativo en la expresión de ARNm de EGFR en pacientes con tumores BRAF^{V600E} positivos respecto a pacientes con tumores que albergan BRAF en estado nativo (Figura 52 B). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de EGFR en el PTC estaría regulada principalmente por la actividad oncogénica de BRAF^{V600E}.

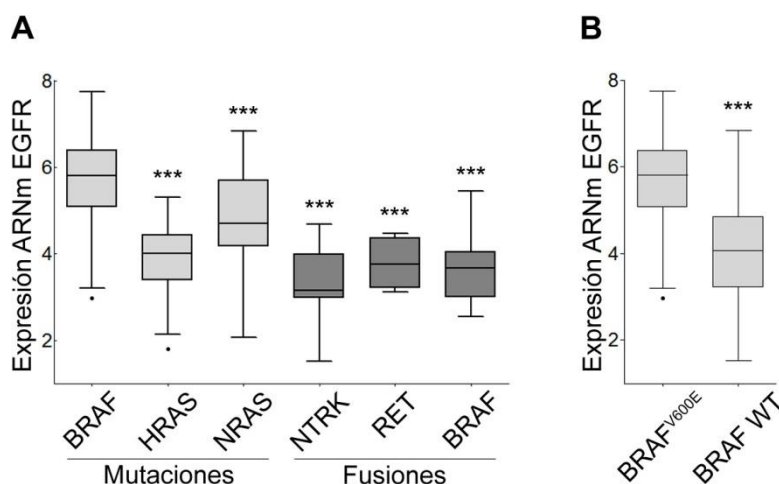


Figura 52. EGFR se sobreexpresa en PTCs BRAF^{V600E} positivos. **A)** Análisis de la expresión de ARNm de EGFR en función de los oncogenes promotores tumorales más comúnmente identificados en el PTC, incluyendo mutaciones puntuales en BRAF (n=234), HRAS (n=14) y NRAS (n=34), como así también fusiones cromosómicas de tirosinas quinasa incluyendo NTRK (n=10), RET (n=32) y BRAF (n=12). Se grafica mediana y rango intercuartil. *** $P < 0,0001$ vs PTCs con mutaciones en BRAF (*Kruskal-Wallis test*, *Dunn's test*). **B)** Análisis de la expresión de ARNm de EGFR en función del oncogén BRAF^{V600E} (n=234) y la expresión de BRAF en estado nativo (BRAF WT) (n=130). Se grafica mediana y rango intercuartil. *** $P < 0,0001$ vs PTCs BRAF^{V600E} positivos (*Mann-Whitney t test*). Datos transcriptómicos de ARNseq se obtuvieron del TCGA.

4.II.1.2. Niveles Incrementados de ARNm de EGFR en PTCs se asocian con mayor grado de dediferenciación tiroidea en el PTC

A fin de estudiar si la expresión de EGFR varía en función del grado de diferenciación en PTCs, se realizó un análisis bioinformático de correlación entre la expresión de ARNm de EGFR y el score de diferenciación a partir de los datos de PTCs aportados por el TCGA (18). Como era de esperar, se evidenció una asociación negativa significativa entre los niveles de ARNm de EGFR y el score de diferenciación tiroidea ($r_s = -0,2818$, $P = 0,0001$) (Figura 53 A). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de EGFR es un evento tardío en el PTC ya que la expresión de EGFR es significativamente mayor en PTCs más indiferenciados (valores negativos de score). Dado que la mayoría de los tumores que albergan la mutación BRAF^{V600E} presentan menor grado de diferenciación (con valores negativos en el score de diferenciación), consideramos que la significancia estadística de este análisis podría estar vinculada a la sobreexpresión de EGFR anteriormente observada para tumores BRAF^{V600E} positivos (Figura 52). Por otro lado, al realizar el análisis de correlación sólo en PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E} no se demostró una correlación estadísticamente significativa ($r_s = 0,0702$, $P = 0,0702$) entre los niveles de ARNm de EGFR y el score de diferenciación (Figura 53 B). Esta falta de significancia estadística podría deberse a la homogeneidad de los datos del score de diferenciación en este conjunto de tumores. En correlación, cabe mencionar que no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ARNm de EGFR entre los PTCs BRAF^{V600E} positivos con mutaciones en el promotor de TERT (n=32) y los PTCs BRAF^{V600E} positivos con expresión de TERT en estado nativo (n=202) (datos no mostrados).

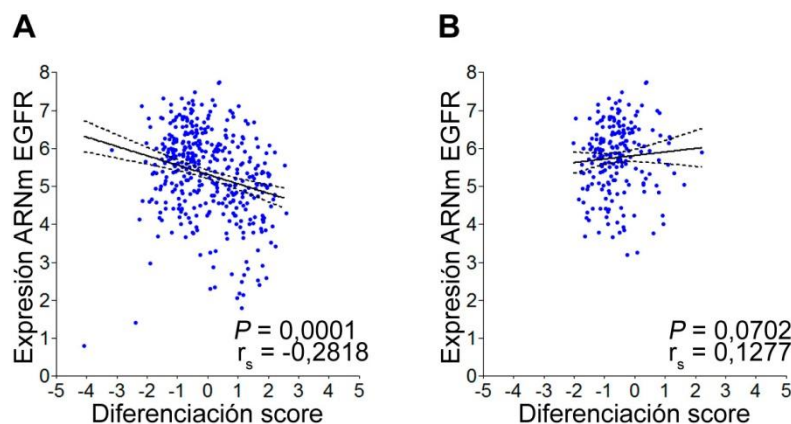


Figura 53. La expresión de EGFR varía en función del grado de diferenciación tiroidea en PTCs. Análisis de correlación entre la expresión de ARNm de EGFR y el score de diferenciación tiroidea utilizando la población completa de PTCs (A) (n=392). $P=0,0001$ (Spearman's correlation test); y utilizando un subconjunto de PTCs que albergan el oncogén BRAF^{V600E} (n=202) (B). $P=0,0702$ (Spearman's correlation test). Datos transcriptómicos de ARNseq se obtuvieron del TCGA.

4.II.1.3. La expresión condicional de oncogenes promotores de PTC induce expresión incrementada de EGFR

Para investigar el efecto de la expresión de los oncogenes más prevalentes del PTC sobre la expresión de EGFR se evaluó la influencia de los oncogenes BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3 sobre la expresión de este receptor, utilizando como modelo experimental de PTC las líneas celulares inducibles por doxiciclina para dichos oncogenes. Sorprendentemente, la inducción de la expresión los oncogenes en células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 estuvo asociada a un incremento significativo de los niveles de ARNm de EGFR (Figura 54 A).

Adicionalmente, se evaluó la expresión proteica de EGFR en células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 en respuesta a doxiciclina, mediante ensayos de western blot. Demostramos un incremento significativo de los niveles de EGFR en respuesta a la inducción de la expresión de los oncogenes con la tetraciclina (Figura 54 B). En concordancia, la transfección transiente de un vector de expresión para el oncogén BRAF^{V600E} en la línea tiroidea humana no tumoral Nthy-ori 3-1, incrementó significativamente los niveles de expresión de EGFR en comparación con células transfectadas con un vector vacío (Figura 54 B). La determinación de pERK se utilizó como control de la señalización gatillada por los oncogenes en estudio (Figura 54 B).

Complementariamente, mediante inmunofluorescencia indirecta se demostró un incremento de EGFR a nivel proteico en respuesta a la expresión de los oncogenes en estudio mediante el tratamiento con doxiciclina (Figura 54 C). En su conjunto estos resultados sugieren que la sobreexpresión de EGFR podría estar estimulada por diferentes oncogenes promotores del PTC.

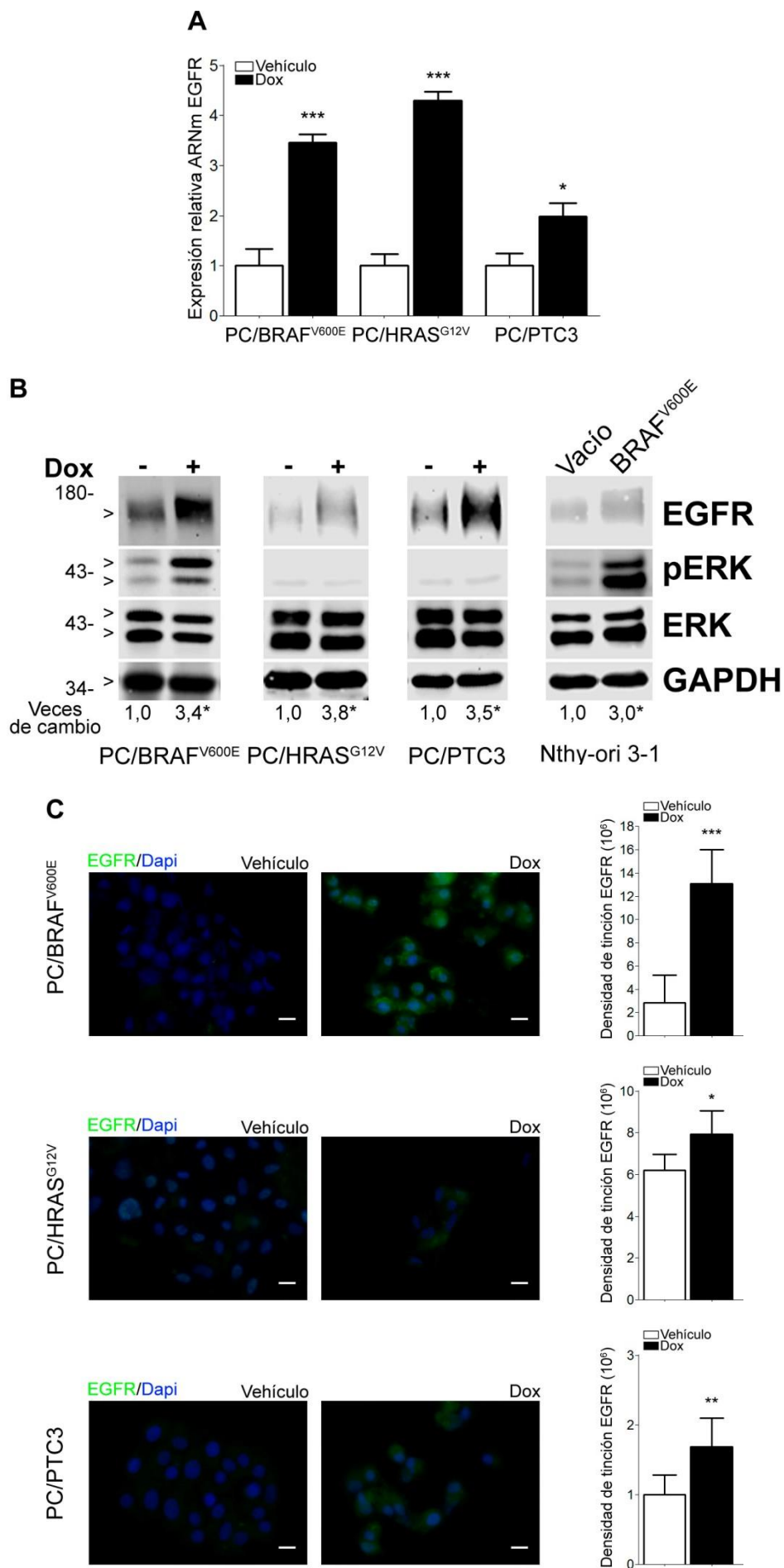


Figura 54. La expresión condicional de oncogenes incrementa los niveles de expresión de EGFR en modelos de PTCs. **A)** Evaluación de los niveles de ARNm de EGFR por RT/qPCR. El ARN total se extrajo de células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3 en ausencia o presencia de doxiciclina (Dox) (1 µg/ml) durante 48 hs. Los niveles de ARNm de EGFR se grafican relativos a la expresión de β-Actina. Los resultados (media ± DS) se indican como veces de cambio con respecto al ARNm de EGFR de células tratadas con vehículo. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs células tratadas con vehículo (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*). El gráfico mostrado es representativo de tres experimentos realizados de manera independiente (n=3). **B)** Western Blots realizados a partir de extractos proteicos totales de células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V}, PC/PTC3 y Nthy-ori 3-1. Se muestran niveles de expresión de EGFR (175 kDa) en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} o RET/PTC3 inducidos por doxiciclina (Dox) durante 48 hs o en respuesta a la transfección del vector de expresión para BRAF^{V600E} durante 48 hs en células Nthy-ori 3-1. La fosforilación de ERK (pERK) (42/44 kDa) indica la señalización gatillada por los oncogenes. GAPDH (37 kDa) fue utilizada como control de carga. La cuantificación de los niveles proteicos de EGFR se expresa relativa al nivel de expresión de GAPDH. El nivel de expresión de EGFR en células no tratadas o células transfectadas con el vector vacío se definió arbitrariamente como 1. Los resultados se expresan como veces de cambio respecto a la expresión de EGFR en células no tratadas o en células transfectadas con el vector vacío. * $P < 0,05$ vs células no tratadas o células transfectadas con el vector vacío (*unpaired Student's t test*). La imagen mostrada es representativa de tres experimentos realizados de manera independiente (n=2). **C)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia evaluando la expresión proteica de EGFR (ab-52894, Abcam) en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} o RET/PTC3 inducida por doxiciclina (Dox) (1 µg/ml) durante 48 hs. Se muestra la superposición de imágenes obtenidas para la marcación inmunofluorescente de EGFR (verde) y la marcación fluorescente del núcleo con Dapi (azul). Las barras de escala representan 10 µm. La cuantificación de los niveles proteicos de EGFR se expresa relativa al número de células por campo microscópico (paneles derechos). Los resultados se muestran como media ± SEM y corresponden a dos experimentos independientes (n=6).) * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs células tratadas con vehículo (*unpaired Student's t test*).

4.II.1.4. Los PTCs desarrollados en ratones transgénicos con expresión de BRAF^{V600E} en la glándula tiroides presentan niveles incrementados de EGFR

A fin de confirmar los resultados obtenidos *in vitro* se analizó el impacto de la actividad oncogénica de BRAF^{V600E} sobre la expresión de EGFR *in vivo*, utilizando ratones transgénicos que expresan el oncogén BRAF^{V600E} dirigido a las células foliculares tiroideas como modelo de PTC (65). De manera similar a lo anteriormente realizado para el análisis de TLR4, se obtuvieron cortes de tejidos tiroideos de ratones transgénicos y ratones no transgénicos controles de las mismas camadas y a diferentes edades (5, 12 y 30 semanas) y se procedió a evaluar mediante inmunohistoquímica la expresión de proteica de EGFR. En concordancia con los resultados obtenidos a partir de la base de datos del TCGA y los ensayos *in vitro*, se observaron niveles incrementados de EGFR en los PTCs provenientes de ratones transgénicos en comparación con el tejido normal tiroideo de ratones controles a todas las edades estudiadas (datos no mostrados). Sin embargo, la inducción de la expresión de EGFR fue mayor en la quinta semana de vida de los ratones transgénicos, demostrando un incremento significativo de la densidad de tinción de EGFR (Figura 55 A). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de EGFR podría ser un evento mediado por la actividad oncogénica de BRAF^{V600E} *in vivo*. Además, al igual que lo observado para la expresión de TLR4, el descenso de la expresión de EGFR en tumores de ratones transgénicos de edades más avanzadas podría deberse a la limitante de este modelo tumoral, donde se demostró una disminución de la expresión de BRAF^{V600E} a medida que el tumor progresa por una inhibición de la actividad del promotor de tiroglobulina (65).

Complementariamente, evaluamos la expresión de ARNm de EGFR mediante PCR a tiempo real a partir de muestras de PTCs de ratones transgénicos (n=8) y tejidos tiroideos de ratones controles (n=7) de las mismas camadas a las 5 semanas de edad. Sin embargo, a la inversa de lo observado para los niveles proteicos, no evidenciamos expresión diferencial del ARNm de EGFR entre los tejidos de PTCs provenientes de ratones transgénicos y los tejidos tiroideos normales de ratones controles (Figura 55 B). La falta de coincidencia para la expresión proteica y de ARNm de EGFR podría deberse a un diferente grado de activación de la vía de señalización que induce la expresión de este gen durante la carcinogénesis tiroidea.

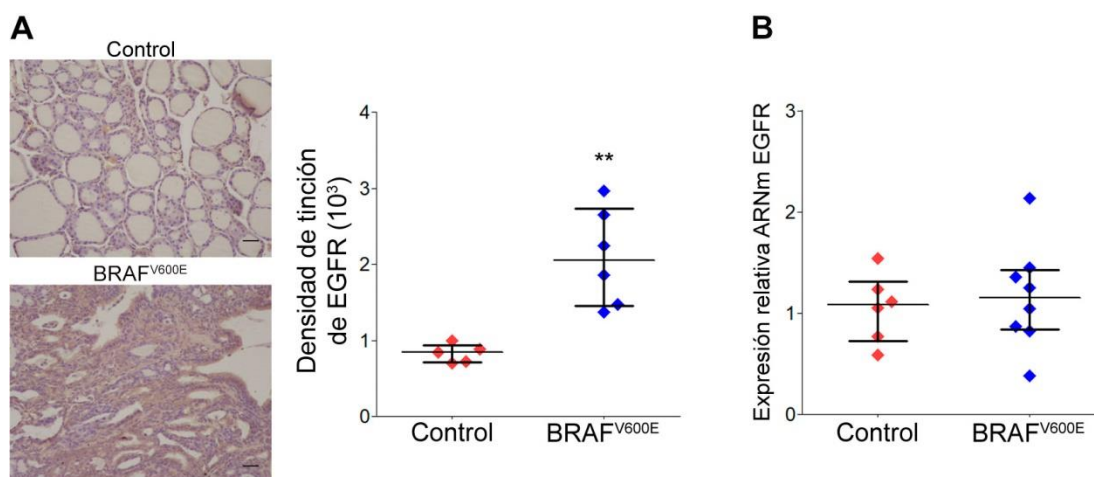


Figura 55. La expresión de BRAF^{V600E} dirigida al tejido tiroideo de ratones transgénicos incrementa los niveles de proteicos de EGFR. A) Imágenes representativas de cortes histológicos, a 200x de magnificación, correspondientes a tejidos tiroideos de ratones controles (n=5) y ratones transgénicos (Tg-BRAF^{V600E}) (n=6) de 5 semanas de edad, mostrando los niveles de expresión proteica de EGFR evaluados por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal de conejo anti-EGFR (ab-52894, Abcam). Las barras de escala representan 10 μm. La cuantificación de los niveles proteicos de EGFR se expresa relativa al número de células de las secciones de tejidos (panel derecho). Los resultados se muestran como mediana y rango intercuartil. ** P<0,01 vs control (Mann-Whitney t test). **B)** Evaluación de los niveles de ARNm de EGFR por RT/qPCR. El ARN total se extrajo de tejidos tiroideos de ratones controles (n=6) y ratones transgénicos (Tg-BRAF^{V600E}) (n=8) de 5 semanas de edad. Los niveles de ARNm de EGFR se grafican relativamente a la expresión de β-Actina. La cuantificación de los niveles de ARNm de EGFR se expresan como mediana y rango intercuartil y se indica como veces de cambio con respecto al ARNm de EGFR de ratones controles.

4.II.1.5. La activación exacerbada de la vía de señalización MAPK/ERK se correlaciona con niveles incrementados de ARNm de EGFR en el PTC

Para investigar si la expresión de EGFR varía en función del grado de activación de la vía de señalización MAPK/ERK en PTCs, se utilizaron los datos del transcriptoma derivado del TCGA (18) y se realizó un análisis bioinformático de correlación entre la expresión de ARNm de EGFR y el ERK score. Sorprendentemente, identificamos una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de ARNm de EGFR y el score de activación de ERK ($r_s=0,3236$, $P<0,0001$) de los PTCs (n=392) (Figura 56). Este resultado sugiere que la sobreactivación de la vía de señalización MAPK/ERK podría ser un evento necesario para conducir la expresión de EGFR en el PTC. Sin embargo, no podríamos descartar la posibilidad de que la asociación encontrada entre EGFR y la activación

MAPK/ERK pueda deberse a la contribución de una posible activación constitutiva de EGFR en este tipo de tumores.

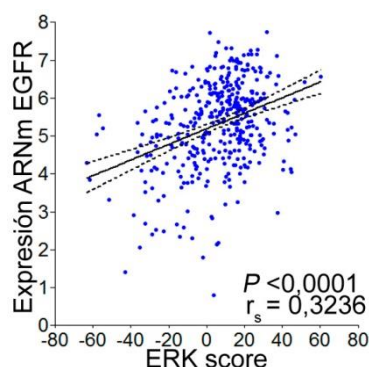
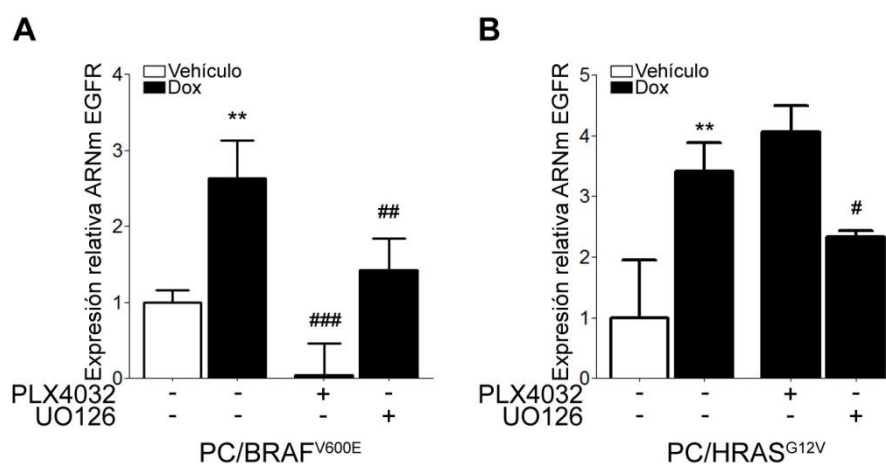


Figura 56. Correlación positiva entre los niveles de ARNm de EGFR y la activación de ERK. Análisis de correlación entre la expresión de ARNm de EGFR y el score de activación de ERK. Datos transcriptómicos de ARNseq se obtuvieron del TCGA (n=392). $P=0,0001$ (Spearman's correlation test). El ERK score fue calculado en base al valor promedio de la expresión de 52 genes para evaluar la activación de la vía de señalización MAPK/ERK.

4.II.1.6. La expresión condicional de oncogenes promotores de PTC induce expresión incrementada de EGFR a través de la señalización de MAPK/ERK

Para dilucidar la vía de señalización involucrada en la regulación de la expresión génica de EGFR en respuesta a la expresión los oncogenes BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3, se evaluó el efecto los inhibidores PLX4032 y UO126 sobre la expresión de EGFR en células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V}, PC/PTC3 bajo tratamiento con doxiciclina. En concordancia con la correlación positiva observada entre la expresión de ARNm de EGFR y el score de activación de MAPK/ERK, la inhibición de la señalización MAPK/ERK mediante UO126 redujo la expresión de ARNm de EGFR inducida por los distintos oncogenes (Figura 57). Además, la inhibición de BRAF^{V600E} mediante PLX4032 redujo el incremento en la expresión de ARNm de EGFR en respuesta al tratamiento con doxiciclina en células PC/BRAF^{V600E} (Figura 57 A). Debido a que el inhibidor PLX4032 es específico para la variante BRAF mutada (V600E), este inhibidor no tuvo efecto en la sobreexpresión de EGFR inducido por los oncogenes HRAS^{G12V} y RET/PTC3 dado que estas líneas celulares expresan BRAF en estado nativo (Figura 57 B y C).



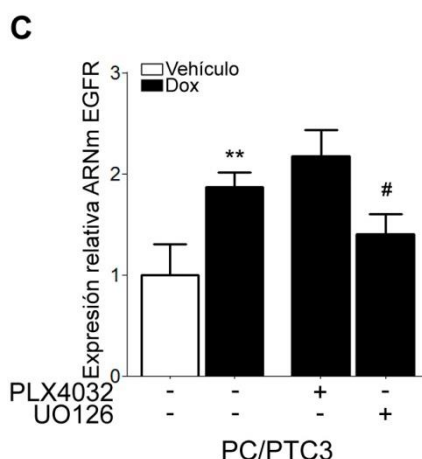


Figura 57. La señalización de MAPK/ERK regula la expresión de EGFR en respuesta a la expresión condicional de oncogenes promotores de PTC. Evaluación de los niveles de ARNm de EGFR por RT/qPCR a partir de células PC/BRAF^{V600E} (A), PC/HRAS^{G12V} (B) y PC/PTC3 (C). Se muestran niveles de ARNm de EGFR en respuesta a la expresión de los oncogenes inducida por doxiciclina (Dox) durante 48 hs y el efecto del tratamiento con los inhibidores químicos PLX4032 o UO126 durante 16 hs. Los niveles de ARNm de EGFR (media \pm DS) se indican relativos a la expresión de β -Actina. Los resultados se expresan como veces de cambio con respecto al ARNm de EGFR de células tratadas con vehículo. ** $P < 0,01$ vs células tratadas con vehículo y # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ vs células tratadas con Dox (one-way ANOVA, Newman-Keuls test). Los gráficos mostrados son representativos de tres experimentos realizados de manera independiente (n=3).

4.II.1.7. EGFR se expresa en líneas tumorales tiroideas humanas con actividad oncogénica BRAF^{V600E}

Para investigar si las células tiroideas tumorales humanas portadoras de la mutación BRAF^{V600E}, BCPAP, 8505c y KTC2 expresan EGFR, se determinó la expresión proteica del receptor mediante ensayos de western blot. Se utilizó como control positivo proteínas totales purificadas de células PC/BRAF^{V600E} tratadas o no con doxiciclina. Como se observa en la Figura 58, demostramos una expresión robusta de EGFR en todas las líneas tumorales analizadas. Además, evidenciamos que las líneas tumorales con expresión basal de pERK expresan niveles altos de EGFR (Figura 58); sugiriendo una vez más que la expresión de EGFR podría estar asociada a una activación exacerbada de la vía de MAPK/ERK. Sin embargo, no observamos una asociación aparente entre los niveles de expresión de EGFR con el grado de fosforilación de ERK.

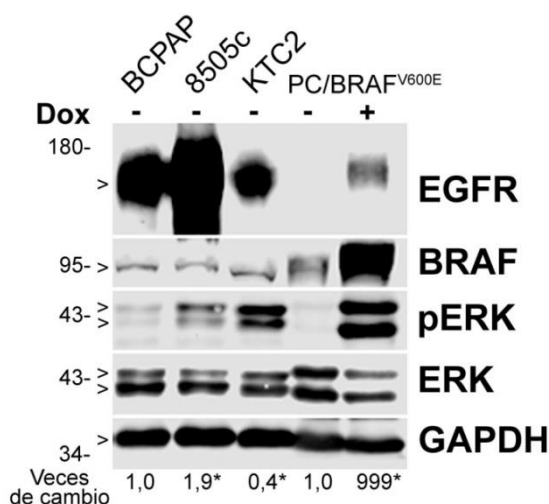
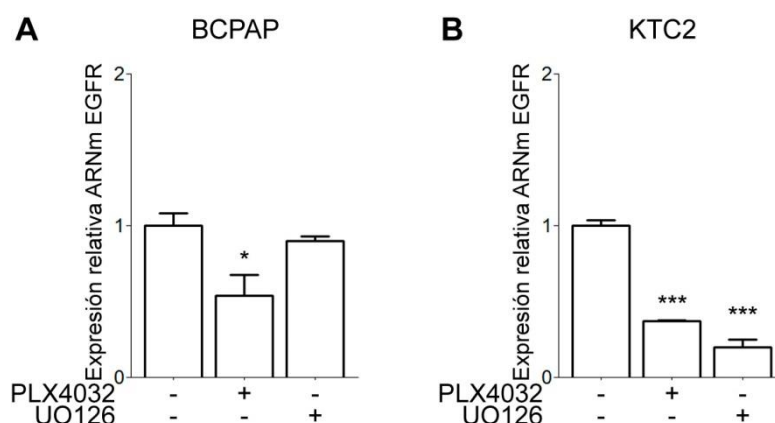


Figura 58. EGFR se expresa marcadamente en líneas tumorales tiroideas humanas BRAF^{V600E} positivas. Western Blot realizado a partir de extractos proteicos totales de células BCPAP, 8505c, KTC2 y PC/BRAF^{V600E}. Se muestran los niveles de expresión de EGFR (175 kDa). El incremento de la expresión de EGFR en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E} inducido por doxiciclina (Dox) (1 µg/ml) durante 48 hs en células PC/BRAF^{V600E} se utilizó como control positivo. La fosforilación de ERK (pERK) (42/44 kDa) indica la señalización gatillada por los oncogenes. GAPDH (37 kDa) fue utilizada como control de carga. El nivel de expresión de EGFR en células BCPAP o en células PC/BRAF^{V600E} no tratadas se definió arbitrariamente como 1. Los resultados se expresan como veces de cambio con respecto a la expresión de EGFR en células BCPAP o en PC/BRAF^{V600E} no tratadas. * $P < 0,05$ vs células BCPAP (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*). * $P < 0,05$ vs células PC/BRAF^{V600E} no tratadas (*unpaired Student's t test*). La imagen mostrada es representativa de tres experimentos realizados de manera independiente (n=2).

4.II.1.8. La señalización de MAPK/ERK inducida por el oncogén BRAF^{V600E} regula la expresión de EGFR en líneas tumorales tiroideas humanas

A fin de reforzar nuestras observaciones, se estudió si el oncogén BRAF^{V600E} es el responsable de modular los niveles de expresión de EGFR en líneas de carcinomas tiroideos humanos, tal como se observó en células PC/BRAF^{V600E}. Para ello, se procedió a evaluar la expresión de EGFR en respuesta a los inhibidores químicos PLX4032 y UO126. Como se especulaba, el tratamiento con PLX4032 en células BCPAP y KTC2 disminuyó significativamente los niveles de ARNm de EGFR (Figura 59 A y B). Sin embargo, el tratamiento con UO126 sólo disminuyó significativamente el nivel de EGFR en células KTC2 (Figura 59 B). La falta de coincidencia para el tratamiento con UO126 podría deberse a un diferente grado de activación de la vía de MAPK en distintos momentos de la actividad celular.

Adicionalmente, y en concordancia con lo anterior el tratamiento de células BCPAP, 8505c y KTC2 con los inhibidores químicos redujo significativamente los niveles proteicos de EGFR (Figura 59 C). En su conjunto estos resultados confirman la participación del oncogén BRAF^{V600E} mediante la señalización de MAPK/ERK en la inducción de la expresión de EGFR.



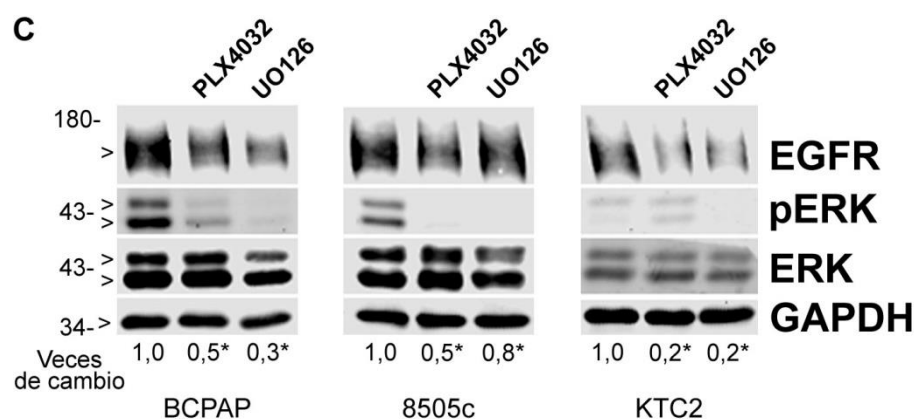


Figura 59. El oncogén BRAF^{V600E} regula la expresión de EGFR a través de la señalización de MAPK/ERK en células tumorales tiroideas humanas. Evaluación de los niveles de ARNm de EGFR por RT/qPCR a partir de células BCPAP (A) y KTC2 (B). Se muestran niveles de expresión de ARNm de EGFR en respuesta al tratamiento con los inhibidores químicos PLX4032 o UO126 durante 16 hs. Los niveles de ARNm de EGFR se indican relativos a la expresión de β -Actina. Los resultados (media \pm DS) se indican como veces de cambio con respecto al ARNm de EGFR de células no tratadas. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs células no tratadas (*one-way ANOVA, Newman-Keuls test*). El gráfico mostrado es representativo de tres experimentos realizados de manera independiente ($n=3$). **B)** Western Blots representativos realizados a partir de extractos proteicos totales de células BCPAP (A), 8505c (B) y KTC2 (C). Se muestran niveles de expresión de EGFR (175 kDa) en respuesta al tratamiento con PLX4032 o UO126 durante 16 hs. La disminución de la fosforilación de ERK (pERK) (42/44 kDa) permitió constatar la inhibición de la señalización de MAPK/ERK en respuesta a los inhibidores. GAPDH (37 kDa) fue utilizada como control de carga. El nivel de expresión de células no tratadas se definió arbitrariamente como 1. Los resultados se expresan como veces de cambio con respecto a la expresión de EGFR en células no tratadas. * $P < 0,05$ vs células no tratadas (*unpaired Student's t test*). Las imágenes mostradas son representativas de dos experimentos obtenidos de manera independiente ($n=2$).

4.II.1. Conclusiones

A través de análisis bioinformáticos identificamos que los PTCs presentan expresión diferencial de ARNm de EGFR en función a los oncogenes que alberguen, sugiriendo que la sobreexpresión de EGFR podría depender principalmente del estado de mutación de BRAF. En consistencia con informes previos (189), hemos evidenciado que niveles incrementados de ARNm de EGFR se asocian con un menor grado de diferenciación tiroidea en el PTC. Por otra parte, hallamos una asociación positiva entre los niveles aumentados de ARNm de EGFR y la activación de la señalización MAPK/ERK en PTCs. En correspondencia, nuestros estudios *in vitro* demostraron que la sobreexpresión de EGFR es una consecuencia de la sobreactivación de la vía de señalización MAPK/ERK inducida por diferentes oncogenes promotores de cáncer de tiroides. En correlación, hemos demostrado que EGFR está altamente expresado en tumores tiroideos de un modelo murino de PTC BRAF^{V600E} positivo.

4. II.2. Señalización cruzada entre TLR4 y EGFR

4.II.2.1. Niveles incrementados de TLR4 se correlacionan con niveles aumentados de EGFR

Para investigar si la expresión de TLR4 varía en función de los niveles de expresión de EGFR en PTCs, se realizó un análisis de correlación entre los niveles de expresión de ARNm de TLR4 y el ARNm de EGFR a partir de los datos transcriptómicos aportados por el TCGA. De manera interesante, se evidenció una asociación positiva significativa entre los niveles de expresión de ARNm de ambos genes tanto al evaluar la población completa de PTCs ($n=392$, $r_s=0,2196$, $P<0,0001$) (Figura 60 A), como así también en los PTCs que albergan exclusivamente el oncogén BRAF^{V600E} ($n=234$, $r_s=0,2133$, $P=0,0010$) (Figura 60 B). En su conjunto, estos resultados sugieren que ambos genes estarían regulados por la activación de una misma vía de señalización, sin embargo no podríamos descartar la posibilidad de que la señalización de estos receptores contribuya a la expresión de los mismos.

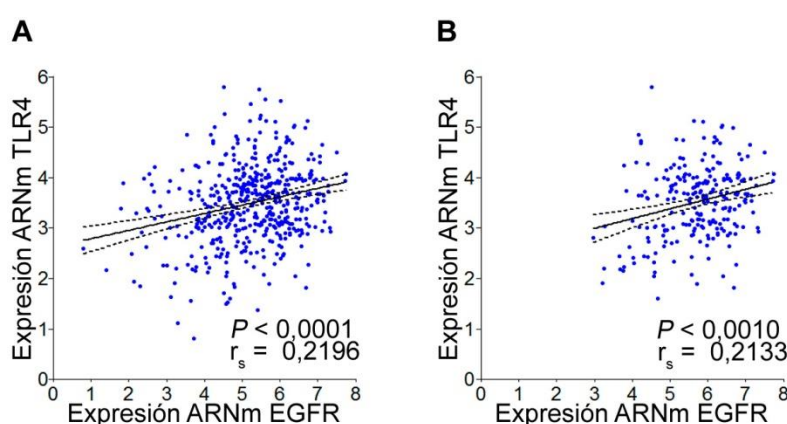


Figura 60. Análisis de correlación entre el ARNm de TLR4 en función del ARNm de EGFR en PTCs. Se grafica el análisis de correlación de la expresión de ARNm de TLR4 y EGFR utilizando la población completa de PTCs ($n=392$) (A) $P<0,0001$ (*Spearman's correlation test*); y utilizando un subconjunto de PTCs que albergan el oncogén BRAF^{V600E} ($n=234$) (B) $P=0,0010$ (*Spearman's correlation test*). Datos transcriptómicos de ARNseq se obtuvieron del TCGA.

4.II.2.2. La activación de TLR4 incrementa la fosforilación de EGFR

Recientemente, De *et al.* (166) revelaron una señalización cruzada entre EGFR y TLR4, observando que la activación de NF- κ B en respuesta a LPS además de TLR4 requiere de la expresión de EGFR y a la inversa, la expresión de TLR4 es requerida para la activación de NF- κ B mediada por la unión de EGF al EGFR. En el presente trabajo de tesis, demostramos que la presencia de los oncogenes BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3 incrementa los niveles proteicos de TLR4 y de EGFR, sugiriendo que el aumento concomitante de ambos receptores podría conducir a una hipersensibilidad a estímulos endógenos y exógenos para ambos receptores en tumores tiroideos que expresen dichos oncogenes.

En este sentido, nos propusimos evaluar la existencia del fenómeno conocido como transactivación de EGFR a través de la activación de TLR4 focalizando el estudio en células 8505c y BCPAP que contienen el oncogén BRAF^{V600E} y expresan niveles altos de ambos receptores en estudio. Para ello, células 8505c y BCPAP en estado basal cultivadas en medio libre de suero fueron tratadas durante períodos cortos de tiempos con LPS y EGF (como control positivo). La fosforilación de residuos tirosinas de EGFR constituye el paso inicial para la activación del receptor (160), por lo que la activación de EGFR fue evaluada través de

la semicuantificación de la fosforilación de dos residuos tirosina (Tyr 1068 y Tyr 1173) mediante ensayos de Western blot a partir de extractos proteicos totales. Como control de la funcionalidad de EGFR se evidenció un rápido incremento de su fosforilación en el residuo Tyr 1068 luego del tratamiento con distintas dosis de su ligando EGF en la línea 8505c (Figura 61 A). Sorprendentemente, la activación de TLR4 en células 8505c mediante el tratamiento con LPS indujo un rápido incremento de la fosforilación de EGFR en el residuo Tyr 1068 que posteriormente disminuyó sin alcanzar niveles basales (Figura 61 B). Por otro lado, el tratamiento con LPS de células 8505c y BCPAP también incrementó la fosforilación del residuo Tyr 1173 corroborando la activación de EGFR, (Figura 61 C y D).

En consonancia con lo demostrado anteriormente, demostramos el fenómeno de transactivación de EGFR luego del tratamiento con LPS en la línea celular humana de PTC, TPC-1 portadora del oncogén RET/PTC3 (Figura 61 E). En su conjunto, estos hallazgos sugieren la existencia de un fenómeno de transactivación del receptor de EGFR en respuesta a la activación de TLR4 en las células tumorales tiroideas que expresen niveles altos de ambos receptores en respuesta a la expresión de diferentes oncogenes.

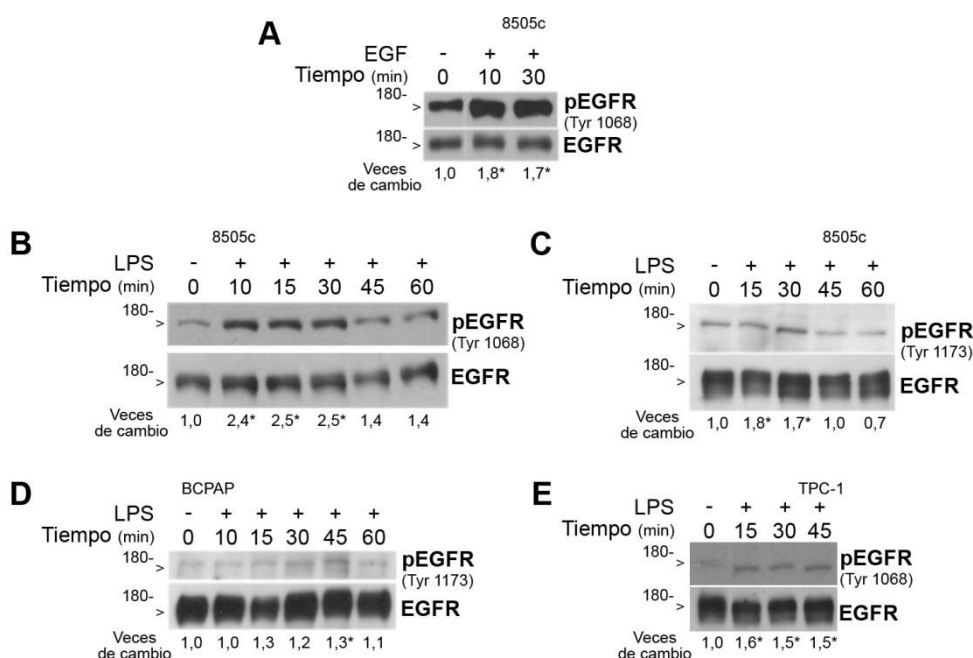


Figura 61. La activación de TLR4 incrementa los niveles de fosforilación de EGFR en modelos celulares de cáncer tiroideo. Western Blots realizados a partir de extractos proteicos totales de células 8505c (A, B y C), células BCPAP (D) y células TPC-1 (E). Niveles de expresión de EGFR fosforilado (pEGFR) en distintos residuos tirosinas (Tyr 1068 y Tyr 1173) y expresión total de EGFR (175 kDa) en respuesta al tratamiento con EGF (50 ng/ml) y LPS (1000 ng/ml) durante los tiempos indicados. Los niveles totales de EGFR fueron utilizados como control de carga. El nivel de expresión de células no tratadas se definió arbitrariamente como 1. Los resultados se expresan como veces de cambio con respecto a la expresión de EGFR en células no tratadas. * $P < 0,05$ (unpaired Student's *t* test). Los gráficos mostrados son representativos de tres experimentos realizados de manera independiente (n=2).

4. II.2. Conclusiones

A través de análisis bioinformáticos identificamos una asociación significativa entre niveles incrementados de EGFR y aumentados niveles de ARNm de TLR4 en la población completa de PTCs como así también en el subconjunto de PTCs que albergan el oncogén

BRAF^{V600E}. Estos resultados sugirieron que la expresión de TLR4 y EGFR está regulada por una misma vía de señalización y a su vez la señalización gatillada por estos receptores podría estar contribuyendo a la regulación de los niveles de expresión de los mismos. Por otro lado, hemos evidenciado que la estimulación de TLR4 con LPS induce la transactivación de EGFR, poniendo en evidencia una interacción cruzada entre TLR4 y EGFR en el cáncer tiroideo.

5. DISCUSIÓN

5.1. CAPÍTULO I: MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA SOBREEXPRESIÓN FUNCIONAL DE TLR4 EN LA CÉLULA TUMORAL TIROIDEA

En el presente trabajo de tesis doctoral se demostró sobreexpresión de TLR4 en carcinomas tiroideos humanos diferenciados, como así también una asociación con características clínicas desfavorables en los PTCs que expresan niveles altos de TLR4. Además, se evaluó el mecanismo molecular involucrado en la expresión aberrante de TLR4 en modelos experimentales de transformación maligna *in vitro*, dando el primer aporte al conocimiento del mecanismo subyacente por el cual oncogenes iniciadores de carcinoma tiroideo modulan los niveles de TLR4 en esta neoplasia. Estas observaciones fueron confirmadas *in vivo* utilizando tejidos tiroideos tumorales de ratones transgénicos con expresión del oncogén BRAF^{V600E} dirigida a células foliculares tiroideas e *in vitro* en modelos celulares humanos de PTC y ATC portadores del oncogén BRAF^{V600E}.

Existe vasta evidencia que indica una asociación entre la sobre-activación de la señalización de TLRs y la progresión del cáncer. En efecto, la señalización desregulada de TLRs fue reportada en varios cánceres humanos y relacionada a la producción exacerbada de un microambiente pro-inflamatorio que provee el contexto necesario para la progresión tumoral, angiogénesis, invasión, metástasis y la evasión de la vigilancia inmune (94, 262). La relevancia biológica de la expresión de TLRs en células tumorales parece ser compleja, dependiente del órgano que afecte, del contexto, del tipo de TLR y del ligando que se exprese (30, 104). Sin embargo, los mecanismos que regulan la expresión diferencial de TLRs en células tumorales continúan sin ser dilucidados.

Nuestro grupo demostró por primera vez en la membrana plasmática de tirocitos murinos normales la expresión concomitante de TLR4 y las moléculas accesorias MD-2 y CD14 necesarias para la correcta funcionalidad del receptor luego del reconocimiento de su ligando clásico, LPS. Además, hemos reportado que la estimulación de TLR4 con LPS en células tiroideas normales resulta en el incremento de la expresión de genes marcadores de diferenciación involucrados en la biosíntesis de hormonas tiroideas (149-151, 232). Por otro lado, en el presente trabajo hemos evidenciado en cortes de tejidos humanos de tumores tiroideos diferenciados (PTCs y FTCs) que los niveles proteicos de TLR4 se encuentran incrementados en comparación con tejidos tiroideos normales; Esto fue coincidente con algunos datos reportados en la literatura (152, 153). Por el contrario, no hemos evidenciado cambios significativos en los niveles de expresión de TLR4 en MTCs, un tumor que no deriva de la célula folicular tiroidea.

Hagström *et al.* (152) reportaron que tanto la sobreexpresión como la ausencia de expresión de TLR4 se asocian con enfermedad agresiva y metastásica en el FTC. Por otra parte, Dang *et al.* (153) demostraron que la sobreexpresión de TLR4 en el PTC se relaciona con mayor tamaño tumoral y mayor prevalencia de metástasis a nódulos linfáticos. Sin embargo, hasta el presente ningún estudio ha identificado el mecanismo molecular por el cual incrementa la expresión de TLR4 diferencialmente en el cáncer de tiroides y en otros tipos de tumores, motivando el interés en dilucidar este interrogante.

Nuestro estudio evidenció niveles incrementados de expresión proteica de TLR4 en muestras apareadas de tejidos de metástasis a nódulos linfáticos de PTCs en comparación con las secciones de tejidos de tumores papilares primarios. Además hemos demostrado que la estimulación con LPS de células BCPAP y 8505c (derivadas de PTC y ATC, respectivamente) incrementa la migración celular. Estos hallazgos estarían a favor de un

potencial rol pro-metastásico de la señalización de TLR4 en la tumorigénesis del PTC. En concordancia, Dang *et al.* (153) demostraron que la estimulación de células W3 derivadas de PTC humano con ácido hialurónico de bajo peso molecular (LMW-HA), un ligando endógeno de TLR4, incrementa la proliferación y la capacidad migratoria de la línea celular.

La patogénesis de los tumores tiroideos es relativamente sencilla en comparación con la patogénesis de otros tipos de cánceres. La gran mayoría de los tumores tiroideos derivados de la célula folicular resultan de alteraciones genéticas somáticas incluyendo mutaciones puntuales o rearrreglos cromosomales que originan proteínas con actividad constitutiva (oncogenes) o pérdida de la actividad de supresores tumorales (1). Particularmente, el PTC tiene una de las densidades mutacionales más bajas de los cánceres analizados mediante el secuenciamiento completo del exoma a través de la tecnología NGS (92). Se identificaron numerosas alteraciones que cumplen un rol fundamental tanto en el inicio como en la progresión del PTC. Sin embargo, la oncogénesis del PTC aún no está completamente esclarecida y continúa bajo investigación. La comprensión de la biología molecular del PTC a través del descubrimiento de nuevos marcadores y vías de señalización diferencialmente activadas promete ser de vital importancia tanto para el desarrollo de estrategias terapéuticas eficaces como para el avance en el uso de marcadores moleculares para el diagnóstico y/o el pronóstico de esta patología.

El PTC constituye la neoplasia tiroidea más prevalente representando un 80% mientras que el FTC constituye un 10% de los casos (5). El proyecto Del Atlas del Genoma del Cáncer (*The Cancer Genome Atlas*, TCGA) (18) ofrece el secuenciamiento del exoma completo de 496 pacientes con PTC, junto al tejido normal adyacente de 59 de los casos así como algunos datos y parámetros clínicos de relevancia. Por otra parte, la plataforma GSE33630 del estudio de la Expresión Génica Omnibus (*Gene Expression Omnibus*, GEO) ofrece el perfil transcriptómico de 49 casos de PTC junto al tejido normal adyacente de 45 de los pacientes. En los últimos años los análisis bioinformáticos que utilizan datos moleculares aportados por el TCGA en diferentes estudios combinados de correlación son ampliamente utilizados en trabajos científicos, cobrando veracidad y robustez debido a que el número de muestras de esta base de datos constituye la cohorte más grande de casos de PTCs estudiada hasta el presente (27, 263).

En el presente trabajo de tesis hemos realizado diversos estudios combinados de correlación mediante el examen de datos transcriptómicos provistos por el TCGA para la expresión de TLR4 en función de la expresión de los oncogenes iniciadores tumorales más prevalentes del PTC, como así también en función de la expresión de diversos genes y de diferentes *scores* de activación y parámetros clínicos. Algunos de los análisis bioinformáticos fueron validados al utilizar los datos moleculares aportados por la plataforma GSE33630 de la base de datos GEO. Mediante el estudio de los datos de las mencionadas plataformas, hemos evidenciado un incremento significativo de los niveles de expresión de TLR4 en PTCs respecto al tejido normal adyacente. Sin embargo, los PTCs no presentaron expresión diferencial de TLR4 entre tumores que albergan diferentes oncogenes, sugiriendo que la sobreexpresión de TLR4 en el PTC podría estar regulada por una misma vía de señalización. En concordancia, revelamos por primera vez una asociación positiva entre la expresión de TLR4 y la activación de la vía de señalización MAPK/ERK. Estos resultados sugirieron que la sobreexpresión de TLR4 podría estar comandada por la sobre-activación de la señalización MAPK/ERK inducida por diferentes oncogenes del PTC.

La letalidad y la agresividad de los tumores tiroideos derivados de células foliculares están inversamente correlacionadas con el grado de diferenciación (93). Mientras que, la sobreexpresión de genes o la expresión de variantes mutantes en tumores tiroideos bien diferenciados pueden ser interpretadas como eventos que ocurren tempranamente en el

proceso de carcinogénesis (64). En el presente trabajo de tesis, mediante análisis bioinformático de correlación, hemos evidenciado una asociación positiva significativa entre la expresión de TLR4 y el grado de diferenciación tiroidea (evaluado a través de un *score* de diferenciación) en la población de PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E} (con o sin mutaciones en el promotor de TERT). Estos resultados, sugirieron que la expresión de TLR4 es mayor en tumores más diferenciados; Otra posible interpretación sería que los niveles de expresión de TLR4 pueden disminuir progresivamente a medida que los PTCs se desdiferencian. Estos hallazgos están en discrepancia con nuestros resultados, en donde observamos un aumento de TLR4 en metástasis de PTCs a nódulos linfáticos en comparación con el tumor primario y con la menor supervivencia libre de enfermedad en pacientes con PTCs que expresan niveles altos de TLR4. Además, en el presente trabajo hemos demostrado niveles altos de expresión de TLR4 en líneas celulares humanas derivadas de ATC. La falta de coincidencia podría estar relacionada a que el *score* de diferenciación está calculado en base a la expresión de 16 genes relacionados al metabolismo y la función tiroidea normal y este *score* podría estar reflejando sólo parcialmente el grado de diferenciación tiroidea. En conjunto, nuestros resultados estarían a favor de un rol pro-tumorigénico de TLR4, por lo tanto desestimando la posibilidad de la pérdida de expresión del receptor a medida que progresa la enfermedad. Sin embargo, consideramos que sería de gran utilidad realizar un estudio comparativo de los niveles de expresión de TLR4 entre muestras clínicas de PDCs y ATCs humanos, dado que constituyen los tumores tiroideos más indiferenciados, y en muestras obtenidas a través de biopsias por PAAF de microcarcinomas tiroideos, debido a que esta subclasificación se corresponde con etapas tempranas de tumores tiroideos bien diferenciados.

Recientemente se identificaron dos mutaciones en el promotor de TERT que generan motivos de unión *de novo* para miembros de la familia de factores de transcripción ETS, resultando en una inapropiada activación de la expresión transcripcional del gen y liderando la inmortalización de las células tumorales. Por lo tanto las mutaciones en el promotor de TERT son consideradas potentes marcadores de enfermedad agresiva (264). Alrededor de dos tercios de los carcinomas tiroideos muestran activación aberrante de esta telomerasa, siendo más frecuente su activación en el PDC y el ATC que en el DTC (74). Particularmente, se informó que el 7,5% de los PTCs presentan mutaciones en el promotor de TERT (18). Además, las mutaciones en el promotor de TERT son significativamente más frecuentes en PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E}, dando un fenotipo más indiferenciado en estos tumores (74). A través del desarrollo del *score* de diferenciación descrito en el TCGA (18) se comprobó que los PTCs con “comportamiento BRAF^{V600E}” representan un grupo heterogéneo compuesto de tumores bien diferenciados y tumores portadores de mutaciones en el promotor de TERT con menor grado de diferenciación, mientras que los PTCs del grupo con “comportamiento RAS” representan una entidad más homogénea de tumores bien diferenciados (93, 262),18).

Mediante el análisis bioinformático comparativo de la expresión de TLR4 hemos notado que dentro de la población de tumores portadores de la mutación BRAF^{V600E} el subgrupo de tumores que albergan mutaciones en el promotor de TERT parece presentar niveles más bajos de expresión de TLR4 que el subgrupo de tumores con el TERT en estado nativo, aunque sin alcanzar significancia estadística. Este hallazgo podría explicar, al menos en parte, la heterogeneidad de la expresión de TLR4 que hemos observado en la población de PTCs BRAF^{V600E} positivos. En consecuencia, decidimos considerar a la población de PTCs BRAF^{V600E} positivos que albergan mutaciones en el promotor de TERT como una entidad funcionalmente diferente y por lo tanto fueron excluidos de los análisis integrados de datos

transcriptómicos para la expresión de TLR4 y datos clínicos como el tiempo de supervivencia libre de enfermedad y los valores de MACIS score.

El oncogén BRAF^{V600E} es el oncogén más prevalente del PTC (36-69% de los casos) (74). Se reportaron asociaciones significativas entre la mutación BRAF^{V600E} e indicadores de peor pronóstico como edad avanzada, sexo masculino, extensión extra tiroidea, metástasis a ganglio linfático, metástasis a distancia, estadificación tumoral más alta, mayor tamaño tumoral, mayor refractariedad al tratamiento convencional con iodo radioactivo y mayor recurrencia tumoral (60, 74, 93). En el presente trabajo de tesis se realizaron análisis integrados de datos clínicos y de datos del transcriptoma derivados del TCGA para tumores BRAF^{V600E} positivos (excluyendo a los tumores con mutaciones en el promotor de TERT). Sin embargo, estos análisis no pudieron ser realizados en PTCs portadores de oncogenes diferentes a BRAF^{V600E} debido a que el bajo número de muestras para estos tumores representó una limitante para la realización de los análisis estadísticos. De manera interesante, hemos hallado que pacientes con tumores BRAF^{V600E} positivos que expresaban niveles altos de TLR4 (por encima de la mediana poblacional) presentaron menor supervivencia libre de enfermedad en comparación con pacientes con tumores que mostraron niveles bajos de TLR4 (por debajo de la mediana poblacional). Además, hemos evidenciado una modesta asociación positiva entre la expresión de TLR4 y el predictor de pronóstico MACIS. En su conjunto y de manera similar a lo descrito por Hagström *et al.* (152) para FTCs, nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de TLR4 podría servir como indicador de peor pronóstico o como marcador de agresividad en PTCs que alberguen la mutación BRAF^{V600E}.

Las células PCCL3 derivan de células foliculares tiroideas de ratas Fisher y requieren de TSH para su crecimiento y para la expresión de genes específicos de diferenciación tiroidea. Esta línea celular mantiene las propiedades de diferenciación como la acumulación de yoduro, la expresión de NIS, Tg, TPO y TSHR de manera dependiente de TSH (50). Hace aproximadamente 17 años se establecieron diferentes líneas celulares derivadas de la expansión clonal de células PCCL3 para la expresión condicional inducible por doxiciclina de diferentes oncogenes, denominadas comúnmente como células PC/BRAF^{V600E}, PC/HRAS^{G12V} y PC/PTC3, entre otras (50, 51). Estas líneas celulares constituyen buenos modelos “*in vitro*” de transformación tiroidea maligna y son ampliamente utilizados para explorar las consecuencias biológicas tempranas luego de la activación oncogénica (50, 51). En el presente trabajo de tesis, a través de la utilización de estos modelos celulares, hemos demostrado que la expresión de los oncogenes más prevalentes del PTC (BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3), conduce a un incremento en la expresión de TLR4 en la membrana de la célula folicular tiroidea. Estos hallazgos sugieren que la sobreexpresión de TLR4 podría estar ocurriendo en etapas tempranas de la carcinogénesis tiroidea.

Los ratones transgénicos denominados Tg-BRAF^{V600E} se desarrollaron aproximadamente hace 12 años en el laboratorio del Dr. Fagin (65). Estos ratones expresan el oncogén BRAF^{V600E} bajo el control del promotor de Tg conduciendo de esta manera la activación oncogénica específicamente al tejido tiroideo. Los ratones Tg-BRAF^{V600E} desarrollan hacia la quinta semana de edad tumores tiroideos con características morfológicas y fenotípicas similares a PTCs humanos. Por lo tanto, estos animales constituyen un buen modelo de PTC *in vivo*, ampliamente utilizado para corroborar las observaciones obtenidas *in vitro* (226). En este trabajo a través de la utilización de tejidos de PTCs provenientes de ratones transgénicos Tg-BRAF^{V600E} hemos confirmado que la activación oncogénica de BRAF^{V600E} conduce a la sobreexpresión de TLR4 *in vivo*. Hemos evidenciado sobreexpresión de TLR4 en tumores provenientes de los animales a distintas edades (5, 12 y 30 semanas) en comparación con los correspondientes ratones no

transgénicos controles. El mayor incremento de la expresión de TLR4 en ratones transgénicos fue obtenido hacia la quinta semana de edad, hallazgo que podría estar relacionado a una disminución de la actividad del promotor de Tg en el transcurso del tiempo que conduce a una menor expresión del oncogén BRAF^{V600E}. A favor de esta suposición, se observó que en los ratones Tg-BRAF^{V600E} a medida que el tumor progresa la consiguiente desdiferenciación tiroidea produce una disminución de la actividad del promotor de Tg y en consecuencia provoca un descenso de la expresión del oncogén BRAF^{V600E} (65). Por lo tanto, el descenso de la expresión de TLR4 observada en tumores de ratones transgénicos a edades más avanzadas podría ser interpretada como un efecto vinculado a la limitante descrita del modelo tumoral. De este modo, nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de TLR4 estaría en dependencia continua de la actividad oncogénica de BRAF^{V600E}. Otra posible interpretación a considerar, sería que la sobreexpresión de TLR4 estaría ocurriendo mayoritariamente en etapas tempranas de la tumorigénesis del PTC, con un progresivo descenso a medida que los tumores se desdiferencian. Sin embargo, en base a nuestros resultados en donde demostramos niveles incrementados de TLR4 en muestras apareadas de metástasis de PTCs en nódulos linfáticos respecto a los tumores primarios y en base a los niveles aumentados de TLR4 hallados en líneas humanas derivadas de ATC, desestimamos que la causa de la disminución de los niveles de TLR4 en ratones Tg-BRAF^{V600E} a edades avanzadas sea una consecuencia de la pérdida de diferenciación.

Recientemente se establecieron otros tipos de modelos transgénicos con expresión estable del oncogén BRAF^{V600E}. En el laboratorio del Dr. Fagin desde el año 2011 se desarrollaron dos modelos tumorales con actividad oncogénica BRAF^{V600E} dirigida a tejido tiroideo, los denominados ratones Tg-rtTA/tetO-BRAF^{V600E} (265) y los ratones LSL-BRAF^{V600E}/TPO-Cre (266). Los ratones Tg-rtTA/tetO-BRAF^{V600E} expresan condicionalmente el oncogén BRAF^{V600E} de manera inducible a través de la administración por vía oral de doxiciclina (265). Los ratones LSL-BRAF^{V600E}/TPO-Cre constituyen un sistema de recombinación Cre-lox, diseñado para dirigir la expresión del oncogén BRAF^{V600E} en células tiroideas a través de la cruce de ratones LSL-BRAF^{V600E} (los cuales poseen el alelo BRAF mutante latente que puede ser activado por la recombinasa Cre a través de la escisión del casete floxado STOP) con ratones TPO-Cre (los cuales expresan la recombinasa Cre bajo el control del promotor de Tg) (266). Ambos tipos de ratones transgénicos constituyen excelentes modelos tumorales con expresión continua para el oncogén BRAF^{V600E} y son de gran utilidad para la confirmación de resultados obtenidos *in vitro* y para los ensayos de diferentes agentes terapéuticos (265, 266). En este sentido, consideramos que sería importante en un futuro determinar la expresión de TLR4 en tejidos de ratones Tg-rtTA/tetO-BRAF^{V600E} y/o ratones LSL-BRAF^{V600E}/TPO-Cre de diferentes semanas de edad para dilucidar si la sobreexpresión TLR4 en PTCs requiere de una continua actividad oncogénica o si la sobreexpresión de TLR4 es un evento que ocurre principalmente en etapas iniciales de la tumorigénesis con una progresiva disminución de los niveles de expresión a medida que avanza la enfermedad.

Por otro lado, se reportó que ratones deficientes de MyD88 (ratones MyD88^{-/-}) desarrollan tumores en colon inducidos experimentalmente con DSS, demostrando que la activación de la señalización mediada por MyD88 tiene un rol protector en este modelo de tumorigénesis (131). A la inversa, se comprobó que ratones deficientes de TLR4 (ratones TLR4^{-/-}) están significativamente protegidos contra el desarrollo del cáncer de colon inducido químicamente con DSS (132). Lu *et al.* (267) demostró que la estimulación de TLR4 a través de la endotoxina bacteriana LPS activa predominantemente la señalización “independiente de MyD88” en cáncer colorectal, hallazgo que podría explicar la

discrepancia mencionada anteriormente. Por otro lado, el efecto de la deficiencia de la señalización de TLR4 en la tumorigénesis tiroidea aún no fue estudiado, por lo que consideramos que sería de gran importancia evaluar la progresión tumoral tiroidea en ratones transgénicos obtenidos a partir de la cruce de ratones deficientes de TLR4 (ratones TLR4^{-/-}) con los modelos transgénicos anteriormente descritos con actividad oncogénica BRAF^{V600E} específicamente en el tejido tiroideo (ratones Tg-BRAF^{V600E}, ratones rtTA/tetO-BRAF^{V600E} o ratones LSL-BRAF^{V600E}/TPO-Cre).

La vía de señalización de los TLRs culmina principalmente en la activación del factor de transcripción NF-κB, el cual induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, factores antiapoptóticos y factores pro-angiogénicos (254). Reciente evidencia indica que la señalización de NF-κB, como así también las vías que culminan en su activación, son eventos cruciales en diversas etapas iniciales y de progresión tumoral (122). Es ampliamente conocido que las alteraciones génicas que lideran la activación constitutiva de la vía de MAPK/ERK tienen un rol fundamental en la carcinogénesis tiroidea (92). Sin embargo, alteraciones adicionales cooperan desregulando múltiples vías de señalización durante la progresión tumoral contribuyendo a una mayor agresividad. Particularmente, en el caso del melanoma se demostró una aberrante activación de la señalización de NF-κB dirigida por diferentes oncogenes a través de la activación de la señalización de MAPK/ERK (268). En la carcinogénesis tiroidea se comprobó que la señalización de los oncogenes BRAF, RAS y RET/PTC asociados con un fenotipo papilar pueden inducir la activación de NF-κB (158). Además se reportó actividad constitutiva de NF-κB en tumores tiroideos anaplásicos (158). La activación de la señalización de NF-κB en tumores tiroideos se asoció con mayor progresión e invasión tumoral a través de la sobreexpresión de metaloproteinasas (158). Considerando estos antecedentes, se propuso inhibir la señalización de NF-κB como un potencial blanco terapéutico para pacientes con enfermedad tumoral tiroidea refractaria a la radioiodoterapia (158, 269). Sin embargo, el mecanismo corriente arriba que resulta en el incremento de la activación de NF-κB en tumores tiroideos aún no fue definido. En el presente trabajo, a través de la utilización de modelos celulares de transformación tiroidea maligna, hemos corroborado que la actividad oncogénica de BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3 conduce al incremento de la activación de NF-κB. Además, hemos demostrado por primera vez que la estimulación de TLR4, a través del tratamiento con la endotoxina bacteriana LPS potencia el incremento de la actividad de NF-κB tanto en células PC/BRAF^{V600E} inducidas para la expresión del oncogén, como así también en las líneas celulares BCPAP, 8505c y KTC2, derivadas de tumores tiroideos humanos que albergan la mutación BRAF^{V600E}.

En diversos tipos de cánceres humanos se demostró incrementada producción de IL-6, conocida citoquina inducida por la señalización de NF-κB (270, 271). Particularmente, niveles séricos de IL-6 aumentados son considerados como biomarcadores de mal pronóstico en el cáncer colorectal (267). En relación al cáncer de tiroides, la expresión de IL-6 se correlaciona con una mayor agresividad en PTC y MTC (272). Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que la estimulación de TLR4 a través de LPS incrementa la expresión de IL-6 en células PC/BRAF^{V600E} inducidas para la expresión del oncogén, como así también en la línea tumoral humana BCPAP. Nuestros resultados sugieren que la señalización a través de TLR4 podría cooperar con la producción exacerbada de IL-6 demostrada en el PTC (272), contribuyendo a la formación de un microambiente pro-inflamatorio.

El óxido nítrico (NO) es sintetizado por la NO sintasa, de la cual se conocen varias isoformas de expresión constitutiva o inducible. La NO sintasa inducible (iNOS) produce cantidades elevadas de NO asociadas a procesos inflamatorios siendo esta secreción estimulada principalmente por citoquinas a través de la señalización de NF-κB (273). El

exceso de producción de NO puede ocasionar una respuesta citotóxica de manera directa. Por otra parte, el NO puede reaccionar con aniones superóxido resultando en peroxinitritos que pueden causar daño a tejidos cercanos (274). Se reportó que el incremento de la expresión de iNOS en respuesta a la activación de TLR4 contribuye a la resistencia de las células tumorales al ataque de los linfocitos T citotóxicos y de células asesinas (*natural killer*) (275). En relación a la patogénesis del carcinoma tiroideo se describió que la expresión incrementada de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y de la iNOS podría contribuir a la progresión tumoral del PTC (274, 276). En el presente trabajo de tesis hemos demostrado que la estimulación de TLR4 incrementa los niveles de expresión de iNOS en células PC/BRAF^{V600E} inducidas para la expresión del oncogén, como así también en la línea celular humana BCPAP, corroborando la funcionalidad de TLR4 en la célula tumoral tiroidea. Nuestros resultados sugieren que el incremento de la expresión de iNOS a través de la señalización de TLR4 podría estar contribuyendo a la evasión de la vigilancia del sistema inmune en el PTC. Sin embargo, consideramos que sería necesario realizar ensayos adicionales para corroborar que la inducción de la expresión de iNOS a través de la señalización de TLR4 sea reflejada en un incremento de los niveles de NO.

Mediante la utilización de diferentes vectores de expresión que codifican proteínas con propiedades dominantes negativas para elementos claves de la señalización de TLR4 hemos demostrado en el presente trabajo que la vía TLR4/MyD88/I κ B- α /NF- κ B se encuentra funcionalmente conservada en líneas celulares de PTC y ATC. De manera contraria a lo reportado por Lu *et al.* (267) en cáncer colorectal donde demostraron que la estimulación de TLR4 a través de la endotoxina bacteriana LPS activa predominantemente la señalización “independiente de MyD88”, nuestros resultados evidenciaron que la activación de la señalización de NF- κ B a través de la estimulación de TLR4 con LPS ocurre principalmente a través de la vía “dependiente de MyD88”.

Los TLRs reconocen moléculas que son ampliamente compartidas con patógenos denominadas PAMPs; sin embargo algunas de ellas son estructuralmente similares a moléculas propias del organismo liberadas por células dañadas por necrosis o como resultado de la proteólisis de componentes estructurales o de matriz extracelular, colectivamente referidas como DAMPs. En el presente trabajo hemos demostrado que las células tiroideas tumorales responden al agonista exógeno de TLR4, LPS. Hemos evidenciado que la estimulación de células tumorales tiroideas con LPS induce la activación de la señalización de NF- κ B, como así también la expresión de genes blancos para la vía de este factor de transcripción. Además, hemos demostrado que la estimulación de TLR4 con LPS incrementa la migración celular, un evento necesario para el inicio del proceso metastásico, lo cual fue coincidente con datos de reportados en la literatura (153). Sin embargo, aún no se dilucidó la posible participación de moléculas endógenas capaces de ser reconocidas por TLR4 para inducir la cascada de señalización de NF- κ B en el microambiente tumoral tiroideo. Nosotros hipotetizamos que la señalización de TLR4 en la célula tumoral tiroidea podría estar mediada por diferentes DAMPs. Al respecto, podría especularse que la proteína HMGB1 (*High mobility group box-1*) y los productos liberados por la proteólisis de ácido hialurónico serían potencialmente buenos candidatos como DAMPs, dado que se demostró una expresión alta de estos ligandos endógenos de TLR4 en microambientes tumorales de carcinomas tiroideos bien diferenciados (277, 278). Avalando la importancia de los DAMPs en la progresión tumoral tiroidea, reciente evidencia sugiere que el receptor multiligando de productos derivados de glicación avanzada (RAGE) media la respuesta pro-migratoria de la proteína pequeña de unión al calcio (S100A4) en células tumorales tiroideas (279).

El gen NFKBIA codifica la proteína I κ B- α , encargada de mantener secuestradas las subunidades de NF- κ B en el citoplasma celular. Se observó que el polimorfismo rs2233406

heterocigoto GA localizado en el promotor del gen NFKBIA causa una disminución de los niveles proteicos de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$, permitiendo la producción exacerbada de $\text{IL-1}\beta$ en células pulmonares (280). De manera interesante, la señalización de $\text{IL-1}\beta$ se vinculó previamente con la disminución de los niveles de expresión de NIS en células de PTC (281). Recientemente Plantinga *et al.* (163) describieron una asociación significativa entre la sensibilidad disminuida a la radioiodoterapia y la presencia del polimorfismo rs2233406 en el gen NFKBIA en pacientes con cáncer tiroideo. En estrecha relación con nuestros resultados, estudios funcionales utilizando las líneas celulares FTC133 (derivada de FTC) y BCPAP demostraron que la estimulación de TLR4 a través de LPS resulta en la secreción exacerbada de $\text{IL-1}\beta$. Por consiguiente, estos autores sugirieron que el microambiente inflamatorio tumoral podría contribuir a la resistencia a la radioiodoterapia (163).

Por otra parte, nuestro grupo reportó que la estimulación de TLR4 resulta en el incremento de la expresión de NIS a través de la señalización de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en tirocitos murinos normales (149, 151). Además hemos comprobado que diferentes dadores de NO producen una modificación post-traducciona de S-nitrosilación en la subunidad p65 de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ que resulta en la disminución de la expresión de NIS a nivel transcripcional en tirocitos murinos normales (282). Dado que en el presente trabajo de tesis hemos demostrado que la estimulación de TLR4 induce incrementada expresión de la enzima iNOS en un contexto tiroideo tumoral, hipotetizamos que la estimulación de TLR4 mediante un mecanismo autocrino o paracrino en un microambiente inflamatorio podría estar mediando la producción de NO que a su vez podría reducir los niveles de NIS en la membrana citoplasmática, contribuyendo de esta manera a la desdiferenciación tiroidea y a la refractariedad a la radioiodoterapia, como fue sugerido recientemente (163).

Los ratones transgénicos denominados villin-TLR4 se desarrollaron para dirigir la expresión de TLR4 bajo el control del promotor específico de intestino villin, conduciendo de esta manera la señalización de TLR4 en células intestinales. Se demostró que los ratones villin-TLR4 son más susceptibles al desarrollo de lesiones inflamatorias intestinales y a la presentación de neoplasias asociadas a colitis (133). Consideramos que sería de gran utilidad poder desarrollar en un futuro ratones con expresión constitutiva de TLR4 a nivel del tejido tiroideo de manera análoga a los ratones villin-TLR4 (133) mediante la utilización de un promotor específico de tiroides (como Tg) o a través de la utilización del sistema de recombinación Cre-lox. El desarrollo de estos ratones sería de gran utilidad para estudiar el efecto de la sobre-activación de la señalización de TLR4 sobre la expresión de marcadores de diferenciación tiroidea y la susceptibilidad al desarrollo de lesiones tiroideas malignas.

El gen de TLR4 es altamente polimórfico, reportándose hasta el presente 44 polimorfismos de nucleótido único (SNPs) (283). Ciertos polimorfismos de TLR4 se asociaron a riesgo incrementado para el desarrollo de diversas neoplasias derivadas de células epiteliales. Particularmente, los polimorfismos rs4986790, rs4986791 y rs10759932 parecen estar positivamente asociados al desarrollo de cáncer gástrico (144). Por otra parte, el polimorfismo rs11536889 localizado en la región 3' no traducida (3' UTR) del gen de TLR4 se asoció con riesgo incrementado para el desarrollo de cáncer de próstata y de colon (145, 146). En relación a polimorfismos de TLRs asociados al desarrollo de tumores tiroideos, Kim *et al.* (154) informaron una asociación significativa entre el polimorfismo rs11466653 en el gen de TLR10 y riesgo aumentado para el desarrollo de PTC de pequeño tamaño (microcarcinoma). Estos autores además reportaron una asociación entre los polimorfismos rs3804099 y rs3804100 en el gen de TLR2 con tumores tiroideos bilaterales, un criterio quirúrgico para la realización de tiroidectomía total (155). Sin embargo, hasta el presente no se investigó si existe una asociación entre características desfavorables y polimorfismos en el gen de TLR4 en tumores tiroideos.

Roger *et al.* (235), quienes llevaron a cabo un detallado estudio del mecanismo molecular que controla la regulación de la expresión del gen de TLR4 en macrófagos de ratones, evidenciaron varias regiones regulatorias positivas y negativas dentro del promotor de TLR4 y revelaron que dos sitios consenso para ETSs (comprendidos en la región -336/-104) eran necesarios para la actividad basal del promotor. El sitio consenso Ets distal (Ets^d, -292/-289) resultó indispensable para la transcripción basal del gen, mientras que el sitio Ets proximal (Ets^p -115/-112) aportó aproximadamente el 50% a la actividad basal del promotor. En el presente trabajo de tesis hemos proporcionado evidencia sobre los mecanismos que resultan en la sobreexpresión funcional de TLR4 en células de PTC. En este sentido, demostramos que el sitio distal de unión a ETS (Ets^d) previamente identificado en el promotor de TLR4 es crítico para la activación a nivel transcripcional de la expresión de TLR4 en respuesta a la actividad oncogénica de BRAF^{V600E}, HRAS^{G12V} y RET/PTC3.

Los factores de transcripción ETSs constituyen una de las familias del creciente número de reguladores maestros del desarrollo (284). Actualmente, 28 factores de transcripción ETS fueron identificados en humanos (285). Estos factores de transcripción regulan una pléthora de procesos, incluyendo el control del ciclo celular, diferenciación, proliferación, apoptosis, remodelación de tejidos y angiogénesis (258). La activación aberrante de la familia ETS a lo largo de diversas etapas de la tumorigénesis se reportó en diversos tumores sólidos (285). Varios miembros de la familia ETS se describieron como blancos directos de la señalización MEK/ERK y recientemente se propuso que la terapia dirigida contra diferentes miembros de ETSs podría sustituir a los inhibidores de MEK/ERK (259). Por otra parte, se reportó que la inducción de la expresión de ETS1 y ETS2 es necesaria para la transformación maligna de la célula tiroidea (286). Además, se demostró que la expresión del ARNm de ETS1 se encuentra regulada positivamente en PTCs que albergan el oncogén BRAF^{V600E} a través de señalización ERK1/2 (260). En el presente trabajo mediante el análisis bioinformático de datos transcriptómicos aportados por el TCGA y la plataforma GSE33630 de GEO hallamos una correlación positiva significativa entre los niveles de ARNm de TLR4 y diferentes miembros de la familia de ETS. En este sentido, identificamos que el factor ETS1 presentaba la mayor asociación positiva con los niveles de ARNm de TLR4. En correlación, mediante ensayos de inmunohistoquímica evaluamos los niveles proteicos de ETS1 en *microarrays* de tejidos tiroideos humanos, demostrando sobreexpresión de este factor de transcripción en el tejido de PTCs en comparación con el tejido tiroideo normal. Además, el análisis de correlación entre los niveles proteicos de TLR4 y ETS1 (en tejidos de PTCs equivalentes) nos permitió observar una asociación positiva significativa, reforzando un potencial rol de ETS1 en la regulación de la expresión de TLR4 en el PTC.

En el presente trabajo hemos demostrado que el silenciamiento de ETS1 (a través de un ARN de interferencia específico) previene el incremento de los niveles de ARNm y de la actividad transcripcional de TLR4 inducidos por el oncogén BRAF^{V600E}. Además, hemos evidenciado que la sobreexpresión de ETS1 (a través de un vector de expresión para este factor de transcripción) induce el incremento de los niveles proteicos y de la actividad transcripcional del promotor de TLR4 en células tiroideas normales. En coincidencia, Shaikhibrahim *et al.* (287) realizaron un detallado análisis mediante *microarrays* para evaluar la expresión de genes regulados por ETS1 en células PC3 derivadas de cáncer de próstata. Estos autores evidenciaron que la inhibición de la expresión de ETS1 disminuía los niveles de ARNm de TLR4 y sugirieron que ETS1 podría constituir un regulador positivo para la expresión del gen de TLR4 en células de cáncer.

Roger *et al.* (235) demostraron experimentalmente que ESE1 es el principal miembro de la familia de factores de transcripción ETS que se une al sitio Ets^d para inducir la

transcripción basal del gen de TLR4 en macrófagos de ratones. Además, estos autores demostraron que los factores de transcripción ETS1, ETS2, ELK1 y PU.1, miembros de la familia de ETS, no tienen relevancia durante la expresión basal del gen de TLR4 en los macrófagos de ratones (235). En este trabajo de tesis, a través de ensayos de CHIP, hemos demostrado que ETS1 se une directamente al promotor de TLR4 en respuesta a la actividad oncogénica de BRAF^{V600E}, dirigiendo la sobreexpresión de TLR4 a nivel transcripcional en células de PTC. Por lo tanto y en concordancia con lo informado por Shaikhibrahim *et al.* (287) nuestros resultados sugieren que la expresión de TLR4 se encuentra regulada diferencialmente en el contexto tumoral, a través de la expresión exacerbada de factores de transcripción impulsados por la sobre-activación de vías de señalización inducidas por diferentes oncogenes.

En conjunto, los resultados del presente trabajo referidos a la regulación de la expresión de TLR4 indican que el programa transcripcional de este receptor se encuentra exacerbado en PTCs que albergan oncogenes activantes de la vía MAPK/ERK. Hemos evidenciado además que la estimulación de TLR4 incrementa la actividad transcripcional de NF- κ B e induce la expresión de genes de respuesta inflamatoria en modelos celulares de PTC. Estos datos plantean un enigma sobre el rol de la señalización de TLR4 en el desarrollo y progresión del PTC. Considerando que la señalización intracelular gatillada por TLR4 confluye en la activación de NF- κ B, nuestros resultados apoyan un potencial rol pro-oncogénico de la señalización de TLR4 en el PTC. El esclarecimiento del impacto de la actividad transcripcional estimulada por TLR4 en la progresión del carcinoma tiroideo, así como los mecanismos involucrados en la regulación de su expresión y en su activación, resultan de gran relevancia clínica al brindar los fundamentos para la comprensión de la etiopatogenia de la neoplasia, aportar futuras alternativas para el diseño de herramientas diagnósticas capaces de identificar carcinomas tiroideos potencialmente más agresivos y contribuir al desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas que redunden en el beneficio de los pacientes.

5.II. CAPÍTULO II: MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA EXPRESIÓN Y TRANSACTIVACIÓN DE EGFR EN LA CÉLULA TIROIDEA TUMORAL

Numerosos reportes indicaron una asociación entre la expresión aberrante de EGFR y la progresión tumoral. En efecto, el 30% de los tumores sólidos presentan alteraciones genéticas en EGFR con ganancia de función que generalmente se asocian con mal pronóstico (177). Se describió que la supervivencia de diversas células tumorales es estrictamente dependiente de la forma mutante o de la sobreexpresión de EGFR (172). En concordancia, terapias con inhibidores de tirosina quinasa o anticuerpos neutralizantes para miembros de la familia de EGFR son usualmente eficientes en el tratamiento contra el cáncer (172-174). Más aún, las terapias combinadas de inhibidores de EGFR con agentes dirigidos contra vías de señalización que controlan la proliferación o la apoptosis celular son posibilidades terapéuticas prometedoras que amplían el alcance del tratamiento antitumoral (177). Sin embargo, los mecanismos que regulan la expresión diferencial de EGFR en células tumorales continúan sin ser dilucidados.

Los niveles de expresión de EGFR se encuentran incrementados en el PDTC y el ATC en comparación con el tejido tiroideo normal y el DTC. Por lo tanto, la sobreexpresión de EGFR se definió como un marcador molecular de desdiferenciación y progresión tumoral en los carcinomas tiroideos (189, 190). Landriscina *et al.* (189) demostraron expresión de EGFR en el PTC y observaron que los niveles de este receptor incrementan durante la desdiferenciación o la transformación anaplásica. Dado que la sobreexpresión de EGFR fue asociada a un fenotipo invasivo, quimiorresistente, con crecimiento independiente de TSH y con pérdida de diferenciación, se propuso que el aumento de la expresión de EGFR podría servir como un importante biomarcador de PTC agresivos (189).

Clásicamente se pensaba que la sobreexpresión de EGFR y mutaciones en BRAF o RAS eran eventos mutuamente excluyentes, debido a que estos oncogenes comparten vías de señalización similares (288, 289). Sin embargo, Fisher *et al.* (190) evidenció concomitante sobreexpresión de EGFR y expresión de BRAF^{V600E} en PTCs. En concordancia con estos autores, nuestros estudios bioinformáticos a partir de datos transcriptómicos de PTCs aportados por el TCGA indicaron una fuerte correlación positiva entre los niveles de expresión de EGFR y la presencia de la mutación BRAF^{V600E}.

En el presente trabajo de tesis evidenciamos por primera vez una expresión diferencial de EGFR entre PTCs que expresan diferentes oncogenes. Hemos demostrado que los PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E} poseen niveles incrementados de expresión de EGFR en comparación con PTCs que expresan BRAF nativo así como mutaciones en HRAS, NRAS y fusiones cromosómicas NTRK y RET. Estos resultados ponen en evidencia la potencial existencia de una vía de señalización diferencialmente activada dirigiendo la sobrerregulación de EGFR en PTCs BRAF^{V600E} positivos.

En este trabajo de tesis demostramos que en las líneas celulares humanas derivadas de PTC y ATC la sobreexpresión de EGFR está regulada por la actividad del oncogén BRAF^{V600E} implicando la participación de la vía de señalización MEK/ERK. Además, mediante estudios *in vitro* utilizando modelos celulares de transformación tiroidea maligna, hemos demostrado que tanto la actividad oncogénica de BRAF^{V600E}, como la de HRAS^{G12V} y de RET/PTC3 a través de la activación MAPK/ERK induce significativamente el incremento de la expresión proteica y del ARNm de EGFR. Dado que las células transformadas utilizadas ponen en evidencia efectos que ocurren en etapas tempranas de la transformación maligna, la sobre-regulación de la expresión de EGFR inducida por la actividad oncogénica de HRAS^{G12V} y RET/PTC3 y su falta de correlación con el análisis bioinformático donde identificamos menor expresión de EGFR en los PTCs portadores de estos oncogenes podría

ser explicada, al menos en parte, como el resultado de la activación inicial de algún factor de transcripción común en estos modelos celulares, que luego posiblemente disminuye su actividad a medida que avanza la tumorigénesis hacia PTCs. Se demostró que la inhibición específica del oncogén BRAF^{V600E}, como HRAS^{G12V} y RET/PTC3 en diferentes líneas celulares que albergan diferencialmente estos oncogenes, incrementa la sensibilidad al inhibidor específico de EGFR, gefitinib mejorando la efectividad terapéutica (290). Estos antecedentes indicarían que a pesar de que EGFR se encuentra diferencialmente sobre-regulado en PTCs portadores de la mutación BRAF^{V600E}, la expresión y la actividad exacerbada de este receptor también estaría conservada en PTCs que alberguen los oncogenes HRAS^{G12V} y RET/PTC3.

Mediante la utilización de tejidos de PTCs provenientes de ratones transgénicos Tg-BRAF^{V600E} hemos confirmado que la expresión del oncogén BRAF^{V600E} conduce a la sobreexpresión de EGFR *in vivo*. Hemos evidenciado sobreexpresión de EGFR en tumores provenientes de ratones Tg-BRAF^{V600E} de distintas edades (5, 12 y 30 semanas) en comparación con los correspondientes ratones controles no transgénicos. Sin embargo, y de manera similar a lo observado para TLR4, el mayor incremento de la expresión de EGFR en PTCs de estos animales fue obtenido hacia la quinta semana de edad. En base a nuestros resultados que revelaron niveles incrementados de EGFR en líneas humanas derivadas de ATC y teniendo en cuenta los datos de la literatura (189), consideramos que el descenso de la expresión de EGFR observado en tumores de ratones transgénicos a edades más avanzadas podría ser una consecuencia de la limitante del modelo tumoral anteriormente planteada. Estos hallazgos sugieren que la sobreexpresión de EGFR podría estar en dependencia continua de la actividad oncogénica de BRAF^{V600E} en estos tumores, debido a que la expresión del oncogén disminuye progresivamente en este modelo tumoral.

Mediante análisis bioinformático utilizando los datos moleculares de PTCs derivados del TCGA no hemos observado una correlación significativa entre los niveles de expresión de EGFR y el grado de diferenciación tiroidea en la cohorte de PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E} (con o sin mutaciones en el promotor de TERT), posiblemente a causa de la homogeneidad de los niveles de ARNm de EGFR en este subgrupo de tumores. Por otro lado y en concordancia con trabajos previos reportados en la literatura (175, 190), hemos evidenciado una asociación negativa estadísticamente significativa entre la expresión de EGFR y el grado de diferenciación tiroidea al estudiar la población completa de PTCs. Dado que la mayoría de los tumores que albergan la mutación BRAF^{V600E} presentan menor grado de diferenciación (con valores negativos en el *score* de diferenciación), consideramos que la significancia estadística de este análisis podría estar vinculada a la sobreexpresión de EGFR anteriormente observada para tumores BRAF^{V600E} positivos. Sin embargo, no podríamos descartar la posibilidad de que el menor grado de diferenciación tiroidea en PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E} sea una consecuencia de la expresión exacerbada de EGFR.

Es de amplio conocimiento que la señalización de MAPK/ERK está fuertemente activada en PTCs con “comportamiento BRAF^{V600E}” perdiendo relevancia en tumores con “comportamiento RAS” (18, 92). En concordancia, a través del análisis bioinformático de datos de PTCs provistos por el TCGA, revelamos una asociación positiva estadísticamente significativa entre la expresión de ARNm de EGFR y la activación de la vía de señalización MAPK/ERK. Estos hallazgos sugirieron que la sobreexpresión diferencial de EGFR podría estar en dependencia de la sobre-activación de la vía de señalización MAPK/ERK. Dado que la mayoría de los tumores que albergan la mutación BRAF^{V600E} presentan niveles altos de ERK *score* (valores positivos de *score*), consideramos que la significancia estadística de este análisis podría estar vinculada a la sobreexpresión de EGFR anteriormente observada para tumores BRAF^{V600E} positivos. Por otro lado, a través de ensayos con inhibidores químicos específicos se demostró que EGFR activa la señalización de MAPK/ERK mediante una vía

independiente de BRAF^{V600E} (290). En base a todas estas observaciones, no podríamos descartar la posibilidad de que la activación de la señalización de EGFR podría estar contribuyendo a la sobre-activación de MAPK/ERK en el PTC.

En el presente trabajo, mediante diferentes estrategias metodológicas hemos demostrado que la señalización a través de MAPK/ERK induce tanto la expresión de TLR4 como de EGFR en modelos celulares de PTC y ATC. Además mediante análisis bioinformático utilizando la base de datos del TCGA hemos evidenciado una fuerte correlación positiva entre los niveles de expresión de TLR4 y EGFR al evaluar la población completa de PTCs, como así también al evaluar los tumores que albergan la mutación BRAF^{V600E}. Dado que hemos demostrado sobreexpresión de EGFR diferencialmente en PTCs que albergan el oncogén BRAF^{V600E} respecto a tumores portadores de otros oncogenes pero no hemos hallado diferencias en la expresión de TLR4 entre PTCs que albergan diferentes oncogenes, estimamos que la asociación entre los niveles de TLR4 y EGFR no sería una mera coincidencia del análisis. Por otro lado, considerando que la activación de EGFR señala a través de la vía MAPK/ERK mediante una vía independiente de BRAF^{V600E} (176, 290), nuestros hallazgos sugieren que la señalización a través de EGFR podría estar contribuyendo a la sobrerregulación de la expresión de TLR4 en tumores que expresen niveles altos de EGFR. Hasta el presente no hay datos en la literatura que indiquen una regulación de los niveles de expresión de TLR4 a través de la señalización gatillada por EGFR, por lo tanto sería de gran importancia determinar si el silenciamiento de la expresión de EGFR modifica los niveles de expresión de TLR4 tanto *in vitro* como *in vivo*.

Numerosa evidencia sugiere que los factores de crecimiento peptídicos tienen un importante papel en la transformación oncogénica. Sin embargo, una característica importante de las células transformadas es que exhiben un requerimiento menor de factores de crecimiento suministrados exógenamente para mantener una alta tasa de proliferación. El menor requisito nutricional de las células tumorales podría deberse, al menos en parte, a la capacidad de producir niveles altos de factores de crecimiento peptídicos que son reconocidos en última instancia por receptores afines de manera autocrina y/o paracrina (171). Particularmente, el incremento en la expresión de EGF determinado mediante inmunohistoquímica fue asociado a un mayor número de recurrencias en pacientes con PTC (186). Además, en PTCs humanos se demostró expresión incrementada de TGF- α en paralelo a la sobreexpresión de EGFR (188). En correlación, la mayoría de las líneas celulares derivadas de tumores tiroideos responden al tratamiento con el inhibidor específico de EGFR, gefinitib en condiciones basales (290). Por otra parte, estudios *in vivo* comprobaron buena respuesta clínica al tratamiento con inhibidores de EGFR en tumores anaplásicos que sobreexpresan EGFR (192). En su conjunto, estos hallazgos sugieren que en el cáncer de tiroides se sintetizan y liberan ligandos capaces de activar a EGFR a través de un mecanismo autocrino y/o paracrino.

Como se mencionó anteriormente, el receptor EGFR puede ser transactivado por otras clases de receptores de membrana. Al respecto, numerosos reportes describieron una interacción cruzada entre TLR4 y EGFR, demostrando que la estimulación de TLR4 a través de diferentes agonistas específicos para este receptor redundaba en la activación de EGFR en diversas células tumorales y no tumorales (107, 166, 208, 209, 211, 212). Recientemente el receptor EGFR fue reconocido como miembro efector de una nueva vía de señalización "no-canónica" para el receptor TLR4 (121). Aunque el mecanismo por el cual EGFR forma parte de la vía de señalización de TLR4 es poco claro, existen reportes donde se demuestra una interacción física entre estos receptores en la membrana citoplasmática y en vesículas endocíticas (107, 208), mientras que otros trabajos proponen la participación de transductores de la familia de quinasas Src como intermediarios de la transactivación (166,

214, 215). De manera interesante, se demostró que la activación de la vía de señalización de NF- κ B a través de la interacción cruzada entre TLR4 y EGFR ocurre de manera bidireccional (166). En este sentido, la activación de NF- κ B en respuesta a EGF requiere necesariamente de la expresión funcional de TLR4 y, a la inversa, la activación de NF- κ B en respuesta a LPS requiere de la expresión funcional de EGFR (280).

En el presente trabajo hemos demostrado niveles aberrantemente incrementados de TLR4 y EGFR en PTCs, especialmente en tumores que albergan la mutación BRAF^{V600E}. Esta sobreexpresión de TLR4 y EGFR nos sugirió la presencia de una hipersensibilidad adquirida tanto a estímulos endógenos como exógenos para ambos receptores en el PTC. Nuestros resultados evidenciaron que la activación de TLR4 mediante LPS induce una rápida fosforilación de los residuos tirosinas Tyr1068 y Tyr1173 de EGFR en líneas celulares humanas derivadas de PTC y ATC que albergan la mutación BRAF^{V600E}. La activación del EGFR mediante fosforilación de residuos tirosinas se relaciona con la dimerización del receptor y la activación de las vías de señalización de MAPK/ERK y NF- κ B (256). Nuestros hallazgos permitieron así demostrar por primera vez el mecanismo de transactivación de EGFR a través de la activación de TLR4 en el cáncer de tiroides, como se comprobó en otros tipos de tumores (107, 166, 208). En consecuencia, consideramos que sería de gran importancia poder determinar si la interacción cruzada entre TLR4 y EGFR ocurre de manera bidireccional en las células tiroideas tumorales.

En el presente trabajo hemos demostrado que la vía de señalización TLR4/MyD88/I κ B- α /NF- κ B se encuentra funcionalmente conservada en líneas celulares humanas de PTC y ATC. Recientemente, se demostró que la disminución de la expresión de EGFR, como así también la inhibición de su actividad, impide la activación constitutiva de NF- κ B en varias líneas celulares de cáncer (291). Por lo tanto sería importante develar si la expresión funcional de EGFR constituye un evento indispensable tanto durante la activación de la vía de señalización de NF- κ B a través del reconocimiento de ligandos de TLR4 como durante el reconocimiento de ligandos propios de EGFR en células tiroideas tumorales.

Teniendo en cuenta que la desregulación de la señalización de NF- κ B juega un importante papel en la progresión del cáncer de tiroides (158) y considerando el potencial rol pro-oncogénico de TLR4 propuesto en el presente trabajo, nuestros resultados plantean la necesidad de dilucidar qué moléculas endógenas del microambiente tumoral tiroideo serían capaces de ser reconocidas por TLR4 y/o EGFR. El descubrimiento de los mecanismos que conducen a la señalización aberrante de NF- κ B mediante la interacción TLR4-EGFR pondría en evidencia la importancia funcional de estos receptores, ponderando los efectos en función de los niveles de expresión de EGFR y revelando la contribución del microambiente tumoral hacia la progresión de la neoplasia tiroidea.

El diagnóstico del cáncer de tiroides se basa en la evaluación ecográfica del nódulo tiroideo y el análisis citológico de una biopsia obtenida mediante PAAF. Sin embargo, el 25% de los nódulos tiroideos poseen citología indeterminada o sospechosa (292). Actualmente existe gran interés en identificar marcadores que permitan mejorar la sensibilidad diagnóstica de la citología para evitar tiroidectomías innecesarias en pacientes con lesiones benignas. En base a los resultados planteados en el presente trabajo, consideramos que sería de gran relevancia poder evaluar en un futuro si el programa transcripcional de la interacción TLR4-EGFR permite realizar un diagnóstico diferencial de nódulos tiroideos con citología indeterminada. Por otra parte, la detección concomitante de la sobreexpresión de TLR4 y EGFR podría ser de utilidad como marcador pronóstico para predecir el comportamiento y agresividad de los carcinomas tiroideos y permitir optimizar el abordaje terapéutico.

6. CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis doctoral permitió extraer las siguientes conclusiones:

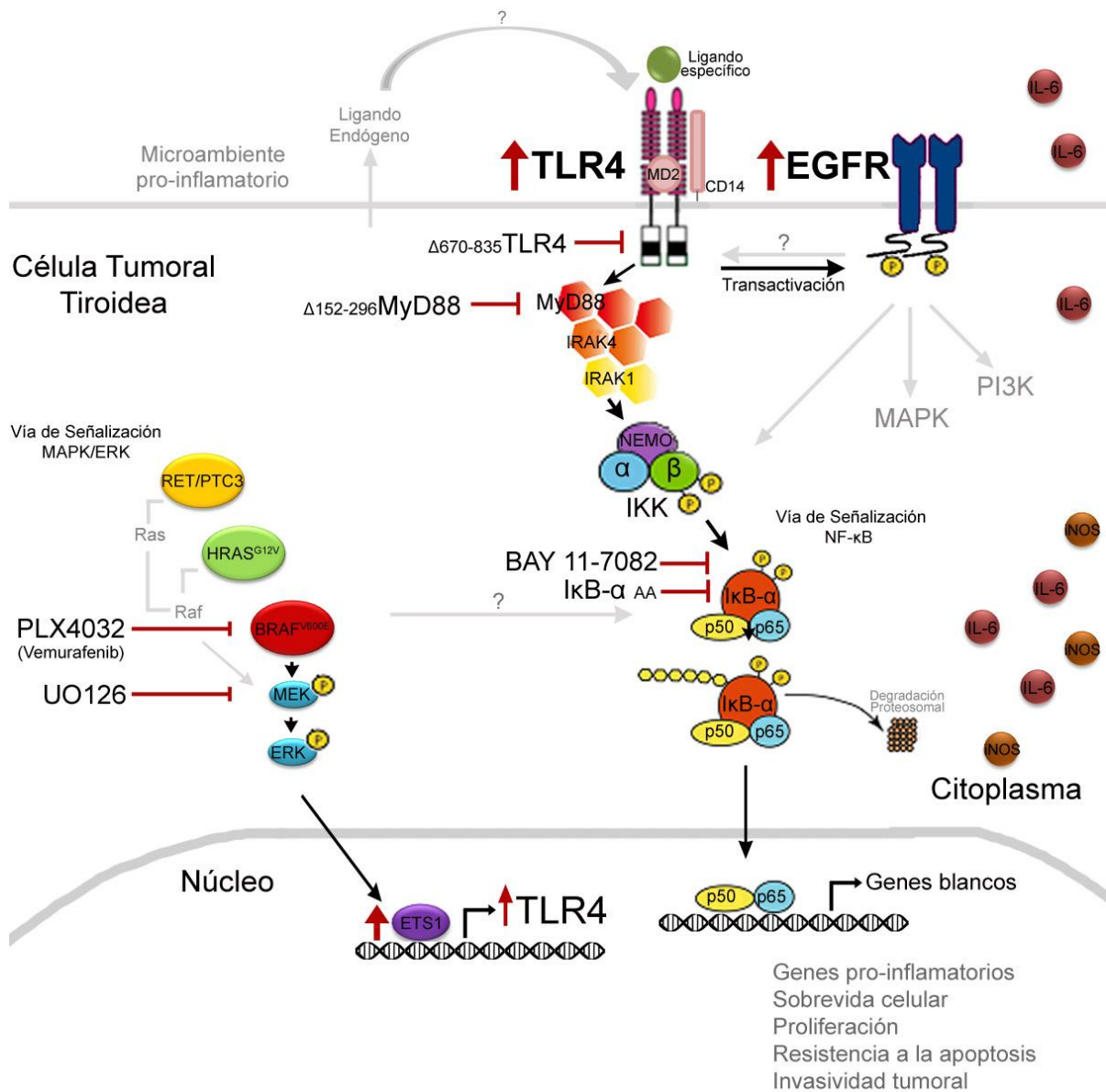
CAPÍTULO I: MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA SOBREENPRESIÓN FUNCIONAL DE TLR4 EN LA CÉLULA TUMORAL TIROIDEA

- Los niveles proteicos de TLR4 se encuentran incrementados en PTCs y FTCs.
- Los niveles proteicos y de ARNm de TLR4 incrementan en muestras apareadas de PTCs respecto al tejido tiroideo normal adyacente.
- La expresión proteica de TLR4 incrementa en muestras apareadas de metástasis de PTCs en nódulos linfáticos respecto a los tumores primarios.
- Los niveles de ARNm de TLR4 no varían entre PTCs que albergan diferentes oncogenes promotores de cáncer de tiroides.
- Niveles aumentados de ARNm de TLR4 se asocian con actividad incrementada de la vía de señalización MAPK/ERK en PTCs.
- Niveles incrementados de ARNm de TLR4 se asocian con mayor grado de diferenciación tiroidea en PTCs que albergan la mutación BRAF^{V600E}.
- La expresión de ARNm de TLR4 no varía en función del predictor de pronóstico MACIS en PTCs BRAF^{V600E} positivos (promotor de TERT nativo).
- Niveles altos de expresión de ARNm de TLR4 se asocian con menor supervivencia libre de enfermedad en pacientes con PTCs BRAF^{V600E} positivos (promotor de TERT nativo).
- Oncogenes promotores de cáncer de tiroides inducen la expresión proteica y de ARNm de TLR4 *in vitro*.
- El oncogén BRAF^{V600E} incrementa la expresión de TLR4 *in vivo*.
- La estimulación de TLR4 potencia la actividad transcripcional de NF-κB inducida por el oncogén BRAF^{V600E}.
- La señalización de NF-κB a través de la estimulación de TLR4 induce la expresión de genes de respuesta inflamatoria en modelos celulares de PTC BRAF^{V600E} positivos.
- El eje TLR4/MyD88/IκB-α/NF-κB se encuentra funcionalmente conservado en modelos celulares humanos de PTC y ATC BRAF^{V600E} positivos.
- La activación de TLR4 incrementa la migración celular en modelos celulares humanos de PTC y ATC BRAF^{V600E} positivos.
- La sobreexpresión de TLR4 es una consecuencia de la desregulación de la señalización MAPK/ERK inducida por oncogenes promotores de cáncer de tiroides.

- Oncogenes promotores de cáncer de tiroides inducen la sobreexpresión de TLR4 a través de un mecanismo a nivel transcripcional, involucrando un sitio de unión para factores de transcripción ETSs.
- La sobreexpresión a nivel proteico y del ARNm de TLR4 se asocia con niveles incrementados de ETS1 en tejidos de PTCs.
- El silenciamiento de ETS1 previene el incremento de la expresión de TLR4 inducidos por el oncogén BRAF^{V600E}.
- La sobreexpresión de ETS1 induce la expresión de TLR4 implicando la participación de un mecanismo, al menos en parte, a nivel transcripcional en células tiroideas normales.
- ETS1 es un regulador transcripcional para la expresión de TLR4 corriente abajo de la señalización de MAPK/ERK inducida por el oncogén BRAF^{V600E}.

CAPÍTULO II MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA EXPRESIÓN Y TRANSACTIVACIÓN DE EGFR EN LA CÉLULA TIROIDEA TUMORAL

- Los niveles de ARNm de EGFR se encuentran diferencialmente incrementados en PTCs que albergan el oncogén BRAF^{V600E}.
- Niveles incrementados de ARNm de EGFR se asocian con menor grado de diferenciación tiroidea en PTCs.
- Niveles aumentados de ARNm de EGFR se asocian con actividad incrementada de la vía de señalización MAPK/ERK en PTCs.
- Oncogenes promotores de cáncer de tiroides inducen la expresión proteica y de ARNm de EGFR *in vitro*.
- El oncogén BRAF^{V600E} incrementa la expresión de EGFR *in vivo*.
- La sobreexpresión de EGFR es una consecuencia de la desregulación de la señalización MAPK/ERK inducida por oncogenes promotores de cáncer de tiroides.
- La sobreexpresión a nivel del ARNm de TLR4 se asocia con niveles incrementados de EGFR en tejidos de PTCs.
- La estimulación de TLR4 con LPS induce la transactivación de EGFR en modelos celulares humanos de PTC y ATC.



Representación esquemática de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis. La presencia de oncogenes promotores de cáncer tiroideo induciría un aumento de la expresión de TLR4. El efecto sería ejercido a nivel transcripcional mediante la vía MAPK/ERK/ETS1. La señalización inducida por TLR4 conduciría a un aumento de la actividad de NF- κ B a través de la vía “dependiente de MyD88” que mediaría procesos relacionados a la producción de un microambiente pro-inflamatorio, resistencia a la apoptosis, sobrevida, proliferación e invasión tumoral. La interacción funcional entre los receptores TLR4 y EGFR, luego del reconocimiento de posibles ligandos endógenos, llevaría a una potenciación de las vías intracelulares de cada uno de ellos que podría favorecer el desarrollo y la progresión tumoral.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):292-306.
2. Dunn JT, Dunn AD. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid*. 2001;11(5):407-14.
3. Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochimica et biophysica acta*. 1993;1154(1):65-82.
4. La Vecchia C, Malvezzi M, Bosetti C, Garavello W, Bertuccio P, Levi F, et al. Thyroid cancer mortality and incidence: a global overview. *International journal of cancer*. 2015;136(9):2187-95.
5. Elisei R, Pinchera A. Advances in the follow-up of differentiated or medullary thyroid cancer. *Nature reviews Endocrinology*. 2012;8(8):466-75.
6. Tuttle RM, Ball DW, Byrd D, Dilawari RA, Doherty GM, Duh QY, et al. Thyroid carcinoma. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2010;8(11):1228-74.
7. Ito Y, Nikiforov YE, Schlumberger M, Vigneri R. Increasing incidence of thyroid cancer: controversies explored. *Nature reviews Endocrinology*. 2013;9(3):178-84.
8. Hershman JM. The Increased Incidence of Thyroid Cancer Is Worldwide. *Clinical Thyroidology*. 2017; 29(1):: 11-2.
9. Kilfoy BA, Zheng T, Holford TR, Han X, Ward MH, Sjodin A, et al. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002. *Cancer causes & control : CCC*. 2009;20(5):525-31.
10. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(3):184-99.
11. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*. 2014;74(11):2913-21.
12. Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA otolaryngology-- head & neck surgery*. 2014;140(4):317-22.
13. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *Jama*. 2006;295(18):2164-7.
14. Ezaki H, Ebihara S, Fujimoto Y, Iida F, Ito K, Kuma K, et al. Analysis of thyroid carcinoma based on material registered in Japan during 1977-1986 with special reference to predominance of papillary type. *Cancer*. 1992;70(4):808-14.
15. Mathur A, Moses W, Rahbari R, Khanafshar E, Duh QY, Clark O, et al. Higher rate of BRAF mutation in papillary thyroid cancer over time: a single-institution study. *Cancer*. 2011;117(19):4390-5.
16. Siironen P, Hagstrom J, Maenpaa HO, Louhimo J, Heikkila A, Heiskanen I, et al. Anaplastic and poorly differentiated thyroid carcinoma: therapeutic strategies and treatment outcome of 52 consecutive patients. *Oncology*. 2010;79(5-6):400-8.
17. Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, Durso MB, Nikiforov YE. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(11):E1852-60.
18. Cancer Genome Atlas Research N. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014;159(3):676-90.
19. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2005;55(2):74-108.
20. Maze H, Sippel RS. Familial nonmedullary thyroid carcinoma. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2013;23(9):1049-56.
21. Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer research*. 1997;57(9):1690-4.
22. Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, et al. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(3):1093-103.

23. Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, Santoro M, Gandhi M, Knauf JA, et al. Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. *Cancer letters*. 2004;209(1):1-6.
24. Joseph KR, Edirimanne S, Eslick GD. The association between breast cancer and thyroid cancer: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2015;152(1):173-81.
25. Harach HR, Escalante DA, Day ES. Thyroid cancer and thyroiditis in Salta, Argentina: a 40-yr study in relation to iodine prophylaxis. *Endocrine pathology*. 2002;13(3):175-81.
26. Yamashita H, Noguchi S, Murakami N, Kato R, Adachi M, Inoue S, et al. Effects of dietary iodine on chemical induction of thyroid carcinoma. *Acta pathologica japonica*. 1990;40(10):705-12.
27. Kuo C-Y, Liu T-P, Yang P-S, Cheng S-P. Characteristics of lymphocyte-infiltrating papillary thyroid cancer. *Journal of Cancer Research and Practice*. 2017;4(3):95-9.
28. Lee JH, Kim Y, Choi JW, Kim YS. The association between papillary thyroid carcinoma and histologically proven Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2013;168(3):343-9.
29. Spitzweg C, Bible KC, Hofbauer LC, Morris JC. Advanced radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer: the sodium iodide symporter and other emerging therapeutic targets. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(10):830-42.
30. Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(2):425-30.
31. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
32. Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol*. 2014;15(11):e493-503.
33. Liu CL, Lee JJ, Liu TP, Chang YC, Hsu YC, Cheng SP. Blood neutrophil-to-lymphocyte ratio correlates with tumor size in patients with differentiated thyroid cancer. *Journal of surgical oncology*. 2013;107(5):493-7.
34. Li B, Severson E, Pignon JC, Zhao H, Li T, Novak J, et al. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. *Genome biology*. 2016;17(1):174.
35. Kim BH. The expression of tumor-associated macrophages in papillary thyroid carcinoma. *Endocrinology and metabolism*. 2013;28(3):178-9.
36. Cunha LL, Marcello MA, Ward LS. The role of the inflammatory microenvironment in thyroid carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(3):R85-R103.
37. French JD, Weber ZJ, Fretwell DL, Said S, Klopper JP, Haugen BR. Tumor-associated lymphocytes and increased FoxP3+ regulatory T cell frequency correlate with more aggressive papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(5):2325-33.
38. Fagin JA. Genetic basis of endocrine disease 3: Molecular defects in thyroid gland neoplasia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1992;75(6):1398-400.
39. Sacks W, Braunstein GD. Evolving approaches in managing radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2014;20(3):263-75.
40. Xing M. Recent advances in molecular biology of thyroid cancer and their clinical implications. *Otolaryngologic clinics of North America*. 2008;41(6):1135-46, ix.
41. Krohn K, Fuhrer D, Bayer Y, Eszlinger M, Brauer V, Neumann S, et al. Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter. *Endocrine reviews*. 2005;26(4):504-24.
42. Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Farr CJ, Hughes D, Padua RA, et al. Activated ras oncogenes in human thyroid cancers. *Cancer research*. 1988;48(16):4459-63.
43. Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(8):625-7.
44. Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, et al. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*. 1990;60(4):557-63.

45. Pierotti MA, Bongarzone I, Borrello MG, Mariani C, Miranda C, Sozzi G, et al. Rearrangements of TRK proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas. *Journal of endocrinological investigation*. 1995;18(2):130-3.
46. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, 2nd, Tallini G, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(5):2318-26.
47. Garcia-Rostan G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJ, et al. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer research*. 2005;65(22):10199-207.
48. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res*. 2009;69(11):4885-93.
49. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(1):179-84.
50. Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, Wang J, Ouyang B, Elisei R, et al. The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. *Oncogene*. 2000;19(34):3948-54.
51. Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C, Jr., Zhang L, Fagin JA. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer research*. 2005;65(6):2465-73.
52. Dahia PL, Marsh DJ, Zheng Z, Zedenius J, Komminoth P, Frisk T, et al. Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors. *Cancer research*. 1997;57(21):4710-3.
53. Davies MA, Koul D, Dhesi H, Berman R, McDonnell TJ, McConkey D, et al. Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN. *Cancer research*. 1999;59(11):2551-6.
54. Ringel MD, Hayre N, Saito J, Saunier B, Schuppert F, Burch H, et al. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer research*. 2001;61(16):6105-11.
55. Wu G, Mambo E, Guo Z, Hu S, Huang X, Gollin SM, et al. Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(8):4688-93.
56. Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de Micco C. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(6):2745-52.
57. De Vita G, Berlingieri MT, Visconti R, Castellone MD, Viglietto G, Baldassarre G, et al. Akt/protein kinase B promotes survival and hormone-independent proliferation of thyroid cells in the absence of dedifferentiating and transforming effects. *Cancer research*. 2000;60(14):3916-20.
58. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
59. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer research*. 2003;63(7):1454-7.
60. Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011;135(5):569-77.
61. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer cell*. 2004;6(4):313-9.
62. Lima J, Trovisco V, Soares P, Maximo V, Magalhaes J, Salvatore G, et al. BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(9):4267-71.
63. Rosenbaum E, Hosler G, Zahurak M, Cohen Y, Sidransky D, Westra WH. Mutational activation of BRAF is not a major event in sporadic childhood papillary thyroid carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005;18(7):898-902.

64. Fakhruddin N, Jabbour M, Novy M, Tamim H, Bahmad H, Farhat F, et al. BRAF and NRAS Mutations in Papillary Thyroid Carcinoma and Concordance in BRAF Mutations Between Primary and Corresponding Lymph Node Metastases. *Scientific reports*. 2017;7(1):4666.
65. Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer research*. 2005;65(10):4238-45.
66. Liu D, Liu Z, Condouris S, Xing M. BRAF V600E maintains proliferation, transformation, and tumorigenicity of BRAF-mutant papillary thyroid cancer cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(6):2264-71.
67. Guerra A, Sapio MR, Marotta V, Campanile E, Rossi S, Forno I, et al. The primary occurrence of BRAF(V600E) is a rare clonal event in papillary thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(2):517-24.
68. Xing M. BRAFV600E mutation and papillary thyroid cancer: chicken or egg? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(7):2295-8.
69. Sohn SY, Park WY, Shin HT, Bae JS, Ki CS, Oh YL, et al. Highly Concordant Key Genetic Alterations in Primary Tumors and Matched Distant Metastases in Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2016;26(5):672-82.
70. Melo M, Gaspar da Rocha A, Batista R, Vinagre J, Martins MJ, Costa G, et al. TERT, BRAF, and NRAS in Primary Thyroid Cancer and Metastatic Disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2017;102(6):1898-907.
71. Kim TY, Kim WB, Rhee YS, Song JY, Kim JM, Gong G, et al. The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *Clinical endocrinology*. 2006;65(3):364-8.
72. Elisei R, Ugolini C, Viola D, Lupi C, Biagini A, Giannini R, et al. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(10):3943-9.
73. Xing M, Clark D, Guan H, Ji M, Dackiw A, Carson KA, et al. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(18):2977-82.
74. Tavares C, Melo M, Cameselle-Teijeiro JM, Soares P, Sobrinho-Simoes M. ENDOCRINE TUMOURS: Genetic predictors of thyroid cancer outcome. *European journal of endocrinology*. 2016;174(4):R117-26.
75. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(1):11-22.
76. Shi YF, Zou MJ, Schmidt H, Juhasz F, Stensky V, Robb D, et al. High rates of ras codon 61 mutation in thyroid tumors in an iodide-deficient area. *Cancer research*. 1991;51(10):2690-3.
77. Suchy B, Waldmann V, Klugbauer S, Rabes HM. Absence of RAS and p53 mutations in thyroid carcinomas of children after Chernobyl in contrast to adult thyroid tumours. *British journal of cancer*. 1998;77(6):952-5.
78. Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *American journal of clinical pathology*. 2003;120(1):71-7.
79. Miller KA, Yeager N, Baker K, Liao XH, Refetoff S, Di Cristofano A. Oncogenic Kras requires simultaneous PI3K signaling to induce ERK activation and transform thyroid epithelial cells in vivo. *Cancer research*. 2009;69(8):3689-94.
80. Hara H, Fulton N, Yashiro T, Ito K, DeGroot LJ, Kaplan EL. N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery*. 1994;116(6):1010-6.
81. Basolo F, Pisaturo F, Pollina LE, Fontanini G, Elisei R, Molinaro E, et al. N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2000;10(1):19-23.

82. Vasko VV, Gaudart J, Allasia C, Savchenko V, Di Cristofaro J, Saji M, et al. Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant of papillary carcinoma. *European journal of endocrinology*. 2004;151(6):779-86.
83. Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(5):367-75.
84. Tallini G, Asa SL. RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma. *Advances in anatomic pathology*. 2001;8(6):345-54.
85. Nikiforov YE. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocrine pathology*. 2002;13(1):3-16.
86. Jhiang SM, Sagartz JE, Tong Q, Parker-Thornburg J, Capen CC, Cho JY, et al. Targeted expression of the ret/PTC1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas. *Endocrinology*. 1996;137(1):375-8.
87. Powell DJ, Jr., Russell J, Nibu K, Li G, Rhee E, Liao M, et al. The RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids. *Cancer Res*. 1998;58(23):5523-8.
88. Sugg SL, Ezzat S, Rosen IB, Freeman JL, Asa SL. Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(11):4116-22.
89. Soares P, Sobrinho-Simoes M. Correspondence re: G. Tallini et al., RET/PTC oncogene activation defines a subset of papillary thyroid carcinomas lacking evidence of progression to poorly differentiated or undifferentiated tumor phenotype. *Clin. Cancer Res.*, 4:287-294, 1998. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1999;5(11):3724-5.
90. Mochizuki K, Kondo T, Nakazawa T, Iwashina M, Kawasaki T, Nakamura N, et al. RET rearrangements and BRAF mutation in undifferentiated thyroid carcinomas having papillary carcinoma components. *Histopathology*. 2010;57(3):444-50.
91. Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q, Viale A, Sander C, Solit DB, et al. (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4519-24.
92. Fahiminiya S, de Kock L, Foulkes WD. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *The New England journal of medicine*. 2016;375(23):2306-7.
93. Penna GC, Vaisman F, Vaisman M, Sobrinho-Simoes M, Soares P. Molecular Markers Involved in Tumorigenesis of Thyroid Carcinoma: Focus on Aggressive Histotypes. *Cytogenetic and genome research*. 2016;150(3-4):194-207.
94. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(1):57-63.
95. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-35.
96. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
97. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002;20:197-216.
98. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. Pillars article: the dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996. 86: 973-983. *J Immunol*. 2012;188(11):5210-20.
99. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*. 2014;5:461.
100. Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*. 1985;42(3):791-8.
101. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-7.
102. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
103. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(2):588-93.

104. Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene*. 2014;33(27):3485-95.
105. Hornef MW, Normark BH, Vandewalle A, Normark S. Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J Exp Med*. 2003;198(8):1225-35.
106. Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, Tobias PS. TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor. *J Immunol*. 2004;173(2):1166-70.
107. Thuringer D, Hammann A, Benikhlef N, Fourmaux E, Bouchot A, Wettstein G, et al. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by heat shock protein 90 via Toll-like receptor 4 contributes to the migration of glioblastoma cells. *J Biol Chem*. 2011;286(5):3418-28.
108. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.
109. Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K. MD-2 is necessary for the toll-like receptor 4 protein to undergo glycosylation essential for its translocation to the cell surface. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003;10(3):405-10.
110. Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, et al. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*. 2007;130(5):906-17.
111. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42(2):145-51.
112. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell death and differentiation*. 2006;13(5):816-25.
113. Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF-kappaB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell*. 2017;168(1-2):37-57.
114. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986. 46: 705-716. *J Immunol*. 2006;177(11):7485-96.
115. Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(5):392-401.
116. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(1):49-62.
117. Sanjabi S, Hoffmann A, Liou HC, Baltimore D, Smale ST. Selective requirement for c-Rel during IL-12 P40 gene induction in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(23):12705-10.
118. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology*. 2009;27:693-733.
119. Neumann M, Naumann M. Beyond IkkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(11):2642-54.
120. Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*. 2006;25(51):6706-16.
121. McKeown-Longo PJ, Higgins PJ. Integration of Canonical and Noncanonical Pathways in TLR4 Signaling: Complex Regulation of the Wound Repair Program. *Advances in wound care*. 2017;6(10):320-9.
122. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer*. 2013;12:86.
123. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-45.
124. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International journal of cancer*. 2006;118(12):3030-44.
125. Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, et al. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunological reviews*. 2007;220:60-81.
126. Salcedo R, Cataisson C, Hasan U, Yuspa SH, Trinchieri G. MyD88 and its divergent toll in carcinogenesis. *Trends in immunology*. 2013;34(8):379-89.
127. Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nature reviews Drug discovery*. 2010;9(4):293-307.

128. Okamoto H, Shoin S, Koshimura S, Shimizu R. Studies on the anticancer and streptolysin S-forming abilities of hemolytic streptococci. *Japanese journal of microbiology*. 1967;11(4):323-6.
129. Garay RP, Viens P, Bauer J, Normier G, Bardou M, Jeannin JF, et al. Cancer relapse under chemotherapy: why TLR2/4 receptor agonists can help. *European journal of pharmacology*. 2007;563(1-3):1-17.
130. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(10):749-59.
131. Swann JB, Vesely MD, Silva A, Sharkey J, Akira S, Schreiber RD, et al. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(2):652-6.
132. Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, Cohen J, Breglio K, Krishnareddy S, et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*. 2007;133(6):1869-81.
133. Fukata M, Shang L, Santaolalla R, Sotolongo J, Pastorini C, Espana C, et al. Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(7):1464-73.
134. Dheer R, Santaolalla R, Davies JM, Lang JK, Phillips MC, Pastorini C, et al. Intestinal Epithelial Toll-Like Receptor 4 Signaling Affects Epithelial Function and Colonic Microbiota and Promotes a Risk for Transmissible Colitis. *Infection and immunity*. 2016;84(3):798-810.
135. Gatti G, Quintar AA, Andreani V, Nicola JP, Maldonado CA, Masini-Repiso AM, et al. Expression of Toll-like receptor 4 in the prostate gland and its association with the severity of prostate cancer. *Prostate*. 2009;69(13):1387-97.
136. Szajnik M, Szczepanski MJ, Czystowska M, Elishaev E, Mandapathil M, Nowak-Markwitz E, et al. TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. *Oncogene*. 2009;28(49):4353-63.
137. He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Molecular immunology*. 2007;44(11):2850-9.
138. Pei Z, Lin D, Song X, Li H, Yao H. TLR4 signaling promotes the expression of VEGF and TGFbeta1 in human prostate epithelial PC3 cells induced by lipopolysaccharide. *Cellular immunology*. 2008;254(1):20-7.
139. Kelly MG, Alvero AB, Chen R, Silasi DA, Abrahams VM, Chan S, et al. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer research*. 2006;66(7):3859-68.
140. Wang JH, Manning BJ, Wu QD, Blankson S, Bouchier-Hayes D, Redmond HP. Endotoxin/lipopolysaccharide activates NF-kappa B and enhances tumor cell adhesion and invasion through a beta 1 integrin-dependent mechanism. *J Immunol*. 2003;170(2):795-804.
141. Tichomirowa M, Theodoropoulou M, Lohrer P, Schaaf L, Losa M, Uhl E, et al. Bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) stimulates interleukin-6 production and inhibits growth of pituitary tumour cells expressing the toll-like receptor 4. *J Neuroendocrinol*. 2005;17(3):152-60.
142. Hold GL, Rabkin CS, Chow WH, Smith MG, Gammon MD, Risch HA, et al. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors. *Gastroenterology*. 2007;132(3):905-12.
143. Huang L, Yuan K, Liu J, Ren X, Dong X, Tian W, et al. Polymorphisms of the TLR4 gene and risk of gastric cancer. *Gene*. 2014;537(1):46-50.
144. Castano-Rodriguez N, Kaakoush NO, Mitchell HM. Pattern-recognition receptors and gastric cancer. *Frontiers in immunology*. 2014;5:336.
145. Zheng SL, Augustsson-Balter K, Chang B, Hedelin M, Li L, Adami HO, et al. Sequence variants of toll-like receptor 4 are associated with prostate cancer risk: results from the CANcer Prostate in Sweden Study. *Cancer research*. 2004;64(8):2918-22.
146. Slattery ML, Herrick JS, Bondurant KL, Wolff RK. Toll-like receptor genes and their association with colon and rectal cancer development and prognosis. *International journal of cancer*. 2012;130(12):2974-80.

147. Harii N, Lewis CJ, Vasko V, McCall K, Benavides-Peralta U, Sun X, et al. Thyrocytes express a functional toll-like receptor 3: overexpression can be induced by viral infection and reversed by phenylmethimazole and is associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. *Mol Endocrinol.* 2005;19(5):1231-50.
148. McCall KD, Harii N, Lewis CJ, Malgor R, Kim WB, Saji M, et al. High basal levels of functional toll-like receptor 3 (TLR3) and noncanonical Wnt5a are expressed in papillary thyroid cancer and are coordinately decreased by phenylmethimazole together with cell proliferation and migration. *Endocrinology.* 2007;148(9):4226-37.
149. Nicola JP, Velez ML, Lucero AM, Fozzatti L, Pellizas CG, Masini-Repiso AM. Functional toll-like receptor 4 conferring lipopolysaccharide responsiveness is expressed in thyroid cells. *Endocrinology.* 2009;150(1):500-8.
150. Nazar M, Nicola JP, Velez ML, Pellizas CG, Masini-Repiso AM. Thyroid peroxidase gene expression is induced by lipopolysaccharide involving nuclear factor (NF)-kappaB p65 subunit phosphorylation. *Endocrinology.* 2012;153(12):6114-25.
151. Nicola JP, Nazar M, Mascanfroni ID, Pellizas CG, Masini-Repiso AM. NF-kappaB p65 subunit mediates lipopolysaccharide-induced Na(+)/I(-) symporter gene expression by involving functional interaction with the paired domain transcription factor Pax8. *Molecular endocrinology.* 2010;24(9):1846-62.
152. Hagstrom J, Heikkila A, Siironen P, Louhimo J, Heiskanen I, Maenpaa H, et al. TLR-4 expression and decrease in chronic inflammation: indicators of aggressive follicular thyroid carcinoma. *Journal of clinical pathology.* 2012;65(4):333-8.
153. Dang S, Peng Y, Ye L, Wang Y, Qian Z, Chen Y, et al. Stimulation of TLR4 by LMW-HA induces metastasis in human papillary thyroid carcinoma through CXCR7. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:712561.
154. Kim SK, Park HJ, Hong IK, Chung JH, Eun YG. A missense polymorphism (rs11466653, Met326Thr) of toll-like receptor 10 (TLR10) is associated with tumor size of papillary thyroid carcinoma in the Korean population. *Endocrine.* 2013;43(1):161-9.
155. Kim MK, Park SW, Kim SK, Park HJ, Eun YG, Kwon KH, et al. Association of Toll-like receptor 2 polymorphisms with papillary thyroid cancer and clinicopathologic features in a Korean population. *Journal of Korean medical science.* 2012;27(11):1333-8.
156. Pacifico F, Leonardi A. NF-kappaB in solid tumors. *Biochemical pharmacology.* 2006;72(9):1142-52.
157. Visconti R, Cerutti J, Battista S, Fedele M, Trapasso F, Zeki K, et al. Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NFkappaB p65 protein expression. *Oncogene.* 1997;15(16):1987-94.
158. Pacifico F, Leonardi A. Role of NF-kappaB in thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;321(1):29-35.
159. Ludwig L, Kessler H, Wagner M, Hoang-Vu C, Dralle H, Adler G, et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively active in C-cell carcinoma and required for RET-induced transformation. *Cancer research.* 2001;61(11):4526-35.
160. Palona I, Namba H, Mitsutake N, Starenki D, Podtcheko A, Sedliarou I, et al. BRAFV600E promotes invasiveness of thyroid cancer cells through nuclear factor kappaB activation. *Endocrinology.* 2006;147(12):5699-707.
161. Guigon CJ, Zhao L, Willingham MC, Cheng SY. PTEN deficiency accelerates tumour progression in a mouse model of thyroid cancer. *Oncogene.* 2009;28(4):509-17.
162. Abdulghani J, Gokare P, Gallant JN, Dicker D, Whitcomb T, Cooper T, et al. Sorafenib and Quinacrine Target Anti-Apoptotic Protein MCL1: A Poor Prognostic Marker in Anaplastic Thyroid Cancer (ATC). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2016;22(24):6192-203.
163. Plantinga TS, Petrulea MS, Oosting M, Joosten LAB, Piciu D, Smit JW, et al. Association of NF-kappaB polymorphisms with clinical outcome of non-medullary thyroid carcinoma. *Endocrine-related cancer.* 2017;24(7):307-18.

164. Meng Z, Lou S, Tan J, Xu K, Jia Q, Zheng W. Nuclear factor-kappa B inhibition can enhance apoptosis of differentiated thyroid cancer cells induced by 131I. *PloS one*. 2012;7(3):e33597.
165. Starenki D, Namba H, Saenko V, Ohtsuru A, Yamashita S. Inhibition of nuclear factor-kappaB cascade potentiates the effect of a combination treatment of anaplastic thyroid cancer cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(1):410-8.
166. De S, Zhou H, DeSantis D, Croniger CM, Li X, Stark GR. Erlotinib protects against LPS-induced endotoxicity because TLR4 needs EGFR to signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(31):9680-5.
167. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):127-37.
168. Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current opinion in cell biology*. 2009;21(2):177-84.
169. Jacobi N, Seeboeck R, Hofmann E, Eger A. ErbB Family Signalling: A Paradigm for Oncogene Addiction and Personalized Oncology. *Cancers*. 2017;9(4).
170. Mincione G, Di Marcantonio MC, Tarantelli C, D'Inzeo S, Nicolussi A, Nardi F, et al. EGF and TGF-beta1 Effects on Thyroid Function. *Journal of thyroid research*. 2011;2011:431718.
171. Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, De Luca A, et al. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Current drug targets*. 2005;6(3):243-57.
172. Domarkas J, Dudouit F, Williams C, Qiyu Q, Banerjee R, Brahimi F, et al. The combi-targeting concept: synthesis of stable nitrosoureas designed to inhibit the epidermal growth factor receptor (EGFR). *Journal of medicinal chemistry*. 2006;49(12):3544-52.
173. Roy V, Perez EA. Beyond trastuzumab: small molecule tyrosine kinase inhibitors in HER-2-positive breast cancer. *The oncologist*. 2009;14(11):1061-9.
174. Normanno N, Maiello MR, Chicchinelli N, Iannaccone A, Esposito C, De Cecio R, et al. Targeting the EGFR T790M mutation in non-small-cell lung cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2017;21(2):159-65.
175. Zhao Y, Wang H, Shi Y, Cai S, Wu T, Yan G, et al. Comparative effectiveness of combined therapy inhibiting EGFR and VEGF pathways in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of 16 phase II/III randomized trials. *Oncotarget*. 2017;8(4):7014-24.
176. Lopez JS, Banerji U. Combine and conquer: challenges for targeted therapy combinations in early phase trials. *Nature reviews Clinical oncology*. 2017;14(1):57-66.
177. Wykosky J, Fenton T, Furnari F, Cavenee WK. Therapeutic targeting of epidermal growth factor receptor in human cancer: successes and limitations. *Chinese journal of cancer*. 2011;30(1):5-12.
178. Han W, Lo HW. Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer letters*. 2012;318(2):124-34.
179. Hofmann E, Seeboeck R, Jacobi N, Obrist P, Huter S, Klein C, et al. The combinatorial approach of laser-captured microdissection and reverse transcription quantitative polymerase chain reaction accurately determines HER2 status in breast cancer. *Biomarker research*. 2016;4:8.
180. Lee Y, Ma J, Lyu H, Huang J, Kim A, Liu B. Role of erbB3 receptors in cancer therapeutic resistance. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2014;46(3):190-8.
181. Zhang K, Wong P, Salvaggio C, Salhi A, Osman I, Bedogni B. Synchronized Targeting of Notch and ERBB Signaling Suppresses Melanoma Tumor Growth through Inhibition of Notch1 and ERBB3. *The Journal of investigative dermatology*. 2016;136(2):464-72.
182. Junttila TT, Sundvall M, Maatta JA, Elenius K. Erbb4 and its isoforms: selective regulation of growth factor responses by naturally occurring receptor variants. *Trends in cardiovascular medicine*. 2000;10(7):304-10.
183. Asmis LM, Gerber H, Kaempfer J, Studer H. Epidermal growth factor stimulates cell proliferation and inhibits iodide uptake of FRTL-5 cells in vitro. *J Endocrinol*. 1995;145(3):513-20.
184. Hoelting T, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY. Epidermal growth factor enhances proliferation, migration, and invasion of follicular and papillary thyroid cancer in vitro and in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1994;79(2):401-8.

185. Zhang Z, Liu ZB, Ren WM, Ye XG, Zhang YY. The miR-200 family regulates the epithelial-mesenchymal transition induced by EGF/EGFR in anaplastic thyroid cancer cells. *International journal of molecular medicine*. 2012;30(4):856-62.
186. Mizukami Y, Nonomura A, Hashimoto T, Michigishi T, Noguchi M, Matsubara F, et al. Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor and c-myc oncogene product in normal, benign and malignant thyroid tissues. *Histopathology*. 1991;18(1):11-8.
187. Ota I, Higashiyama S, Masui T, Yane K, Hosoi H, Matsuura N. Heparin-binding EGF-like growth factor enhances the activity of invasion and metastasis in thyroid cancer cells. *Oncology reports*. 2013;30(4):1593-600.
188. Gorgoulis V, Aninos D, Priftis C, Evagelopoulou C, Karameris A, Kanavaros P, et al. Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in thyroid tumors. *In vivo*. 1992;6(3):291-6.
189. Landriscina M, Pannone G, Piscazzi A, Toti P, Fabiano A, Tortorella S, et al. Epidermal growth factor receptor 1 expression is upregulated in undifferentiated thyroid carcinomas in humans. *Thyroid*. 2011;21(11):1227-34.
190. Fisher KE, Jani JC, Fisher SB, Foulks C, Hill CE, Weber CJ, et al. Epidermal growth factor receptor overexpression is a marker for adverse pathologic features in papillary thyroid carcinoma. *The Journal of surgical research*. 2013;185(1):217-24.
191. Landriscina M, Piscazzi A, Fabiano A, Maddalena F, Costantino E, Farese A, et al. Targeting epidermal growth factor receptor 1 signaling in human thyroid-stimulating hormone-independent thyroid carcinoma FRO cells results in a more chemosensitive and less angiogenic phenotype. *Thyroid*. 2009;19(6):629-37.
192. Masago K, Miura M, Toyama Y, Togashi Y, Mishima M. Good clinical response to erlotinib in a patient with anaplastic thyroid carcinoma harboring an epidermal growth factor somatic mutation, L858R, in exon 21. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(16):e465-7.
193. Croyle M, Akeno N, Knauf JA, Fabbro D, Chen X, Baumgartner JE, et al. RET/PTC-induced cell growth is mediated in part by epidermal growth factor receptor (EGFR) activation: evidence for molecular and functional interactions between RET and EGFR. *Cancer Res*. 2008;68(11):4183-91.
194. Marti U, Ruchti C, Kampf J, Thomas GA, Williams ED, Peter HJ, et al. Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues. *Thyroid*. 2001;11(2):137-45.
195. Akslen LA, Myking AO, Salvesen H, Varhaug JE. Prognostic impact of EGF-receptor in papillary thyroid carcinoma. *British journal of cancer*. 1993;68(4):808-12.
196. Kato S, Kobayashi T, Yamada K, Nishii K, Sawada H, Ishiguro H, et al. Expression of erbB receptors mRNA in thyroid tissues. *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1673(3):194-200.
197. Aasland R, Lillehaug JR, Male R, Josendal O, Varhaug JE, Kleppe K. Expression of oncogenes in thyroid tumours: coexpression of c-erbB2/neu and c-erbB. *British journal of cancer*. 1988;57(4):358-63.
198. Haugen DR, Akslen LA, Varhaug JE, Lillehaug JR. Expression of c-erbB-2 protein in papillary thyroid carcinomas. *British journal of cancer*. 1992;65(6):832-7.
199. Montero-Conde C, Ruiz-Llorente S, Dominguez JM, Knauf JA, Viale A, Sherman EJ, et al. Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF-mutant thyroid carcinomas. *Cancer Discov*. 2013;3(5):520-33.
200. Cheng L, Jin Y, Liu M, Ruan M, Chen L. HER inhibitor promotes BRAF/MEK inhibitor-induced redifferentiation in papillary thyroid cancer harboring BRAFV600E. *Oncotarget*. 2017;8(12):19843-54.
201. Kasaian K, Wiseman SM, Walker BA, Schein JE, Zhao Y, Hirst M, et al. The genomic and transcriptomic landscape of anaplastic thyroid cancer: implications for therapy. *BMC cancer*. 2015;15:984.
202. Mincione G, Piccirelli A, Lazzereschi D, Salomon DS, Colletta G. Heregulin-dependent autocrine loop regulates growth of K-ras but not erbB-2 transformed rat thyroid epithelial cells. *Journal of cellular physiology*. 1998;176(2):383-91.

203. Morandell S, Stasyk T, Skvortsov S, Ascher S, Huber LA. Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network. *Proteomics*. 2008;8(21):4383-401.
204. Carpenter G. EGF receptor transactivation mediated by the proteolytic production of EGF-like agonists. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2000;2000(15):pe1.
205. Gschwind A, Zwick E, Prenzel N, Leserer M, Ullrich A. Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene*. 2001;20(13):1594-600.
206. Yamashita M, Chattopadhyay S, Fensterl V, Saikia P, Wetzel JL, Sen GC. Epidermal growth factor receptor is essential for Toll-like receptor 3 signaling. *Science signaling*. 2012;5(233):ra50.
207. Lee KG, Xu S, Kang ZH, Huo J, Huang M, Liu D, et al. Bruton's tyrosine kinase phosphorylates Toll-like receptor 3 to initiate antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(15):5791-6.
208. Basu S, Pathak SK, Chatterjee G, Pathak S, Basu J, Kundu M. *Helicobacter pylori* protein HP0175 transactivates epidermal growth factor receptor through TLR4 in gastric epithelial cells. *J Biol Chem*. 2008;283(47):32369-76.
209. McElroy SJ, Hobbs S, Kallen M, Tejera N, Rosen MJ, Grishin A, et al. Transactivation of EGFR by LPS induces COX-2 expression in enterocytes. *PloS one*. 2012;7(5):e38373.
210. Wang L, Huang Z, Huang W, Chen X, Shan P, Zhong P, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor attenuates atherosclerosis via decreasing inflammation and oxidative stress. *Scientific reports*. 2017;8:45917.
211. Shan X, Zhang Y, Chen H, Dong L, Wu B, Xu T, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor attenuates LPS-induced inflammation and acute lung injury in rats. *Oncotarget*. 2017;8(16):26648-61.
212. Yamaguchi R, Yamamoto T, Sakamoto A, Narahara S, Sugiuchi H, Yamaguchi Y. Neutrophil elastase enhances IL-12p40 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages via transactivation of the PAR-2/EGFR/TLR4 signaling pathway. *Blood cells, molecules & diseases*. 2016;59:1-7.
213. Perconti G, Maranto C, Romancino DP, Rubino P, Feo S, Bongiovanni A, et al. Pro-invasive stimuli and the interacting protein Hsp70 favour the route of alpha-enolase to the cell surface. *Scientific reports*. 2017;7(1):3841.
214. Li W, Fang Q, Zhong P, Chen L, Wang L, Zhang Y, et al. EGFR Inhibition Blocks Palmitic Acid-induced inflammation in cardiomyocytes and Prevents Hyperlipidemia-induced Cardiac Injury in Mice. *Scientific reports*. 2016;6:24580.
215. Fang Q, Zou C, Zhong P, Lin F, Li W, Wang L, et al. EGFR mediates hyperlipidemia-induced renal injury via regulating inflammation and oxidative stress: the detrimental role and mechanism of EGFR activation. *Oncotarget*. 2016;7(17):24361-73.
216. Chattopadhyay S, Veleparambil M, Poddar D, Abdulkhalek S, Bandyopadhyay SK, Fensterl V, et al. EGFR kinase activity is required for TLR4 signaling and the septic shock response. *EMBO reports*. 2015;16(11):1535-47.
217. Trussoni CE, Tabibian JH, Splinter PL, O'Hara SP. Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Biliary Epithelial Cell NRas Activation Requires Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). *PloS one*. 2015;10(4):e0125793.
218. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature immunology*. 2004;5(10):975-9.
219. Huang B, Zhao J, Unkeless JC, Feng ZH, Xiong H. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene*. 2008;27(2):218-24.
220. Smale ST. Selective transcription in response to an inflammatory stimulus. *Cell*. 2010;140(6):833-44.
221. Caronia LM, Phay JE, Shah MH. Role of BRAF in thyroid oncogenesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(24):7511-7.
222. Geraldo MV, Yamashita AS, Kimura ET. MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF-beta by repressing SMAD4 in thyroid cancer. *Oncogene*. 2012;31(15):1910-22.

223. Fozzatti L, Velez ML, Lucero AM, Nicola JP, Mascanfroni ID, Maccio DR, et al. Endogenous thyrocyte-produced nitric oxide inhibits iodide uptake and thyroid-specific gene expression in FRTL-5 thyroid cells. *The Journal of endocrinology*. 2007;192(3):627-37.
224. Burton K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *The Biochemical journal*. 1956;62(2):315-23.
225. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
226. Yamashita AS, Geraldo MV, Fuziwara CS, Kulcsar MA, Friguglietti CU, da Costa RB, et al. Notch pathway is activated by MAPK signaling and influences papillary thyroid cancer proliferation. *Translational oncology*. 2013;6(2):197-205.
227. Sauvadet A, Rohn T, Pecker F, Pavoine C. Arachidonic acid drives mini-glucagon action in cardiac cells. *J Biol Chem*. 1997;272(19):12437-45.
228. Hirai A, Nakamura S, Noguchi Y, Yasuda T, Kitagawa M, Tatsuno I, et al. Geranylgeranylated rho small GTPase(s) are essential for the degradation of p27Kip1 and facilitate the progression from G1 to S phase in growth-stimulated rat FRTL-5 cells. *J Biol Chem*. 1997;272(1):13-6.
229. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic acids research*. 1989;17(15):6419.
230. Mascanfroni ID, Montesinos Mdel M, Alamino VA, Susperreguy S, Nicola JP, Ilarregui JM, et al. Nuclear factor (NF)-kappaB-dependent thyroid hormone receptor beta1 expression controls dendritic cell function via Akt signaling. *J Biol Chem*. 2010;285(13):9569-82.
231. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.
232. Velez ML, Costamagna E, Kimura ET, Fozzatti L, Pellizas CG, Montesinos MM, et al. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the thyrotropin-dependent thyroglobulin gene expression at the transcriptional level by involving the transcription factors thyroid transcription factor-1 and paired box domain transcription factor 8. *Endocrinology*. 2006;147(7):3260-75.
233. Marais R, Spooner RA, Light Y, Martin J, Springer CJ. Gene-directed enzyme prodrug therapy with a mustard prodrug/carboxypeptidase G2 combination. *Cancer research*. 1996;56(20):4735-42.
234. Bulut Y, Faure E, Thomas L, Karahashi H, Michelsen KS, Equils O, et al. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J Immunol*. 2002;168(3):1435-40.
235. Roger T, Miconnet I, Schiesser AL, Kai H, Miyake K, Calandra T. Critical role for Ets, AP-1 and GATA-like transcription factors in regulating mouse Toll-like receptor 4 (Tlr4) gene expression. *The Biochemical journal*. 2005;387(Pt 2):355-65.
236. De La Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiological reviews*. 2000;80(3):1083-105.
237. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
238. Nelson JD, Denisenko O, Bomsztyk K. Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nature protocols*. 2006;1(1):179-85.
239. Shaha AR. TNM classification of thyroid carcinoma. *World journal of surgery*. 2007;31(5):879-87.
240. Papaleontiou M, Haymart MR. New insights in risk stratification of differentiated thyroid cancer. *Current opinion in oncology*. 2014;26(1):1-7.
241. Zhong W, Ciatipis M, Wolfenstetter T, Jessberger J, Muller C, Ponsel S, et al. Selective entrainment of gamma subbands by different slow network oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(17):4519-24.
242. Joseph EW, Pratilas CA, Poulikakos PI, Tadi M, Wang W, Taylor BS, et al. The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(33):14903-8.

243. Voutilainen PE, Siironen P, Franssila KO, Sivula A, Haapiainen RK, Haglund CH. AMES, MACIS and TNM prognostic classifications in papillary thyroid carcinoma. *Anticancer Res.* 2003;23(5b):4283-8.
244. Fagin JA. Challenging dogma in thyroid cancer molecular genetics--role of RET/PTC and BRAF in tumor initiation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2004;89(9):4264-6.
245. Mesa C, Jr., Mirza M, Mitsutake N, Sartor M, Medvedovic M, Tomlinson C, et al. Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. *Cancer research.* 2006;66(13):6521-9.
246. Riesco-Eizaguirre G, Rodriguez I, De la Vieja A, Costamagna E, Carrasco N, Nistal M, et al. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res.* 2009;69(21):8317-25.
247. Venkateswaran A, Marsee DK, Green SH, Jhiang SM. Forskolin, 8-Br-3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate, and catalytic protein kinase A expression in the nucleus increase radioiodide uptake and sodium/iodide symporter protein levels in RET/PTC1-expressing cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2004;89(12):6168-72.
248. Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, et al. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol.* 2000;164(7):3471-5.
249. Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh QY, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Annals of surgery.* 2007;246(3):466-70; discussion 70-1.
250. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *Jama.* 2013;309(14):1493-501.
251. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2003;88(11):5399-404.
252. Kato Y, Ying H, Zhao L, Furuya F, Araki O, Willingham MC, et al. PPARgamma insufficiency promotes follicular thyroid carcinogenesis via activation of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Oncogene.* 2006;25(19):2736-47.
253. Bauerle KT, Schweppe RE, Haugen BR. Inhibition of nuclear factor-kappa B differentially affects thyroid cancer cell growth, apoptosis, and invasion. *Molecular cancer.* 2010;9:117.
254. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine.* 2007;13(11):460-9.
255. Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P. The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13(1):257-69.
256. Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nature reviews Clinical oncology.* 2010;7(9):493-507.
257. Sizemore GM, Pitarresi JR, Balakrishnan S, Ostrowski MC. The ETS family of oncogenic transcription factors in solid tumours. *Nature reviews Cancer.* 2017;17(6):337-51.
258. Findlay VJ, LaRue AC, Turner DP, Watson PM, Watson DK. Understanding the role of ETS-mediated gene regulation in complex biological processes. *Adv Cancer Res.* 2013;119:1-61.
259. Tetsu O, McCormick F. ETS-targeted therapy: can it substitute for MEK inhibitors? *Clin Transl Med.* 2017;6(1):16.
260. Kim YH, Choi YW, Han JH, Lee J, Soh EY, Park SH, et al. TSH signaling overcomes B-RafV600E-induced senescence in papillary thyroid carcinogenesis through regulation of DUSP6. *Neoplasia.* 2014;16(12):1107-20.
261. Plotnik JP, Budka JA, Ferris MW, Hollenhorst PC. ETS1 is a genome-wide effector of RAS/ERK signaling in epithelial cells. *Nucleic acids research.* 2014;42(19):11928-40.

262. Ridnour LA, Cheng RY, Switzer CH, Heinecke JL, Ambis S, Glynn S, et al. Molecular pathways: toll-like receptors in the tumor microenvironment--poor prognosis or new therapeutic opportunity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(6):1340-6.
263. Goedert L, Placa JR, Fuziwara CS, Machado MCR, Placa DR, Almeida PP, et al. Identification of Long Noncoding RNAs Deregulated in Papillary Thyroid Cancer and Correlated with BRAF(V600E) Mutation by Bioinformatics Integrative Analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):1662.
264. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*. 2013;339(6122):957-9.
265. Chakravarty D, Santos E, Ryder M, Knauf JA, Liao XH, West BL, et al. Small-molecule MAPK inhibitors restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional BRAF activation. *J Clin Invest*. 2011;121(12):4700-11.
266. Franco AT, Malaguarnera R, Refetoff S, Liao XH, Lundsmith E, Kimura S, et al. Thyrotrophin receptor signaling dependence of Braf-induced thyroid tumor initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(4):1615-20.
267. Lu CC, Kuo HC, Wang FS, Jou MH, Lee KC, Chuang JH. Upregulation of TLRs and IL-6 as a marker in human colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*. 2014;16(1):159-77.
268. Dhawan P, Richmond A. A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells. *J Biol Chem*. 2002;277(10):7920-8.
269. Li X, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Kandil E. The nuclear factor kappa-B signaling pathway as a therapeutic target against thyroid cancers. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2013;23(2):209-18.
270. Penson RT, Kronish K, Duan Z, Feller AJ, Stark P, Cook SE, et al. Cytokines IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF and TNFalpha in patients with epithelial ovarian cancer and their relationship to treatment with paclitaxel. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2000;10(1):33-41.
271. Galizia G, Orditura M, Romano C, Lieto E, Castellano P, Pelosio L, et al. Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery. *Clinical immunology*. 2002;102(2):169-78.
272. Ruggeri RM, Villari D, Simone A, Scarfi R, Attard M, Orlandi F, et al. Co-expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) in thyroid nodules is associated with co-expression of CD30 ligand/CD30 receptor. *Journal of endocrinological investigation*. 2002;25(11):959-66.
273. Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Guaza C. LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *The European journal of neuroscience*. 2001;13(3):493-502.
274. Nose F, Ichikawa T, Fujiwara M, Okayasu I. Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in lymphocytic thyroiditis and thyroid tumors: significant correlation with inducible nitric oxide synthase. *American journal of clinical pathology*. 2002;117(4):546-51.
275. Huang B, Zhao J, Li H, He KL, Chen Y, Chen SH, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer research*. 2005;65(12):5009-14.
276. Kim KH, Kim SH, Kim SH, Back JH, Park MJ, Kim JM. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in thyroid neoplasms and their clinicopathological correlation. *Journal of Korean medical science*. 2006;21(6):1064-9.
277. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*. 2006;26(2):174-9.
278. Bohm J, Niskanen L, Tammi R, Tammi M, Eskelinen M, Pirinen R, et al. Hyaluronan expression in differentiated thyroid carcinoma. *The Journal of pathology*. 2002;196(2):180-5.
279. Medapati MR, Dahlmann M, Ghavami S, Pathak KA, Lucman L, Klonisch T, et al. RAGE Mediates the Pro-Migratory Response of Extracellular S100A4 in Human Thyroid Cancer Cells. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2015;25(5):514-27.

280. Ali S, Hirschfeld AF, Mayer ML, Fortuno ES, 3rd, Corbett N, Kaplan M, et al. Functional genetic variation in NFKBIA and susceptibility to childhood asthma, bronchiolitis, and bronchopulmonary dysplasia. *J Immunol.* 2013;190(8):3949-58.
281. Ohta K, Pang XP, Berg L, Hershman JM. Antitumor actions of cytokines on new human papillary thyroid carcinoma cell lines. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1996;81(7):2607-12.
282. Nicola JP, Peyret V, Nazar M, Romero JM, Lucero AM, Montesinos Mdel M, et al. S-Nitrosylation of NF-kappaB p65 Inhibits TSH-Induced Na(+)/I(-) Symporter Expression. *Endocrinology.* 2015;156(12):4741-54.
283. El-Omar EM, Ng MT, Hold GL. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene.* 2008;27(2):244-52.
284. Bartel FO, Higuchi T, Spyropoulos DD. Mouse models in the study of the Ets family of transcription factors. *Oncogene.* 2000;19(55):6443-54.
285. Dart A. Metastasis: The plastic state. *Nature reviews Cancer.* 2017;17(6):373.
286. de Nigris F, Mega T, Berger N, Barone MV, Santoro M, Viglietto G, et al. Induction of ETS-1 and ETS-2 transcription factors is required for thyroid cell transformation. *Cancer Res.* 2001;61(5):2267-75.
287. Shaikhibrahim Z, Lindstrot A, Langer B, Buettner R, Wernert N. Comprehensive gene expression microarray analysis of Ets-1 blockade in PC3 prostate cancer cells and correlations with prostate cancer tissues: Insights into genes involved in the metastatic cascade. *Int J Mol Med.* 2011;27(6):811-9.
288. Schmid K, Oehl N, Wrba F, Pirker R, Pirker C, Filipits M. EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases. *Clin Cancer Res.* 2009;15(14):4554-60.
289. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba, II, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(5):339-46.
290. Frasca F, Vella V, Nicolosi ML, Messina RL, Giani F, Lotta S, et al. Thyroid cancer cell resistance to gefitinib depends on the constitutive oncogenic activation of the ERK pathway. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2013;98(6):2502-12.
291. De S, Dermawan JK, Stark GR. EGF receptor uses SOS1 to drive constitutive activation of NFkappaB in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(32):11721-6.
292. Cibas ES, Ali SZ, Conference NCITFSotS. The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology. *American journal of clinical pathology.* 2009;132(5):658-65.

8. ABREVIATURAS

3' UTR	Región 3' no traducida
ACTIRA	Asociación de pacientes con cáncer de tiroides de la República Argentina
ALR	Receptor similar a AIM2
Ank	Ankirina
AnkR	Repeticiones de ankirina
AP-1	Proteína activadora 1
AR	Anfiregulina
ATC	Cáncer tiroideo anaplásico
BRAF	Transductor perteneciente a la familia de proteínas RAF
BTC	Betacelulina
células C	Células parafoliculares
CLR	Receptor de lectina tipo C
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CPTC	PTC convencional o clásico
CTNNB1	Gen que codifica para β -Catenina
DAMP	Patrón molecular asociado a daño
DC	Células dendríticas
dcARN	ARN doble cadena
DD	<i>Death domain</i>
DEHAL	Deshalogenasas de iodotironinas
DIO1	Desahalogenasa de iodotironinas tipo 1
DIT	Diiodotirosina
DSS	Dextrano sulfato de sodio
DTC	Cáncer tiroideo diferenciado
Duox	Oxidasa tiroidea dependiente de NADPH
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELE1	Gen NCOA4
EPG	Epigen
EPR	Epiregulina
ER	Retículo endoplásmico
ETS	Proteínas de unión a Ets
Ets^d	Ets distal
FTA	Adenoma tiroideo folicular
FTC	Cáncer folicular tiroideo
FVPTC	Variante folicular de PTC
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GNAS1	Proteína G unidora de nucleótidos de guanina
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
H2O2	Peróxido de hidrógeno
H4	Gen de CCDC6
HB-EGF	Factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina

HMGB1	<i>High mobility group box-1</i>
I-	Ioduro
IKK	Inhibidores de IκB (IKKY)
IL	Interleuquina
INF-I	Interferón tipo I
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IκB	Proteína inhibitoria de NF-κB
Jak2	Tirosina quinasa Janus 2
LMW-HA	Ácido hialurónico de bajo peso molecular
LPS	Lipopolisacárido
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MEN	Neoplasia endocrina múltiple
miRNA	micro ARN
MIT	Monoiodotirosina
MTC	Cáncer tiroideo medular
NEMO	Modificador esencial de NF-κB
NF-κB	Factor nuclear κB
NF-κB1	Factor de transcripción p50
NF-κB2	Factor de transcripción p52
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NIK	Quinasa inductora de NF-κB
NIS	Simportador Na ⁺ /I ⁻
NK	Células <i>natural killer</i>
NLR	Receptor similares a NOD
NLS	Secuencia de localización nuclear
NO	Óxido nítrico
NRG	Neuregulina
NSCLC	Cáncer de células no pequeñas de pulmón
p100	Precursor del factor de transcripción p52
p105	Precursor del factor de transcripción p50
PAAF	Punción aspirativa con aguja fina
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PDS	Pendrina
PDTC	Cáncer tiroideo pobremente diferenciado
pERK	ERK fosforilado
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PTC	Cáncer papilar tiroideo
RAGE	Receptor de productos derivados de glicación avanzada
RelA	Factor de transcripción p65
RHD	Dominio de homología Rel
RLR	Receptor similar al gen inducible por ácido retinoico
rT₃	T3 reversa
RTK	Receptor con actividad tirosina quinasa
S100A4	Proteína pequeña de unión al calcio
scARN	ARN de simple cadena

siARN	ARN de interferencia
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
T₃	3, 5, 3' triiodotironina
T₄	3, 5, 3', 5' tetraiodotironina
TAD	Dominios de transactivación
TAM	Macrófago asociado a tumores
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCPTC	PTC de células altas
TERT	Transcriptasa Reversa de la Telomerasa
Tg	Tiroglobulina
TGF-α	Factor de crecimiento transformante α
TLR	Receptor tipo toll
TP53	Gen supresor tumoral
TPO	Peroxidasa tiroidea
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
TSH	Tirotropina
TSHR	Receptor de TSH
Ub	Ubiquitinación
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

9. AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar gracias a muchas personas que han estado presentes en esta etapa de formación profesional y personal.

A la Dra. Ana María Masini de Repiso, que me abrió las puertas de su laboratorio para realizar una Estancia de investigación con una Beca de Formación Inicial en Investigación en Cáncer y luego para comenzar a dirigir mi carrera de doctorado. Por confiar en mi capacidad y darme la confianza suficiente para desenvolverme libremente y resolver los interrogantes que nos planteamos durante este trabajo de tesis. Por su capacidad de motivar y entusiasmar al equipo de trabajo y por sobre todo, por su respetuosa y cálida forma de ser, digna de imitar.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, que me ofreció un espacio físico ameno para desempeñar actividades de docencia.

A las distintas organizaciones que financiaron el desarrollo de este trabajo de tesis, la Secretaria de Ciencia y Tecnología (SeCyT), la Agencia Córdoba Ciencia, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT, FONCYT). A las distintas organizaciones que me otorgaron becas para completar mis estudios, el Instituto Nacional del Cáncer (INC), la Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM), SeCyT y CONICET.

A mi comisión evaluadora de Tesis, Dra. María del Mar Montesinos, Dra. Mariana Maccioni y Dra. Cristina Maldonado por su invaluable aporte científico y metodológico durante el desarrollo, evaluación y corrección de esta tesis.

A mi co-directora de beca, la Dra. María del Mar Montesinos por seguir los avances de cerca durante esta etapa, por brindar su valioso aporte científico y metodológico en cada instancia de redacción de informes, publicaciones y presentación a congresos.

Al Dr. Juan Pablo Nicola, que participó activamente y de manera desinteresada en el diseño experimental, hipótesis y análisis bioinformáticos, en la discusión de resultados, y durante el desarrollo y corrección de la publicación que deriva de esta tesis doctoral. Además, por las largas charlas en las que fui formando y tallando aspectos profesionales.

Al Dr. Elmer A. Fernandez por su colaboración en la realización y discusión de los análisis bioinformáticos que aportaron información valiosa a este trabajo de tesis. Al Dr. Amado Quintar por su colaboración en la realización de las reacciones inmunohistoquímicas, por su aporte científico y metodológico.

A la Dra. Edna T. Kimura por su valioso aporte científico y por recibirme en su laboratorio de la Universidad de San Pablo para realizar una pasantía que me permitió aprender aspectos metodológicos que enriquecieron mi trabajo de tesis.

A la Dra. Ana Carolina Donadio y la Dra. Mónica Gilardoni quienes me abrieron por primera vez las puertas del laboratorio 116 para realizar mi Practicanato Especializado en Investigación, cuando aún era estudiante de la carrera de Bioquímica. Por motivarme a

perseguir este sueño, confiar en mis capacidades, por sus consejos profesionales y personales y por todo el cariño que me brindaron.

A todos mis COMPAÑEROS y AMIGOS del laboratorio 116 por las largas horas de trabajo compartidas y el valioso aporte científico que me servirá, sin dudas, para el resto de mi carrera profesional. Por alegrarme cada día con sus charlas ocurrentes en lo laboral y personal; por los inolvidables viajes a congresos y por convertir estos últimos años en momentos únicos: Ana Belén, Ana Caro, Ana Masini, Clau, Flor, Juan, Lau, Luci, Maga, Mari, Marian, Moni, Nico, Rocío, Romi y Vani.

A todos mis COMPAÑEROS y AMIGOS del CIBICI por las charlas entre pasillos y la colaboración desinteresada para resolver todo tipo de problemas. Por las inolvidables salidas, “After Lab”, “Trekking”, y las vacaciones post congresos compartidas. A mis compañeros del lab 114, Fabi, Jime, Leo y Nati, por estar siempre dispuestos a ayudarme a resolver problemas experimentales, por las horas de docencia compartidas y por permitir que naciera una hermosa amistad.

A mis AMIGOS que son maravillosas personas que fui eligiendo en mi camino por la vida. Ellos están siempre presente para escucharme, aconsejarme y apoyarme en cada decisión. Por las largas charlas que me enriquecen como persona y llenan de alegría: Bela, Cande, Cesar, Day, Gabi, Gise, Jime, Mayi, Pablo, Romi, Vale y Vero y a todos aquellos que me brindaron su amistad.

A mi FAMILIA, que siempre estuvo para apoyarme y alentarme en cada decisión y emprendimiento, aún cuando estos parecían inalcanzables. A la hermosa y fuerte mujer que me dió la vida, mi MAMÁ, por enseñarme a ser libre e independiente como ella, a no rendirme nunca, a tener fortaleza y a creer que todo lo que me proponga es posible. A mi PAPÁ a quién recuerdo con mucho cariño y sé que estaría orgulloso de mí. A mis HERMANOS Paula, Guillermo y Mercedes por todo el amor que nos une y por el apoyo incondicional de siempre. A mis queridos ABUELOS Lila y Chacho y mis tíos Cinthya y Sandro quienes desde la distancia siempre me alientan para alcanzar mis metas brindándome mucho cariño. A mí cuñada y cuñados, Estefi, Mati y Pierre, por hacer más grande y divertida mi familia. A mis pequeños sobrinos, Agus y Juan, porque con sus risas e inocentes travesuras me llenan de vida.

A Román que se presentó inesperadamente en mi vida para brindarme amor y cariño, por su compañerismo, comprensión y paciencia, por alegrar mis días y por sobre todo por soñar a mi lado.

Por último, agradezco a la *VIDA* que me da la oportunidad de decidir, me ofrece desafíos continuamente y me permite aprender siempre algo nuevo cada día.

Muchas Gracias...

10. PUBLICACIONES

10.1. PUBLICACIONES RELACIONADAS AL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

Peyret V, Nazar M, Martín M, Quintar A, Fernandez EA, Geysels RC, Fuziwara CS, Montesinos MM, Maldonado CA, Santisteban P, Kimura ET, Pellizas CG, Nicola JP, Masini-Repiso AM. “*Functional Toll-like Receptor 4 Overexpression in Papillary Thyroid Cancer by MAPK/ERK-induced ETS1 Transcriptional Activity*”. Revista: *Molecular Cancer Research*. Editorial: *Amer Assoc Cancer Research*. Lugar: Philadelphia; Año: 2018. ISSN: 1541-7786.

10.2. OTRAS PUBLICACIONES

Nicola JP*, **Peyret V***, Nazar M, Romero JM, Lucero AM, Montesinos MM, Bocco JL, Pellizas CG, Masini-Repiso AM. “*S-nitrosylation of NF- κ B p65 inhibits TSH-induced Na⁺/I⁻ symporter expression*”. Revista: *Endocrinology*. Editorial: *Endocrine Soc*. Lugar: Washington; Año: 2015 vol. 156 p. 4741 – 4741. ISSN: 0013-7227. * Ambos autores deben ser considerados primer autor.

Montesinos MM, Nicola JP, Nazar M, **Peyret V**, Lucero AM, Pellizas CG, Masini-Repiso AM. “*Nitric Oxide-Repressed Forkhead Factor FOXE1 Expression is Involved in the Inhibition of TSH-Induced Thyroid Peroxidase Levels*”. Revista: *Molecular and Cellular Endocrinology*. Editorial: *Elsevier Ireland Ltd*. Lugar: Amsterdam; Año: 2016 vol. 420 p. 105 – 105. ISSN: 0303-7207.

10.3. CAPÍTULOS DE LIBROS

Autores: Nicola JP, **Peyret V**, Masini-Repiso AM, Pisarev MA. **Libro**: “*Fisiopatología Molecular y Clínica en Endocrinológica*”. **Capítulo**: “*Regulación del Crecimiento y la Función Tiroidea por Hormonas y Factores de crecimiento*”. Editorial: *Neuhaus Industria Gráfica*. Lugar: Buenos Aires, Argentina; Año: 2015. p. 529-541. ISBN: 9789874579201.