

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**EFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL
RECEPTOR DE HORMONAS
TIROIDEAS BETA (TR β) SOBRE LA
TRANSFORMACIÓN CELULAR,
TUMORIGÉNESIS Y FORMACIÓN
DE METÁSTASIS**

TESIS DOCTORAL

**OLAIA ANTÍA MARTÍNEZ IGLESIAS
MADRID, 2007**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**EFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL
RECEPTOR DE HORMONAS
TIROIDEAS BETA (TR β) SOBRE LA
TRANSFORMACIÓN CELULAR,
TUMORIGÉNESIS Y FORMACIÓN
DE METÁSTASIS**

Memoria presentada por OLAIA ANTÍA MARTÍNEZ IGLESIAS,
licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid.

Director de tesis: Dra. Ana María Aranda Iriarte

Tutor: Juan Carlos Lacal Sanjuan

Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM
Madrid, 2007

Ana María Aranda Iriarte, Doctora en Ciencias y profesora de Investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas del CSIC,

CERTIFICA QUE: Olaia Antía Martínez Iglesias, Licenciada en Biología por la Universidad de A Coruña, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado:

EFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE HORMONAS TIROIDEAS BETA (TR β) SOBRE LA TRANSFORMACIÓN CELULAR, TUMORIGÉNESIS Y FORMACIÓN DE METÁSTASIS

El cual considero satisfactorio y apto para ser presentado como tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, expido el presente certificado en Madrid a 8 de Marzo de 2007.

Fdo. Ana María Aranda Iriarte
Profesor honorario de la U.A.M.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Ana Aranda no sólo el haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, sino también tu apoyo, dirección, confianza y continuas enseñanzas durante estos años. Realmente haces muy agradable trabajar en tu laboratorio.

En segundo lugar quiero dar las gracias al Dr. Javier Regadera por introducirme en el apasionante mundo de la anatomía patológica, gracias por tu ayuda, por las clases magistrales, por tu tiempo dedicado y sobre todo por tu paciencia. Muchas gracias también a Carmen, sin tu ayuda no hubiera sido posible esta tesis, gracias por las histologías, por tu buen trabajo y sobre todo por tu amabilidad y por tener siempre una sonrisa en tu cara, eres encantadora. Gracias también a Raquel Marcos por tu ayuda con las histologías que se resistían.

Gracias también a la Dra. Angels Fabra por las células MDA MB 468 PM1, por tantos consejos y protocolos de experimentos, por los ensayos de inoculación de células tumorales en la grasa de la mama de ratones atómicos y por estar siempre dispuesta a ayudarnos.

Gracias al Dr. Alberto Muñoz por el matrigel, anticuerpos, células y tanto material que nos ha proporcionado. Gracias a la Dra. Benilde Jiménez y a la ya Dra. Nuria Fernández por sus consejos y explicaciones sobre los ensayos de invasión a través de matrigel. Gracias a la Dra. Amparo Cano por sus lecciones sobre la transición epitelio-mesénquima, por sus consejos y explicaciones cuando este trabajo estaba comenzando. Gracias al Dr. Javier Alonso y a Jaime por vuestra ayuda con las PCRs cuantitativas y con los microarrays.

Gracias al Dr. Angel Pascual por tu buen humor y tus sonrisas, por tu amabilidad, por tu sencillez.

Gracias también a los chicos del animalario, principalmente a Saleta y Fernando, desde luego haceis muchísimo más sencillo y agradable el trabajar con animales, gracias por las enseñanzas y por el gran respeto que teneis con los animales. Gracias Fernando por estar siempre dispuesto a ayudarme, por movilizar y adaptar el animalario para los experimentos con radioactividad. Gracias también a M^a Teresa y las chicas del servicio de Protección Radiológica por ayudarme con esos experimentos, por hacer todo lo que esta en vuestras manos para ayudarnos, por vuestra amabilidad. Gracias a los chicos del servicio de Fotografía e Imagen Científica por vuestra ayuda con la fotografía, los posters y los programas de imágenes. Gracias a los chicos de bioinformática por hacer algo más fácil la informática, gracias por tantos y tantos pequeños favores. Gracias Nani por la tarde intentando salvar la charla del congreso que se había “tragado” el ordenador.

Un apartado muy especial de estos agradecimientos es para mis compañeros de laboratorio durante todos estos años. Gracias Anabel por proporcionarme las primeras ayudas cuando llegué al laboratorio. Gracias Eva por estar siempre dispuesta a ayudarme en mis primeros experimentos cuando todo me parecía nuevo y sobre todo por tu alegría y vitalidad que desde luego contagiabas. Gracias a Ruth los comienzos juntas en el laboratorio y por tu compañía en los congresos, sobre todo en Nueva York.; a Mila por tantos pequeños favores; a Jose Miguel, Anita y Borja por traer vuestra gran experiencia al laboratorio; a Ángeles y a Nacho por traer aires nuevos al laboratorio y a Alberto por tus conversaciones

culturales. Gracias también a Dani por tu apoyo con mi tesis, por tu buen humor y sobre todo por ser un ejemplo de fortaleza. Gracias Laura por haber compartido contigo nuestras “penurias” con los ratones y las histologías, por tu apoyo, por escucharme tantas veces, por tus ánimos. Gracias a Manu, Elena y Paula por vuestra vitalidad y buen humor. Gracias Sandra por tus ánimos con la tesis y por traer aires jóvenes al laboratorio. Gracias Aurora por ser como eres, un pedazo de pan, por ayudarme y animarme en tantos momentos, por estar siempre dispuesta a dejar lo que estás haciendo para ayudar a quien lo necesita. Gracias Marina por tu alegría, energía y buen humor, por tu entusiasmo que contagia a los que están a tu lado, por tus sonrisas. Gracias a las dos por vuestros sabios consejos y por vuestros ánimos cuando estaba escribiendo esta tesis, gracias por vuestra amistad. Gracias Maxy por confiar en mi trabajo, por esas salidas culturales, por tus charlas filosóficas y políticas, por tu gran corazón. Gracias Mariana por tantos consejos y pequeños trucos, por tus protocolos, por tu ayuda con los ratones, gracias también por ser como eres, por ser todo dulzura y alegría, por ser la perfecta anfitriona en Nueva York y por las divertidas fiestas de disfraces. Gracias Tamara por ayudarme en muchos experimentos, por tu ayuda con los ratones, por tu simpatía y sobre todo por descubrirme lo bonito que es enseñar. Gracias Bea por tu ayuda y por la alegría que nos traías todos los días al laboratorio. Y sobre todo GRACIAS, muchísimas gracias a Susana, gracias por el día a día, por tu apoyo y confianza constante, por tu paciencia, gran parte de este trabajo te lo debo a ti. ¡Aún queda pendiente el corte de pelo!. Gracias también simplemente por tu forma de ser, por tu bondad, por tu buen corazón, por tu sencillez y por tu alegría. Sin duda eres mucho más que una compañera de laboratorio, gracias por tu amistad..

Gracias también a la gente del laboratorio del Dr. Angel Pascual. Gracias a Yolanda, Anuska, Tamara, Lauro y Ascen por hacer de vuestro laboratorio una extensión del nuestro. Gracias también a Tamara, Lauro y Ascen por los viajes.

Gracias a Sita, Merche y Antonio por vuestros visitas por el laboratorio, por vuestros ánimos y apoyo, por tantos consejos a la hora de escribir esta tesis, gracias por tantas y tantas charlas en las comidas y en el cuarto de cultivos, por el secageles, la PCR, etc. Gracias también a Tiago por tus charlas culturales y por estar siempre dispuesto a ayudar cuando alguien lo necesita.

Gracias a los chicos/as de los laboratorios de Amparo Cano, Miguel Quintanilla y Juan Carlos Lacal por vuestra ayuda con tantos protocolos novedosos para mí, sin vuestra ayuda esta tesis hubiera sido muchísimo más difícil.

Otro apartado muy especial en para mis amigos de Coruña por vuestro continuo apoyo y por hacerme sentir como si siguiera allí, y sobre todo por las maravillosas vacaciones que pasaba cada vez que me escapaba a casa. Gracias Jose por tu sensatez y alegría, gracias por tu gran cariño y por ser un gran amigo, eres el mejor haciendo reír a la gente. Gracias Fran, has sido un gran apoyo durante todo este tiempo, siempre tan alegre y con ganas de fiesta, y desde luego dispuesto a darlo todo. Gracias Sandra por tus ánimos y consejos, que a lo mejor precisamente por originales, siempre me sacaban una sonrisa cuando más lo necesitaba. ¡Cuántas veces me has hecho reír a carcajadas!. Gracias a Jose y Sonia por vuestro apoyo, vuestra amistad y por ser un ejemplo de fortaleza.. Gracias Ana por tu dulzura, por tu buen humor y por desprender tanta y tanta vitalidad, gracias por ser una gran amiga. Gracias a Rocío y Santi por vuestra amistad y vuestros ánimos, realmente sois dos personas muy especiales. Gracias María por tener

siempre un hueco para verme cuando me acercaba a Coruña aún cuando te resultaba realmente difícil y por tener ese corazón enorme. Gracias Carlota por tus consejos siempre sabios y comprensivos, por tu forma de ser, por tu naturalidad y sensatez, por tu amistad. Gracias Pablo por tu apoyo y amistad en tantas ocasiones. Gracias a Cayetana, Tamara, Vanesa, Pablo, Silvia, Ana y Olaia por hacer de Coruña y Betanzos ese refugio acogedor. Gracias Yago por ser como eres, ese osito de peluche, y por tener un corazón enorme. Gracias Rafa por tu amistad, por demostrarme que hay que luchar por los sueños. Gracias a Richard y a David por vuestras visitas a Madrid, por hacer más fácil los primeros meses en esta ciudad.

Gracias también a mis amigos de Madrid por tantos buenos momentos. Gracias Ada por tu bondad, dulzura y amistad. Desde luego sin tu amistad hubiera sido mucho más duro vivir aquí. Gracias a Marisa y Mari Carmen por tantas fiestas, gracias también por vuestra energía. ¡Madre mía, que marcha teneis!. Gracias a Elena y a Elisa por las alidas en Madrid y por vuestro cariño. Gracias Jose Antonio por tu amistad, por tu dulzura y por tratar tan bien a “tus niñas”. Gracias a Luz y Jorge por vuestro apoyo en estos últimos meses y por tantas risas en vuestra compañía. Gracias Alex por tantas enseñanzas y por ser un ejemplo de fuerza y constancia. Gracias a todos tus amigos por estar ahí, por estar siempre dispuestos a ayudar, por vuestro gran corazón.

Gracias Belén por tantas y tantas cosas, gracias por el día a día, por tu apoyo y amistad, por tu sencillez, gracias por tu paciencia durante los momentos de estrés y sobre todo gracias por hacer todo más fácil. En definitiva, gracias por ser una gran amiga, gracias por ser como eres. Sin duda el vivir en Madrid hubiera sido muy distinto y aburrido sin ti. Gracias Shelkis por tu compañía, por tus juegos, por hacerme sonreír y distraerme cuando llego a casa.

Otro capítulo muy especial en estos agradecimientos es el de mi familia. Gracias a mis padrinos Ana y Ángel por estar ahí, por vuestro apoyo continuo. Gracias a mis abuelos por vuestra ilusión y confianza en vuestra nieta. Y sobre todo, MUCHÍSIMAS GRACIAS a mis padres por apoyarme y confiar en mí, por empujarme a hacer siempre lo que me gustaba, en definitiva, por ser como sois.

Y como cierre, y ya que tan sólo lo he dicho 2000 veces GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS A TODOS.

RESUMEN

La hormona triiodotironina (T3) desempeña un papel fundamental en procesos de desarrollo, proliferación y metabolismo. En esta tesis hemos analizado los efectos de la expresión de TR β sobre la transformación celular, tumorigénesis y formación de metástasis. En presencia de T3, el TR β inhibe la activación del promotor de ciclina D1 por el oncogén ras en células de hepatocarcinoma, a través de los factores de transcripción ATF-2 y de la quinasa MSK. La T3 también reprime la transformación de fibroblastos NIH3T3 por Ras. Tanto la transrepresión del promotor de ciclina D1 como la inhibición de la transformación requiere la integridad del DBD y de la hélice 1 del LBD, mientras que es independiente del dominio AF-2, responsable de la unión de coactivadores. La expresión estable de TR β también disminuye la formación de tumores *in vivo*, en ratones atímicos desnudos, por células de hepatocarcinoma SK-hep1 o de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1. La expresión de TR β disminuye la angiogénesis de los tumores y aumenta el grado de diferenciación de los mismos, produciendo una reversión parcial de la EMT. El receptor tiene un efecto aún más drástico sobre la invasividad y formación de metástasis, impidiendo totalmente la formación de nódulos metastáticos pulmonares cuando las células se inoculan en la vena de la cola de ratones inmunosuprimidos. La expresión de TR β en ambos modelos celulares bloquea por completo la respuesta al tratamiento con distintos factores de crecimiento, importantes para el fenotipo invasivo de las células tumorales e inhibe de manera drástica la expresión de genes que codifican moléculas importantes para el desarrollo metastático. Todos estos resultados muestran que TR β actúa como un potente supresor tumoral y de la formación de metástasis.

SUMMARY

The thyroid hormone (T3) plays an important role in development, proliferation and metabolism. In this work we have analyzed the effect of TR β expression on tumor formation and metastasis development. In hepatocarcinoma cells that have been transfected with TR β , T3 blocks ras-dependent activation of the cyclin D1 promoter. This inhibition occurs through ATF-2 transcription factors and MSK kinase activity. T3 also blocks transformation of NIH3T3 fibroblasts when the ras oncogene is cotransfected with TR β . Transrepression of cyclin D1 promoter activity, as well as the anti-transforming effects of T3 depend on the integrity of the DBD and the LBD helix 1, whereas it is independent of the AF-2 domain required for coactivators recruitment. Stable TR β expression also blocks tumorigenesis in immunodeficient mice inoculated with SK-hep1 hepatocarcinoma or MDA MB 468 PM1 breast adenocarcinoma cells. TR β expression reduces tumor angiogenesis and produces an increase in tumor differentiation, with a partial reversion of EMT. Indeed, TR β expression causes an even more drastic effect on invasiveness and metastasis development, blocking totally formation of lung nodular metastasis upon inoculation of cells into the tail vein of immunodeficient mice. We have shown that SK-hep1-TR β and MDA MB 468 TR β cells are refractory to treatment with growth factors important for the invasive phenotype of tumoral cells. Indeed, TR β reduces expression of genes encoding proteins that are required for metastatic growth. In conclusion, our results show that TR β acts as a potent suppressor of tumor growth and blocks metastasis development.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	6
INTRODUCCIÓN	10
1.- LA SUPERFAMILIA DE RECEPTORES NUCLEARES	11
1.1.- Clasificación	11
1.2.- Estructura	11
1.3.- Elementos de respuesta a hormona	12
1.4.- Mecanismos de regulación de la expresión génica	13
1.4.1.- Activación y represión transcripcional mediada por HREs positivos	13
1.4.2.- Represión transcripcional mediada por HREs negativos	15
1.4.3.-Mecanismos independientes de la unión a HREs	15
2.- EL RECEPTOR DE HORMONAS TIROIDEAS	16
2.1.- Funciones del receptor de hormonas tiroideas	17
2.2.- El receptor de hormonas tiroideas en cáncer	18
3.- LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN	19
3.1.- Estructura y función de los genes y proteínas Ras	19
3.2.- Estructura y función de los receptores del factor de crecimiento epidérmico ...	20
3.3.- Estructura y función de los receptores del factor de crecimiento similar a insulina	21
3.4.- Estructura y función de los receptores del factor de crecimiento transformante beta	21
3.5.- La ruta Raf/MEK/ERK.....	22
3.6.- La ruta de PI3K	23
3.7.- La ruta de p38	24
4.- EL PROCESO DE TUMORIGÉNESIS Y FORMACIÓN DE METÁSTASIS	25
4.1.- Angiogénesis	26
4.2.- Invasión local e intravasación	27
4.3.- Circulación	29
4.4.- Extravasación y formación de micro y macrometástasis	29

MATERIALES Y MÉTODOS

33

1.- MATERIALES

34

Productos generales	34
Líneas celulares	34
Animales de experimentación	36
Plásmidos y vectores de expresión	36
Anticuerpos	38

2.- MÉTODOS

39

Experimentos de transfección transitoria	39
Experimentos de transfección estable	39
Mutagénesis dirigida	39
Medidas de crecimiento celular	40
1.- Incorporación de (³ H)-Timidina	40
2.- Ensayo MTT	41
3.- Ensayo de marcaje con bromo-deoxi-uridina (BrdU)	41
Inmunodetección de proteínas	41
1.- Cuantificación de proteínas	41
2.- Western Blot	41
3.- Inmunofluorescencia	42
Zimograma	42
Extracción de ARN y RT-Q-PCR en tiempo real	42
1.- Extracción de ARN	42
2.- RT-PCR en tiempo real	42
Experimentos de retardo de la movilidad electroforética en gel (EMSA)	43
1.- Marcaje de la sonda	43
2.- Traducción <i>in vitro</i>	44
3.- Incubación de las proteínas con el ADN y electroforesis	44
Ensayos de interacción proteína-proteína	44
1.- Purificación de proteínas fusionadas a GST	44
2.- Ensayo de interacción proteína-proteína	44
Ensayos biológicos	45
1.- Ensayos de crecimiento en agar blando	45
2.- Crecimiento en suspensión	45
3.- Ensayos de formación de focos de transformación	45

4.- Ensayos de invasión	45
Ensayos de formación de tumores y metástasis en ratones inmunosuprimidos	46
1.- Inoculación heterotópica	46
2.- Inoculación ortotópica	46
3.- Ensayo de formación de metástasis experimentales	47
4.- Experimentos de biodistribución de células tumorales por vía endovenosa en ratones inmunosuprimidos	47
5.- Obtención de cultivos celulares a partir de explantes de los tumores	47
6.- Análisis histopatológico	48

RESULTADOS 51

La regulación del promotor de ciclina D1 por Ras depende de los sitios CRE y Sp1	52
La quinasa MSK participa en la activación del promotor de ciclina D1 por el oncogen Ras en la línea celular HepG2	55
Caracterización de los dominios del TR β implicados en bloqueo de la estimulación del promotor de ciclina D1 por V12 H-Ras	57
Mutaciones en el dominio de unión al ADN (DBD)	57
Mutaciones que impiden la interacción con correpresores	59
Mutaciones en el dominio de unión al ligando (LBD)	61
El antagonismo de T3 sobre la activación del promotor de ciclina D1 por el oncogén ras es dependiente del DBD y de la hélice 1 del LBD	62
El efecto de TR β sobre la activación del promotor de ciclina D1 por Ras es independiente del reclutamiento de coactivadores	64
La inhibición de la transformación inducida por el oncogén Ras en fibroblastos murinos NIH3T3 depende de la integridad del DBD y del reclutamiento de correpresores, mientras que no requiere la unión de coactivadores	65
Generación de células establemente transfectadas con TR β	67
La expresión de TR β reduce la formación de tumores <i>in vivo</i> por células de hepatocarcinoma humano SK-hep1	68
La expresión de TR β disminuye a lo largo del periodo de crecimiento de los tumores originado por las células SK-hep1 TR β	70
La expresión de TR β disminuye la formación de tumores <i>in vivo</i> por células de adenocarcinoma de mama humano MDA MB 468 PM1	72
La expresión de TR β se mantiene a lo largo del crecimiento de los tumores originado por las células MDA MB 468 PM1 TR β	73
La expresión de TR β reduce la proliferación de los tumores	74
La expresión de TR β reduce la angiogénesis y aumenta el área necrótica de los tumores .	76

TR β produce una reversión parcial de la transición epitelio-mesénquima	77
TR β reduce la capacidad de infiltrar tejidos adyacentes	81
La expresión de TR β regula la expresión y la actividad de metaloproteasas (MMPs)	84
La expresión de TR β reduce la capacidad de proliferación sin anclaje a un sustrato	85
La expresión de TR β reduce la capacidad de invasión <i>in vitro</i>	87
La presencia de TR β impide la proliferación inducida por el tratamiento con la citoquina TGF β	88
La expresión de TR β bloquea la estimulación de la actividad de MMP2 por la citoquina TGF β	90
La presencia de TR β impide la proliferación inducida por distintos factores de crecimiento	91
La vía de las proteínas Smads está implicada en el efecto de TR β sobre la señalización por TGF β	92
La ruta Raf/MEK/ERK también está implicada en el efecto de TR β sobre la señalización por la citoquina TGF β	94
La expresión de TR β regula la expresión de los receptores para los factores de crecimiento EGF e IGF-1	96
La ruta de RAF/MEK/ERK está implicada en el efecto de TR β sobre la señalización por los factores de crecimiento EGF e IGF-1	98
La expresión de TR β disminuye la extravasación de las células tumorales y su capacidad de formar micro y macrometástasis	100
La expresión de TR β regula los niveles de moléculas importantes en la formación de metastásis	104
DISCUSIÓN	107

La regulación del promotor de ciclina D1 por el oncogen Ras en células de hepatoma HepG2	108
El antagonismo de T3 sobre la activación del promotor de ciclina D1 y sobre la transformación mediada por el oncogen Ras es dependiente de la integridad del DBD y de la hélice 1 del LBD	109
La expresión de TR β reduce la formación de tumores <i>in vivo</i>	111
La expresión de TR β bloquea la capacidad de las células de responder al tratamiento con TGF β o factores de crecimiento	113
La expresión de TR β inhibe la angiogénesis y aumenta la necrosis en los tumores	115
TR β produce una reversión parcial de la transición epitelio-mesénquima	117
La expresión de TR β reduce la capacidad invasiva tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i>	119

La expresión de TR β bloquea la capacidad de formar metástasis <i>in vivo</i>	121
La expresión de TR β regula la expresión de moléculas importantes en la formación de metástasis	121

CONCLUSIONES	123
---------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	125
---------------------	-----

ABREVIATURAS

ACTR: activador de los receptores de hormonas tiroideas y ácido retinoico

ADNc: ADN codificante

AMPc: adenosina 3'5' monofosfato cíclico

AP-1: proteína activadora 1

ARN : ácido ribonucleico

ATCC: colección de cultivos celulares tipo americana

BCA: ácido bibinconínico

BrdU: bromo- deoxi- uridina

Brg-1: gen relacionado con Brama 1

BSA: albúmina de suero bovina

°C: grados centígrados

CBP: proteína de unión a CREB

CCL20: ligando de quimoquinas 20 (motivo C-C)

CCR6: receptor de quimoquinas 6 (motivo C-C)

CDK: quinasa dependiente de ciclina

Ci: curios

Cl₂Ca: cloruro cálcico

CO₂: dióxido de carbono

CoR: correpresor

CRE: elemento de respuesta a AMPc

CREB: proteína de unión a CRE

CTE: extensión carboxi-terminal

CXCL12: ligando de quimioquinas 12 (motivo C-X-C)

CXCR4: receptor de quimioquinas 4 (motivo C-X-C)

DBD: dominio de unión a ADN

DCS: suero de ternero donante

dCTP: deoxi- citosin trifosfato

DMEM: medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DR: repetición directa.

DTT: ditioneitol

ECL: quimioluminiscencia mejorada.

ECM: matriz extracelular

EDTA: ácido etilen-diamino-tetracético

EERs: receptores relacionados con los receptores de estrógenos.

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGFR1: receptor del factor de crecimiento epidérmico 1

EGTA: ácido etilenglicol-bis-(β-aminoetiléter)N,N,N', N'-tetracético

EMSA: ensayo de retraso de la movilidad electroforética

EMT: transición epitelio-mesénquima

ERs: receptores de extrógenos.

ERBB2: receptor del factor de crecimiento epidérmico 2

ERBB3: receptor del factor de crecimiento epidérmico 3

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

GAPs: proteínas GTPasa activadoras

GDP: dinucleotidos de guanina.

GES: factor de intercambio de guanidin nucleótidos

GRs: receptores de glucocorticoides.

GRE: elemento de respuesta a glucocorticoides

GSK3: quinasa 3 de la glucógeno sintasa

GST: glutathion S-transferasa

GTP: trinucleotidos de guanina.

h: horas

³H: isótopo de tritio.

HAT: acetiltransferasa de histonas

HBS: tampón hepes salino

HBSS: tampón salino Hanks

HCl: ácido clorhídrico

HDACs: deacetilasas de histonas

Hepes: N-2-hidroxietilpiperazina-N'-ácido 2-etanosulfónico

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos

HMT: metiltransferasa de histonas

HNF-4: factor nuclear hepático 4.

HREs: elementos de respuesta a hormonas

Hsp: proteínas de choque térmico.

IGF-1: factor de crecimiento similar a insulina

IGFBP3: proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina

IGFR1: receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1

IL-8: interleuquina 8

IP: palíndromo invertido.

IPTG: isopropil-β-D- tiogalactopiranosido

¹²⁵IrdU: 5 - [¹²⁵I] Iodo-2'- deoxi-uridina.

IRS: sustrato del receptor de insulina

Kb: kilobases

KCl: Cloruro de potasio.

KDa: kilodalton.

KOH: hidróxido de potasio.

KRT: queratina

LBD: dominio de unión a ligando

M: molar

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MEM: medio esencial mínimo Eagle's

MgCl₂: cloruro de magnesio.

Min: minutos

MMP: metaloproteasa

MMTV: virus del tumor mamario de ratón.

MSK: quinasa regulado por mitógenos y estrés

MTT: (3-(4, 5-dimetiltiazol-z-y))-2, 5-difeniltetrazolio bromidido

NaCl: cloruro sódico

NaOH: hidróxido de sodio

NCoR: correpresor nuclear.

NP-40: Nonidet P-40 (SIGMA)

NRG: neuregulina

NRs: receptores nucleares

³²P: isótopo de fósforo 32

p300: proteína asociada a la proteína de adenovirus E19

PAI-1 : inhibidor del activador del plaminógeno 1

Pal: palíndrome

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino pH 7,5

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PI3K: quinasa del fosfatidil 3-OH-inositol

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluoruro

PPARs: receptores de actividades de la proliferación de peroxisomas.

PRs: receptores de progesterona.

PVDF: difluoruro de polivinilideno

r.p.m: revoluciones por minuto

RA: ácido retinoico

RARs: receptores del ácido retinoico

RARE: elemento de respuesta a ácido retinoico.

Rb: retinoblastoma.

RSK: quinasa de la subunidad ribosomal S6

RXR: receptor X de retinoides

s: segundos

³⁵S: isótopo de azufre 35

SDS: dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico

SFB : suero fetal bovino

SMRT: modulador de silenciamiento por RAR y TR.

T3: hormona triiodotironina

T4: hormona tiroxina

TBE: tampón tris-borato-EDTA

TβR-I: receptor de TGFβ I

TβR-II: receptor de TGFβ II

TBS: tampón Tris salino pH 7,5

TGFβ: factor de crecimiento transformante

TK: promotor basal del gen de la timidina quinasa del virus Herpes simple.

TPA: 12-O-tetraforbol-13-acetato.

TREs: elemento de respuesta a hormona tiroidea

TRH: gen de la hormona liberadora de tirotropina.

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

TRs: receptores de hormonas tiroideas

TSH: genes de la tirotropina.

uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa

VDR: receptor de vitamina D

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

v-erbA: oncogen del virus de la eritroblastosis aviar

Vim: vimentina

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1.- LA SUPERFAMILIA DE RECEPTORES NUCLEARES

Moléculas lipofílicas pequeñas tales como esteroides, hormonas tiroideas o las formas activas de la vitamina A (retinoides) y vitamina D, desempeñan un papel fundamental en el crecimiento, diferenciación, metabolismo, reproducción y morfogénesis de organismos superiores y humanos (Aranda y Pascual, 2001). La mayoría de las acciones de estas moléculas están mediadas por la unión a receptores localizados en el núcleo celular, que actúan como factores de transcripción dependientes de ligando. Estos receptores forman parte de una extensa familia de proteínas denominada la superfamilia de receptores nucleares (NRs) (Escriba y cols., 1997)

1.1.- Clasificación

El análisis evolutivo de estos receptores ha conducido a una subdivisión de los mismos en seis subfamilias (Laudet, 1997). La primera gran subfamilia estaría compuesta por los receptores de hormonas tiroideas (TRs), de ácido retinoico (RARs), de vitamina D (VDR), los receptores de activadores de la proliferación de peroxisomas (PPARs) y algunos de los receptores para los que se desconoce su ligando (receptores huérfanos). Una segunda subfamilia incluiría los receptores X de retinoides (RXR), los COUPs (chicken ovalbumin upstream stimulators) y el factor nuclear hepático 4 (HNF-4), entre otros. La tercera familia de receptores nucleares estaría constituida por los receptores de hormonas esteroideas como los glucocorticoides (GRs), los estrógenos (ERs) o la progesterona (PRs) y por los receptores relacionados con los receptores de estrógenos (ERRs). La cuarta, quinta y sexta subfamilia de receptores nucleares contienen respectivamente los receptores huérfanos NGFI-B, FTZ-1/SF-1 y GCNF (Giguere, 1999; Aranda y Pascual., 2001).

1.2.- Estructura

Los NRs presentan una estructura modular compuesta por varios dominios funcionalmente autónomos. La estructura típica de un receptor nuclear consiste en una región amino-terminal A/B variable, un dominio conservado de unión al ADN (DBD) o región C, un dominio bisagra o región D y una región E conservada que incluye el dominio de unión al ligando (LBD). Algunos receptores nucleares contienen una región carboxi-terminal F cuya función es actualmente desconocida (Fig1).

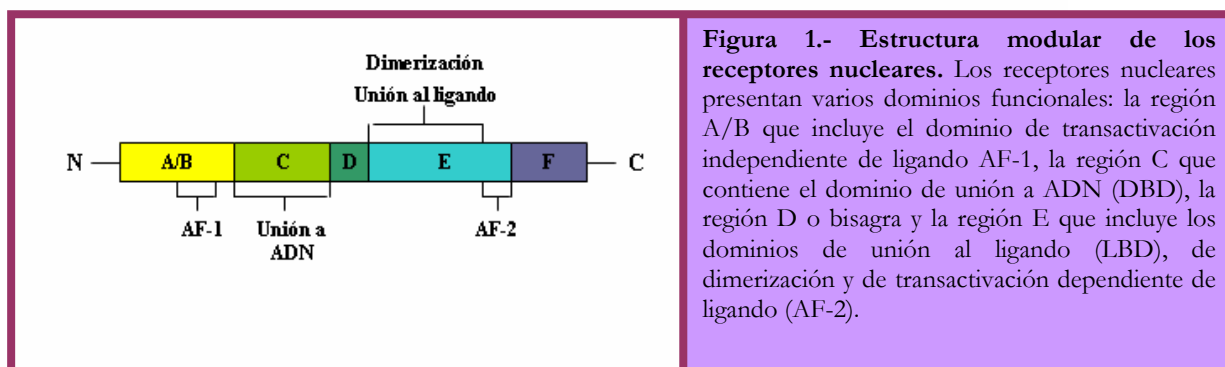


Figura 1.- Estructura modular de los receptores nucleares. Los receptores nucleares presentan varios dominios funcionales: la región A/B que incluye el dominio de transactivación independiente de ligando AF-1, la región C que contiene el dominio de unión a ADN (DBD), la región D o bisagra y la región E que incluye los dominios de unión al ligando (LBD), de dimerización y de transactivación dependiente de ligando (AF-2).

La **región A/B** está localizada en el extremo N-terminal del receptor. Presenta variabilidad de longitud y secuencia y contiene el dominio AF-1, involucrado en la activación transcripcional independiente de ligando. Este dominio es diana de fosforilación de diversas vías de señalización que, de este modo, modulan la actividad transcripcional del receptor (Rochette-Egly, 2003).

La **región C o DBD** constituye el dominio más conservado entre los receptores nucleares y su función es reconocer secuencias específicas en las regiones reguladoras de los genes diana (Rastinejad y cols., 1995). El DBD comprende dos motivos de dedos de zinc que abarcan aproximadamente 60-70 residuos y una extensión carboxi-terminal (CTE) que contiene las denominadas cajas T y A. En cada dedo de zinc están presentes cuatro cisteínas conservadas en todos los miembros de la superfamilia (Schwabe y cols., 1993). En la base del primer dedo de zinc se localizan los residuos responsables del reconocimiento de la secuencia del ADN (caja P). Otros residuos de la base del segundo dedo de zinc están implicados en la dimerización de los receptores (caja D).

El núcleo del DBD está formado por dos α -hélices. La primera de ellas es la hélice de reconocimiento y establece contactos con bases específicas del surco mayor del ADN. La segunda hélice se sitúa perpendicularmente respecto a la hélice de reconocimiento (Glass, 1994).

La **región D o región bisagra** es un dominio que difiere de unos receptores a otros y actúa como un puente flexible entre el DBD y el LBD. Frecuentemente contiene señales de localización nuclear. Esta región en su extremo C-terminal incluye la hélice 1 del LBD y contiene residuos cuya mutación anula la interacción de los receptores nucleares con correpressores (Horlein y cols., 1995; Chen y Evans, 1995; Perissi y cols., 1999; Pissios y cols., 2000).

La **región E o LBD** presenta múltiples funciones. Es responsable de la unión al ligando y de la transactivación dependiente de ligando, siendo mediada esta última por el dominio AF-2 (Webster y cols., 1988; Danielian y cols., 1992; Durand y cols., 1994). Además, el LBD media también la homo- y heterodimerización de los receptores (Forman y Samuels, 1989), la interacción con proteínas hsp (heat-shock proteins) (Bresnick y cols., 1989) y, en algunos casos, la represión transcripcional reversible por el ligando (Tomic-Canic y cols., 1996).

El dominio LBD está constituido por 12 α -hélices conservadas que se numeran desde H1 hasta H12. Entre las hélices H5 y H6 existe un giro β igualmente conservado. Las hélices se organizan para configurar una cavidad hidrofóbica que acoge al ligando (Moras y Gronemeyer, 1998). La unión del ligando implica diversos elementos estructurales a lo largo del LBD y conlleva un importante cambio conformacional de la estructura del receptor. De este modo, se genera una estructura más compacta en la que destaca la recolocación de la hélice 12 hacia una posición que cierra la cavidad en la que se encuentra el ligando.

1.3.- Elementos de respuesta a hormona

Las secuencias de ADN a las que se unen los receptores nucleares para regular la transcripción de sus genes diana se denominan elementos de respuesta a hormonas (HREs).

El análisis de las secuencias de múltiples HREs ha revelado la importancia de un hexámero de bases que constituye el motivo central de reconocimiento por los receptores nucleares y que se define

como hemisítio. Existen dos secuencias consenso para dichos hemisítios. Una de ellas, AGAACA, es reconocida principalmente por los receptores de esteroides. La otra secuencia, AGGTCA, sirve de motivo de reconocimiento para el resto de miembros de la superfamilia de NRs (Beato y cols., 1995).

A pesar de que algunos receptores monoméricos pueden unirse a motivos hexaméricos individuales, la inmensa mayoría de receptores se unen como homo- o heterodímeros a HREs compuestos de dos dominios hexaméricos (Aranda y Pascual, 2001). En estos HREs, los hemisítios se configuran a modo de palíndromes (Pal), palíndromes invertidos (IPs) o repeticiones directas (DRs) separados entre sí un número de bases variable, siendo la longitud de la región espaciadora un importante determinante de la especificidad de la respuesta hormonal.

1.4.- Mecanismos de regulación de la expresión génica

Los receptores nucleares regulan la expresión de genes diana mediante diferentes mecanismos que conducen a la activación o represión de dichos genes.

1.4.1.- Activación y represión transcripcional mediada por HREs positivos

Algunos receptores como TR o RAR en ausencia del ligando reprimen la transcripción de genes que contienen HREs (Casanova y cols., 1994; Banhiamad y cols., 1995). La unión del ligando al receptor revierte este silenciamiento transcripcional y conduce a la activación del gen (fig 2).

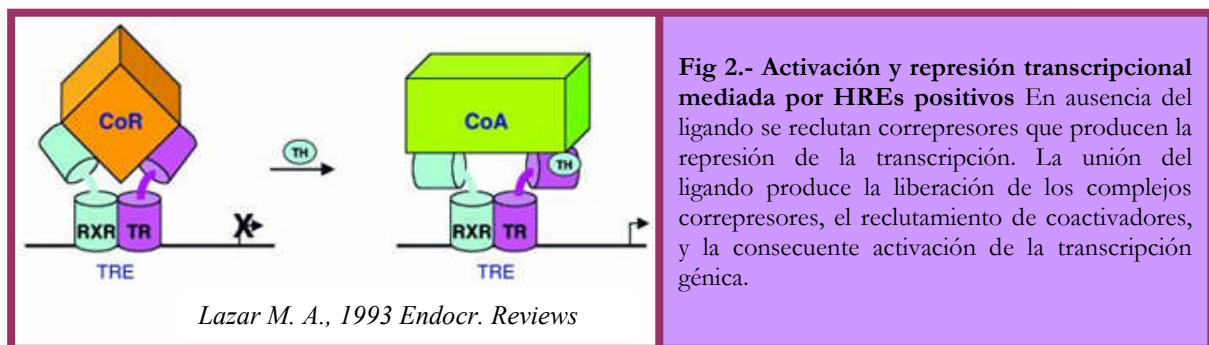


Fig 2.- Activación y represión transcripcional mediada por HREs positivos En ausencia del ligando se reclutan correpresores que producen la represión de la transcripción. La unión del ligando produce la liberación de los complejos correpresores, el reclutamiento de coactivadores, y la consecuente activación de la transcripción génica.

En ausencia del ligando, el LBD de muchos receptores nucleares se encuentra unido a una serie de correpresores transcripcionales, como por ejemplo NcoR (co-Represor Nuclear) y SMRT (Modulador del Silenciamiento por RAR y TR) (Horlein y cols., 1995; Chen y Evans., 1995; Hu y Lazar, 2000; Sachs, 2004), que reclutan complejos transcripcionales con actividad deacetilasa de histonas (HDAC) (Gronemeyer y cols., 2004). Estas HDACs generan una estructura compactada de la cromatina sobre el promotor, lo que provoca la represión transcripcional. En la unión de los correpresores a los NRs está implicada la hélice 1 del LBD contenida en la región D, región que se conoce como caja CoR (Chen y Evans., 1995; Horlein y cols., 1995; Pissios y cols., 2000). Estudios más recientes sugieren que existe un solapamiento en las regiones de los NRs implicadas en la unión tanto a correpresores como a coactivadores (Hu y Lazar, 1999; Nagy y cols., 1999; Perissi y cols., 1999). De este modo las hélices 1, 3, 5, 6, y 11 estarían implicadas en la interacción con correpresores (Wagner y cols., 1995; Feng y cols., 1998).

La unión del ligando genera un cambio de conformación en el receptor en el que destaca el replegamiento de la hélice 12 que contiene el núcleo del dominio AF-2 (Lanz y Rusconi, 1994; Renaud y cols., 1995; Wagner y cols., 1995). De este modo, se produce la liberación de los complejos correpresores y se configura la superficie de interacción para la unión de proteínas activadoras que permiten el

ensamblaje de otras proteínas y complejos cuyo resultado final es la activación transcripcional del gen diana (Moras y Gronemeyer, 1998). Otro elemento esencial para esta activación transcripcional está constituido por residuos de la mitad carboxi-terminal de las hélices 3 y 4 y del lazo que las une (Wurtz y cols., 1996; Henttu y cols., 1997).

El número de coactivadores identificados hasta el momento es considerable. La familia de coactivadores p160 consta de 3 miembros: SRC-1, GRIP-1/TIF-2 y ACTR que presentan una homología de secuencia del 40% (Aranda y Pascual, 2001). Estos coactivadores interactúan específicamente con diversos receptores nucleares, incrementan las respuestas transcripcionales dependientes de ligando y son, generalmente, factores limitantes reclutados por los receptores.

Los coactivadores p160 son coactivadores primarios que interactúan con CBP/p300 y p/CAF que tienen actividad histona acetiltransferasa (HAT) y se asocian además a proteínas con actividad histona arginina metiltransferasa (HMT) como CARM1 o PRMT, de forma que la interacción del ligando con el receptor causaría diferentes modificaciones en el “código de histonas”. El CBP/p300 es una proteína esencial para la transactivación mediada por los receptores nucleares que como se ha mencionado tiene actividad acetiltransferasa de histonas intrínseca, capaz de remodelar la cromatina para la transcripción (Kalkhoven, 2004; Moore y Guy, 2005). Esta proteína además actúa como cointegrador de otras rutas de señalización intracelular y extracelular (Shikama y cols., 1998), ya que interactúa con numerosos factores de transcripción como CREB, AP-1, Jun, Fos, myoD, NF- κ B, Pit-1, STATs y factores Ets (Voegel y cols., 1996; Chakravarti y cols., 1996; Yang y cols., 1996). Por otro lado, también interactúa con coactivadores de la familia p160 y con componentes de la maquinaria basal de transcripción como TBP y TFIIB.

Los receptores también reclutan complejos remodeladores de cromatina con actividad ATPasa como SWI/SNF o WINAC a través de su interacción con componentes de estos complejos (Aranda y Pascual, 2001; Gronemeyer y cols., 2004). Estos complejos utilizan la energía liberada por la hidrólisis del ATP para movilizar los nucleosomas. El reclutamiento de los complejos que causan modificaciones post-traduccionales de las histonas y de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP producen una modificación de la cromatina hacia un estado menos compacto y más accesible a la maquinaria de transcripción que permite la activación transcripcional.

La compleja coordinación de las interacciones entre el receptor unido a su ligando y los coactivadores y cointegradores conduce al reclutamiento de la maquinaria basal de la transcripción (Majan y Samuels, 2004). De hecho, algunos de los componentes de la maquinaria basal interactúan directamente o mediante correguladores con los NRs. Por otro lado, se ha descrito la asociación dependiente de ligando de complejos multiproteicos como DRIP/TRAP a los NRs. El complejo DRIP/TRAP intensifica la actividad dependiente de ligando de TR (Fondell y cols., 1996) y VDR (Rachez y cols., 1999) en un sistema de transcripción *in vitro* con moldes de cromatina y es reclutado a los receptores nucleares a través de la interacción directa de éstos con uno de los componentes de este complejo, el DRIP205/TRAP220. DRIP/TRAP es homólogo al Mediator de levaduras (Rachez y cols., 1998), un complejo que junto con las proteínas SRB se asocia a la subunidad grande de la ARN polimerasa II. Por tanto este complejo no contiene ninguna actividad enzimática, pero sería el encargado de reclutar la holoenzima de RNA polimerasa II al promotor diana.

El reclutamiento de todos estos tipos de complejos de coactivadores, posiblemente de una forma secuencial, produciría la descompactación de la cromatina, la unión de la polimerasa al promotor que contiene el HRE y la activación de la transcripción del gen diana.

1.4.2.- Represión transcripcional mediada por HREs negativos

Los receptores nucleares también pueden mediar la regulación negativa de genes de un modo dependiente de ligando. En algunos casos, esta represión se debe a una inhibición pasiva debido a la competición con otros transactivadores por los sitios de unión del ADN o bien por la formación de heterodímeros transcripcionalmente inactivos. Sin embargo, existen HREs negativos que unen receptores y median una represión activa en presencia del ligando. Se han identificado este tipo de elementos en el gen de la proopiomelanocortina, los genes de la tirotropina (TSH) y los de la hormona liberadora de tirotropina (TRH), indicando la relevancia de estos elementos en los mecanismos de retro-alimentación en la hipófisis (Drouin y cols., 1989; Bodenner y cols., 1991; Hollenberg y cols., 1995). En estos elementos negativos, generalmente, el receptor vacío estimula la transcripción y la unión del ligando revierte dicha activación (Eckey y cols., 2003). La posición de estos elementos de respuesta en el gen parece importante. Generalmente se localizan próximos al sitio de inicio de la transcripción y algunos han sido encontrados también debajo de la caja TATA (Saatcioglu y cols., 1993; Belandia y cols, 1998; Perez-Juste y cols., 2000).

1.4.3.- Mecanismos independientes de la unión a HREs

Los receptores nucleares pueden modular la expresión de genes que no contiene HREs mediante la interferencia o “cross-talk” con otros factores de transcripción o rutas de señalización.

Los receptores pueden regular negativamente la actividad de promotores que contienen elementos de unión para AP-1, NF- κ B o CREB sin unirse directamente a dichos elementos (Pfahl, 1993; Sánchez-Pacheco y cols., 1995; Gottlicher y cols., 1998; Mendez-Pertuz y cols., 2003; García-Silva y cols., 2004). Uno de los ejemplos mejor conocidos es la transrepresión dependiente de ligando ejercida por GR, RAR o TR sobre la actividad de AP-1 (Jun/Fos) (Pfahl, 1993). Recíprocamente, AP-1 inhibe la transactivación mediada por estos receptores nucleares. Esta actividad anti-AP-1 podría explicar parte de los efectos antiproliferativos de algunos ligandos de receptores nucleares. De un modo similar, GR puede interferir con la actividad NF- κ B. Este mecanismo podría estar implicado en los efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores de los glucocorticoides.

Otra importante conexión entre los receptores nucleares y otras rutas de señalización viene mediada por la fosforilación del propio receptor o de sus co-reguladores. De este modo, múltiples quinasas activadas por señales extracelulares como las MAPKs, protein quinasa A (PKA), casein quinasas o quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) afectan la actividad de ciertos receptores nucleares (Shao y Lazar., 1999).

Dependiendo del receptor y del residuo implicado, la fosforilación puede ejercer diversos efectos. En ocasiones, la fosforilación del receptor conduce a la inhibición de la activación dependiente de ligando. En otros casos, los receptores pueden ser activados por fosforilación en ausencia de su ligando. Un ejemplo de ello es la modificación de la transactivación dependiente e independiente de ligando de los RARs originada por la fosforilación mediada por CDK7 (Rochette-Egly y cols., 1997).

También los coactivadores y los correpresores son dianas de distintas quinasas y vías de transducción de señales que, de esta forma, también pueden modular las respuestas transcripcionales de los receptores nucleares. Por ejemplo, la señalización a través de tirosina quinasas ejerce importantes efectos reguladores sobre el silenciamiento transcripcional mediado por diversos factores de transcripción como TR o RAR que requieren el correpresor SMRT (Hong y cols., 1998).

Las hormonas también ejercen acciones no genómicas mediadas por sus receptores. Estas acciones ocurren en pocos minutos después de la adición de la hormona y se han descrito para diversos esteroides, la vitamina D y la hormona tiroidea (Wehling, 1997). Principalmente, estas acciones no genómicas implican la modulación positiva de cascadas de transducción de señales. Este es el caso de los efectos de los esteroides, principalmente estrógenos, en diversos tejidos y líneas celulares.

La unión de la hormona tiroidea a la integrina $\alpha V\beta 3$, localizada en la membrana plasmática, sin entrar en la célula, activa la vía de las MAPK. Este mecanismo de activación afecta a los procesos de angiogénesis y promueve el crecimiento celular (Tang y cols., 2004; Bergh y cols., 2005). Además, se ha descrito un mecanismo de acción de las hormonas tiroideas que consiste en la asociación de TR β unido a T3 con la subunidad p85 de PI3K en el citosol, con la consecuente activación de esta ruta de señalización (Cao y cols., 2005; Moeller y cols., 2006).

La interacción proteína-proteína entre ciclina D1 y algunos receptores como el de estrógenos o el de hormonas tiroideas modula la actividad de estos últimos de un modo independiente de la actividad CDK (Zwijsen y cols., 1997; Lin y cols., 2002).

Otro mecanismo diferente es el “cross-talk” entre VDR y TGF- β (factor de crecimiento transformante beta). Smad3, una de las proteínas componentes de la ruta de señalización de TGF- β actúa como un coactivador para VDR mediante la formación de un complejo con una proteína coactivadora del propio receptor (Yanagisawa y cols., 1999). Estas interacciones son potencialmente relevantes para el control de la proliferación y diferenciación llevado a cabo por la vitamina D y TGF- β .

Los numerosos mecanismos expuestos ilustran la enorme versatilidad con que los receptores nucleares regulan funciones celulares. La visión clásica de las acciones de las hormonas se amplía progresivamente con la descripción de nuevas relaciones entre los receptores y otras rutas de señalización que reflejan la emergente complejidad existente en la regulación de los procesos celulares.

2.- EL RECEPTOR DE HORMONAS TIROIDEAS

Los receptores de hormonas tiroideas están codificados por los genes c-erbA-1 y c-erbA-2, localizados en los cromosomas 17 y 3, cuyos productos son TR α y TR β (Lazar, 1993). El gen c-erbA-1 es el homólogo celular del oncogén v-erbA del virus de la eritroblastosis aviar. Este oncogén codifica una proteína de fusión entre c-erbA-1 y el gen retroviral *gag* incapaz de unir hormona y transcripcionalmente inactivo (Sap y cols., 1986; Damm y cols., 1989).

El gen c-erbA-1 codifica varias isoformas del receptor, siendo las principales TR $\alpha 1$ y TR $\alpha 2$. La última es una variante que no une hormona y se comporta como un dominante negativo del producto génico TR $\alpha 1$ (Lazar, 1993).

Por su parte, c-erbA-2 también codifica varias isoformas del receptor. TR β 1 y TR β 2 unen T3 y TREs con alta afinidad y especificidad y median la transcripción dependiente de hormona (Hodin y cols., 1989; Lazar, 1993). Recientemente se han identificado dos nuevas isoformas del receptor generadas por “splicing” alternativo, TR β 3 y TR $\Delta\beta$ 3; esta última es un potente dominante negativo que une hormona con alta afinidad (Williams, 2000).

Las variaciones tejido-específicas de expresión de estas isoformas constituyen un nivel adicional de regulación de las acciones de la hormona tiroidea en los diferentes tejidos.

2.1.- Funciones del receptor de hormonas tiroideas

Se ha empleado la expresión de transgenes que codifican mutantes de TR dominantes negativos, así como la inactivación génica o “knock-out” de isoformas del receptor, para el estudio de los efectos fisiológicos de estos receptores.

El ratón transgénico para v-erbA presenta hipotiroidismo, respuesta a TSH alterada, hepatomas, fertilidad disminuída y una reducción del tejido adiposo (Barlow y cols., 1994). Es posible que estos efectos no sean debidos enteramente al bloqueo de la transcripción mediada por T3, puesto que se ha observado una actividad dominante negativa de v-erbA sobre la transcripción mediada por ácido retinoico (Desbois y cols., 1991, Chen y Privalsky, 1993).

Los ratones “knock-out” para TR α 1 presentan una disminución de la temperatura corporal y alteraciones en la función cardíaca (Wikstrom y cols., 1998). Los ratones “knock-out” para TR α 2 no tienen problemas de supervivencia y presentan ligeras anomalías (Forrest y Vennström, 2000). Los ratones transgénicos en los que se han inactivado tanto TR α 1 como TR α 2 presentan hipotiroidismo severo, malformaciones intestinales, retraso del crecimiento y mueren poco tiempo después del periodo de la lactancia (Fraichard y cols., 1997). Esta muerte prematura puede evitarse parcialmente inyectando T3 a las crías.

Los estudios con ratones “knock-out” para TR β indican que este receptor tiene un papel importante en el desarrollo del oído y la retina y en el metabolismo del colesterol (Forrest y cols., 1996; Gullberg y cols., 2000; Ng y cols., 2001).

Los ratones doble “knock-out” para TR α y TR β presentan un fenotipo similar a los ratones “knock-out” para TR α . Además, las hembras son estériles y los machos presentan una menor fertilidad (Gothe y cols., 1999).

Estos estudios indican que la ausencia de TRs no es incompatible con la vida y que ratones que carecen de TRs sobreviven sorprendentemente bien. Algunos de los efectos sobre tejidos periféricos son más suaves en los ratones doble “knock-out” que en ratones con hipotiroidismo congénito. Una posible explicación es que la falta de TRs es menos deletérea que la presencia de los mismos durante el hipotiroidismo dado el papel que el receptor vacío y los correceptores tienen en la represión de la transcripción basal.

2.2.- El receptor de hormonas tiroideas en cáncer

Las primeras evidencias de que los TRs podrían tener un papel importante en los procesos de carcinogénesis provienen del descubrimiento de que TR α 1 es el homólogo celular de v-erbA, implicado en la transformación neoplásica en eritroleucemias y sarcomas en aves (Sap y cols., 1986; Thormeyer y Baniahmad, 1999). Además, ratones transgénicos para v-erbA desarrollan hepatocarcinomas (Barloe y cols., 1994).

Otra evidencia sobre el papel de los TRs en procesos neoplásicos proviene de la identificación de la existencia de una interacción directa entre las proteínas ciclina D1 o p53 y el receptor nuclear TR β (Yap y cols., 1996; Bhat y cols., 1997, Barrera-Hernandez y cols., 1998; Lin y cols., 2002). Además, los receptores de hormonas tiroideas suprimen la transformación y tumorigénesis mediada por el oncogén ras (Garcia-Silva y cols., 2004).

Recientemente, se han encontrado evidencias que sugieren una expresión aberrante y mutaciones en los genes de los TRs en neoplasias humanas. En pacientes con hepatocarcinoma se han detectado mutaciones en el gen TR α 1 y TR β 1 en el 65% y 76% de los pacientes, respectivamente (Lin y cols., 1999). También se han detectado mutaciones en los TRs en otros tipos de tumores como el cáncer renal, de mama, de tiroides y gástrico (Lin y cols., 1997, 1999, 2001; Kamiya y cols., 2002; Puzianowska-Kuznicka y cols., 2002; Wang y cols., 2002; Silva y cols., 2002; Gonzalez-Sancho y cols., 2003). Recientemente, se ha descrito que distintos mutantes del TR β detectados en pacientes con hepatocarcinomas presentan defectos en la capacidad de unión de la hormona T3 de modo que no se produce la liberación de correpresores y el reclutamiento de coactivadores, lo que imposibilita la activación de la transcripción (Chan y Privalsky., 2006). Estos mutantes tampoco son capaces de inhibir la función de AP-1 dependiente de T3, además de actuar como dominantes negativos que imposibilitan la actividad de los receptores TR β silvestres.

Por otra parte, se ha observado un variable grado de metilación y el silenciamiento de TR β por hipermetilación del promotor en tumores y distintas líneas celulares de cáncer de mama (Li y cols., 2002).

En pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas, mama, cabeza y cuello, renal, cérvix uterino, ovarios, testicular y melanoma uveal son frecuentes las deleciones en el cromosoma 3p, en el área donde se encuentra TR β . Algunos estudios proponen la inclusión de TR β en el área de deleción (Leduc y cols., 1989; Sisley y cols., 1993; Chen y cols., 1994). Además se ha descrito la pérdida de heterozigosidad en el cromosoma 3p en pacientes con cáncer de mama (Ali y cols., 1989). El locus de TR α 1 se encuentra también en un área con frecuentes pérdidas de heterozigosidad en cáncer de mama (Futreal y cols., 1992; Futreal y cols., 1994).

Los niveles de ARNm de TR β también se encuentran disminuidos en neoplasias humanas de tiroides (Tallin y cols., 1992; Bronnegard y cols., 1994). Los niveles de ARNm de TR β son significativamente menores en carcinomas papilares y foliculares que en tejido sano del tiroides. También se ha detectado una alta incidencia de mutaciones en los genes TR α 1 y TR β 1 en pacientes con carcinomas papilares de tiroides. De un modo similar a lo que sucede con las mutaciones en los TRs en otros cánceres

humanos, la presencia de estas mutaciones impide la transactivación y muestran actividad dominante negativa (Puzianowska-Kuznick y cols., 2002).

Recientemente se han realizado ratones “knock-in” para una forma mutada de TRβ1 (TRβPV), que corresponde con una mutación detectada en pacientes con síndrome de resistencia a hormona tiroidea (Kaneshige y cols., 2000) En ratones homocigotos para esta mutación se desarrollan carcinomas de tiroides de manera espontánea, presentando invasión capsular, invasión vascular, anaplasia y metástasis en pulmón y corazón pero no en los nódulos linfáticos (Suzuki y cols., 2002).

3.- LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN

Una fracción importante de las señales extracelulares que llegan a la célula es recibida por receptores de membrana que a su vez presentan actividad tirosina quinasa o están acoplados a proteínas G. La transducción de estas señales al interior de la célula produce la modificación de proteínas, principalmente factores de transcripción, que conducen a cambios en el fenotipo celular.

3.1.- Estructura y función de los genes y proteínas Ras

En mamíferos, los genes ras son tres, H-ras, K-ras y N-ras y se expresan en todos los tejidos y tipos celulares, a pesar de que su patrón de expresión varía dependiendo del órgano y del estado de desarrollo (Leon y cols., 1997). El dominio efector, por el cual interacciona con diferentes proteínas efectoras, se localiza en la región amino-terminal (Wittinghofer y Pai, 1991). Sin embargo, otros segmentos de la proteína, incluyendo la caja CAAX terminal son esenciales para la función de Ras (Lowy y Willumsem, 1993; Malumbres y Pellicer, 1998).

En estado inactivo, Ras está unido a dinucleótidos de guanina (GDP) y en su estado activo, se encuentra unido a trinucleótidos de guanina (GTP). El paso cíclico entre los dos estados está estrechamente controlado por, al menos, dos tipos de proteínas reguladoras (Crespo y Leon, 2000). Los factores de intercambio de guanidín nucleótidos (GES) catalizan el intercambio GDP/GTP y las proteínas GTPasa activadoras (GAPs) promueven la hidrólisis de GTP por Ras (Barbacid, 1987; Lowy y Willumsem, 1993).

Las proteínas Ras necesitan asociarse con el lado interior de la membrana plasmática para ser funcionales. Esta asociación se obtiene principalmente mediante la farnesilación de la cisteína 186 localizada en el motivo CAAX y la posterior eliminación proteolítica del péptido AAX (Lowy y Willumsem, 1993). Esta modificación confiere un carácter más hidrófobo a la proteína y le otorga mayor afinidad por la membrana.

Se han detectado mutaciones en el gen ras en el 30% de los tumores humanos, aunque este porcentaje aumenta en cánceres con poca supervivencia como el cáncer de pulmón y páncreas (30-90%) (Bos, 1989). Ras también se activa por otros mecanismos, incluyendo cambios en otros componentes de rutas de señalización, como por ejemplo receptores tirosina quinasa (Shields y cols., 2000). Además, la activación aberrante de las proteínas Ras se ha relacionado con distintos aspectos del fenotipo maligno de las células tumorales, incluyendo la proliferación, transformación, invasión y metástasis (Malumbres y Barbacid, 2001; Campbell y Der, 2004).

3.2.- Estructura y función de los receptores del factor de crecimiento epidérmico

El receptor del factor de crecimiento epidérmico pertenece a una familia de receptores tirosina quinasa que consta de cuatro receptores humanos (EGFR (ERBB1), ERBB2 (HER2/neu), ERBB3 (HER3) y ERBB4 (HER4)) (Ullrich y cols., 1984; Bargmann y cols., 1986; Plowman y cols., 1993). Son proteínas de 170 KDa., ancladas en la membrana plasmática, que comparten una estructura similar. Constan de un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio transmembrana hidrofóbico y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa (Wells, 1999; Yarden y Sliwkowski, 2001; Burgess y cols., 2003; Hynes y Lane, 2005; Singh y cols., 2005; Scaltriti y Baselga, 2006;). Estos receptores forman heterodímeros con ERBB2. Únicamente los receptores EGFR y ERBB4 son completamente funcionales en términos de unión al ligando. ERBB3 presenta una incompleta actividad quinasa (Guy y cols., 1994) y requiere de la heterodimerización para su total activación (Kim y cols., 1998). ERBB2 es incapaz de unir ligando pero potencia la actividad quinasa de los heterodímeros.

La activación de EGFR se produce tanto por sobreexpresión del receptor como por mecanismos dependientes e independientes del ligando. La unión del ligando produce un cambio conformacional que permite la dimerización y autofosforilación de distintos residuos de la cola COOH-terminal del receptor (Burgess y cols., 2003; Hubbard, 2005). La activación independiente de ligando ocurre en algunos tipos de tumores que presentan formas mutadas de EGFR. Estas mutaciones consisten en deleciones en el dominio extracelular que provocan una activación constitutiva del receptor (Frederick y cols., 2000; Anido y cols., 2006). La activación independiente de ligando también ocurre en respuesta a estrés celular (Fischer y cols., 2003). La activación de estos receptores provoca la fosforilación de distintos residuos del extremo COOH terminal y, de este modo proporciona sitios de anclaje para proteínas citoplasmáticas que contengan dominios Src2 y de unión a fosfotirosina (Yarden y Sliwkowski, 2001). Estas proteínas se unen a residuos específicos e inician la señalización intracelular por distintas vías. Estas vías incluyen aquellas que implican PLC γ (Piiper y cols., 1997; Thomas y cols., 2003), la activación de Ras (Alroy y cols., 1997) otras pequeñas GTPasa como Rho y Rac, múltiples STATs (David y cols., 1996), proteínas heterotrímicas G, así como otras vías que incluyen la PI3K y PLD (fosfolipasa D) y el protooncogen src (Fig 3) (Hackel y cols., 1999).

Los ligandos de estos receptores comparten un dominio de 60 aminoácidos que es necesario y suficiente para la activación (Barbacci y cols., 1995). Los ligandos se clasifican según los receptores a los que se unen específicamente. EGF, epirregulina, anfirregulina y TGF α son ligandos de EGFR, mientras que las neurregulinas (NRG) son los ligandos de ERBB3 y ERBB4 (Stove y cols., 2004).

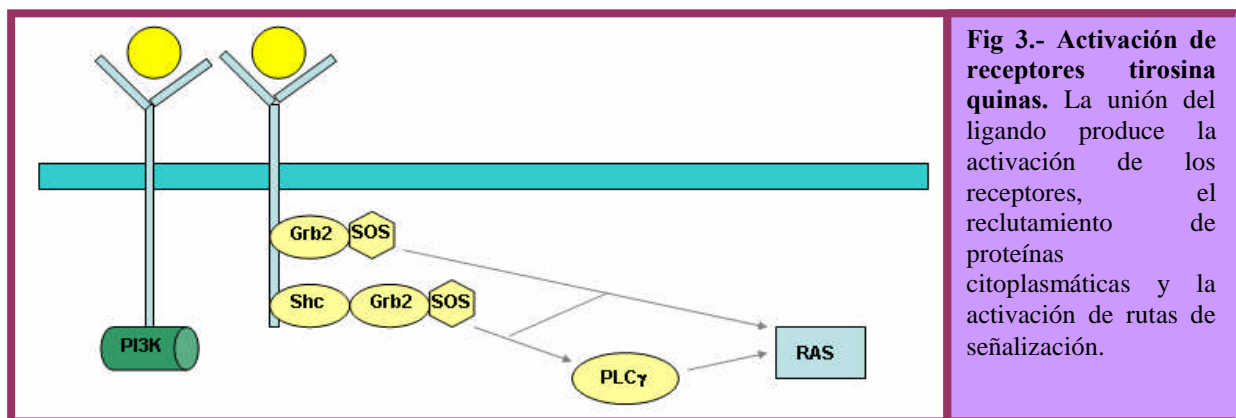
Los receptores ERBB se encuentran en distintos tejidos epiteliales, mesenquimales y de origen neural, donde tienen un papel muy importante en desarrollo, diferenciación y proliferación. Además la expresión anómala (sobreexpresión, activación constitutiva o mutaciones) de estos receptores, especialmente EGFR y ERBB2, está implicada en el desarrollo y malignidad de numerosos tipos de cáncer (Thompson y cols., 1985; Slamon y cols., 1987; Slamon y cols., 1989; Salomon y cols., 1995; Kondapaka y cols., 1997; Ross y cols., 1999; Herbst y cols., 2002; Arteaga, 2003). La expresión de TGF α y EGF también se encuentra aumentada en pacientes con cáncer de mama (Lacroix y cols., 1989; Graus y cols., 1989; Plowman y cols., 1993).

3.3.- Estructura y función de los receptores del factor de crecimiento similar a insulina

El factor de crecimiento IGF-1 interacciona con el receptor de membrana IGF-IR, receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa. Cuando IGF-1 se une a la subunidad extracelular de IGF-IR, se produce un cambio conformacional en el dominio transmembrana que produce la autofosforilación del dominio citoplasmático tirosina quinasa. Estos residuos fosforilados actúan como sitios de anclaje para el sustrato del receptor de insulina (IRS-1 y IRS-2). Los miembros de esta familia de proteínas IRS comparten una gran homología aunque cada uno de ellas presenta una estructura única (White y cols., 1994). La fosforilación de estas proteínas permite a las proteínas IRS y Shc reclutar otros factores como Grb2/SOS y la subunidad p85 de PI3K (Fig 3) (LeRoith y Roberts, 2003).

La actividad biológica de IGF-1 está modulada por la familia IGFBP-1-6 que se encuentran en la circulación y en los fluidos extracelulares. Actúan uniéndose a IGF-1, afectando a su vida media e impidiendo de este modo su unión a los receptores de membrana. Se ha descrito que los IGFBP también tienen funciones independientes de la unión a IGF-1. Por ejemplo, IGFBP3 y 5 tienen efectos importantes en proliferación, invasión y apoptosis que son independientes de la señalización por IGF-1.

IGF-1 desempeña un papel clave en el crecimiento normal y desarrollo, así como en una gran variedad de patologías, en especial en procesos tumorales (Khandwala y cols., 2000; LeRoith y Roberts, 2003). Unos altos niveles de IGF-1 circulante constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama, próstata, colon y pulmón. Además, los altos niveles de expresión de los receptores IGF-IR y IGF-IIR son un marcador predictivo de cáncer de mama.



3.4.- Estructura y función de los receptores del factor de crecimiento transformante beta

La citoquina TGFβ se une al receptor tipo II (TβRII), que permite la interacción con el receptor tipo I (TβRI), formando un complejo ligando-receptor que implica a un dímero de ligando y cuatro moléculas de receptor (Massague, 1998). TβRI requiere ser activado por fosforilación por TβRII para ser funcional y ser capaz de unir ligando por sí mismo (Wrana y cols., 1994). Esta fosforilación produce una serie de cambios conformacionales y la activación de los dominios quinasa de estos receptores (Shi y Massague, 2003). Tras esta activación se produce la fosforilación de las proteínas citoplasmáticas Smad 2/3 por el receptor TβRI. Posteriormente estas proteínas se asocian con la proteína Smad 4 (Nakao y cols., 1997; Souchel-nytskyi y cols., 1997; Piek y cols., 1999; Attisano y Wrana, 2002; Shi y Massague, 2003) para formar un complejo que se transloca al núcleo (Massague y Chen, 2000). A continuación, este

complejo se une a secuencias específicas de ADN en los promotores de genes diana para regular la transcripción (Fig 4). La señalización por las Smads está regulada negativamente por las Smads inhibitorias Smad 6 y 7 (Hayashi y cols., 1997; Nakao y cols., 1997).

Otras vías de señalización son también activadas por TGF β . Por ejemplo, se ha descrito la activación de Ras, ERK1/2 y JNK por TGF β en células epiteliales intestinales y células de cáncer de mama (Mulder y cols., 2000; Derynck y cols., 2001; Wakefield y cols., 2002).

TGF β es una citoquina multifuncional que regula la proliferación celular, diferenciación y producción de la matriz extracelular (ECM) (Massague, 1998; Jennings y Pietenpol, 1998; Verrecchia y Nauviel, 2002). La desregulación de la expresión o señalización por TGF β está implicada en la patogénesis de una gran variedad de enfermedades, incluyendo el cáncer y la fibrosis. TGF β induce la apoptosis e inhibe la proliferación en células no transformadas (Pierce y cols; 1995), pero pierde su potencial como inhibidor de la proliferación cuando las células avanzan a estadios más malignos (Rebecca y cols., 2005). En estadios avanzados del proceso tumoral las células del tumor y del microentorno secretan activamente TGF β , que contribuye a la proliferación, invasión y metástasis y disminuye la respuesta inmune del huésped (Jennings y Pietenpol, 1998; Dumont y cols., 2000; Seton-Rogers y cols., 2004).

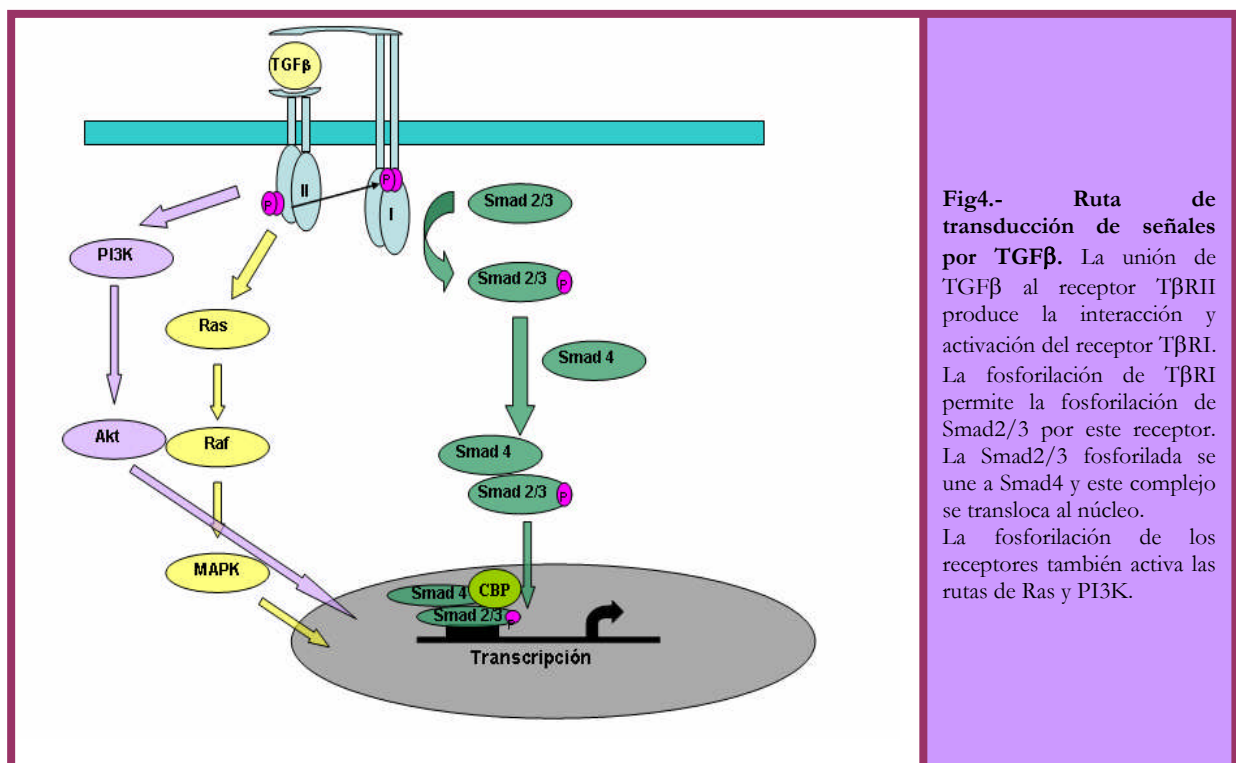


Fig4.- Ruta de transducción de señales por TGF β . La unión de TGF β al receptor T β RII produce la interacción y activación del receptor T β RI. La fosforilación de T β RI permite la fosforilación de Smad2/3 por este receptor. La Smad2/3 fosforilada se une a Smad4 y este complejo se transloca al núcleo. La fosforilación de los receptores también activa las rutas de Ras y PI3K.

3.5.- La ruta Raf/MEK/ERK

Raf-1 fue el primer efector de Ras identificado. La interacción de Ras con Raf permite la translocación de éste último a la membrana y su activación (Leevers y cols., 1994; Stokoe y cols., 1994). Raf activado fosforila en varios residuos a MEK1 y MEK2 (Kyriakis y cols., 1992). La activación de MEK produce la fosforilación de los residuos de serina y treonina de p44^{MAPK} y p42^{MAPK} (ERK1 y ERK2, respectivamente) (Gómez y Cohen, 1991). Las ERKs tienen un amplio espectro de sustratos con diferentes localizaciones subcelulares. Estas quinasas fosforilan proteínas citoplasmáticas como SOS,

MEK, fosfolipasa A o PHAS-1. La translocación de las ERKs al núcleo (Seth y cols., 1992) les permite fosforilar otras proteínas, principalmente factores de transcripción como Elk-1, Ets-2, C/EBP o SMADs (Treisman, 1996; Robinson y Cobb, 1997; Yordy y Muise-Helmericks, 2000) (fig 5).

Unos sustratos de las ERKs que merecen especial atención son la quinasa de 90 KDa de la proteína ribosomal S6 (RSK) (Zhao y cols., 1996) y la quinasa activada por mitosis y estrés (MSK), ambas pertenecientes a la subfamilia de quinasas AGC (Frodin y cols., 2002). RSK es activada por la vía de Raf/MEK, mientras que MSK es activada tanto por esta vía como por la vía de la quinasa de estrés p38 (Soloaga y cols., 2003). MSK es una proteína predominantemente nuclear, aunque también se puede localizar en el citosol (Deak y cols., 1998). En el núcleo, MSK fosforila a distintos factores de transcripción como CREB y ATF y a la histona H3. La translocación de Rsk al núcleo le permite fosforilar distintos sustratos como los factores de transcripción CREB (Xing y cols., 1996; Frödin y Gammeltoft, 1999) y c-fos (Bjorbaek y cols., 1995). Además RSK se asocia con el coactivador transcripcional CBP/p300 (Nakajima y cols., 1996; Buck y cols., 1999). RSK también fosforila a las proteínas GSK3, L1 CAM, Sos y Myt1 (Sutherland y cols., 1993; Wong y cols., 1996; Douville y Downward, 1997; Palmer y cols, 1998).

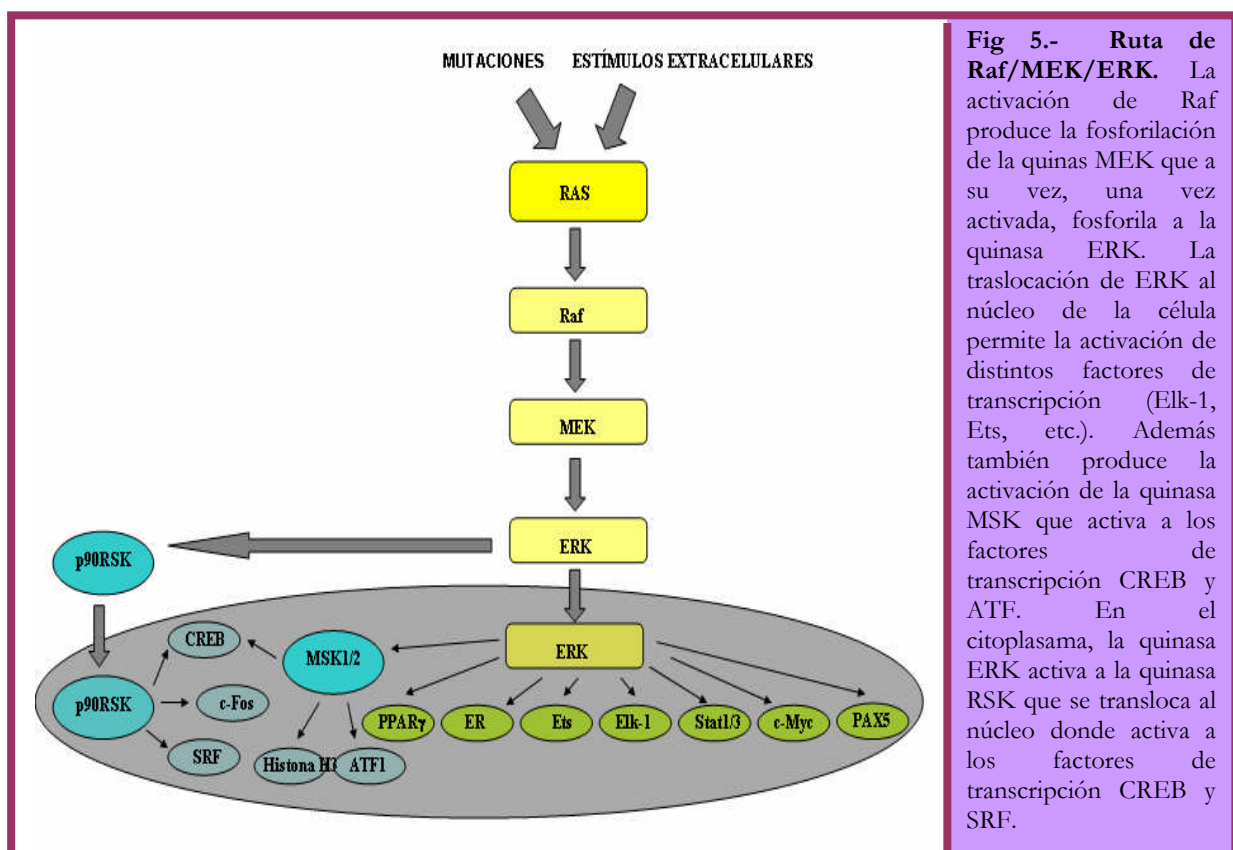


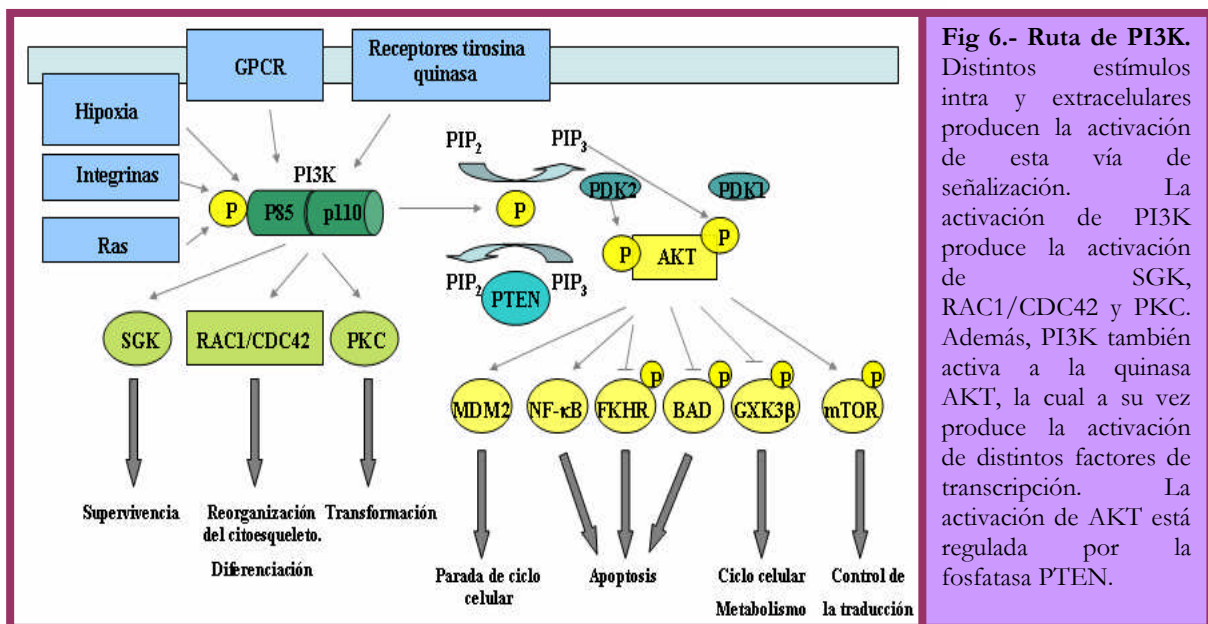
Fig 5.- Ruta de Raf/MEK/ERK. La activación de Raf produce la fosforilación de la quinasa MEK que a su vez, una vez activada, fosforila a la quinasa ERK. La traslocación de ERK al núcleo de la célula permite la activación de distintos factores de transcripción (Elk-1, Ets, etc.). Además también produce la activación de la quinasa MSK que activa a los factores de transcripción CREB y ATF. En el citoplasma, la quinasa ERK activa a la quinasa RSK que se transloca al núcleo donde activa a los factores de transcripción CREB y SRF.

3.6.- La ruta de PI3K

PI3K es una quinasa que, en respuesta a diversos estímulos, cataliza la fosforilación de fosfoinosítidos en posición 3' del anillo de inositol. Consta de una subunidad reguladora p85 y de una subunidad catalítica p110, ambas con varias isoformas descritas (Fruman y cols., 1998). La subunidad p110 se une a Ras-GTP por su dominio efector y es responsable de algunos de los efectos biológicos de Ras

(Rodríguez-Viciano y cols., 1994; 1996). Ras sinergiza con p85 para lograr una activación completa de PI3K, lo cual sugiere que otras señales pueden ser importantes en la activación de PI3K.

Los principales efectores de PI3K son Akt/PKB y la quinasa de la proteína ribosomal S6 p70 (p70^{S6K}) (Downward, 1998). La activación de Akt desencadena efectos anti-apoptóticos e interviene en la regulación de rutas metabólicas a través de la fosforilación de la quinasa 3 de la glucógeno sintasa (GSK3) (Bos, 1998). La p70^{S6K} es una serina/treonina quinasa que induce la traducción de ARN mensajeros conteniendo secuencias 5'TOP y es esencial para la progresión G1/S (Templeton, 2001). Esta vía está regulada por la fosfatasa PTEN, que convierte PIP₃ en PIP₂ (Myers y cols., 1998; Stambolic y cols., 1998; Wu y cols., 1998; Machama y Dixon, 1998) (Fig 6). Este mecanismo de control es análogo al de la regulación de GDP y GTP unido a Ras a través de las proteínas GEFs y GAPs.



La ruta de PI3K es crucial en muchos aspectos de crecimiento celular y supervivencia. La activación de esta ruta produce fallos en el control de estos procesos, proporcionando una ventaja en la proliferación y en la formación de metástasis y, con frecuencia, provocando la resistencia a fármacos (Hennessy y cols., 2005). Varios componentes de esta ruta se encuentran alterados en pacientes con cáncer de ovario, mama, hepatocarcinoma y pulmón (Bellacosa y cols., 1995; Forgacs y cols., 1998; Shayesteh y cols., 1999; Kawamura y cols., 1999; Philp y cols., 2001).

3.7.- La ruta de p38

p38 es un miembro de la familia de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), que traduce señales extracelulares en respuestas intracelulares. Tanto JNKs como la MAPK p38 se activan simultáneamente en respuesta a distintos tipos de estrés ambiental y/o celular (Wada y Penninger, 2004), que incluyen cambios en la osmolaridad o metabolismo, daño en el ADN, choque térmico, respuesta inflamatoria, radiación UV y estrés oxidativo (Han y cols., 1994; Seger y Krebs., 1995; Tibbles y Woodgett, 1999; Widmann y cols., 1999; Davis., 2000; Nebreda y Porras, 2000; Chang y Karin., 2001; Jonhson y Lapadat, 2002; Dent y cols., 2003).

Existen cuatro isoformas conocidas de p38 (α , β , δ , γ) (Kyriakis y Avruch, 2001). Estas MAPKs son fosforiladas y activadas por MKK3 y MKK6 y de este modo controlan la función de factores de transcripción, quinasas o fosfatasas como ATF-2, MEF2, MAPKAPK, CDC25 o MSK1/2 (Seger y Krebs., 1995; Waskiewicz y Cooper, 1995; Tibbles y Woodgett, 1999; Davis, 2000; Bulavin y cols., 2001). La MAPK p38 se regula por la familia de la GTPasa Rho (Holbrook y cols., 1996) y es activada por PAK1-MKK3/6 (Lee y cols., 2001). MKK3 Y 6 son activadas por las quinasas ASK1, MEKKs, y Tak1 (Ge y cols., 2002) (Fig 7).

En el núcleo celular, p38 también produce la activación de la quinasa MSK que a su vez fosforila y activa a distintos factores de transcripción, STAT3 y a la histona H3.

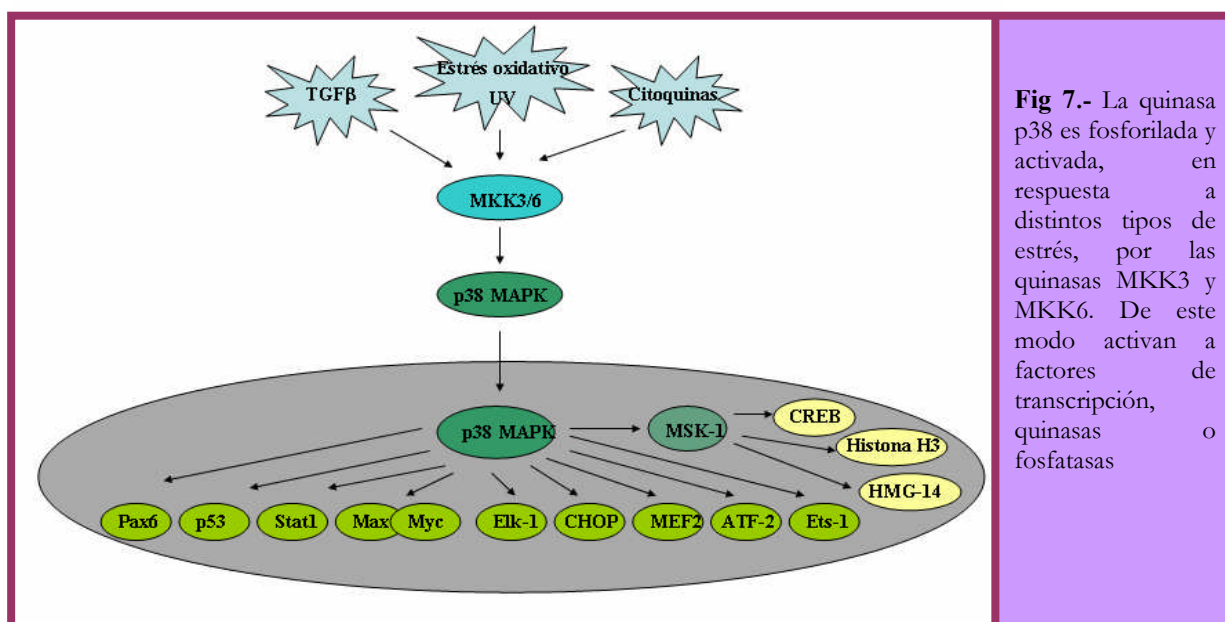


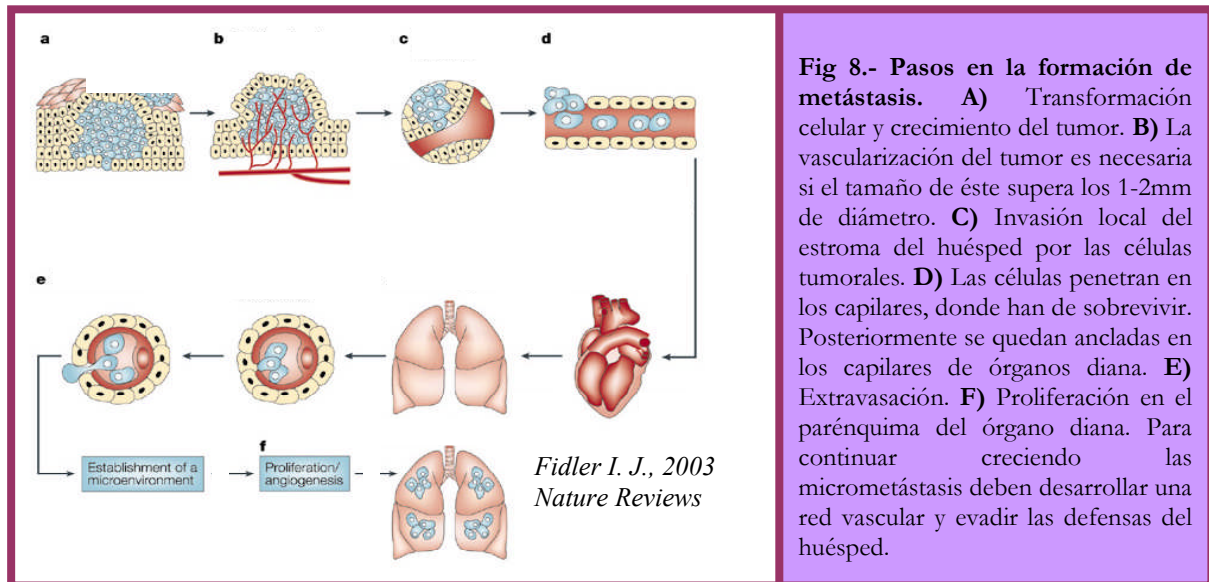
Fig 7.- La quinasa p38 es fosforilada y activada, en respuesta a distintos tipos de estrés, por las quinasas MKK3 y MKK6. De este modo activan a factores de transcripción, quinasas o fosfatasas

Esta ruta de señalización está implicada en una gran variedad de procesos celulares. Esta señalización promueve la apoptosis (Sarkar y cols., 2002; Porras y cols., 2004), aunque por otro lado también se ha observado que está implicada en supervivencia (Park y cols., 2002), crecimiento celular (Juretic y cols., 2001) y diferenciación (Yosimichi y cols., 2001). p38 se ha descrito como un potente supresor tumoral (Rennefahrt y cols., 2004), dado que está implicada en la fosforilación y activación de p53 (Bulavin y cols., 1999, 2002) y en la regulación de la supervivencia y señalización de muerte (Porras y cols., 2004). Además, la actividad de p38 reprime ciclina D1 y estabiliza p21 permitiendo así la parada del ciclo celular (Lavoie y cols., 1996; Kim y cols., 2002; Yee y cols., 2004). p38 se expresa frecuentemente en células de cáncer de mama y en pacientes con esta enfermedad (Nebreda y Porras, 2000; Esteva y cols., 2001; Wang y cols., 2003; Pramanik y cols., 2003).

4.- EL PROCESO DE TUMORIGÉNESIS Y FORMACIÓN DE METÁSTASIS

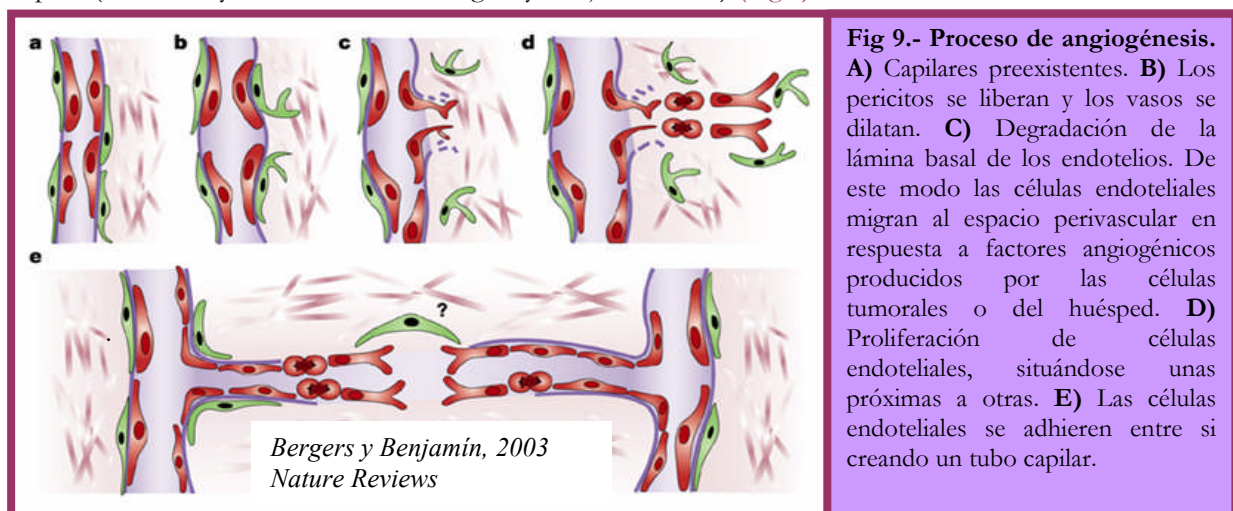
El proceso tumoral y la formación de metástasis implica la sucesión de varios pasos, todos ellos limitantes y necesarios. El proceso comienza con un crecimiento desordenado que da lugar a la formación del **tumor primario**. Para que un tumor primario crezca necesita que se desarrolle una red de vasos sanguíneos y linfáticos que cubran las necesidades metabólicas de las células tumorales (**angiogénesis y linfangiogénesis**). Esta nueva vasculatura permite también la diseminación de las células tumorales y su

entrada en el torrente sanguíneo (**intravasación**). Las células también pueden entrar en el torrente circulatorio por el sistema linfático. Las células han de vivir en la circulación hasta que llegan al órgano diana donde se produce la **extravasación**. Una vez en el nuevo órgano las células deben empezar y mantener el crecimiento de **micrometástasis preangiogénicas** y este crecimiento se debe sostener mediante el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos para formar **macrometástasis** (Chambers y cols., 2002; Fidler, 2003) (Fig 8).



4.1.- Angiogénesis

La supervivencia y crecimiento de las células depende de un adecuado suministro de oxígeno y nutrientes, así como de la eliminación de las sustancias tóxicas. El oxígeno tan sólo puede difundir por capilares de 120-200 μm (Gimbrone y cols., 1974), por lo que cuando la masa tumoral supera 1-2 mm de diámetro se requiere un proceso de neovascularización que se conoce con el nombre de angiogénesis (Folkman., 1986). La formación de nuevos vasos consiste en una sucesión de pasos interdependientes. Comienza con la degradación local de la lámina basal que rodea a los capilares, seguida de la invasión del estroma circundante y la migración de las células endoteliales en la dirección del estímulo angiogénico. Las células endoteliales proliferan y se organizan en estructuras tridimensionales para formar un nuevo tubo capilar (Auerbach y Auerbach, 1994; Bergers y Benjamín, 2003) (Fig 9).



La angiogénesis es inducida con frecuencia por señales transformantes que promueven la progresión tumoral y aumentan de una manera directa los niveles de factores angiogénicos (Bergers y Benjamín, 2003). Por ejemplo, la expresión de VEGF-A es inducida por la vía Ras-Raf-MAPK o por hipoxia. Además, la angiogénesis y el consecuente aumento en la densidad de microcapilares, junto con la presencia de inflamación, facilita la intravasación de las células tumorales y la diseminación a través del torrente circulatorio (Folkman, 2002).

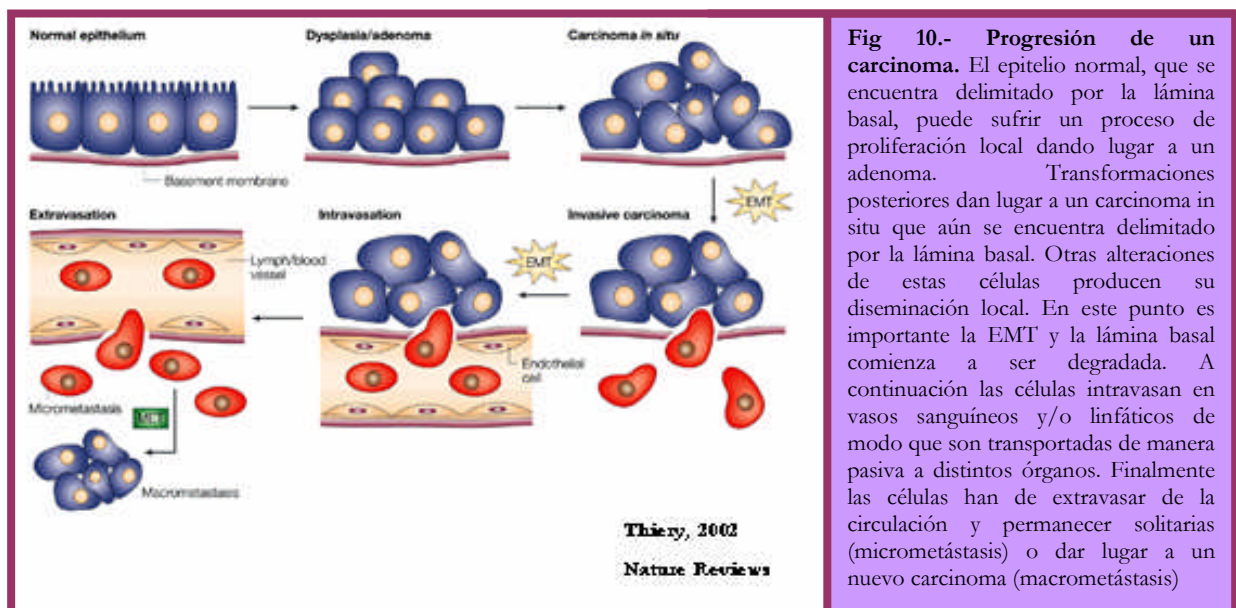
4.2.- Invasión local e intravasación

La invasividad incluye varios procesos: la pérdida de la adhesión intercelular, la degradación de la lámina basal y de la matriz extracelular (ECM) y la movilidad (Liotta, 1985; 1986; 1990).

Las células de carcinomas presentan una reducida adhesividad intercelular, a diferencia de lo que ocurre en células epiteliales de tejido normal (Cavallaro y Christofori, 2004; Gupta y Massagué, 2006). El complejo cadherina E/ β catenina es el principal sistema de adhesión responsable de los contactos célula-célula en los tejidos epiteliales (Takeichi, 1995; Huber y cols., 1996). El dominio extracelular de la cadherina E media la interacción célula-célula, mientras que el dominio intracelular se une a la proteína β catenina que a su vez se une a los filamentos de actina del citoesqueleto (Cavallaro y Christofori, 2004). En muchos casos los tumores pierden la expresión de cadherina E y β catenina a medida que avanza la malignidad de los mismos. Además, la expresión de cadherina E y β catenina se pierde como parte de un fenómeno denominado **transición epitelio-mesénquima** (EMT) (Peinado y cols., 2004), que supone la desdiferenciación de un fenotipo epitelial a otro fibroblastoide con gran capacidad invasiva y migratoria (Behrens y cols., 1992; Christophori y Semb, 1999; Christofori, 2006) (Fig 10). Durante la EMT las células, de manera progresiva, pierden la polaridad que permite definir la existencia de las caras apicales, basales y laterales típicas de los epitelios. Ésto se evidencia por la reorganización de la actina y por la distribución de las moléculas de adhesión célula-célula y célula-ECM (Thompson y cols., 2005; Negrén y Tarin, 2005). Disminuye la expresión de las proteínas de adhesión (cadherina E y citoqueratinas) y se produce la reexpresión de proteínas mesenquimales (vimentina y cadherina N), produciéndose de este modo una drástica remodelación del citoesqueleto (Thiery, 2002; Grunert y cols., 2003; Huber y cols., 2005). La EMT es inducida por distintos factores de crecimiento que son producidos tanto por las células tumorales como por las células del estroma, y que incluyen TGF β , HGF, EGF, IGF y FGF, así como por la alta actividad proteolítica de las metaloproteasas de matriz (MMPs) (Thiery, 2002).

Las integrinas también son importantes mediadores del fenotipo maligno durante la transformación neoplásica (Guo y Giancotti, 2004). Son receptores heterodiméricos de membrana celular que consisten en dos subunidades transmembrana, α y β , que unen distintos componentes de la matriz extracelular (ECM), tales como fibronectina, vitronectina, laminina y colágeno, al citoesqueleto de actina intracelular (Hood y Cheresch, 2002; Hynes, 2002). La unión a estos componentes de la ECM regula la proliferación, supervivencia, polaridad, motilidad y diferenciación (Guo y Giancotti, 2004). En concreto, la integrina $\alpha 6 \beta 4$, que se une a la proteína de membrana laminina, forma complejos de señalización con receptores tirosina quinasa tales como Met, EGFR y HER2 (Guo y Giancotti, 2004).

El tumor se encuentra delimitado por la **membrana o lámina basal**, compuesta por distintas glicoproteínas y proteoglicanos (colágeno tipo IV, laminina, etc.). Una lámina basal íntegra contribuye a la estructura del fenotipo epitelial, proporcionando una barrera física a la migración e invasión del estroma circundante. Las células tumorales capaces de degradar esta lámina basal son las que pueden desarrollar metástasis posteriores (Friedl y Wolf, 2003). Esta degradación es consecuencia del aumento de la expresión y secreción de proteasas y de la disminución de la producción de los inhibidores de estas enzimas. Las proteasas no sólo facilitan la invasión sino que también generan una gran variedad de péptidos bioactivos que regulan la migración, proliferación, supervivencia y angiogénesis. Se conocen varios tipos de proteasas: las metaloproteasas o MMPs, que llevan unidas un metal; las serina-proteasas como uPA (activador del plasminógeno tipo uroquinasa) y tPA, que convierten el plasminógeno inactivo en la enzima activa plasmina; las cisteinil-proteasas como las catepsinas B, C, H y L; y las aspartil-proteasas como la catepsina D. La transfección en una línea celular tumoral de las proteasas MMPs, plasmina, uPA o catepsinas produce un aumento de la invasión. Además, las proteasas liberadas junto con factores de crecimiento y quimioquinas activan proteínas latentes de la superficie celular (Folgueras y cols., 2004; Overall y Kleinfeld, 2006). Las MMPs son una familia de un mínimo de 20 miembros implicadas en la progresión de las células transformadas a un fenotipo invasivo (Westermarck y Kahari, 1999; Freije y cols., 2003; Folgueras y cols., 2004). Estas proteasas están implicadas en la degradación de la ECM, de la lámina basal y de las paredes de los vasos sanguíneos y linfáticos por los que se diseminan las células tumorales. La expresión y actividad de MMPs están reguladas por factores de crecimiento que han sido secretados tanto por las células tumorales como por las células del entorno del tumor. Las MMPs están reguladas por la vía de señalización de Ras (Thorgeirsson y cols., 1985; Ballin y cols., 1988; Bernhard y cols., 1994). Los factores de transcripción AP-1 y Ets-1, efectores de la vía de señalización de Ras, pueden inducir la expresión de MMPs (Westermarck y cols., 2001). La estimulación de NF- κ B por Ras aumenta la expresión de MMP9 y disminuye la expresión del inhibidor TIMP-1 (Yang y cols., 2001). Además el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPa), es estimulado por Ras por medio de la activación de ERK (Lengye y cols., 1995; Gum y cols., 1996).



La transición a un carcinoma invasivo es precedida u ocurre simultáneamente a la activación del estroma del huésped (Tomakidi, 1999). El estroma está compuesto por una gran variedad de tipos celulares: células inmunes, células inflamatorias, músculo liso, fibroblastos, adipocitos y células vasculares (Park y cols., 2000; Pollard, 2004). Durante la progresión tumoral existe una continua interacción entre las células del tumor y el estroma (Kopfstein y Christofori, 2006). Esta interacción está mediada por señales paracrinas producidas por el estroma que inducen la proliferación y supervivencia de las células tumorales (Mueller y Fusenig, 2004). Las células tumorales a su vez secretan factores de crecimiento y citoquinas que activan a las células del microentorno.

Para los fenómenos de invasión local e intravasación es fundamental el movimiento de las células. Este movimiento implica cambios y remodelación del citoesqueleto, cambios en la interacción célula-ECM, proteólisis local, contracciones actina-miosina y rotura de los contactos focales (Friedl y Wolf, 2003). Primero la célula se polariza y su morfología se alarga. Se forma un pseudópodo que se ancla a la ECM. Entonces se produce la contracción de la célula generando una fuerza de tracción que permite su movimiento (Friedl y Wolf, 2003). La motilidad de las células se puede producir de manera espontánea o en respuesta a quimioquinas y/o factores de crecimiento.

4.3.- Circulación

Una vez que las células tumorales han invadido el torrente circulatorio ya pueden llegar a los distintos órganos del cuerpo. Sin embargo, en este punto han de sobrevivir a distintos tipos de estrés que incluyen daño físico por la fuerza hemodinámica, pérdida de sustrato y respuesta inmunitaria del huésped. Las células tumorales en circulación promueven su supervivencia formando agregados con células sanguíneas y usándolos como protección (Nash y cols., 2002). Además, deben evitar la muerte celular inducida por la pérdida de soporte para la adhesión (**anoikis**) (Frisch y Ruoslahti, 1997; Ruoslahti, 1997; Zhan y cols., 2004).

4.4.- Extravasación y formación de micro y macrometástasis

Las células tumorales, una vez que llegan al órgano diana para la formación de metástasis deben salir del torrente circulatorio y penetrar en el parénquima del órgano (**extravasación**). Este proceso se realiza mediante la inducción de la retracción endotelial, permitiendo el anclaje de la célula tumoral a la ECM subendotelial. Posteriormente se reconstruye el capilar. En algunos casos las células tumorales proliferan en el espacio intravascular hasta que la lesión sale a través de la vasculatura próxima (Al-Mehdi y cols., 2000).

La distribución de las metástasis en los órganos no es un proceso al azar. Después de analizar la formación de metástasis en una serie de autopsias de pacientes de cáncer de mama, Stephen Paget propuso que las células tumorales (semillas) sólo serían capaces de colonizar los microentornos de los órganos (suelo) que fueran compatibles para el crecimiento de estas células (Paget, 1889). La observación clínica de pacientes apoya la hipótesis de que la estructura del sistema circulatorio sólo explica parcialmente que exista preferencia por algunos órganos a la hora de formar metástasis (Fidler, 2002). Por ejemplo el cáncer de mama forma metástasis preferentemente en pulmones, hueso, cerebro e hígado y

algunos de estos órganos no presentan una conexión circulatoria directa con el tejido mamario. Hay, al menos, dos determinantes para la especificidad de tropismo. Primero, debe de haber un nicho viable premetastásico en el órgano diana para que facilite la supervivencia inicial y el proceso de extravasación. Posteriormente las células metastásicas deben poder llevar a cabo las funciones necesarias para realmente colonizar ese órgano.

Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo para el inicio de la formación de la metástasis. Consiste en la movilización de progenitores hematopoiéticos desde la médula ósea hacia los órganos diana como respuesta a factores hormonales secretados por los tumores (Kaplan y cols., 2005; Li y cols., 2007). Estos progenitores favorecen la colonización metastásica preparando los órganos premetastásicos para la invasión (Hiratsuka y cols., 2002). La expresión de MMP9 en macrófagos que están en los pulmones y en células endoteliales promueve la invasión en pulmón. Esta inducción, en una fase premetastásica, depende de la secreción de VEGF por el tumor primario (Hiratsuka y cols., 2002). Los tumores primarios también inducen la expresión de los atrayentes inflamatorios S100A8 y S100A9, sustancias que atraen a células mieloides al pulmón premetastásico. Se ha descrito que las células tumorales usan este mecanismo para adquirir capacidad de migración (Hiratsuka y cols., 2006).

Los receptores de las quimioquinas CXCR4 y CCR7 se expresan con frecuencia en células de cáncer de mama, y sus ligandos, CXCL12 y CCL21, respectivamente, se expresan en pulmón y nódulos linfáticos, sitios clave de formación de metástasis por células de cáncer de mama. El bloqueo de las interacciones entre ligando y receptor reduce la formación de metástasis en modelos animales (Muller y cols., 2001). Este mecanismo de reconocimiento ligando-receptor se ha descrito para distintos tipos de tumores y distintos órganos diana.

La mayoría de las células tumorales que han extravasado aún son incapaces de colonizar de una manera efectiva el nuevo sitio. Al menos en algunos casos, la incapacidad de inducir un proceso de angiogénesis en los sitios secundarios limita el crecimiento de las **micrometástasis** (Chambers y cols., 2002). En este contexto, la adquisición de un estímulo angiogénico efectivo en este sitio secundario podría romper el letargo de las células tumorales impuesto por la limitación de vasos sanguíneos. En otros casos, por el contrario, las células permanecen en estado latente a pesar de no ser la angiogénesis un paso limitante. Por mecanismos que aún no se conocen estas células son capaces de seguir vivas aunque incapaces de entrar en el ciclo celular. Cuando se extrajeron células quiescentes de tejido hepático en un modelo de carcinogénesis de mama en ratón y se reimplantaron en la mama de estos animales, las células fueron capaces de desarrollar tumores (Chambers y cols., 2002). En este modelo, las células tumorales mamarias en el hígado podrían estar en un estado de parada del ciclo celular, posiblemente inducido por incompatibilidades entre las células tumorales y las del órgano secundario. Para salir de este estado de latencia o colonizar un nuevo órgano, las células tumorales diseminadas deben tener la capacidad de interactuar con el nuevo microambiente con el objetivo de obtener ventajas para la supervivencia y proliferación.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

En esta tesis nos hemos propuesto investigar el posible papel del receptor de hormonas tiroideas TR β como supresor tumoral así como su efecto sobre la formación de metástasis.

Los objetivos concretos de este trabajo han sido:

1.- Examinar la vía de señalización, los factores de transcripción y los elementos del promotor implicados en la activación del promotor de ciclina D1 por el oncogén ras y en la inhibición de esta transactivación por la hormona T3.

2.- Determinar los dominios del TR β implicados en el efecto inhibitor de la T3 sobre la transactivación y transformación mediadas por Ras.

3.- Investigar el efecto de la re-expresión de TR β en la tumorigénesis por células de hepatocarcinoma humano SK-hep1 y de adenocarcinoma de mama humano MDA MB 468 PM1.

4.- Analizar el efecto de TR β sobre el grado de diferenciación y agresividad tumoral tanto in vitro como in vivo. Estudiar la expresión de distintas moléculas implicadas en el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) y en la invasividad tumoral.

5.- Estudiar el efecto del TR β sobre la señalización mediada por factores de crecimiento en ambos modelos celulares.

6.- Examinar el papel del TR β en la formación de metástasis y en la expresión de moléculas importantes en su desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MATERIALES

Productos generales

Reactivos generales

Los reactivos químicos de uso habitual empleados para la realización de este trabajo han sido suministrados por las siguientes casas comerciales: Aldrich, Amersham Biosciences, Amresco, BD Biosciences, Bio-Rad, Boehringer Mannheim Biochemica, Calbiochem, Carlo Erba, Costar, Falcon, Fluka, Gibco-BRL, Leo, Merck, Millipore, Panreac, PeproTech, Promega, Pronadisa, Riedel de Haën, Roche, Serva, Sigma y Zymed Laboratories INV.

Productos de biología molecular

Los enzimas de restricción y de modificación, los “kits”, y los reactivos empleados en las técnicas de biología molecular fueron proporcionados por las casas comerciales: Amersham Biosciences, Biotools, Boehringer Mannheim, Calbiochem, Clontech, Gibco-BRL, Invitrogen, Quiagen, PeproTech, Promega, Schleicher&Schuell, Stratagene y USB.

Material Radioactivo

Los compuestos radioactivos [γ -³²P] dCTP (10 mCi/ml), [³⁵S]metionina y ³H-timidina (1 mCi/ml) fueron suministrados por el servicio de protección radiológica del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

El compuesto radioactivo 5-[¹²⁵Iodo]2'-deoxi-uridina (¹²⁵I-IdUrd) (1mCi/ml) ha sido suministrado por la casa comercial Amersham Biosciences.

Líneas celulares

Todas las líneas celulares empleadas se cultivaron en placas y frascos de cultivo de la casa comercial Falcon. Los experimentos se realizaron mayoritariamente en suero fetal bovino (SFB) deplecionado de hormonas tiroideas (SFB-T3) mediante tratamiento con la resina AG-1-X8 (Bio-Rad). Las células se incubaron a una temperatura de 37°C y en un ambiente conteniendo un 5% de CO₂ y un 95% de humedad relativa.

Células HepG2

La línea celular HepG2 (ATCC: HB 8065) proviene de un carcinoma hepático humano (Knowles BB y cols., 1980). Estas células se cultivaron en medio MEM (Gibco-BRL) conteniendo 2mM L-glutamina (GIBCO-BRL), 1 mM piruvato sódico (SIGMA), 1 mM aminoácidos no esenciales (GIBCO-BRL), 1,5 g/L bicarbonato sódico (Merck) y un 10% de SFB.

Células NIH3T3

Fibroblastos obtenidos a partir de ratones NIH y seleccionados para presentar una alta inhibición por contacto del crecimiento (Jainchill y cols., 1969). ATCC: CRL-1658. Estos fibroblastos se cultivaron en medio DMEM (pH 7,35) (Gibco-BRL) conteniendo un 10% de suero de ternera donante (DCS).

Células HEK 293T

Las células HEK 293T (ATCC: CRL-11268) provienen de la línea celular 293 (Pear WS y cols., 1993), en las que se ha insertado el antígeno T del virus SV40. Esta línea celular ha sido cedida por el Dr. Miguel Campanero. Se cultivaron en medio DMEM (pH 7,35), conteniendo un 10% de SFB.

Células N2a

Línea tumoral derivada de un neuroblastoma de ratón (ATCC: CCL-131). El cultivo de estas células se llevó a cabo en medio DMEM+Hepes (pH 7,5) conteniendo un 10% de SFB.

Células N2a β

Esta línea celular procede de un clon de células N2a transfectadas de manera estable con el receptor humano TR β (Lebls y cols., 1994). El cultivo de la línea celular se llevó a cabo en medio DMEM+Hepes (pH 7,5) conteniendo un 10% de SFB deplecionado de hormonas tiroideas (SFB-T3).

Células SK-hep1

Línea celular proveniente de un adenocarcinoma hepático humano (Fogh J, 1975). ATCC: HTB-52. Las células SK-hep1 se cultivaron en medio DMEM (pH 7,35) conteniendo 2 mM L-glutamina (GIBCO-BRL), 1mM piruvato sódico (SIGMA), 1 mM aminoácidos no esenciales (GIBCO-BRL) y un 10% de SFB.

Una vez transfectadas las células SK-hep1 de manera estable con el ADNc de TR β (SK-hep1-TR β) o con el vector vacío (SK-hep1- pLPCX), se cultivaron en el mismo medio pero empleando suero deplecionado de hormonas tiroideas (SFB-T3).

Células MDA MB 468 PM1

La línea celular MDA MB 468 PM1 ha sido derivada de la línea celular MDA MB 468, proveniente de un adenocarcinoma lobulillar de mama humano (Cailleau Y Cols., 1977) (ATCC: HTB-132), mediante inoculación en ratones inmunosuprimidos y selección de aquellas células con una alta eficiencia de formación de metástasis en pulmón. Esta línea celular ha sido cedida por la Dra. Angels Fabra. Las células MDA MB 468 PM1 se cultivaron en medio DMEM (pH 7,35) y HAMS F12 (1:1), conteniendo 2 mM de L-glutamina (GIBCO-BRL) y un 10% de SFB.

Una vez transfectadas las células MDA MB 468 PM1 de manera estable con el ADNc de TR β (MDA MB 468 PM1-TR β) o con el vector vacío (MDA MB 468 PM1-pLPCX), se cultivaron en el mismo medio pero empleando suero deplecionado de hormonas tiroideas (SFB-T3).

Animales de experimentación

Para realizar los experimentos de formación de tumores y de metástasis en ratones, se emplearon ratones atímicos desnudos (athymic nude-nu), proporcionados por la casa comercial Harlan. Debido a la inmunodeficiencia que presentan estos animales, el cuidado, tratamiento y seguimiento de estos animales se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Por otro lado, el mantenimiento y manipulación de todos los animales fue realizado siguiendo las recomendaciones de la Directiva del Consejo de la Comunidad Económica Europea del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC).

Plásmidos

Plásmidos reporteros

pD1- Δ 254luc: Contiene la secuencia -254/+141 del promotor del gen de la ciclina D1 humano clonada en el vector pXP2-luc.

pD1- Δ 254-CRE_mluc: Este plásmido contiene la secuencia comprendida entre -254 y +141 del promotor del gen de la ciclina D1 presentando la mutación de 3pb en el elemento CRE localizado a -52.

pD1- Δ 254-Sp1_mluc: Este plásmido contiene la secuencia comprendida entre -254 y +141 del promotor del gen de la ciclina D1 presentando una mutación de 5pb en dos elemento Sp1 localizados a -117.

pD1- Δ 254-CRE_m Sp1_mluc: Este plásmido contiene la secuencia comprendida entre -254 y +141 del promotor del gen de la ciclina D1 presentando simultáneamente las mutaciones anteriormente descritas en los elementos CRE y Sp1. Las mutantes del promotor de la ciclina han sido descritos en García-Silva y Aranda, 2004.

Δ MMTV-TREpal-luc: Este plásmido contiene la secuencia de un elemento de respuesta a hormonas tiroideas palindrómico (TREpal) clonado en el vector p Δ MMTV en el que se han delecionado los elementos de respuesta a glucocorticoides presentes en el promotor del virus del tumor mamario de ratón MMTV (Umesono y cols., 1988).

pE1b-luc: Este plásmido contiene 4 sitios UAS para la unión del factor de transcripción GAL4 situados delante del gen de la luciferasa (cedido por el Dr. Aria Baniahmad).

p3TP-lux: Este plásmido contiene una región del promotor PAI-1, inducible por TGF β , delante del gen de la luciferasa (cedido por la Dra. Pilar Santiesteban).

TK-Renila: Este plásmido contiene el promotor TK, delante del gen de la renila.

Vectores de expresión

pSG5-0: vector vacío que contiene el promotor temprano del virus SV40.

pSG5-TR β : este plásmido contiene el ADN codificante del gen del receptor TR β humano.

pSG5-TR β C102G: este plásmido contiene el ADN codificante del gen del receptor TR β humano en el que hemos introducido la mutación C102G que impide la unión del receptor al ADN.

pSG5-TR β GS120: este plásmido contiene el ADN codificante del gen del receptor TR β humano en el que mutamos la caja P (GS120), cambiando la especificidad de unión a elementos de respuesta a hormona tiroidea por especificidad de unión a elementos de respuesta a glucocorticoides (Shibusawa y cols., 2003).

pSG5-TR β AA120: este plásmido contiene el ADN codificante del gen del receptor TR β humano en el que introducimos la mutación AA120 en la caja P, eliminando la especificidad de unión a elementos de respuesta a hormona tiroidea.

pSG5-TR β AHT: este plásmido contiene el ADN codificante del gen del receptor TR β humano en el que hemos sustituido los residuos Ala223, His224 y Thr227 por Glu223, Glu224 y Ala 227 (Horlein y cols., 1995).

pSG5-TR β P214R: este plásmido contiene el ADN codificante del gen del receptor TR β humano en el que realizamos la mutación P214R en la región bisagra del receptor (Damn y Evans., 1993; Pissios y cols., 2000).

pSG5-TR β K288I: este plásmido contiene el ADN codificante del gen del receptor TR β humano con la mutación K288I en la hélice 3 del receptor (Collingwood y cols., 1998).

pSG5-TR β E452Q: este plásmido contiene el ADN codificante del gen del receptor TR β humano con la mutación E452Q en la hélice 12 del LBD.

pCEFL: vector vacío que contiene el promotor de EF-1 y el ADN codificante del gen de resistencia al antibiótico neomicina.

pCEFL-V12 H-Ras: Este plásmido contiene el DNAC del gen H-ras mutado en el residuo Val12 por lo que origina una proteína H-Ras constitutivamente activa. (Cedido por el Dr. Piero Crespo).

pCMV₅₀₀: vector vacío que contiene la secuencia del promotor de un citomegalovirus.

pCMV-A-ATF2: vector de expresión de un mutante dominante negativo de ATF-2 en el que la región básica fusionada al extremo N-terminal del dominio de dimerización ha sido sustituida por una secuencia de aminoácidos anfipática ácida. Esta secuencia le confiere la capacidad de formar heterodímeros inactivos que no se unen al ADN (Ahn y cols., 1998).

pCDNA GAL4-ATF-2: Este plásmido contiene el DBD de Gal4 fusionado al fragmento 19-96 de la proteína ATF-2 que contiene el dominio de transactivación de la proteína. (Cedido por el Dr. Alberto Muñoz).

pCDNA GAL4-ELK1: Expresa el dominio de transactivación (residuos 307-428) del factor de transcripción Elk-1 fusionado con el DBD de GAL4 (Janknecht y Hunter, 1997). (Cedido por el Dr. Piero Crespo).

pEBGN: vector de expresión que codifica para una proteína GST que se emplea como control (Petersohn D y Thiel G., 1996). (Cedido por el Dr. Gerard Thiel)

pEBGN-SP1 : vector de expresión que codifica para una proteína de fusión que consiste en una proteína GST fusionada al dominio de dedos de zinc de Sp1 (Petersohn D y Thiel G., 1996). (Cedido por el Dr. Gerard Thiel).

pLPCX: vector vacío retroviral que contiene el ADN codificante del gen de resistencia al antibiótico puromicina.

pLPCX-TR β : vector de expresión retroviral que contiene el ADNc del receptor TR β humano clonado a partir de la digestión del plásmido PSG5-TR β con el enzima de restricción EcoR1 y posterior inserción en el sitio EcoR1 del vector pLPCX.

VSV: vector de expresión para la proteína retroviral VSV (envelope) (Cedido por el Dr. Comoglio).

Gag-pol: vector de expresión para la proteína retroviral gag-pol (packing) (Cedido por el Dr. Comoglio).

pCMV-MSK1-A195: vector de expresión que codifica para la proteína quinasa MSK-1 con el dominio N-terminal inactivo (Deak y cols., 1998). (Cedido por el Dr. Alessi)

pCMV-MSK1-D565A: vector de expresión que codifica para la proteína quinasa con el dominio C-terminal inactivo (Deak y cols., 1998). (Cedido por el Dr. Alessi).

Vectores de expresión de proteínas de fusión

pGEX-SMRT: vector para la expresión de la proteína de fusión entre GST y el dominio de interacción con los receptores nucleares del correpressor SMRT.

pGEX-RXR: vector para la expresión de la proteína de fusión entre GST y el receptor de retinoides RXR.

Anticuerpos

Anti-ciclina D1 : Anticuerpo policlonal de conejo sc-718 (Santa Cruz).

Anti-PCNA: Anticuerpo policlonal de cabra sc-9857 (Santa Cruz).

Anti-TR β : Anticuerpo policlonal de ratón sc-737 (Santa Cruz).

Anti-citoqueratina 8/18: Anticuerpo policlonal de conejo NCL-5D3 (Novocastra laboratorios).

Anti- β catenina: Anticuerpo 610154 (Biodiagnostic)

Anti-vimentina: Anticuerpo 61013 (Progen)

Anti-KI67: Anticuerpo M7240 (DakoCytomation)

Anti-CD31: Anticuerpo M0823 (DakoCytomation)

Anti-lamina β : Anticuerpo policlonal de cabra sc-6216 (Santa Cruz)

Anti-IgG de conejo : anticuerpo policlonal de cabra acoplado a HRP, sc-2030 (Santa Cruz).

Anti-IgG de ratón: anticuerpo policlonal de cabra acoplado a HRP, sc-2005 (Santa Cruz).

Anti-IgG de cabra : anticuerpo policlonal de burro acoplado a HRP, sc 2056 (Santa Cruz).

Anticuerpo anti-BrdU: anticuerpo monoclonal de ratón clon BMC 9318 (Boheronger Mannheim Biochemica).

Alexa Fluor 488 Goat anti-IgG de ratón: anticuerpo de cabra acoplado a fluorescencia (Molecular Probes).

Alexa Fluor 488 Goat anti-IgG de conejo: anticuerpo de cabra acoplado a fluorescencia (Molecular Probes).

2.- MÉTODOS

Experimentos de transfección transitoria

Estos experimentos se realizaron en placas de 24 pocillos. En cada pocillo se sembraron 8×10^4 células HepG2 o 4×10^4 células SK-hep1 o MDA MB 468 PM1. Al día siguiente, se transfectaron empleando una mezcla de liposomas catiónicos (Rose y cols., 1991) y las cantidades indicadas en cada caso de plásmido reportero y vectores de expresión. El medio con los liposomas se retiró 6 h después. A continuación, las células se incubaron durante 36 h en medio con 0,1% de suero para las células HepG2 y en ausencia de suero para las células SK-hep1 y MDA MB 468 PM1, y en presencia o ausencia de T3 y de los distintos factores de crecimiento indicados en cada experimento. A continuación, las células se recogieron, se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón de lisis pasivo de Promega. La actividad luciferasa se determinó en 10 μ l de cada extracto en un luminómetro Berthold-BioLumat según las indicaciones del sistema de ensayo de luciferasa dual de Promega. Posteriormente se determinó la actividad renila.

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y cada experimento se repitió un número de veces igual o superior a dos veces. Se emplearon como control interno los vectores de expresión de renila. Los valores de actividad luciferasa se han referido a la actividad renila.

Experimentos de transfección estable

Se sembraron 5×10^6 de células empaquetadoras HEK 293T en placas de 90 mm. Al día siguiente se transfectaron mediante la técnica del fosfato cálcico empleando 10 μ g del plásmido pLPCX o pLPCX-TR β , 3,5 μ g de VSV y 6,5 μ g de gag-pol. Las placas se lavaron con PBS a las 16 h de la transfección y se añadió medio fresco para que se formasen las partículas virales. Al día siguiente se sembraron las células a infectar (SK-hep1 y MDA MB 468 PM1) en una dilución 1/8 en placas de 90 mm. A las 48 h de añadir el medio fresco sobre las células empaquetadoras, se recogió el medio, se filtró con un filtro de 0,45 μ m de poro, se diluyó 1/2 con medio fresco y se añadió polibreno a una concentración final de 4 μ g/ml. Finalmente el medio se añadió sobre las células receptoras. A las 24 h de la infección se comenzó la selección de las células transfectadas mediante tratamiento con el antibiótico puromicina (SIGMA) a una dosis de 2 μ g/ml (Trusolino y cols., 2001). Seleccionamos una mezcla de las células SK-hep1 transfectadas con el vector vacío y otra mezcla de células a las que se transfectó el plásmido pLPCX-TR β (SK-hep1-pLPCX y SK-hep1-TR β). Se realizó la misma selección para las células de adenocarcinoma de mama (MDA MB 468 PM1-pLPCX y MDA MB 468 PM1-TR β).

Mutagénesis dirigida

Para la obtención de las construcciones que presentan mutaciones en los distintos dominios del receptor de hormonas tiroideas se realizó un proceso de mutagénesis dirigida en el que se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

TRβ-C102G: CAA GGA CGA GCT CGG TGT AGT GTG TGG TGA CAA AGC C
GGC TTT GTC ACC ACA CAC TAC ACC GAG CTC GTC CTT G

TRβ-GS120: CCG CTG TAT CAC GTG TGG AAG CTG CAA GGG TTT C
GAA ACC CTT GCA GCT TCC ACA CGT GAT ACA GCG G

TRβ-AA120: CCG CTG TAT CAC GTG TGC AGC CTG CAA GGG TTT C
GAA ACC CTT GCA GGC TGC ACA CGT GAT ACA GCG G

TRβ-P214R: GGG CAC AAG CCA GAG CGC ACA GAC GAG G
CCT CGT CTG TGC GCT CTG GCT TGT GCC C

TRβ-AHT: AAA ACT GTC ACC GAA GGC GGT GTG GCG GCC AAC GCC CAA GGC
GCC TTG GGC GTT GGC CGC CAC ACC GCC TTC GGT GAC AGT TTT

TRβ-E452Q: CCC CCC TTT GTT CCT GCA AGT GTT CGA GG
CCT CGA ACA CTT GCA GGA ACA AAG GGG GG

El plásmido empleado como molde para la reacción de mutagénesis fue pSG5-TRβ. El protocolo utilizado fue el proporcionado por el manual de instrucciones de la Pfx platinum DNA polymerase (Biotools). El producto de PCR se incubó durante 1 h con la endonucleasa para ADN metilado y hemimetilado DpnI (Stratagene) y posteriormente, se transformó la cepa DH5α con el ADN resultante. La obtención de los plásmidos con las mutaciones se confirmó mediante la secuenciación de los mismos.

Medidas de crecimiento celular

1.- Incorporación de (³H)-Timidina

Se sembraron 8x10³ células por pocillo en placas de 24 pocillos. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por medio sin suero y se incubaron las células durante 48 h. Posteriormente se añadió 5 nM de T3 y los factores de crecimiento indicados en cada caso y se incubaron las células durante 48h con estos tratamientos. Durante las últimas 16 h de tratamiento se añadió 0,4 μCi de metil-³H-timidina por pocillo.

Posteriormente, se lavaron las células con PBS y se recogieron empleando el tampón de lisis 0,01 M NaOH y 10% SDS. Una vez lisadas las células se determinó la radioactividad incorporada por los núcleos en un contador de centelleo microbeta 1450 (Wallac)

Cada tratamiento se realizó por triplicado y cada experimento se repitió un mínimo de veces igual o superior a dos.

2.- Ensayo MTT

Se sembraron 8×10^3 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Al día siguiente se reemplazó el medio de cultivo por medio sin suero y se incubaron las células durante 48 h. Posteriormente se trataron las células con T3 y los factores de crecimiento indicados en cada caso. Las células se incubaron 48 h con estos tratamientos. Al finalizar el tratamiento se incubaron las células con 0,5 mg/ml de MTT (Calbiochem) durante 3 h. Transcurrido este tiempo se lavaron las células con PBS y se añadió 1 ml de DMSO, dejando la placa en agitación durante 10 min. Finalmente se midió la absorbancia a 630 y 570nm. Los resultados se expresan restando la absorbancia medida a 570 nm de la medida a 630 nm.

Se realizaron los tratamientos por triplicado y cada experimento se repitió un mínimo de 2 veces.

3.- Ensayo de marcaje con bromo-deoxi-uridina (BrdU)

Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos en las que previamente se han depositado cristales para inmunofluorescencia. Una vez adheridas se realizó un pulso de 1 h con BrdU. La fijación y el marcaje con fluorescencia se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial Boehringer Mannheim Biochemica. Las células fueron visualizadas empleando un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados. Los datos representan el porcentaje de células positivas para la tinción con BrdU respecto de un total de aproximadamente 200 células positivas para la tinción con DAPI.

Inmunodetección de proteínas

1.- Cuantificación de proteínas

De forma rutinaria, la cuantificación de proteínas se determinó por el método del ácido bibinconínico (BCA) (Smith y cols., 1985), empleando el protocolo y los reactivos de la casa comercial Pierce. En los casos en los que el tampón de lisis interfería con los reactivos del BCA, se recurrió a la cuantificación por el método Bradford (1976) empleando los reactivos del “Protein Assay” de Bio-Rad. En ambos casos, la intensidad del color resultante se midió como absorbancia a 595 nm en un lector de ELISA (VersaMax de Molecular Devices).

2.- Western Blot

Las células se cultivaron en placas de 60mm, fueron lavadas con PBS y lisadas en 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EGTA, 1% NP-40, 10% glicerol, 150 mM NaCl, 0,1% SDS y una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF, aprotinina, leupeptina y pepstatina).

Se analizaron muestras de 20 µg de proteínas en geles de SDS-PAGE al 10% (Laemmli, 1970), que posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore). El bloqueo de las membranas se efectuó en TTBS (TBS y 0.5% de Tween 20) y 4% de BSA durante 2 horas. Las incubaciones con los anticuerpos se realizaron en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos se usaron a una dilución 1/2000, excepto el anticuerpo anti-TRβ que se empleó a una dilución 1/500. Posteriormente las membranas fueron incubadas en tampón de bloqueo con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa durante 45 minutos. Después de cada incubación se realizaron 3 lavados con TTBS. Las

proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia empleando el sistema de detección ECL (Amersham).

Con el objetivo de emplear las mismas membranas para sucesivas hibridaciones con distintos anticuerpos, se sometió a dichas membranas a una incubación durante 20 minutos a 50°C con una solución conteniendo 2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 6.8 y 100 mM β -mercapto-etanol. Para eliminar dicha solución se sometió a las membranas a sucesivos lavados con TTBS.

3.- Inmunofluorescencia

Se sembraron las células en cristales autoclavados e introducidos en placas de 60 mm. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100 en PBS y se bloquearon con 0,1 M Glicina. Finalmente se incubaron con los anticuerpos TR β (Santa Cruz) y citokeratina 8-18 (Novocastra laboratories) durante 2 horas. Los anticuerpos primarios se usaron en una dilución 1/100 en solución de bloqueo. Los anticuerpos secundarios se emplearon en una dilución 1/500 durante 45 min. Finalmente se montaron los cristales sobre portaobjetos con Mowiol y se visualizaron las muestras en un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados.

Zimograma

Los zimogramas se realizaron empleando gelatina como sustrato (Llorens y cols., 1998). Se plaquearon $2,5 \times 10^5$ células en placas de 60 mm. Al día siguiente se cambió el medio por medio sin suero y se pusieron los tratamientos correspondientes. A las 36 h se recogió el medio y se centrifugó. Se cargó el volumen de medio correspondiente a 10 μ g de extractos de proteínas de las células en un gel SDS-PAGE conteniendo un 0,05% de gelatina en condiciones no desnaturalizantes. Se lavó el gel con 2,5% Triton X-100 y se reactivaron las metaloproteasas incubando el gel durante 36h en el tampón 40 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M benzamidina (SIGMA) y 10 mM Cl_2Ca . Finalmente se tiñó el gel con Azul de Coomassie y se fotografió. La actividad gelatinolítica se detecta como una banda clara frente al fondo oscuro.

Extracción de ARN y RT-Q-PCR en tiempo real

1.- Extracción de ARN

Para la extracción del ARN total se utilizó el reactivo TriReagent (SIGMA) basado en el método del isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo. La concentración del ARN se estimó por espectrofotometría a 260 nm y las muestras fueron conservadas a -80°C en agua MilliQ.

2.- RT-PCR en tiempo real

El ADNc se obtuvo empleando 2 μ g de ARN total y oligo dT (Invitrogen) como oligonucleótido, siguiendo las instrucciones del kit SuperScript™ First-Strand Síntesis System (Invitrogen Life Technologies).

Para la amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real se usaron 2 μ l de ADNc y los siguientes oligonucleótidos sintéticos:

Oligonucleótido	Secuencia	T ^a anillamiento
TRβ-F	CCAGAAGACATTGGACAAGCACC	55°C
TRβ-R	TGCCATTTTCATTCAAGG	55°C
CXCR4-F	ATCTTTGCCAACGTCAGT	60°C
CXCR4-R	TCACACCCTTGCTTGATG	60°C
c-MET-F	GAGCCAAGTCCTTTCAT	60°C
c-MET-R	ATCGAATGCAATGGATGAT	60°C
CASPASA1-F	TCCGTTCCATGGGTGAAGGTACA	55°C
CASPASA1-R	GAGAGCAAGACGTGTGCGGCT	55°C
EGFR1-F	AGGACCAAGCAACATGGTCA	52°C
EGFR1-R	CCTTGCAGCTGTTTTACCT	52°C
ERBB2-F	AGCTGGTGACACAGCTTA	52°C
ERBB2-R	TGGTTGGGACTCTTGAC	52°C
ERBB3-F	GACCTAGACCTAGACTT	52°C
ERBB3-R	TCTGATGACYCYGATGC	52°C
IGFR1-F	ACCCGGAGTACTTCAGCGCT	52°C
IGFR1-R	CACAGAAGCTTCGTTGAGAA	52°C
IGFBP3-F	AAGTTGACTACGAGTCTCAG	52°C
IGFBP3-R	AATCAGTTCACCACAAACAGA	52°C
CCR6-F	CCATTCTGGGCAGTGAGTCA	55°C
CCR6-R	AGCAGCATCCCAGCAGTTAA	55°C
MMP9-F	AAGGATGGTCTACTGGCAC	52°C
MMP9-R	AAGGATGGTCTACTGGCAC	52°C
GAPDH-F	ACAGTCCATGCCATCACTGCC	55°C
GAPDH-R	GCCTGCTTCACCACCTTCTTG	55°C

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el sistema de detección basado en Syber Green. Las condiciones de la PCR fueron: 30 s. a 95°C para la desnaturalización, 30 s. para el anillamiento y 30 s. a 72°C para la elongación (40 ciclos).

El análisis de los resultados se realizó mediante el software del termociclador y según el método C_t comparativo ($\Delta\Delta C_t$), utilizando los valores de ARNm de GAPDH como control.

Experimentos de retardo de la movilidad electroforética en gel (EMSA)

1.- Marcaje de la sonda

El oligonucleótido de cadena sencilla (100 ng) fue marcado radiactivamente en el extremo 5' con la enzima klenow y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$. Posteriormente, el oligonucleótido fue anillado a su cadena complementaria y fueron eliminados los nucleótidos radiactivos no incorporados mediante una columna S-200 Sephacryl (Amersham Biosciences).

2.- Traducción *in vitro*

Los ADNc que codifican las proteínas TR β y los mutantes en los distintos dominios están clonados, como ya se ha indicado, en el vector pSG5-0. Dicho vector contiene el promotor de SV40 para su expresión en eucariotas, así como el promotor T7 que permite la transcripción y la traducción *in vitro*.

La transcripción y traducción *in vitro* se llevó a cabo utilizando 1 μ g del plásmido en un volumen final de 50 μ l, siguiendo las instrucciones del kit TNT de Promega.

3.- Incubación de las proteínas con el ADN y electroforesis

Las proteínas traducidas *in vitro* fueron incubadas en el tampón de unión (10 mM HEPES-KOH pH 7,9, 80 mM KCl, 1mM DTT, 1% NP-40), conteniendo 1 μ g poli(dI-dC), en un volumen final de 20 μ l, durante 15 min en hielo. Posteriormente se incubó esta mezcla con la sonda marcada durante 30 min a temperatura ambiente. Donde se indica, se añadió una concentración de 1 μ M de T3 a la reacción de unión.

Los complejos DNA-proteína formados se analizaron en geles de poliacrilamida al 6% en TBE 0,5X. Posteriormente, los geles se secaron y se expusieron a películas autorradiográficas a -80°C.

Ensayos de interacción proteína-proteína

1.- Purificación de proteínas fusionadas a GST

La cepa bacteriana BL-21 fue transformada con los plásmidos pGEX-SMRT y pGEX-RXR. Se cultivaron 100 ml de estas bacterias hasta obtener una densidad óptica de 0,6 medida a 600 nm. En este momento, la expresión de la proteína fusionada a GST se indujo con 0,4 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido). La inducción se realizó durante 2 horas. A continuación, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en una mezcla de PBS e inhibidores de proteasas. Posteriormente se añadió 0,5% del detergente Triton X-100. Las bacterias se sonicaron durante 4 ciclos de 15 segundos. Después, el lisado de bacterias se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se incubó con 300 μ l de PBS-glutation-Sepharosa 4B (Amersham-Biosciences) durante 1 h a 4°C. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS. La elusión de la proteína de fusión se realizó mediante sucesivas incubaciones de 15 min con 10 mM glutation.

2.- Ensayo de interacción proteína-proteína

Estos ensayos se realizaron utilizando 2 μ l de la traducción *in vitro* del vector pSG5-TR β en presencia de [³⁵S] metionina y [³⁵S] cisteína. Esta proteína marcada radiactivamente se incubó con 1 μ g de las proteínas de fusión o las mismas cantidades de las proteínas GST como control, inmovilizadas en la matriz de glutation sefarosa en el tampón IPAB (20 mM HEPES pH 7,9, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,02% Triton X-100, 0,02 mg/ml BSA, 0,1 M PMSEF, 10 μ g/ml leupeptina y 10 μ g/ml pepstatina). Donde se indica se añadió una concentración de 1 μ M de T3 a la reacción de unión. Las proteínas unidas se analizaron por electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida y autorradiografía.

Ensayos biológicos

1.- Ensayos de crecimiento en agar blando

Se realizaron sembrando 2×10^4 células resuspendidas en 1,5 ml de una mezcla de agar noble 1% (SIGMA) y medio DMEM- Heps 2x con un 20% de suero fetal bovino y 2% de glutamina (1:1), en presencia o no de 100 nM T3. Las células se sembraron en placas de 60mm sobre una base de 2 ml de esta misma mezcla. Cada 4 días se añadió medio DMEM sin suero con o sin T3 a las placas. A los 40 días se contó al microscopio óptico el número de colonias. Se contabilizó el número de colonias en 10 campos al azar de cada placa. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y cada experimento se repitió un número de veces igual o superior a dos.

2.- Crecimiento en suspensión

Se pusieron $2,5 \times 10^5$ células en 30 ml de DMEM+Heps sin suero y se dejaron en agitación, en presencia o ausencia de 5 nM T3. A continuación se centrifugaron las células, se sembraron en placas de 24 pocillos y se esperó durante 4 h para que las células se adhieran. Transcurrido este tiempo se añadió el reactivo MTT y se midió la actividad. Los resultados se expresaron respecto a la medida de la actividad MTT de células que han sido sembradas en paralelo en placas, sin ser sometidas a agitación (Fernandez Y y cols., 2000). Todos los tratamientos se realizaron por duplicado y cada experimento se repitió un número de veces igual o superior a dos.

3.- Ensayos de formación de focos de transformación

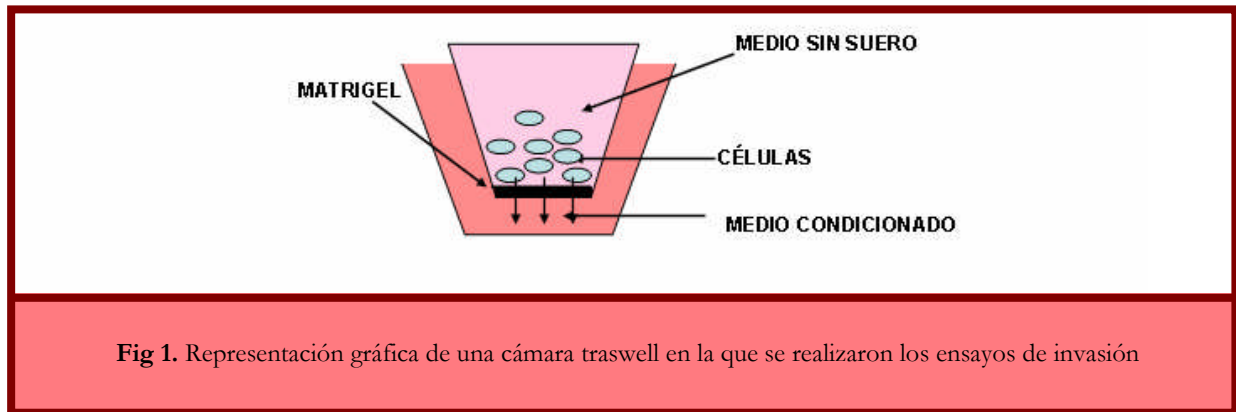
Los fibroblastos NIH3T3 fueron sembrados a una dilución 1/40 en placas de 90 mm. Las transfecciones fueron realizadas por los métodos estándar de fosfato cálcico empleando como tampón HBS. Las mezclas de ADN empleadas en cada transfección contenían 50 ng de pCEFL-V12 H-Ras y 4 μ g de pSG5-TR β o de los receptores de hormonas tiroideas con mutaciones en los distintos dominios, o las cantidades correspondientes de los respectivos vectores vacíos. Después de 16 h de incubación con los precipitados, las células fueron lavadas con PBS, el medio de incubación se cambió por medio deplecionado de hormonas tiroideas y se inició el tratamiento con 5 nM T3. El medio de cultivo se renovó cada 2 días. Los cultivos se recogieron 14 días después de la transfección, se lavaron las células con PBS y finalmente se tiñeron con el colorante GIEMSA (SIGMA). El número de focos se contabilizó visualmente.

Todos los tratamientos se realizaron por duplicado y cada experimento se repitió un número de veces igual o superior a tres veces.

4.- Ensayos de invasión

Se hicieron en cámaras Transwell de 24 pocillos (Costar) en las que se añadieron 2 μ g de matrigel (BD Biscences) en la cara superior de cada filtro (Fig 1). Las células se cultivaron en medio sin suero durante 24 h, en presencia o ausencia de 5 nM T3, y tras este periodo se sembraron 1×10^5 células en cada inserto superior y se dejaron migrar durante 16 horas hacia medio condicionado de NIH3T3. El medio condicionado de NIH3T3 se obtuvo cultivando estos fibroblastos durante 48 h en medio sin suero; el

medio se recogió, se centrifugó y se conservó a -20°C . El tratamiento con T3 se realizó durante las 24 h en ausencia de suero y durante las 16 h de la migración. Como control negativo se puso en la parte inferior del Transwell medio sin suero con un 2% de BSA. Los filtros fueron fijados con glutaraldehído y se tiñeron con cristal violeta, de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial COSTAR. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y cada experimento se repitió un número de veces igual o superior a dos.



Ensayos de formación de tumores y metástasis en ratones inmunosuprimidos

1.- Inoculación heterotópica

Los ratones atímicos desnudos (nu/nu) se dividieron en 4 grupos de 5 ratones cada uno. En dos de estos grupos se indujo un estado de hipotiroidismo mediante tratamiento con metimazol (Sigma) y perclorato sódico en el agua de bebida (Sole y cols., 1996). Para la formación de tumores se inocularon subcutáneamente 1×10^6 de células SK-hep1-pLPCX o SK-hep1-TR β , resuspendidas en 100 μl de PBS. Cada animal se pesó una vez por semana y los tumores fueron medidos 2 veces por semana mediante un calibrador vernier. El volumen se determinó usando la fórmula: volumen de tumor: $(\pi \times \text{longitud} \times \text{ancho}^2) / 6$. Los ratones fueron sacrificados a los 30 días y los tumores se fijaron en paraformaldehído al 4% para su posterior inclusión en parafina y análisis histológico.

2.- Inoculación ortotópica

Los ratones atímicos desnudos (nu/nu) se dividieron en 4 grupos de 8 ratones cada uno, en dos de los cuales se indujo un estado de hipotiroidismo. Recibieron como anestesia una mezcla de xilacina y ketamina por vía intraperitoneal y se realizó una incisión a 1 cm de distancia de la segunda glándula mamaria abdominal derecha. Con unas pinzas se separó la piel del músculo y se procedió a inocular dentro de la glándula 1×10^6 células MDA MB 468 PM1-pLPCX o MDA MB 468 PM1-TR β resuspendidas en 100 μl de PBS. Las heridas fueron cerradas con grapas que se quitaron a la semana de la intervención quirúrgica. Cada animal se pesó una vez por semana y los tumores fueron medidos 2 veces por semana mediante un calibrador vernier. El volumen se determinó usando la fórmula: volumen de tumor = $(\pi \times \text{longitud} \times \text{ancho}^2) / 6$.

Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 200 mm^3 los animales se anestesiaron y los tumores fueron extirpados. Los tumores se dividieron en fragmentos para la fijación en paraformaldehído

al 4% para su posterior inclusión en parafina y análisis histológico, para la generación de cultivos celulares a partir de explantes de los tumores y para la extracción de proteínas. Las heridas fueron cerradas mediante sutura.

Los animales fueron sacrificados 35 días después de la intervención quirúrgica. Se recogieron distintos órganos que se fijaron en paraformaldehído al 4% para su posterior inclusión en parafina y análisis histológico de la formación de metástasis espontáneas.

3.- Ensayo de formación de metástasis experimentales

Para el estudio de la formación de metástasis se dividieron los ratones en 4 grupos de 8 ratones. En dos de estos grupos se indujo un estado de hipotiroidismo y posteriormente se inocularon 1×10^6 de células SK-hep1-pLPCX o SK-hep1-TR β en la vena de la cola. Los ratones fueron sacrificados al cabo de 30 días y se extrajeron los pulmones, que fueron fijados en paraformaldehído al 4 % para su posterior inclusión en parafina y análisis histológico. El mismo experimento se realizó con las células MDA MB 468 PM1 y los animales fueron sacrificados a los 40 días.

4.- Experimentos de biodistribución de células tumorales por vía endovenosa en ratones inmunosuprimidos

Se cultivaron en un frasco de 75 cm³ células procedentes de un cultivo exponencial durante 24 h en presencia de 2,5 μ Ci de ¹²⁵IrdU. Posteriormente se lavaron con HBSS sin Ca⁺² y Mg⁺² para eliminar la radiactividad no incorporada y se levantaron con tripsina, resuspendiendo las células a la concentración de 5×10^6 células/ml. Se separó una alícuota de 100 μ l, se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 100 μ l de 0,25% Triton X-100. Tras 10 min se empapó un bastoncillo de los oídos en este líquido y se cuantificó la radioactividad en un contador gamma. Este valor se emplea como control de radiactividad incorporada.

Los animales se dividieron en grupos de 4 ratones y se inyectaron 100 μ l de la suspensión celular en la vena de la cola de cada animal. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical a distintos tiempos y se exanguinaron mediante punción intracardiaca en el ventrículo derecho. Esta sangre se empleó como control negativo. Se recogieron los pulmones y se colocaron en viales con etanol al 70%. Se reemplazó el etanol diariamente durante 3 días para eliminar la radioactividad no incorporada. Transcurrido este tiempo se midió la radiactividad incorporada en los pulmones y se representó respecto a la radiactividad incorporada por las células.

5.- Obtención de cultivos celulares a partir de explantes de los tumores

Para la obtención de explantes de los tumores se inocularon de manera heterotópica 6 ratones con células SK-hep1-pLPCX y otros 6 con SK-hep1-TR β . Los animales se sacrificaron 13, 25 y 35 días después de la inoculación. Una vez sacrificados los animales se extrajeron los tumores en cámara de flujo, se cortaron en 10 fragmentos y se colocaron en una placa de 60 mm de diámetro. Se añadió una gota de medio DMEM:HAMS 1:1 con 10% de suero fetal bovino deplecionado de hormonas tiroideas sobre cada fragmento y se dejó 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió medio hasta cubrir los tumores y se

mantuvieron en un incubador al 5% CO₂, 37°C de temperatura y 95% de humedad hasta que las células tumorales se extienden por la placa.

Los explantes de los tumores originados por las células MDA MB 468 PM1 se realizaron siguiendo el mismo protocolo, a partir de los tumores extirpados de la mama de los animales inoculados según un modelo ortotópico (día 35).

6.- Análisis histopatológico

Para el estudio histopatológico se hicieron cortes seriados de 4 µm de espesor con un microtomo, tanto de los tumores como de los pulmones, así como de otros órganos con posibles metástasis distantes al tumor primario. Se tiñeron con hematoxilina-eosina (Bancroft y Stevens., 1982), observándose los núcleos de las células de color violeta y el citoplasma y tejido conectivo de color rosa. El protocolo utilizado comprende seis pasos:

1. Desparafinar con xilol e hidratar las secciones.
2. Teñir con hematoxilina de Carazzi durante 5 minutos.
3. Lavado en agua durante 20 minutos.
4. Teñir en una solución de eosina durante 30 segundos.
5. Lavado en agua.
6. Deshidratar y montar las secciones.

Para el procesamiento de los cortes para inmunohistoquímica se utilizó la técnica peroxidasa-antiperoxidasa. Se realizaron cortes de 4 µm de espesor de las muestras de tumores. Los portaobjetos han de estar recubiertos con polilisina antes de su procesamiento. Se procedió a desparafinar e hidratar el tejido y posteriormente se sumergieron las muestras en tampón citrato y se calentaron hasta la ebullición en el microondas. Una vez que se han enfriado los portaobjetos se bloqueó la unión no específica incubando las secciones en suero de cabra (Zymed Laboratories INV). Los anticuerpos primarios se emplearon diluidos en solución de bloqueo (dilución 1/100) y se incubaron toda la noche a 37°C en cámara húmeda. A continuación se incubaron con el complejo streptavidina biotina peroxidasa (Zymed Laboratories INV) y se revelaron con diaminobenzidina (Sigma). Las fotografías se realizaron utilizando el objetivo de 40x de un microscopio Leica DMLB conectado a una cámara fotográfica Leica DC200 y equipado con el software Primal Leica DC Viewer.

Para determinar el grado de angiogénesis (nº vasos neoformados/área del campo) se utilizó un anticuerpo frente a CD31. De cada uno de los grupos de animales se utilizaron 4 secciones y de cada sección se realizaron 7 fotografías. El área del campo se determinó empleando el programa informático Leica Qwin. Los resultados se muestran como la media de cada grupo.

Para determinar el índice de proliferación (nº células positivas/nº total de células) se empleó el marcador de proliferación Ki67 (Fig 2). De cada uno de los grupos de animales se utilizaron entre 4 y 6 secciones y de cada sección se realizaron 5 fotografías. Los resultados se muestran como la media de cada grupo.

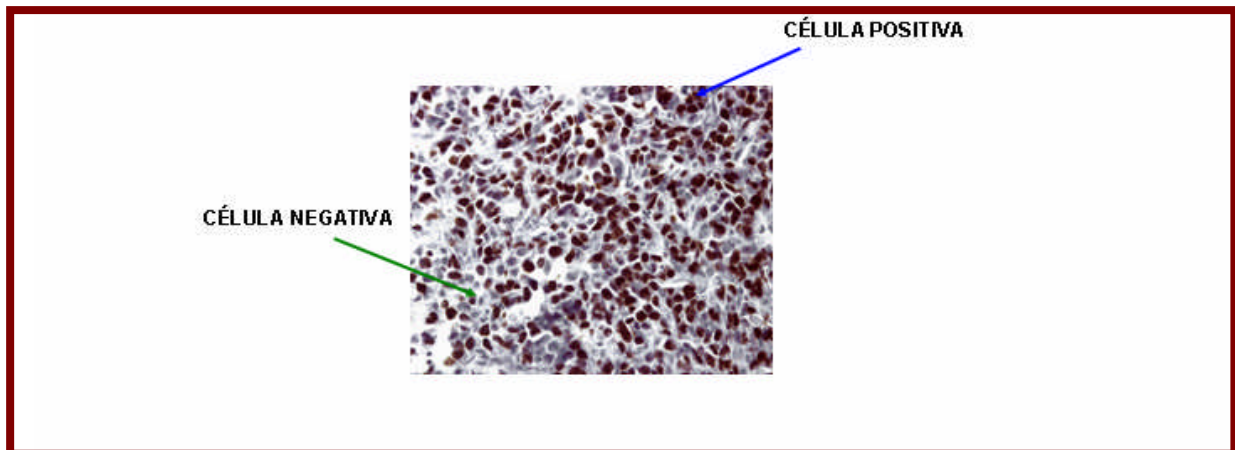


Fig 2. Se contaron el número de células positivas (flecha azul) y se representaron frente al número total de células

Para determinar el área necrótica de los tumores se empleó la técnica histométrica del conteo de puntos (Bancroft y Stevens., 1982). Consiste en dividir el tejido en cuadros muy pequeños y contar el número de cuadros en los que las células están vivas. Para ello se escanearon las secciones de los tumores con un escáner KODAK Professional RES 3370 con el software Adobe Photoshop 5.0. Se representó el porcentaje de células vivas respecto al total (Fig 3).

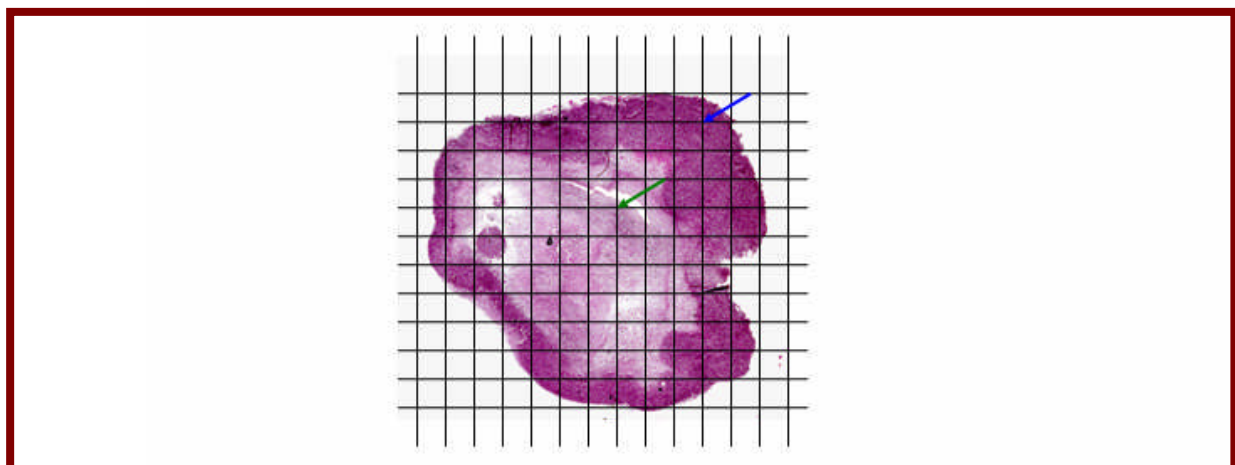


Fig 3. Se contaron el número de células vivas en las intersecciones de la cuadrícula (flecha azul) y se calculó el porcentaje de células vivas frente al total (la flecha verde representa células necróticas).

El análisis de la invasividad en músculo e infiltración de vasos y capilares se realizó empleando las secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina y/o Tricrómico de Masson. Se analizaron todas las secciones de cada grupo de animales y se representa el número de animales en los que se observa invasividad e infiltración en cada grupo. La tinción con Tricrómico de Masson permite observar los núcleos oscuros, el citoplasma, músculo y eritrocitos de color rojo y el colágeno de color azul verdoso. Esta tinción (Bancroft y Stevens., 1982) consta de los siguientes pasos:

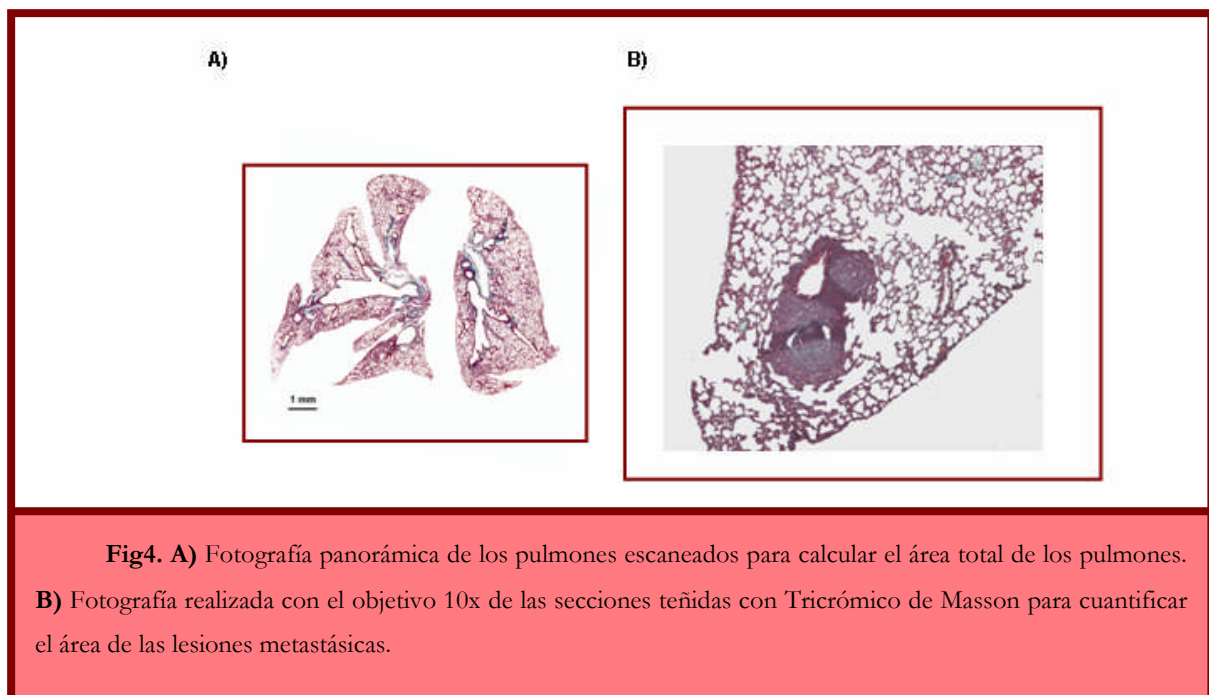
- 1.- Desparafinar e hidratar la muestra.

- 2.- Teñir los núcleos con por el método azul de celestina-hematoxilina
- 3.- Añadir alcohol al 1%
- 4.- Lavar con agua destilada
- 5.- Teñir 5 min con fucsina ácida
- 6.- Lavar con agua destilada
- 7.- Tratar 5 min con ácido fosfomolibdico
- 8.- Secar y teñir 5 min azul de metileno
- 9.- Lavar con agua destilada
- 10.- Tratar 2 min con ácido acético al 1%
- 11.- Deshidratar y montar las secciones

Para el análisis de la formación de metástasis en los pulmones se emplearon las secciones teñidas con hematoxilina-eosina. Se analizaron todas las preparaciones y se cuantificó el porcentaje de animales con lesiones pulmonares. En el caso de los animales inoculados en la vena de la cola con células MDA MB 468 PM1 se calculó también el número de lesiones por ratón, representándose la media de lesiones por animal en cada grupo.

En los animales inoculados con las células MDA MB 468 PM1 también se determinó el área que ocupaban las lesiones pulmonares (área lesiones/área pulmón). Para ello se tiñeron las secciones con la técnica del Tricrómico de Masson que permite una mejor diferenciación de las células tumorales respecto al estroma del pulmón en fotografías con poco aumento.

El área total del pulmón se cuantificó escaneando las secciones, a las que previamente se había pegado una regla, tal y como se ha descrito previamente. Posteriormente se realizaron fotografías con el objetivo de 10x de todas las lesiones metastásicas encontradas. Tanto el área total de los pulmones como la de las lesiones metastásicas se cuantificó empleando el programa informático analySIS® Soft Imaging System (Fig 4). Se representó la media en cada grupo del área de la lesión metastásica respecto al área total del pulmón.



RESULTADOS



RESULTADOS

Trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que en distintos modelos celulares el tratamiento con la hormona tiroidea triiodotironina (T3) o con el ácido retinoico (RA) causan la parada del ciclo celular (Perez Juste y Aranda., 1999; Perez Juste y cols., 2000), debido a la regulación coordinada a nivel transcripcional de la expresión de distintos genes implicados en el control del ciclo celular, entre los que se encuentra la **ciclina D1**. Por otro lado la familia de proteínas Ras tiene un papel clave en la transducción de señales desde el exterior al interior de la célula, jugando un papel esencial en procesos de proliferación y transformación. La ciclina D1 es una de las principales dianas sobre las que actúa Ras para controlar la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular. Recientemente se ha descrito en nuestro laboratorio que la T3 antagoniza la proliferación de células de neuroblastoma inducida por Ras oncogénico, así como la transformación y tumorigénesis mediada por este oncogén. La respuesta transcripcional del promotor de la ciclina D1 a Ras es antagonizada de forma muy potente por esta hormona (Garcia-Silva y Aranda.; 2004).

La regulación del promotor de ciclina D1 por Ras depende de los sitios CRE y Sp1

En ensayos de transfección transitoria, con un plásmido que contiene 254 bp de la región 5' del gen de la ciclina D1, se observa que los TRs, de forma dependiente de hormona, son también capaces de reprimir la activación del promotor por el oncogén ras en células de hepatocarcinoma humano HepG2 (Fig 1).

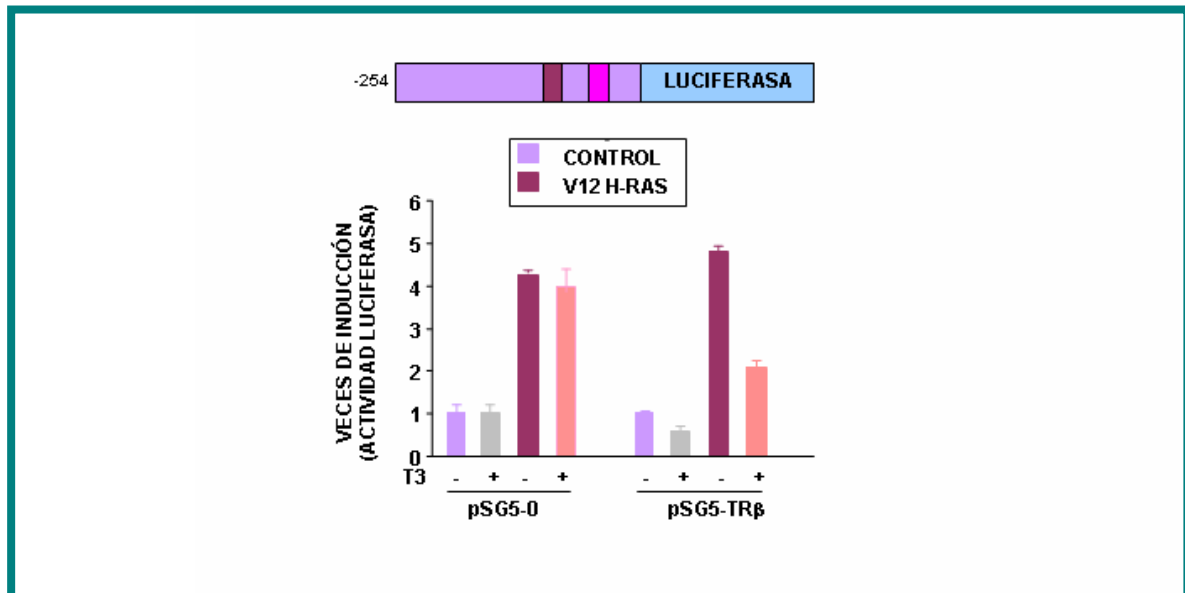
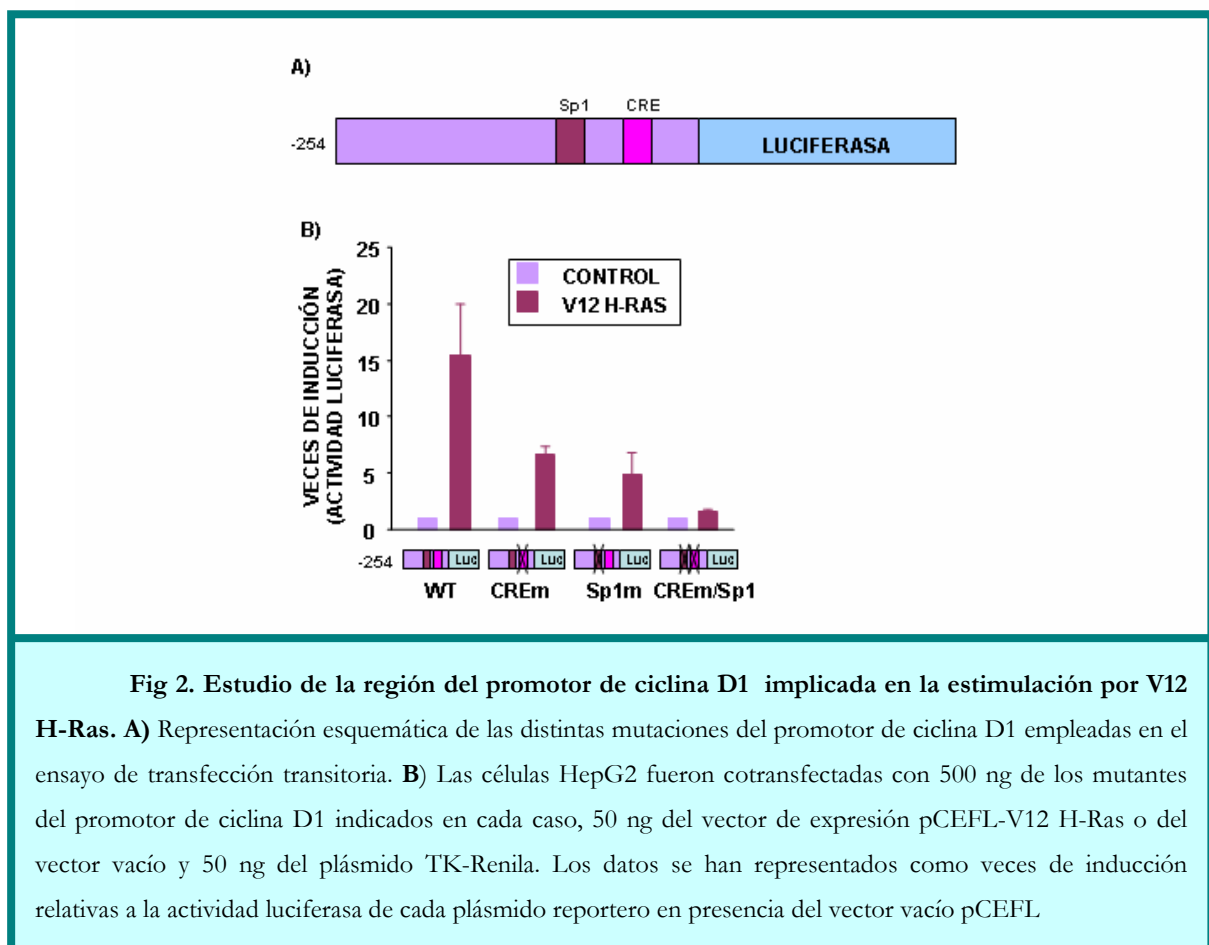


Fig 1. La T3 inhibe la transactivación mediada por V12 H-Ras. Las células HepG2 fueron cotransfectadas con 500 ng del promotor de ciclina D1, 50 ng del vector de expresión pCEFL-V12 H-Ras o del vector vacío, 20 ng del plásmido de expresión de TRβ o del vector vacío y 50 ng del plásmido TK-Renila. Los datos se han representados como veces de inducción relativas a la actividad luciferasa de cada plásmido

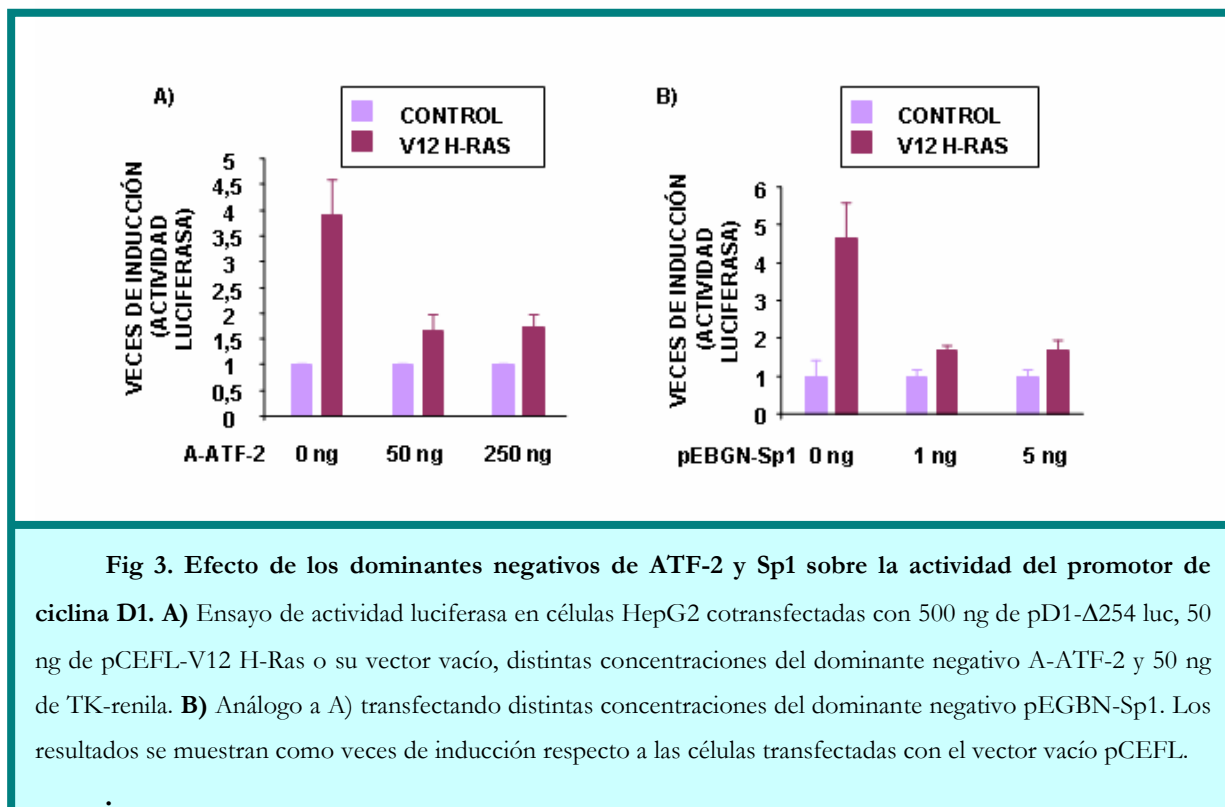
reportero en presencia del vector vacío pCEFL. En los casos indicados las células se trataron durante 36 h con 5 nM T3 en condiciones de 0,1% de SFB – T3

El análisis de la secuencia del fragmento del promotor de la ciclina D1 transfectado (pD1- Δ 254luc) indica que no existen sitios consenso para la unión del receptor de hormonas tiroideas. Sin embargo, en este fragmento se ha descrito la existencia de sitios CRE y Sp1 (Herber y cols., 1994). Para analizar la importancia de los sitios CRE y Sp1 en la regulación del promotor de ciclina D1 por el oncogén ras, realizamos transfecciones transitorias, en células de hepatocarcinoma humano HepG2, con distintas construcciones de este promotor, que presentan mutaciones puntuales en los sitios CRE, Sp1 o en ambos. La construcción pD1- Δ 254_{CREm}luc contiene tres mutaciones puntuales en el sitio CRE localizado a -52, mientras que la construcción pD1- Δ 254_{Sp1m}luc presenta mutaciones en dos de los cuatro sitios de unión para Sp1 descritos en el promotor y localizados a -117. La construcción pD1- Δ 254_{CREmSp1m}luc contiene los sitios CRE y Sp1 mutados (Fig 2A). La mutación del sitio CRE disminuye significativamente la activación del promotor de ciclina D1 por el oncogén ras, si bien para eliminar por completo esta activación se requiere también la mutación de los dos sitios de unión de los factores Sp1 presentes en este fragmento del promotor (Fig 2B).



Dado que el sitio CRE del promotor de ciclina D1 parece estar implicado en la estimulación por ras oncogénico analizamos la importancia del factor de transcripción ATF-2 en este proceso. Para ello transfectamos de manera transitoria el mutante A-ATF-2, que actúa como dominante negativo. Su acción

como dominante negativo se debe a que forma heterodímeros no funcionales que no se unen al ADN. La transfección transitoria del plásmido A-ATF-2 en la línea celular HepG2 disminuye drásticamente la estimulación del promotor de ciclina D1 por el oncogén ras (Fig 3A). Tal y como se observa en la Figura 3B, el mismo efecto inhibitorio se observa al transfectar de manera transitoria una construcción con actividad dominante negativa para los factores de transcripción Sp1. Este plásmido tan sólo contiene su dominio de unión al ADN de modo que compite con los factores Sp1 endógenos para unirse al ADN, actuando así como dominante negativo. Estos resultados corroboran que tanto los factores de transcripción ATF-2 como los Sp1 son necesarios para la estimulación del promotor de ciclina D1 por el oncogén ras en este tipo celular.



Puesto que el factor de transcripción ATF-2 parece estar implicado en la activación del promotor de ciclina D1 dependiente de Ras, examinamos si la expresión de V12 H-Ras tendría efectos sobre la actividad transcripcional de estos factores de transcripción. Mediante ensayos de tipo “un híbrido” analizamos la actividad de ATF-2 fusionado al DBD de GAL4 (GAL4-ATF-2) en células HepG2 que expresan ectópicamente V12 H-Ras y en células control. De esta manera comprobamos que el oncogén ras induce un fuerte incremento en la transactivación mediada por ATF-2. Para analizar si el tratamiento con hormona tiroidea reprime la actividad transcripcional de ATF-2, así como la transactivación mediada por el oncogén ras, cotransfectamos de manera transitoria el plásmido de expresión TRβ en esta línea celular. Las células HepG2 carecen de expresión endógena de TRs. Tal y como se muestra en la Figura 4 el TR vacío disminuye la activación por Ras y el tratamiento con la T3 no sólo disminuye la actividad transcripcional basal del factor ATF-2 sino que también disminuye significativamente la estimulación por el oncogén.

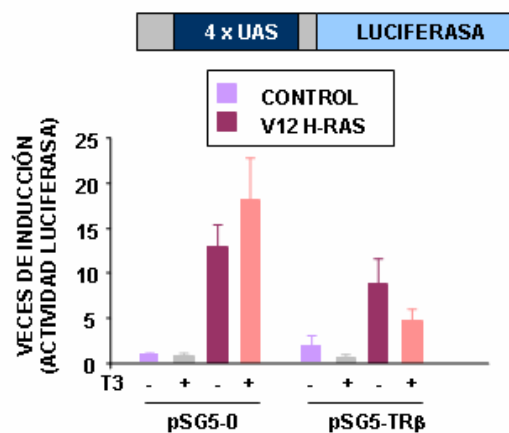


Fig 4. T3 inhibe la transactivación mediada por ATF-2. Cotransfección de células HepG2 con 200 ng de pE1b 4xUAS-luc, 50 ng de pCEFL-V12 H-Ras o el vector vacío, 20 ng de pSG5-TRβ o el vector vacío pSG5-0, 50 ng del plásmido que contiene la fusión GAL4-ATF2 y 50 ng de TK-Renila. Las células fueron incubadas durante 36 h en presencia o ausencia de 5 nM T3 en condiciones de 0,1% SFB - T3. Los resultados se muestran como veces de inducción respecto a las células cotransfectadas con los vectores vacíos pCEFL y pSG5-0

La quinasa MSK participa en la activación del promotor de ciclina D1 por el oncogén ras en la línea celular HepG2

La quinasa activada por mitosis y estrés (MSK) es una proteína predominantemente nuclear, aunque también se puede localizar en el citosol (Deak y cols., 1998). En el núcleo, MSK fosforila a distintos factores de transcripción que incluyen a los factores CREB y ATF-2. Dado que el efecto de la T3 sobre la inducción del promotor de la ciclina D1 por el oncogén ras está mediado, al menos en parte, por el factor de transcripción ATF-2, que es activado por la quinasa MSK, analizamos la importancia de esta quinasa en la activación de este promotor. Para ello transfectamos de manera transitoria dos mutantes en los dominios quinasa de MSK (Deak y cols., 1998; Zhang y cols., 2001). El plásmido MSK1-A195 tiene mutado y por tanto inactivado el dominio quinasa N terminal. El plásmido MSK1-D565A tiene inactivado el dominio quinasa C terminal. De esta manera, comprobamos que el bloqueo de la actividad de esta quinasa disminuye la estimulación del promotor de ciclina D1 por el oncogén ras (Fig 5A)

Para corroborar la importancia de esta quinasa en la estimulación del promotor de ciclina D1 llevamos a cabo experimentos de cotransfección transitoria con el promotor de ciclina D1 y el vector de expresión de V12 H-Ras, en presencia de inhibidores de distintas quinasas de la ruta de transducción de señales Raf/MEK/ERK. El tratamiento con el inhibidor de MEK UO126 provoca el bloqueo total de la inducción del promotor de ciclina D1 por el oncogén ras. El inhibidor H89 es un potente inhibidor de la quinasa PKA aunque a altas concentraciones también inhibe de manera drástica la quinasa MSK (Davies y

cols., 2000). El inhibidor Ro3218220 se desarrolló originalmente como un inhibidor de la quinasa PKC (Davis y cols., 1992) aunque se ha descrito que también inhibe las quinasas MSK y RSK (Alessi, D. 1997; Deak y cols., 1998). Tal y como se observa en la [Figura 5B](#), el tratamiento con el inhibidor Ro3218220 a una dosis 1 μM produce una disminución del 50% en la activación por el oncogén mientras que el tratamiento a una dosis de 5 μM provoca el bloqueo total de la estimulación. El tratamiento con el inhibidor H89 a una dosis 1 μM produce una disminución del efecto del oncogén ras de aproximadamente un 20%, y la dosis de 5 μM de este inhibidor produce el bloqueo total de la estimulación ([Fig 5B](#)). Los datos recogidos en estos experimentos sugieren que la ruta de transducción de señales Raf/MEK/ERK está implicada en la activación del promotor de ciclina D1 por el oncogén ras, y que los efectos del oncogén no sólo se explican por la regulación de la quinasa ERK, sino que también es importante la quinasa MSK.

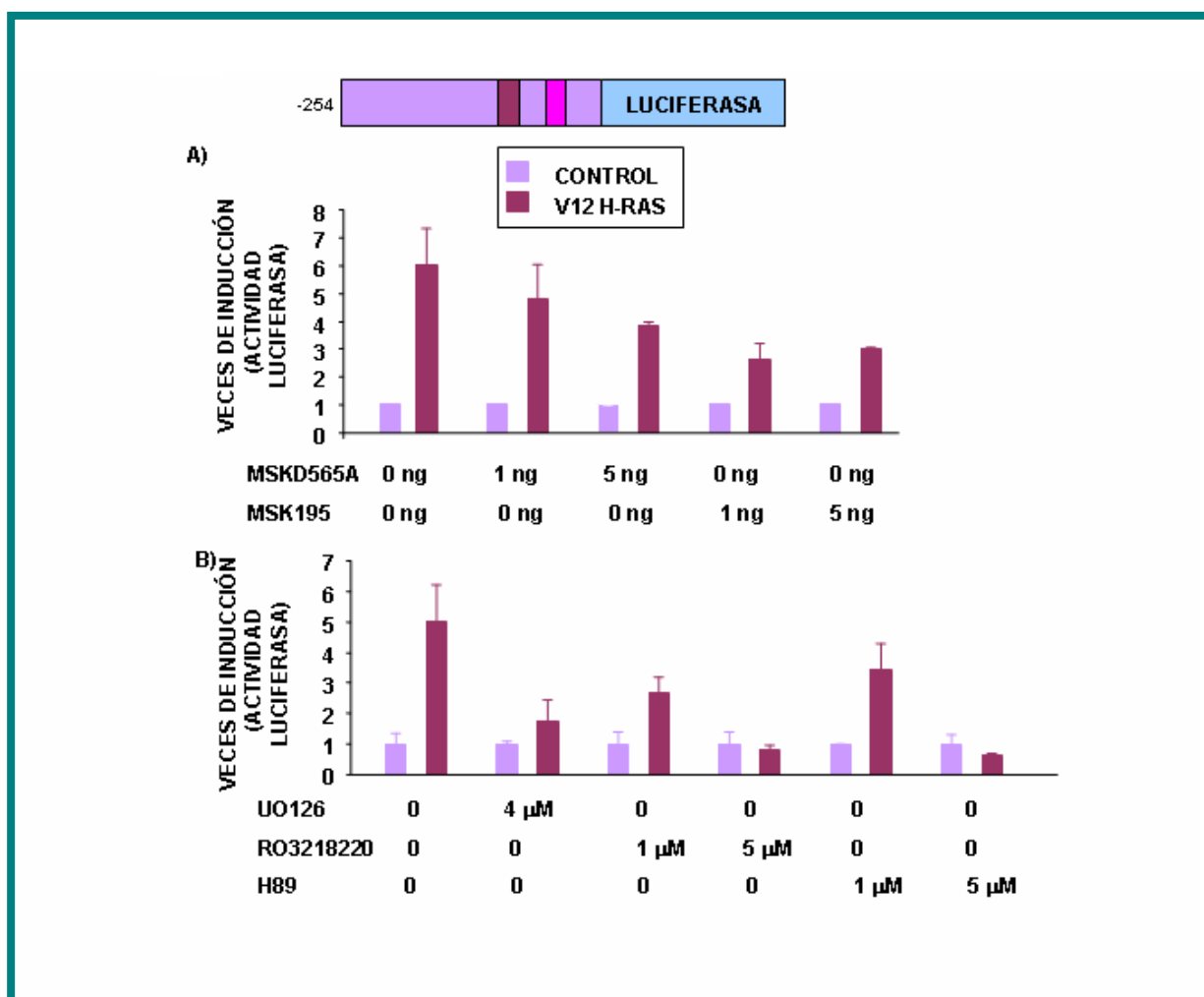


Fig 5. Efecto de la quinasa MSK sobre la estimulación por Ras del promotor de ciclina D1. A) Las células HepG2 se cotransfectaron con 500 ng de pD1- Δ 254 luc conjuntamente con 50 ng del vector de expresión pCEFL-V12 H-Ras o el vector vacío, 50 ng de TK-Renila y cantidades crecientes de los dominantes negativos en cada uno de los dominios quinasa de MSK. **B)** Ensayo de transfección transitoria con 500 ng de pD1- Δ 254 luc, 50 ng de V12 H-Ras o el vector vacío y 50 ng de TK-Renila. Las células fueron incubadas durante 36 h con las concentraciones indicadas en cada caso de los inhibidores UO126, Ro3218220, H89 o con el solvente (DMSO).

Los resultados se representan en veces de inducción respecto a los valores obtenidos en las células transfectadas con el vector vacío pCEFL.

Para analizar la importancia de esta quinasa en el antagonismo entre T3 y el oncogén ras cotransfectamos de manera transitoria el promotor de ciclina D1 junto con el oncogén ras y el plásmido con actividad dominante negativa MSK D565A. Tal y como se muestra en la [Figura 6](#) en estas condiciones la hormona es incapaz de revertir la activación transcripcional causada por Ras.

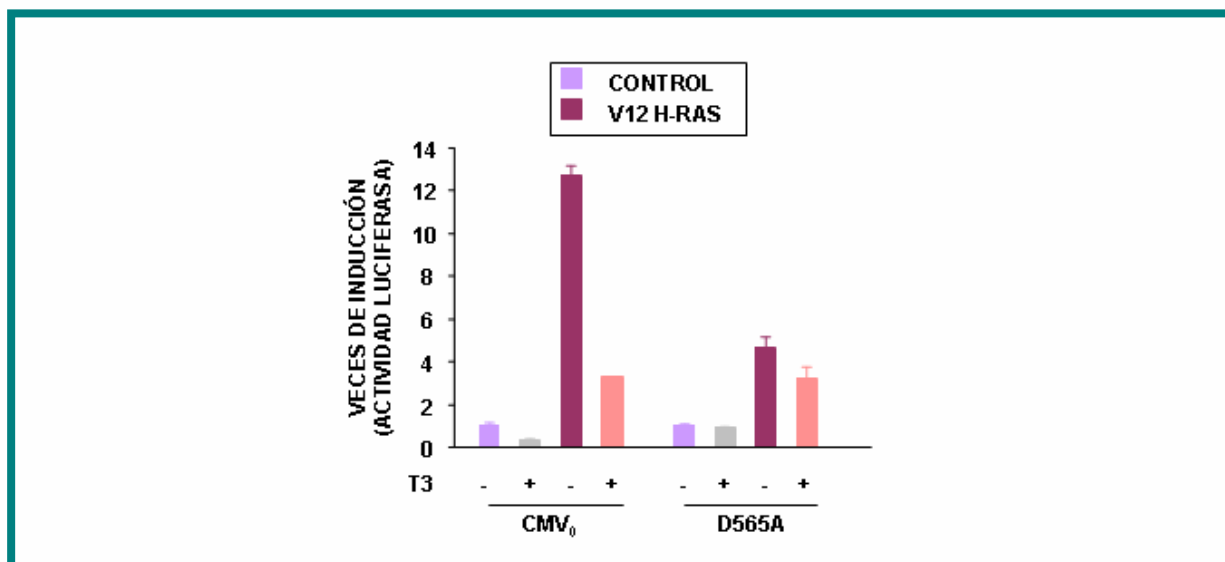


Fig 6. Efecto de la quinasa MSK sobre el antagonismo entre T3 y el oncogén Ras Las células HepG2 se cotransfectaron con 200 ng de pD1- Δ 254 luc conjuntamente con 50 ng del vector de expresión pCEFL-V12 H-Ras o el vector vacío, 20 ng del vector de expresión de TR β , 5 ng del mutante con actividad dominante negativa D565A o su vector vacío y 50 ng de TK-Renila. Las células se incubaron durante 36 h con 5 nM T3 en medio de cultivo con 0,1% SFB – T3. Los resultados se muestran como veces de inducción respecto a los valores obtenidos en las células transfectadas con el vector vacío pCEFL.

Caracterización de los dominios del TR β implicados en el bloqueo de la estimulación del promotor de ciclina D1 por V12 H-Ras

Para determinar los dominios del TR β implicados en el antagonismo transcripcional entre la hormona tiroidea y el oncogén ras en la línea celular HepG2, examinamos el efecto de mutantes en los distintos dominios del receptor de hormonas tiroideas sobre la respuesta inducida por el oncogén sobre el promotor de ciclina D1 en esta línea celular.

Mutaciones en el dominio de unión al ADN (DBD)

Para analizar la importancia del dominio de unión al ADN (DBD) del receptor TR β en el antagonismo transcripcional con el oncogén ras, realizamos distintos mutantes puntuales en este dominio del receptor. El mutante **TR β C102G** presenta una mutación puntual que supone la sustitución de la primera cisteína que forma el dedo de zinc de la primera hélice del DBD por el aminoácido glicina ([Fig 7A](#)), de modo que es incapaz de unirse al ADN de los promotores diana. El mutante **TR β GS120**

presenta dos mutaciones puntuales en la caja P que cambian la especificidad de unión a elementos de respuesta a hormona tiroidea (TREs) por especificidad de unión a elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs). Los dos primeros aminoácidos de la caja P (los residuos 120 y 121 en el TR β) son los que definen la unión a los elementos de respuesta del ADN por lo que realizamos la mutación de los dos primeros aminoácidos del TR (glutámico y glicina) por los del receptor de glucocorticoides (glicina y serina). Estos residuos constituyen junto con la glicina de la posición 124 la secuencia consenso de unión a elementos de respuesta a glucocorticoides. Esta mutación no afecta a la estructura de los dedos de zinc del DBD, sino que únicamente modifica la especificidad de unión a los elementos de respuesta (Fig 7A) (Shibusawa y cols., 2003). El mutante **TR β AA120**, en el que se han sustituido los aminoácidos responsables del reconocimiento de los TREs por dos alaninas presenta mutaciones en los mismos residuos que el mutante TR β GS120, que suponen la pérdida de especificidad de unión a elementos de respuesta a hormona tiroidea pero sin reconocer tampoco los elementos de respuesta a glucocorticoides, (Fig 7A). Las tres mutaciones bloquean la capacidad de unión a un elemento de respuesta consenso DR4 en ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) (Fig 7B). Mediante ensayos de interacción proteína-proteína observamos que la mutación TR β C102G no sólo afecta a la capacidad de unión del receptor al ADN sino que también impide, al afectar a la estructura de los dedos de zinc del DBD, la heterodimerización con el receptor de retinoides RXR (Fig 7C). En los otros dos mutantes permanece intacta la capacidad de heterodimerizar con el receptor RXR. Analizamos también la capacidad de unir correpresores, mediante ensayos de interacción proteína proteína con la construcción GST-SMRT, observando que las mutaciones se comportan de igual manera que el receptor salvaje, tanto en lo que se refiere al reclutamiento del correpresor como en su liberación causada por el tratamiento con el ligando T3 (Fig 7D).

Debido a su incapacidad de unirse al ADN de los promotores de los genes diana, estos mutantes son incapaces de activar la transcripción en respuesta al ligando en ensayos de transfección transitoria de un elemento de respuesta a hormona tiroidea palindrómico (Δ MMTV-TRE pal), en células de hepatocarcinoma humano HepG2 (Fig 7E).

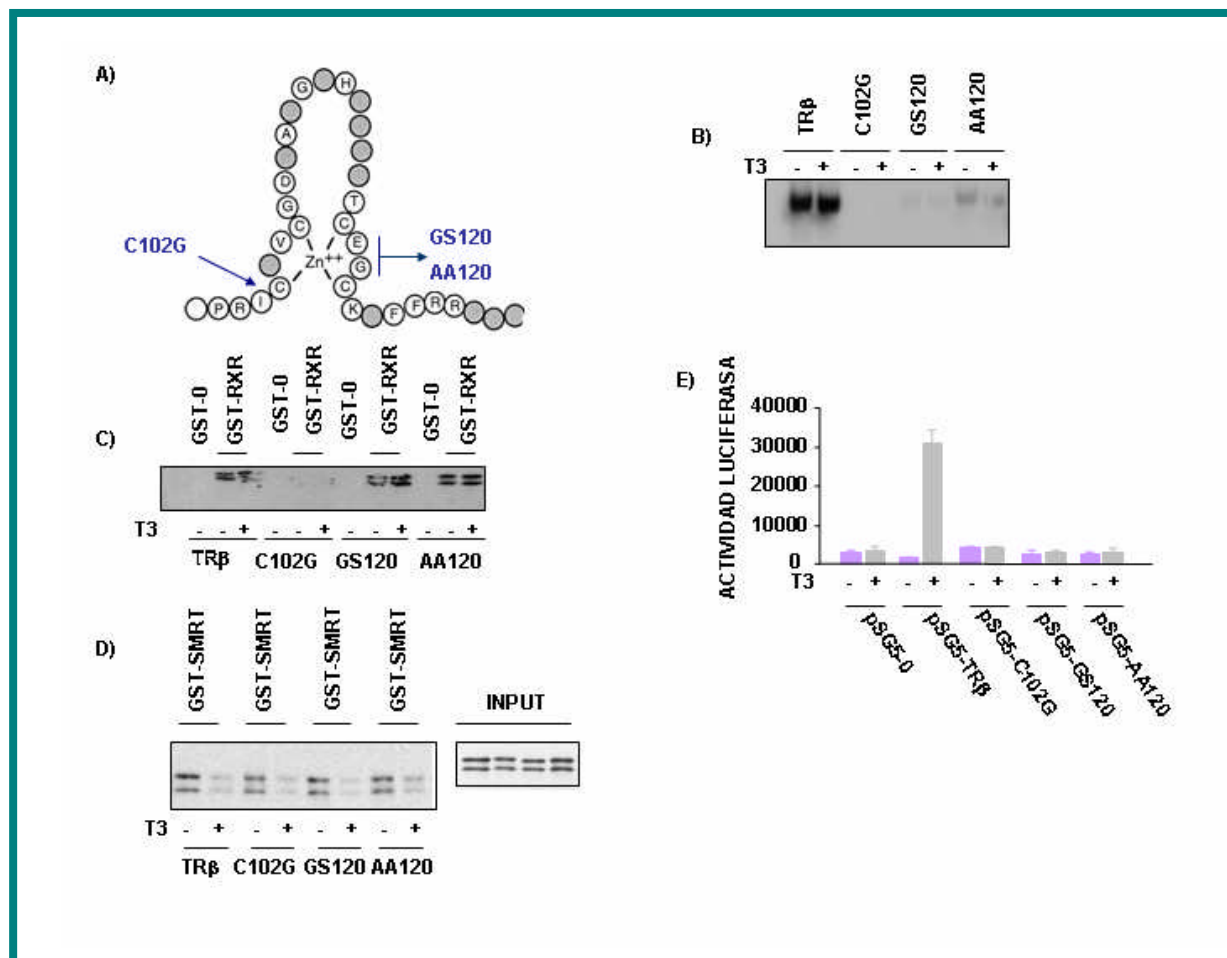


Fig 7. Caracterización de distintos mutantes de TRβ en el DBD. A) Representación esquemática de las mutaciones en el primer dedo de zinc del DBD de TRβ. **B)** Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) empleando como oligonucleótido un elemento de respuesta DR4 consenso. Se han empleado 1 μl de los mutantes del TRβ y de RXR traducidos in vitro. En los casos indicados se ha realizado el tratamiento con 1 μM T3. **C)** Ensayo de interacción proteína-proteína (pull-down) entre los distintos mutantes y el receptor de rexinoides RXR. Se ha empleado 1 mg de GST-RXR y 3 μl de los mutantes de TRβ traducidos in vitro. En los casos indicados se incubó la mezcla con 1 μM T3. **D)** Análogo a C) empleando GST-SMRT para analizar la interacción con correpresores. **E)** Las células HepG2 fueron cotransfectadas con 250 ng del plásmido ΔMMTV-TRE pal luc, 20 ng de los vectores de expresión de los distintos mutantes del receptor de hormonas tiroideas y 30 ng del plásmido TK-Renila. Las células se trataron durante 36 h con 5 nM T3.

Mutaciones que impiden la interacción con correpresores

La mutación **TRβ AHT** (Fig 8A) presenta las sustituciones de los aminoácidos A223, H224 por glicinas y del T227 por alanina. Estos aminoácidos están localizados en la primera hélice del LBD del receptor, en la caja CoR, la cual es necesaria para la interacción con los correpresores, aunque no forma

parte de la superficie de interacción con los mismos (Horlein y cols., 1995; Marimuthu y cols., 2002). Se ha descrito que esta mutación no sólo altera la unión de los correpresores sino que también impide la heterodimerización con RXR (Zhang y cols., 1997). Por el contrario, la mutación **TR β P214R** (Fig 8A), que también bloquea la interacción con correpresores (Damm y Evans, 1993), sólo impide la heterodimerización en ausencia del ligando. Esta última mutación consiste en el cambio del aminoácido P214 por R. Realizamos ambas mutaciones puntuales en el receptor TR β y comprobamos, mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA), que en ambos permanece intacta la capacidad de unión a un elemento de respuesta consenso DR4 (Fig 8B). Además, tal y como está descrito, observamos mediante ensayos de interacción proteína-proteína (pull-down), que en ausencia de ADN el mutante TR β AHT es incapaz de unirse al receptor X de retinoides RXR. Por el contrario, el mutante TR β P214R sí es capaz de interactuar con RXR aunque sólo en presencia del ligando T3 (Fig 8C). Destacar que esta falta de interacción sólo se observa en ausencia del ADN, en presencia del TRE, tal y como se observa en los EMSAs, la capacidad de heterodimerización es normal. Al analizar la capacidad de interacción con el correpresor SMRT observamos que se encuentra reducida en el mutante TR β AHT y totalmente eliminada en el mutante TR β P214R. En el caso del mutante TR β AHT la incubación con el ligando T3 no produce la liberación del reclutamiento de correpresores, a diferencia de lo que se observa en la forma salvaje del receptor (Fig 8D).

Para analizar la funcionalidad de estos mutantes deficientes en la interacción con correpresores realizamos ensayos de transactivación. Para ello transfectamos de manera transitoria un plásmido que contiene un TRE palindrómico (Δ MMTV-TRE pal) en células HepG2. Tal y como se observa en la Figura 8E, estos mutantes que impiden la unión de correpresores presentan una menor represión en ausencia de ligando, y la activación de la transcripción en respuesta al ligando, en el caso del AHT, es menor que cuando se transfecta el TR β salvaje.

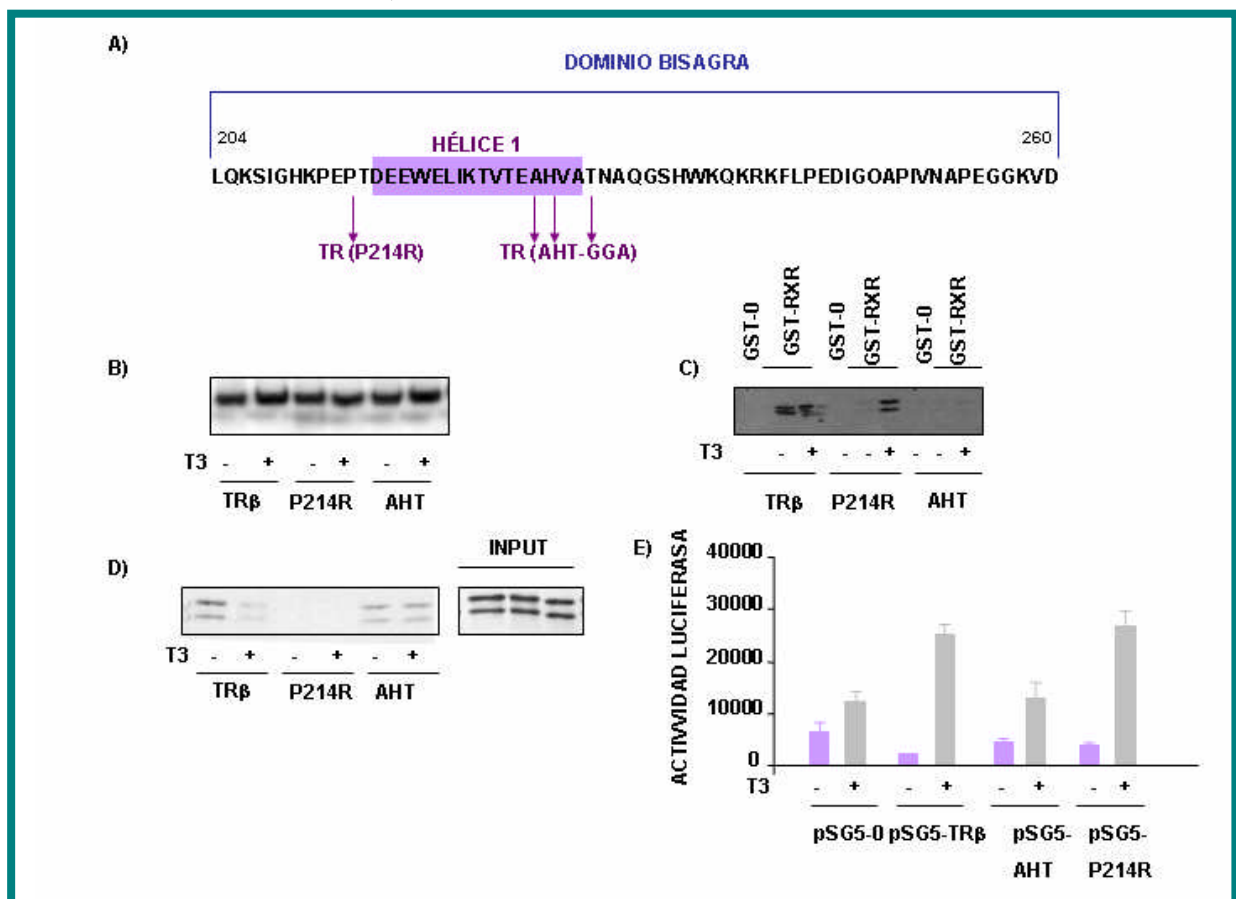


Fig 8. Caracterización de distintos mutantes de TR β que impiden la unión de correpresores. A)

Representación esquemática de las mutaciones. **B)** Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) empleando como oligonucleótido un elemento de respuesta DR4 consenso. Se han empleado 1 μ l de los mutantes del TR β y del receptor RXR traducidos in vitro. En los casos indicados se ha realizado el tratamiento con 1 μ M T3. **C)** Ensayo de interacción proteína-proteína (pull-down) entre los distintos mutantes y el RXR. Se ha empleado 1 mg de GST-RXR y 3 μ l de los mutantes de TR β traducidos in vitro. En los casos indicados se incubó la mezcla con 1 μ M T3. **D)** Análogo a C) empleando GST-SMRT para analizar la interacción con correpresores. **E)** Las células HepG2 fueron cotransfectadas con 250 ng del plásmido Δ MMTV-TRE pal luc, 20 ng de los vectores de expresión de los distintos mutantes del receptor de hormonas tiroideas y 30 ng del plásmido TK-Renila. Las células se trataron durante 36 h con 5 nM T3.

Mutaciones en el dominio de unión al ligando (LBD)

El mutante **TR β E452Q** presenta una mutación puntual en la hélice 12 del LBD disminuyendo ligeramente la unión del ligando T3 y el reclutamiento de coactivadores. El receptor **TR β K288I** presenta una mutación puntual en la hélice 3 que afecta a la interacción con coactivadores (Collingwood y cols., 1998). Estos mutantes no presentan alterada su unión al ADN, tal y como comprobamos realizando ensayos de retardo de la movilidad electroforética (Fig 9A). Estas mutaciones tampoco afectan a la unión al receptor nuclear RXR ni al correpresor SMRT en ensayos de interacción proteína-proteína pull-down (Fig 9B y C). Además, tal y como se observa en la forma salvaje del receptor de hormonas tiroideas, el tratamiento con el ligando T3 produce la liberación de los correpresores.

En ensayos de transfección transitoria de un elemento de respuesta a hormona tiroideas palindrómico (Δ MMTV-TRE pal) comprobamos que, al transfectar estos mutantes de unión con coactivadores, no se observa la activación de la transcripción en respuesta al ligando (Fig 9D).

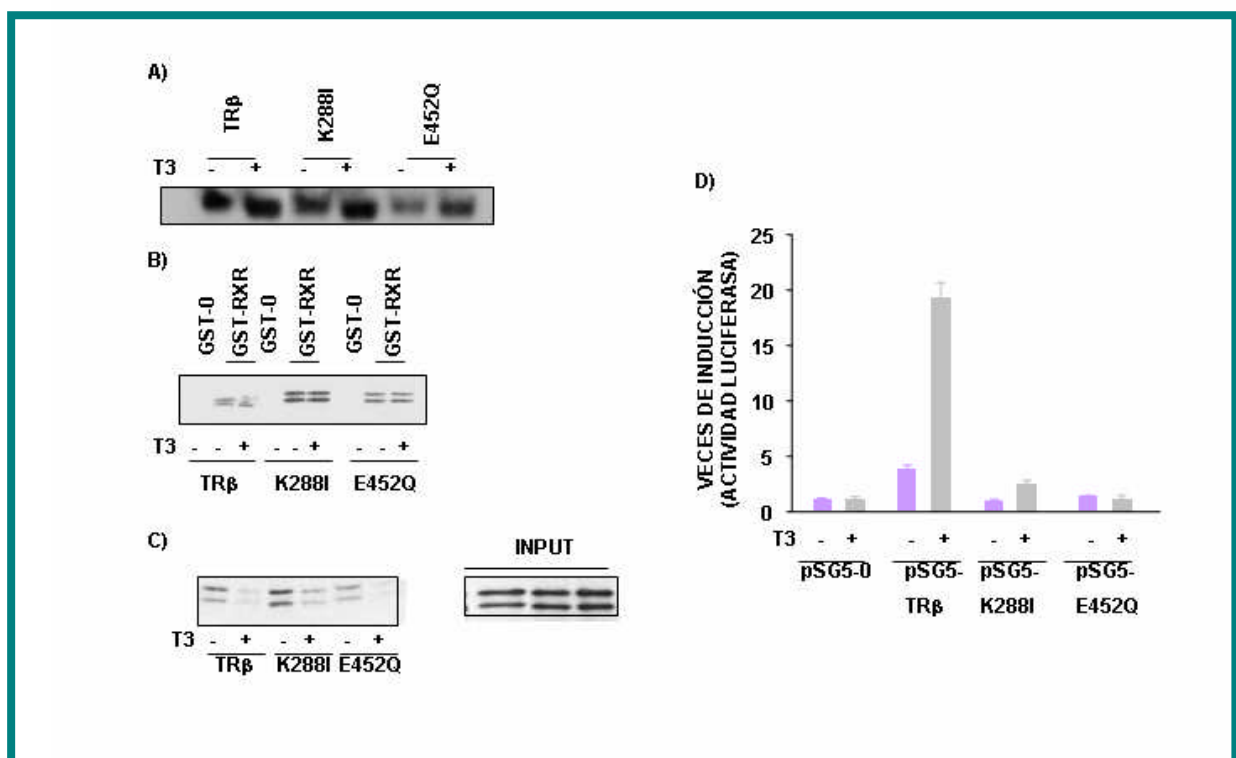


Fig 9. Caracterización de distintos mutantes en el LBD de TR β . **A)** Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) empleando como oligonucleótido un elemento de respuesta DR4 consenso. Se han empleado 1 μ l de los mutantes del TR β y de RXR traducidos in vitro. En los casos indicados se ha realizado el tratamiento con 1 μ M T3. **B)** Ensayo de interacción proteína-proteína (pull-down) entre los distintos mutantes y el receptor de retinoides RXR. Se ha empleado 1 mg de GST-RXR y 3 μ l de los mutantes de TR β traducidos in vitro. En los casos indicados se incubó la mezcla con 1 μ M T3. **C)** Análogo a B) empleando GST-SMRT para analizar la interacción con correpresores. **D)** Las células HepG2 fueron cotransfectadas con 250 ng del plásmido Δ MMTV-TRE pal luc y 20 ng de los vectores de expresión de los distintos mutantes del receptor de hormonas tiroideas. Las células se trataron durante 36 h con 5 nM T3.

El antagonismo de T3 sobre la activación del promotor de ciclina D1 por V12 H-Ras es dependiente del DBD y de la hélice 1 del LBD.

Para analizar si el antagonismo de T3 sobre la activación del promotor de ciclina D1 por V12 H-Ras es dependiente de la integridad del DBD y del reclutamiento de correpresores, cotransfectamos de manera transitoria el promotor de ciclina D1 junto con los vectores de expresión para V12 H-Ras y las distintas formas mutadas del TR β , en células de hepatocarcinoma HepG2. Tal y como se observa en la Fig 10, tanto la integridad del dominio de unión al ADN del TR (Fig 10A) como de la hélice 1 implicada en el reclutamiento de correpresores (Fig 10B) son imprescindibles para la represión de la respuesta a Ras por la T3.

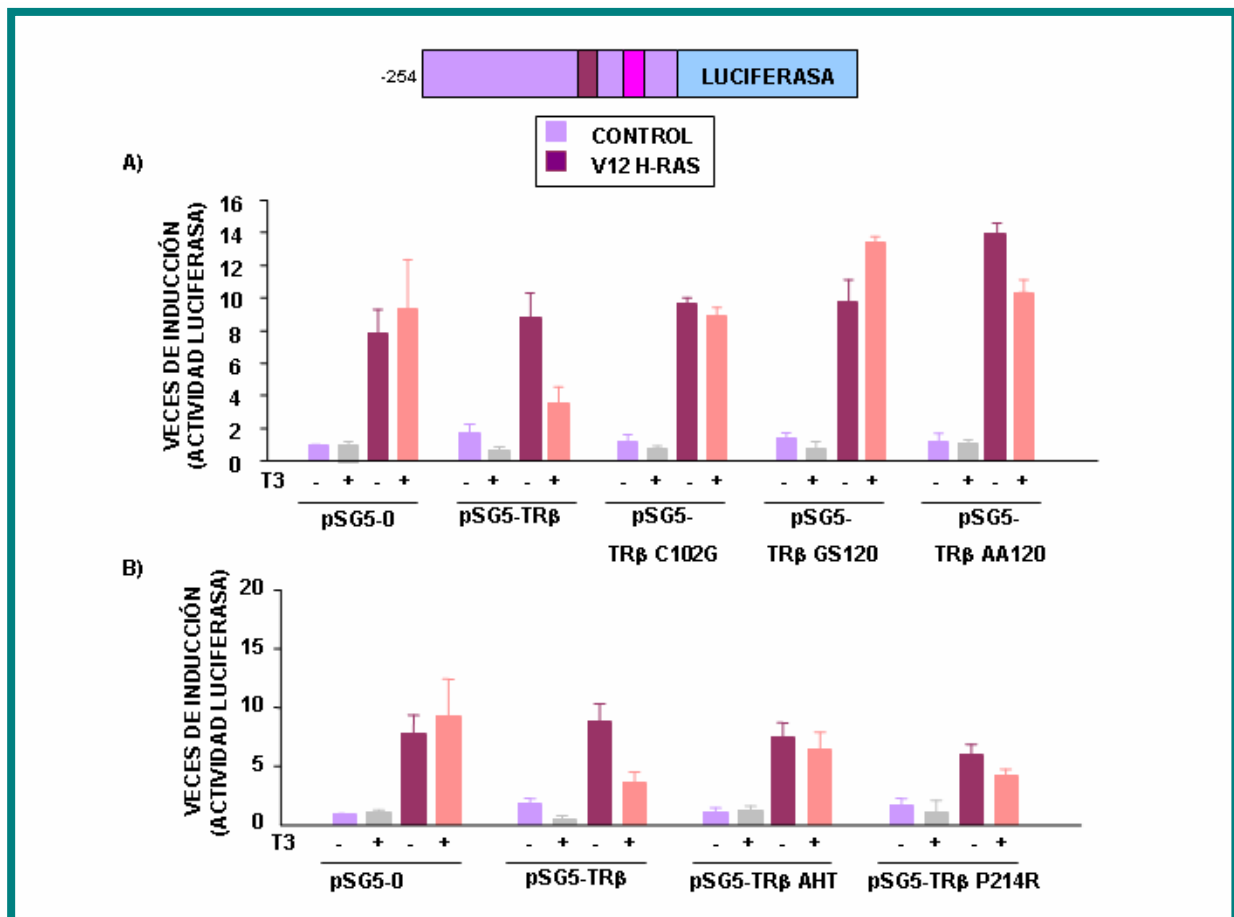


Fig 10. Efecto de mutantes en el DBD y en la helice 1 del LBD de TR β sobre la actividad del promotor de ciclina D1. A) Las células HepG2 fueron cotransfectadas con 200 ng de la construcción pD1- Δ 254 luc, 50 ng de pCEFL-V12 H-Ras o el vector vacío pCEFL, 20 ng de los distintos mutantes en el DBD de TR β o el vector vacío pSG5-0 y 50 ng de TK-Renila. Según se indica se incubaron las células durante 36 h con 5 nM T3 en condiciones de 0,1% SFB – T3. **B)** Análogo a A) transfectando los mutantes de interacción con correpresores. Los resultados se expresan como veces de inducción respecto a las células transfectadas con los vectores vacíos pSG5-0 y pCEFL.

Dado que el factor de transcripción ATF-2 está implicado en la activación del promotor de ciclina D1 dependiente de Ras, y que el tratamiento con la hormona T3 inhibe la transcripción mediada por ATF-2, examinamos si la expresión de los distintos mutantes presenta el mismo efecto sobre la actividad transcripcional de ATF-2 que la del TR β silvestre. Para ello realizamos ensayos de tipo “un híbrido”, cotransfectando las células HepG2 con los distintos mutantes del TR β . De este modo analizamos la actividad del factor ATF-2 fusionado al DBD de Gal4 en esta línea celular. Tal y como se muestra en la [Figura 11A](#), el tratamiento con T3 es incapaz de reprimir la transactivación producida por el oncogén ras cuando se transfectan los distintos mutantes en el DBD en lugar de la forma silvestre del TR. La hormona tiroidea tampoco tiene ningún efecto cuando se transfectan los mutantes del receptor de hormonas tiroideas deficientes en el reclutamiento de correpresores ([Fig 11B](#)). Así pues, tanto la integridad del DBD del receptor como de la hélice 1, implicada en la interacción con correpresores, es imprescindible para que se aprecie el cross-talk entre la T3 y V12 H-Ras

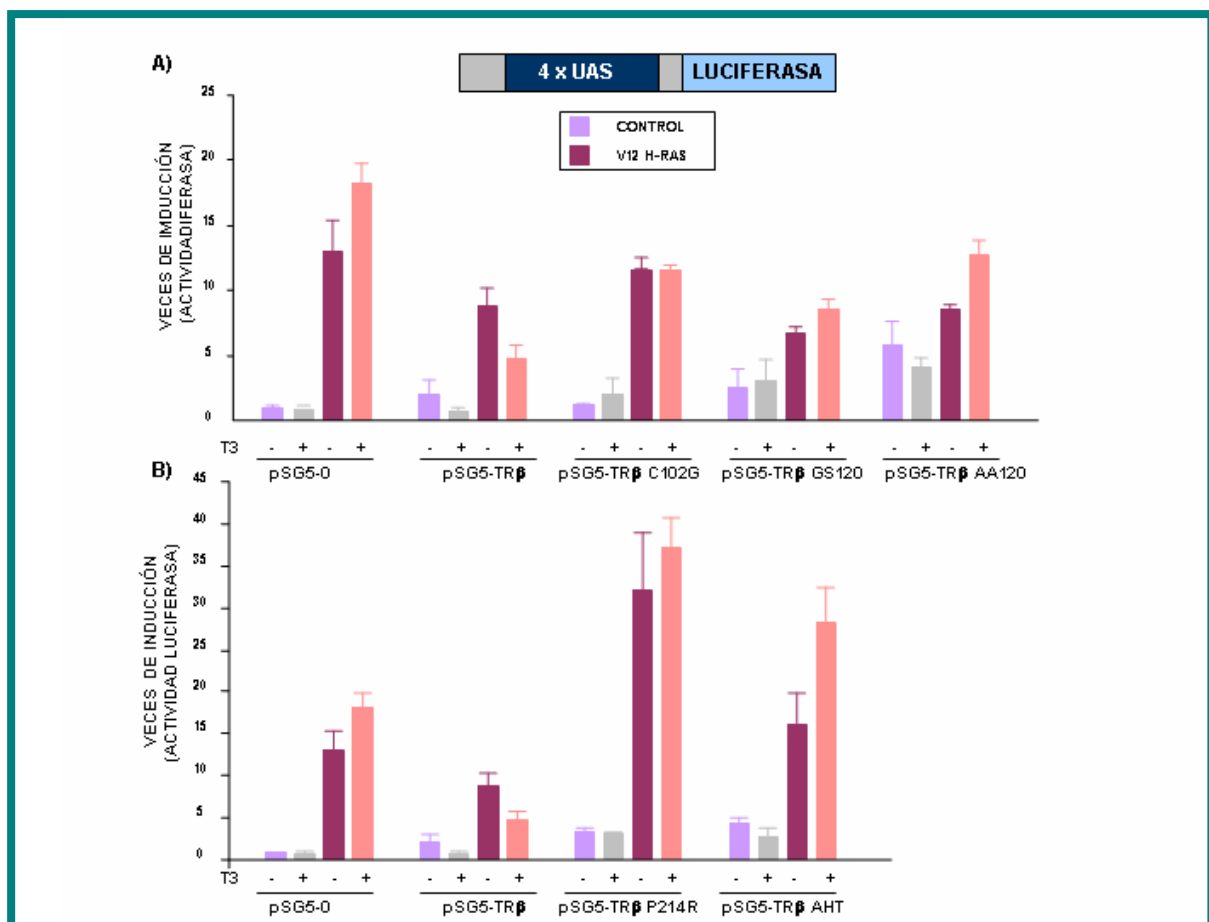


Fig 11. Efecto de mutantes en el DBD y en la helice 1 del LBD de TR β sobre la transactivación mediada por ATF-2. A) Las células HepG2 fueron cotransfectadas con 200 ng de la construcción pE1b 4xUAS-luc, 50 ng de V12 H-Ras, 20 ng de los distintos mutantes en el DBD de TR β y 50 ng de TK-Renila. En los casos indicados se incubaron las células durante 36 h con 5 nM T3 en medio con 0,1% SFB – T3. B) Análogo a A) transfectando los mutantes de interacción con correpresores. Los resultados se muestran como veces de inducción respecto a las células cotransfectadas con los vectores vacíos pCEFL y pSG5-0.

El efecto de TR β sobre la activación del promotor de ciclina D1 por Ras es independiente del reclutamiento de coactivadores

Analizamos también la importancia del reclutamiento de coactivadores para el efecto inhibitorio del receptor de hormonas tiroideas sobre la inducción del promotor de ciclina D1 por el oncogen Ras. Para ello cotransfectamos de manera transitoria el promotor de ciclina D1 junto con los vectores de expresión para V12 H-Ras y los mutantes TR β E452Q y TR β K288I. En la [Figura 12](#) se muestra como, al transfectar estos mutantes del receptor de hormonas tiroideas, se mantiene el efecto inhibitorio de la T3 sobre el promotor de ciclina D1, de manera que no parece necesaria la interacción con coactivadores para el antagonismo entre TR β y V12 H-Ras.

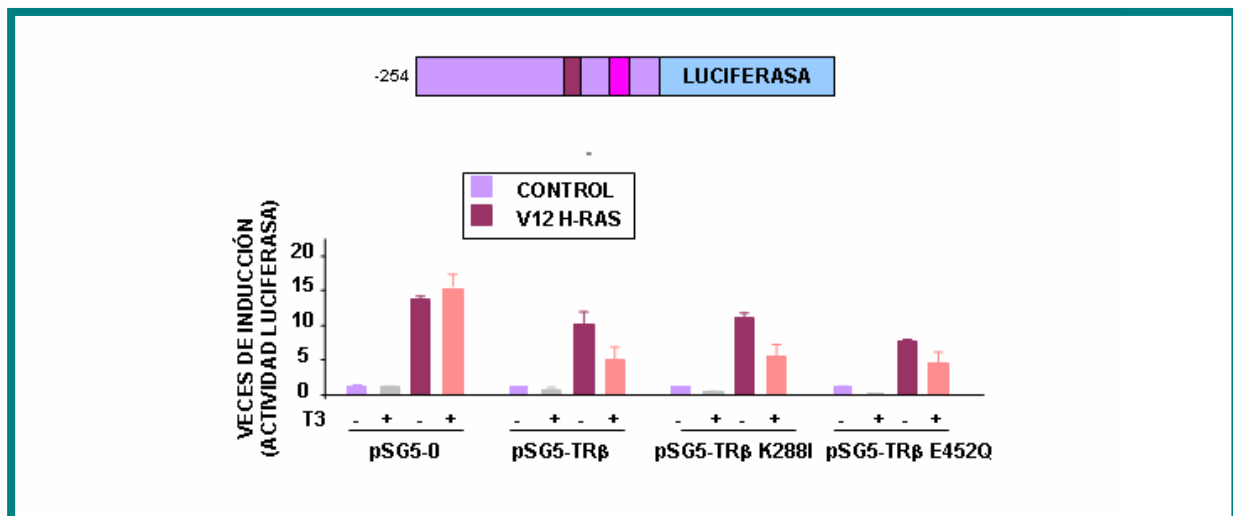


Fig 12. Efecto de mutantes en el LBD de TR β sobre la actividad del promotor de ciclina D1. Las células HepG2 fueron cotransfectadas con 200 ng de la construcción pD1- Δ 254 luc, 50 ng de V12 H-Ras o el vector vacío, 20 ng de los distintos mutantes en el LBD de TR β o el correspondiente vector vacío y 50 ng de TK-Renila. En los casos indicados se incubaron las células durante 36 h con 5 nM T3 en medio 0,1% SFB - T3. Los resultados se representan como veces de inducción respecto a los obtenidos en las células transfectadas con el vector vacío pCEFL.

Tal y como se muestra en la [Figura 13](#), en ensayos de tipo “un híbrido” con el plásmido de ATF-2 fusionado al DBD de Gal4, también observamos que la represión de la actividad transcripcional del factor

de transcripción ATF-2 causada por el tratamiento con la hormona tiroidea es independiente del reclutamiento de coactivadores. El tratamiento con T3 también inhibe la estimulación por el oncogén de la actividad transcripcional del factor ATF-2 en las células transfectadas con los mutantes K288I y E452Q.

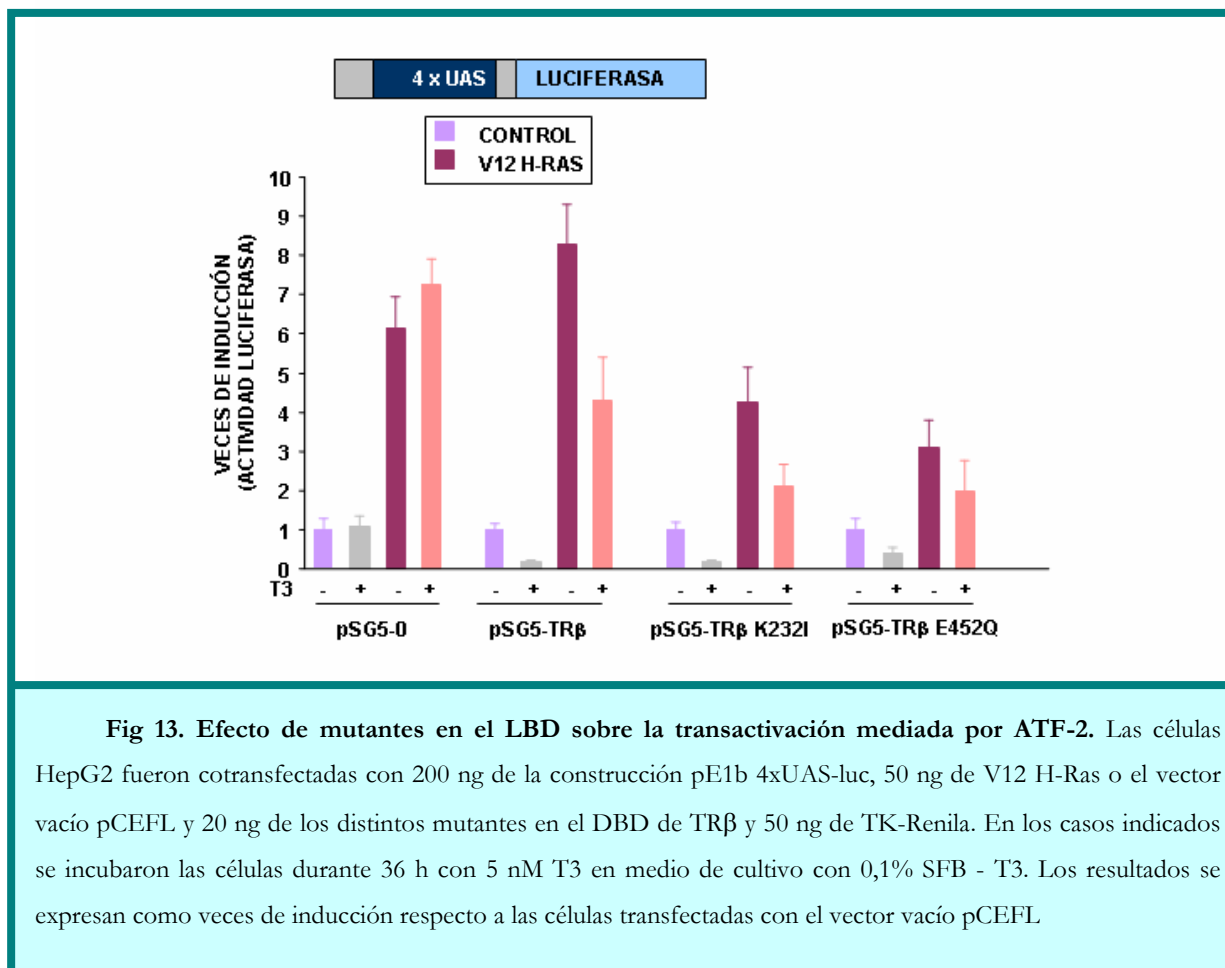


Fig 13. Efecto de mutantes en el LBD sobre la transactivación mediada por ATF-2. Las células HepG2 fueron cotransfectadas con 200 ng de la construcción pE1b 4xUAS-luc, 50 ng de V12 H-Ras o el vector vacío pCEFL y 20 ng de los distintos mutantes en el DBD de TRβ y 50 ng de TK-Renila. En los casos indicados se incubaron las células durante 36 h con 5 nM T3 en medio de cultivo con 0,1% SFB - T3. Los resultados se expresan como veces de inducción respecto a las células transfectadas con el vector vacío pCEFL

La inhibición de la transformación inducida por el oncogén ras en fibroblastos murinos NIH3T3 depende de la integridad del DBD y del reclutamiento de correpresores, mientras que no requiere la unión de coactivadores

La expresión de TRs y el tratamiento con su ligando T3, no sólo afecta a la inducción del promotor de ciclina D1 por V12 H-Ras. Recientemente se ha descrito en nuestro laboratorio que en fibroblastos murinos NIH3T3 el tratamiento con la hormona tiroidea reduce la formación de focos de transformación provocada por el oncogén V12 H-Ras (Garcia-Silva y Aranda., 2004).

Los ensayos de formación de focos de transformación en fibroblastos NIH3T3 se basan en la pérdida de la inhibición del crecimiento por contacto o densidad que presentan las células transformadas. Para investigar los dominios del TRβ implicados en la inhibición de la transformación mediada por el oncogén V12 H-Ras cotransfectamos los mutantes en los distintos dominios del receptor de hormonas tiroideas junto con este oncogén en los fibroblastos NIH3T3. La transfección de los distintos mutantes en el DBD indica que la integridad de este dominio es necesaria para la supresión de la transformación por

TR β en respuesta al tratamiento con el ligando T3 (Fig 14A). Al realizar estos mismos experimentos transfectando los mutantes de interacción con correpresores TR β AHT y P214R observamos que la interacción con correpresores también es necesaria para la supresión de la transformación por TR β en respuesta al tratamiento con el ligando T3 (Fig 14B). Por el contrario, tal y como se observa al transfectar los mutantes TR β E452Q y K288I, la interacción con coactivadores no parece necesaria para la supresión de la transformación por TR β en respuesta al tratamiento con la hormona, observándose una reducción en el número de focos de transformación al tratar con el ligando T3 similar a la obtenida cuando se transfecta la forma silvestre del receptor de hormonas tiroideas con el K288I y sólo parcialmente inhibida con el E452Q (Fig 14C).

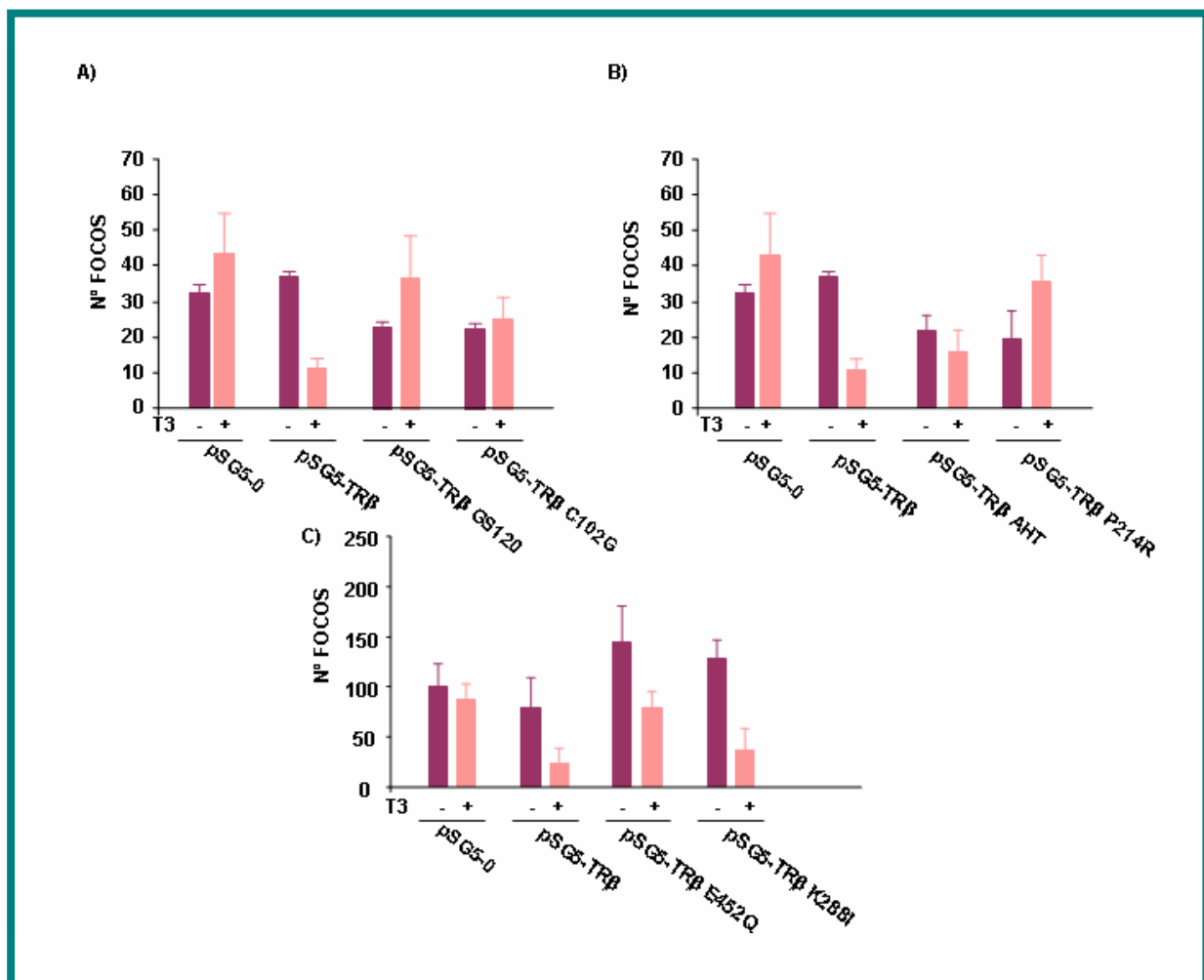


Fig 14. Efecto de los distintos mutantes de TR β sobre la transformación inducida por ras. A) Ensayo de formación de focos de transformación. Los fibroblastos NIH3T3 fueron transfectados con 50 ng de V12 H-Ras y 4 μ g del vector de expresión para los distintos mutantes en el DBD de TR β . Después de 14 h de la transfección se lavaron las células y se les cambió el medio de cultivo por medio deplecionado de hormonas tiroideas, añadiendo cuando se indica 5 nM T3. El medio y la hormona se renovaron cada 2 días. Después de 14 días las placas se lavaron con PBS, se fijaron con metanol y se tiñeron con GIEMSA, contabilizándose el número de focos visualmente. **B)** Análogo a A) transfectando los mutantes de unión a correpresores. **C)** Análogo a A) transfectando los mutantes del receptor en el LBD.

Generación de células establemente transfectadas con TR β

Dado que el receptor de hormonas tiroideas es capaz de inhibir la transformación y tumorigénesis mediada por el oncogen V12 H-Ras intentamos profundizar en el estudio del papel de TR β como supresor tumoral. Se han encontrado distintas evidencias que relacionan la expresión de los receptores de hormonas tiroideas (TRs) con el desarrollo y progresión de las enfermedades tumorales. De esta manera, se ha descrito la existencia de distintas mutaciones en los genes TR α y TR β en pacientes con patologías tumorales tales como hepatocarcinoma (Lin y cols., 1999) y cáncer de mama (Silva y cols., 2002). Además, se ha descrito que el promotor de TR β se encuentra hipermetilado en distintas líneas de cáncer de mama (Li y cols., 2002).

Para analizar el papel del TR β en la formación y progresión tumoral generamos, mediante infección viral, células de hepatocarcinoma humano **SK-hep1** y células de adenocarcinoma lobulillar de mama humano **MDA MB 468 PM1** que reexpresan, de manera estable, el receptor TR β o el vector vacío pLPCX. Empleamos estos dos modelos dada la alta incidencia de alteraciones en la expresión de TRs en ambas patologías y debido también a que ambas líneas celulares carecen de expresión endógena de TRs. Analizamos los niveles de expresión de TR β mediante western blot y RT-PCR cuantitativa, observando que los niveles de expresión de las células transfectadas de manera estable con el receptor TR β eran muy similares a los niveles detectados en células que sí expresan TR β de manera endógena tales como las células de neuroblastoma de ratón transfectadas de manera estable con TR β N2a β (Lebel y cols., 1997) (Fig 15A, B). Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que los niveles de expresión de TR β en la línea celular N2a β son similares a los de la línea celular hipofisaria GH4, que presenta expresión endógena de TRs. Para analizar la funcionalidad del TR β incorporado en las células SK-hep1 y MDA MB 468 PM1 realizamos ensayos de transactivación, transfectando de manera transitoria un TRE palindrómico (Δ MMTV-TRE pal). Tal y como se muestra en la Figura 15C, el tratamiento con el ligando T3 produce, en ambos modelos celulares, un incremento de la transcripción en aquellas células que expresan TR β con respecto a las células transfectadas con el vector vacío.

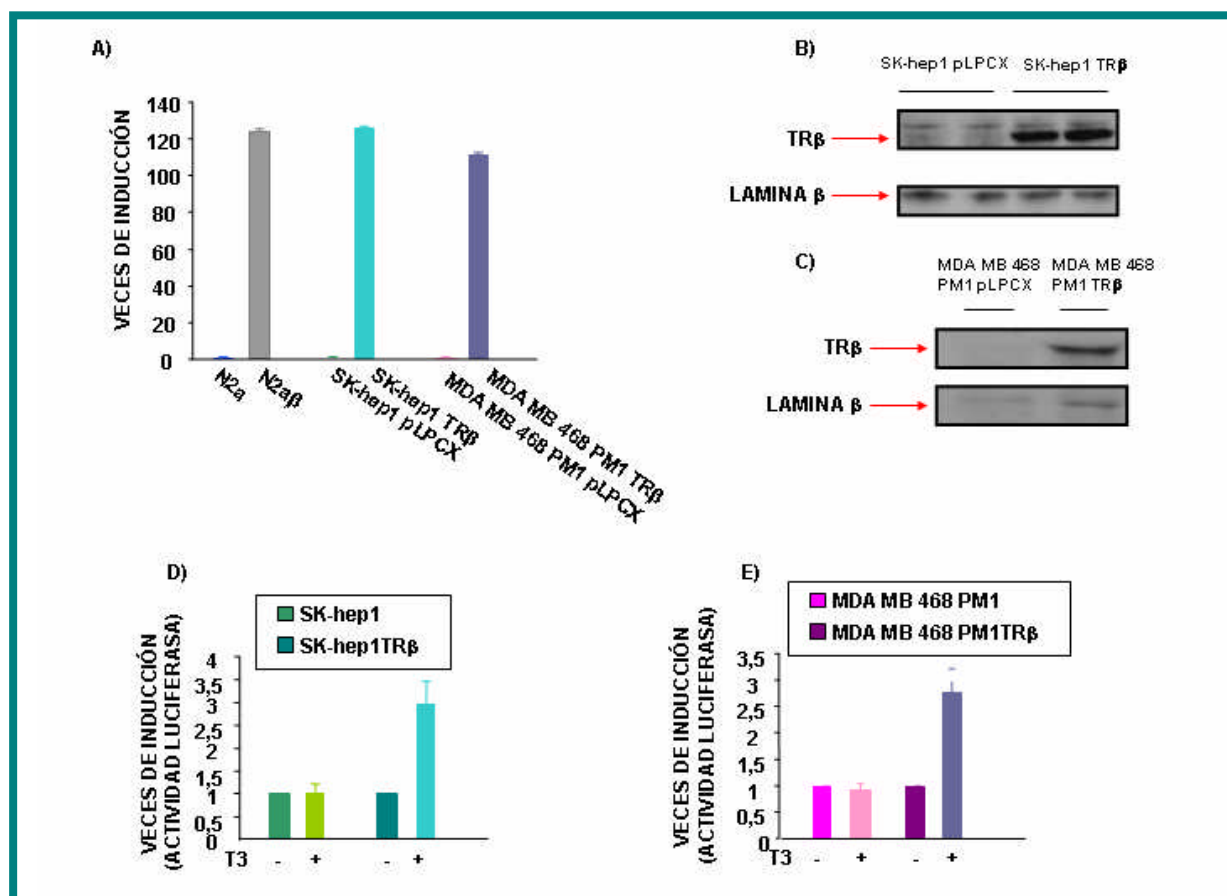


Fig 15. Niveles de expresión de TRβ en las células SK-hep1 y MDA MB 468 PM1 transfectadas de manera estable. A) Niveles de expresión del receptor de hormonas tiroideas analizados mediante RT-PCR cuantitativa en las líneas celulares indicadas. **B)** Western blot de TRβ en la línea celular SK-hep1 transfectada de manera estable con el vector vacío pLPCX o con el vector de expresión para TRβ. **C)** Análogo a B) en la línea celular MDA MB 468 PM1. **D)** Ensayo de transactivación en la línea celular SK-hep1 transfectada de manera estable con el vector vacío pLPCX o con TRβ. Las células fueron transfectadas de manera transitoria con 500 ng de ΔMMTV-TRE pal luc y 20 ng de TRβ e incubadas durante 36 h con 5 nM T3. **E)** Análogo a D) en células MDA MB 468 PM1. Los datos se han representado como veces de inducción relativas a la actividad luciferasa en presencia del vector vacío y en ausencia de T3.

La expresión de TRβ reduce la formación de tumores *in vivo* por células de hepatocarcinoma humano SK-hep1

Para estudiar *in vivo* el efecto del receptor de hormonas tiroideas sobre la formación y crecimiento tumoral inoculamos las células SK-hep1 pLPCX y SK-hep1 TRβ, de manera subcutánea, según un modelo de inoculación heterotópica, en el flanco de ratones atímicos desnudos. Estudiamos el tiempo que tardaban en aparecer los tumores, así como el crecimiento de los mismos. De esta manera observamos que existe un retraso en la formación de los tumores en los ratones en los que se han inoculado las células que expresan el receptor. 10 días después de la inoculación, aproximadamente el 30%

de los animales inoculados con las células de hepatocarcinoma SK-hep1 presentaban tumores de más de 0,3 cm de diámetro. Por el contrario, ninguno de los animales inoculados con células de hepatocarcinoma que expresan el receptor de hormonas tiroideas (SK-hep1 TR β) presentaba lesiones tumorales hasta 15 días después de la inoculación. A los 15 días de la inoculación, la aparición de tumores es aproximadamente 3 veces menor en los animales inoculados con células que expresan TR β (Fig 16A). A partir de este punto la incidencia de tumores se iguala en ambos grupos, llegando a afectar al 100% de los animales a los 25 días de la inoculación.

El efecto del TR sobre la tumorigénesis es aun más evidente cuando analizamos el volumen de los tumores. En este análisis se aprecia que los tumores presentan un menor volumen cuando se han formado a partir de células SK-hep1 TR β (Fig 16B), no igualándose los tamaños hasta 25 después de la inoculación. De este modo no sólo son más evidentes las diferencias en el tamaño de los tumores entre los grupos, sino que estas diferencias también permanecen hasta más tarde en el tiempo.

Para estudiar la importancia del ligando en este retraso de la formación y crecimiento tumoral, indujimos un estado de hipotiroidismo en los animales mediante tratamiento con drogas antitiroideas. En estas condiciones se aprecia un mayor retraso en la aparición de los primeros tumores detectados en los animales. No se detectan los primeros tumores hasta 15 días después de la inoculación, momento en el que se detectan lesiones carcinomatosas en el 40% de los animales inoculados con células que no expresan TR β . A este tiempo ningún animal inoculado con células que expresan TR β presenta tumores, no apareciendo los primeros tumores hasta el día 25 después de la inoculación. En condiciones de hipotiroidismo se aprecia que el efecto protector del receptor es mayor y persiste hasta más tarde en el tiempo. Los animales se sacrificaron a los 30 días de la inoculación y en ese momento el porcentaje de animales con tumores todavía es aproximadamente un 50% menor en el caso de la inoculación de células que expresaban TR β (Fig 16C).

En estos animales en los que se ha inducido un estado de hipotiroidismo, se aprecia también un mayor efecto protector de TR β cuando analizamos los volúmenes de los tumores. Estos volúmenes no se han igualado tampoco en el momento de sacrificar los animales (Fig 16D). Además, los tumores originados por las células que expresaban TR β presentan un menor tamaño en condiciones de hipotiroidismo que en los animales que presentan unos niveles fisiológicos de hormonas tiroideas.

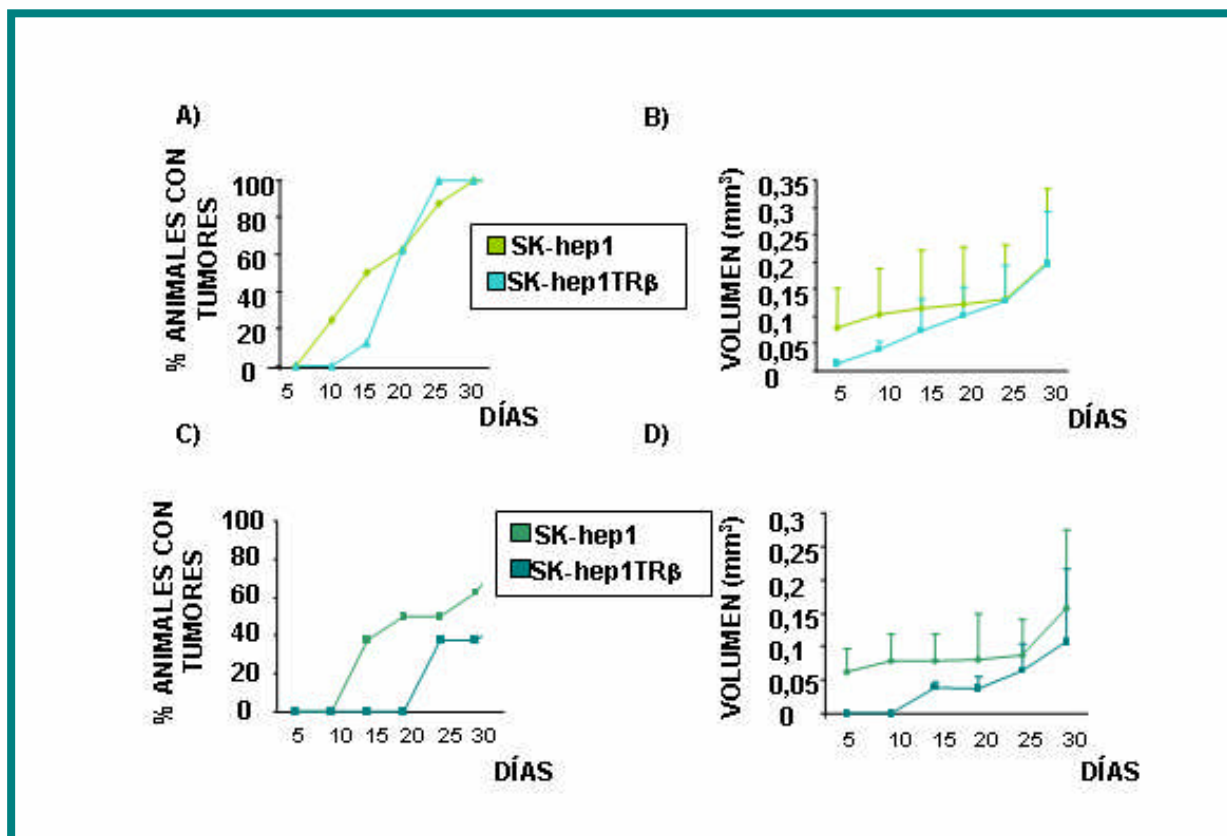


Fig 16. Inoculación heterotópica de células SK-hep1 y SK-hep1 TRβ en ratones atímicos desnudos.

A) Se inocularon de manera subcutánea en el flanco de ratones atímicos desnudos 1×10^6 células de hepatocarcinoma SK-hep1 pLPCX y SK-hep1 TRβ y se monitorizó el tiempo que tardaban en aparecer los tumores en ratones eutiroides. **B)** Representación gráfica del aumento del volumen de los tumores en ratones eutiroides. **C)** Análogo a A) en ratones hipotiroideos. **D)** Análogo a B) en ratones hipotiroideos.

La expresión de TRβ disminuye a lo largo del periodo de crecimiento de los tumores originado por las células SK-hep1 TRβ

In vitro observamos que en las células de hepatocarcinoma SK-hep1 que han sido transfectadas de manera estable con TRβ, los niveles de expresión del receptor se van reduciendo a lo largo de los sucesivos pases del cultivo celular (dato no mostrado). Dado que las diferencias entre los grupos SK-hep1 pLPCX y SK-hep1 TRβ en el porcentaje de animales con tumores, así como en el volumen de los mismos, disminuye con el tiempo de una manera similar a lo que se observa en el cultivo *in vitro* de las células inoculadas, analizamos por inmunohistoquímica los niveles de expresión de TRβ en los tumores extraídos de los animales el día 30. De esta manera comprobamos que ya no se detecta la expresión de TRβ en ninguno de los tumores analizados, independientemente de que las células inoculadas fueren SK-hep1 pLPCX y SK-hep1 TRβ. Como control de la inmunohistoquímica comprobamos que en distintas células del animal huésped, como por ejemplo los adipocitos, sí se detecta expresión del receptor de hormonas tiroideas (Fig 17A).

Para caracterizar en qué momento del crecimiento tumoral se produce esta pérdida de expresión de TR β , así como si se correlaciona en el tiempo con el momento en el que empieza a igualarse el porcentaje de animales con tumores en los distintos grupos, analizamos los niveles de expresión de TR β por western blot e inmunofluorescencia a lo largo de la progresión del tumor. Para ello obtuvimos cultivos celulares a partir de explantes de los tumores a distintos tiempos (Fig 17B). A los 13 días de la inoculación los niveles del receptor detectados por western blot son ya muy inferiores a los de las células que se inocularon en los animales, y al cabo de 25 días los niveles de TR β estaban disminuídos drásticamente, siendo prácticamente inexistentes. La misma disminución de la expresión de TR β observada en el western blot también se detectó, tal y como se muestra en la Fig 17C, cuando realizamos inmunofluorescencia con este mismo anticuerpo, en los cultivos obtenidos a los 13 y 25 días de la inoculación. De este modo comprobamos que existe una clara correlación en el tiempo entre la aparición y el crecimiento del tumor y la disminución de los niveles de expresión TR β . Las células que proliferan y dan lugar a los tumores que se detectan al final en los animales, en el grupo de ratones inoculados con células SK-hep1 TR β , parecen ser aquellas que expresan menores niveles del receptor de hormonas tiroideas.

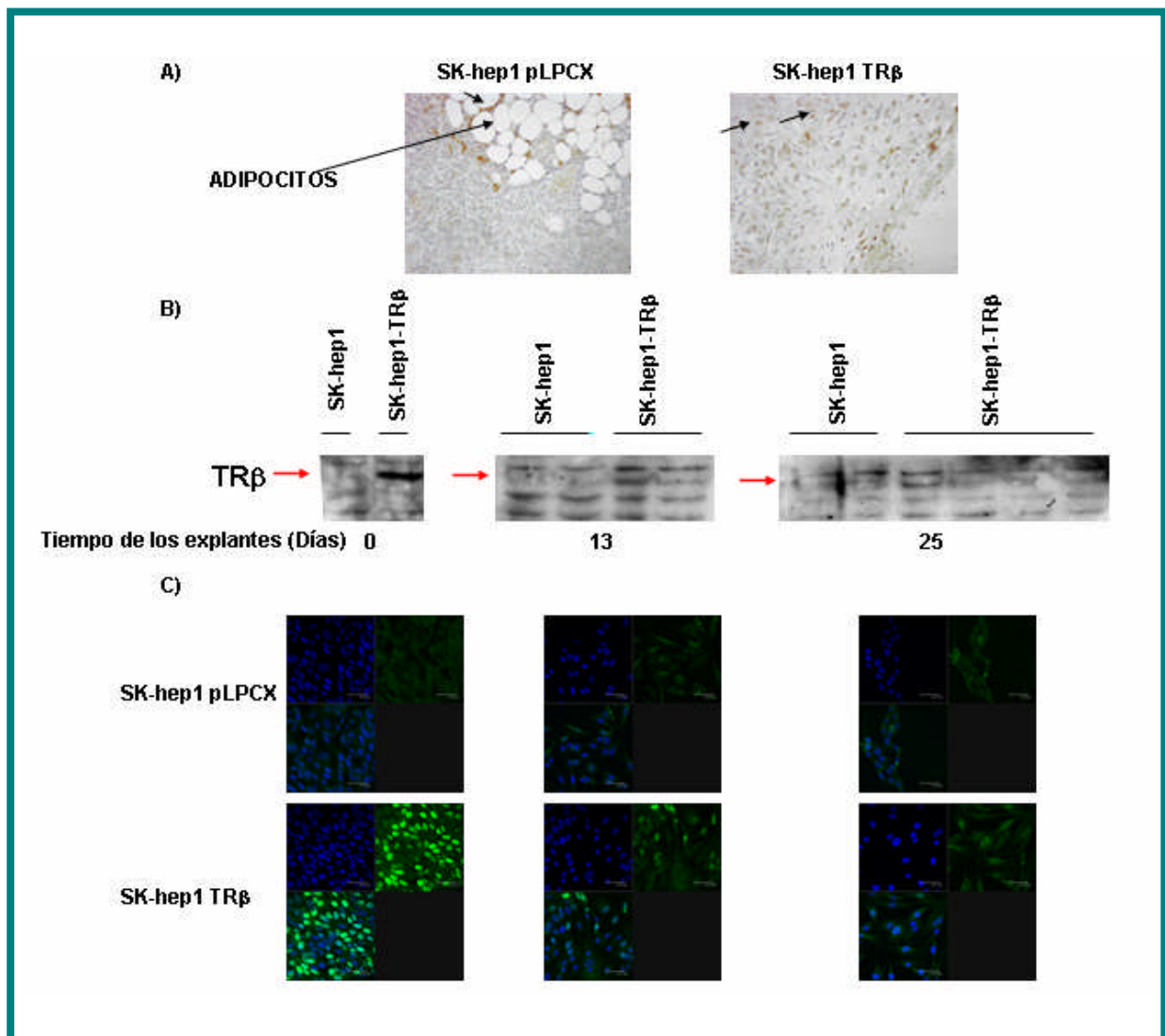


Fig 17. Niveles de expresión de TR β en los tumores originados por las células de hepatocarcinoma humano SK-hep1. A) Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-TR β en los tumores originados en el flanco de ratones atímicos desnudos. Las flechas indican tinción positiva o trazas de expresión de TR β . **B)** Western blot con el anticuerpo anti-TR β en los cultivos celulares obtenidos de explantes de los tumores a los tiempos indicados después de la inoculación. **C)** Inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-TR β en los cultivos celulares obtenidos de explantes de los tumores a distintos tiempos de la inoculación.

La expresión de TR β previene la formación de tumores *in vivo* por células de adenocarcinoma de mama humano MDA MB 468 PM1

Las células de adenocarcinoma lobulillar de mama MDA MB 468 PM1 son células con una alta capacidad tumorigénica, invasiva y metastásica. Con el objetivo de determinar si la expresión de TR β inhibe la formación de tumores *in vivo* en otros modelos celulares distintos al modelo de hepatocarcinoma, inoculamos las células MDA MB 468 PM1 pLPCX y MDA MB 468 PM1 TR β en ratones atímicos desnudos. Las células se inyectaron, mediante una intervención quirúrgica, en la grasa de la mama de los animales siguiendo un modelo ortotópico de inoculación. Con este modelo de inoculación se simula de una manera menos artificial la progresión del tumor, permitiendo analizar la influencia de los distintos factores secretados por el microentorno del tumor sobre el crecimiento y fenotipo tumoral, ya que el tumor se origina en el lugar concreto dónde se desarrolla de manera natural.

Al estudiar la aparición de los tumores tras la inoculación de estas células observamos que en este modelo celular la presencia del receptor TR β también retrasa la formación de los tumores y da lugar a tumores de un menor tamaño. En este modelo el efecto protector del receptor es mayor que en las células de hepatocarcinoma SK-hep1. La inoculación de las células MDA MB 468 PM1 directamente en la grasa de la mama da lugar a tumores que aparecen a los 10 días, si bien la incidencia es del 50% en animales inoculados con células parentales y del 25% cuando se han inoculado células que expresan el receptor de hormonas tiroideas (Fig 18A). A partir del día 15 de la inoculación la incidencia de los tumores en los animales prácticamente se iguala de manera independiente a la expresión de TR β , llegando a ser del 100% a partir del día 25.

Al estudiar el volumen de los tumores se aprecia que desde el principio existe una clara diferencia en el tamaño de los tumores entre los dos grupos de animales y que esta diferencia se mantiene hasta el momento de su extirpación. La inhibición del volumen de los tumores por la expresión de TR β supera el 50% en todo momento del crecimiento tumoral (Fig 18B).

Cuando se induce un estado de hipotiroidismo en los ratones, comprobamos que en este modelo celular apenas se aprecia el efecto protector del receptor de hormonas tiroideas cuando analizamos el porcentaje de animales con tumores (Fig 18C). Al estudiar el volumen de los tumores comprobamos que la expresión de TR β reduce el volumen de los tumores aunque en menor medida que en los animales eutiroideos. Además, este efecto protector desaparece a los 30 días de la inoculación (Fig 18D).

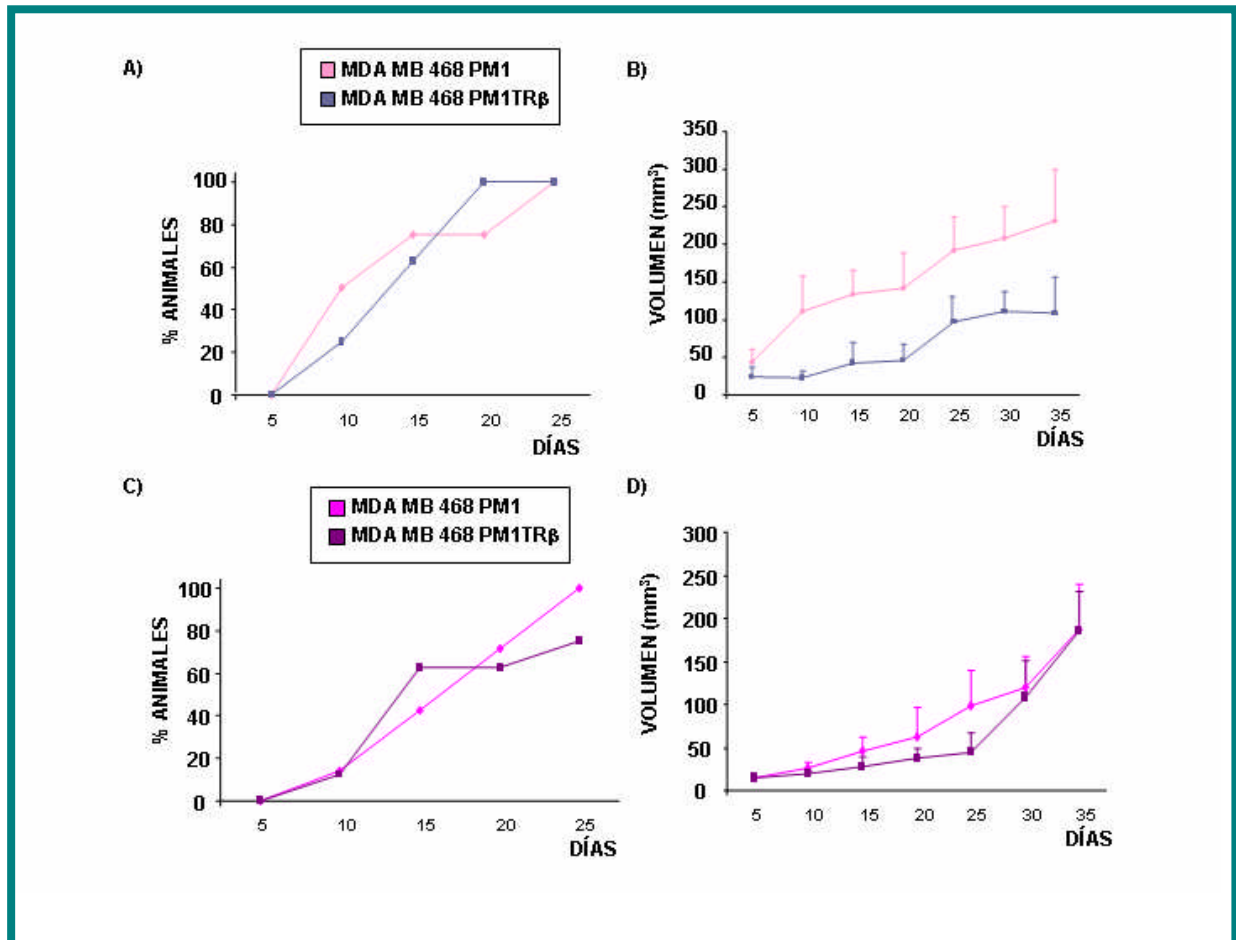


Fig 18. Inoculación ortotópica de células MDA MB 468 PM1 y MDA MB 468 PM1 TR β en ratones atímicos desnudos. Se inocularon en la grasa de la mama de ratones atímicos desnudos 1×10^6 células de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1 pLPCX y MDA MB 468 PM1 TR β . **A)** Se monitorizó el tiempo que tardaban en aparecer los tumores en ratones eutiroides. Se representa hasta el día en el que se detectan tumores en el 100% de los animales. **B)** Representación gráfica del volumen de los tumores que se desarrollan en animales eutiroides. **C)** Análogo a A) en animales hipotiroides. **D)** Análogo a B) en animales hipotiroides.

La expresión de TR β se mantiene a lo largo del crecimiento de los tumores originado por las células MDA MB 468 PM1 TR β

Al igual que en el modelo de hepatocarcinoma, en cultivos *in vitro* de las células MDA MB 468 PM1 observamos que en las células que han sido transfectadas de manera estable con TR β , los niveles de expresión del receptor se van reduciendo a lo largo de los sucesivos pases del cultivo celular (dato no mostrado). Al examinar los niveles de expresión de TR β mediante inmunohistoquímica en los tumores de los animales inoculados con las células de adenocarcinoma de mama se aprecia, a diferencia de lo que ocurre en los tumores originados por las células SK-hep1, que la expresión de TR β se mantiene en el día 35 al extirpar los tumores (Fig 19A). Este resultado se corroboró analizando mediante western blot la

expresión de TR β en cultivos celulares obtenidos a partir de explantes de los tumores obtenidos en ese momento (Fig 19B).

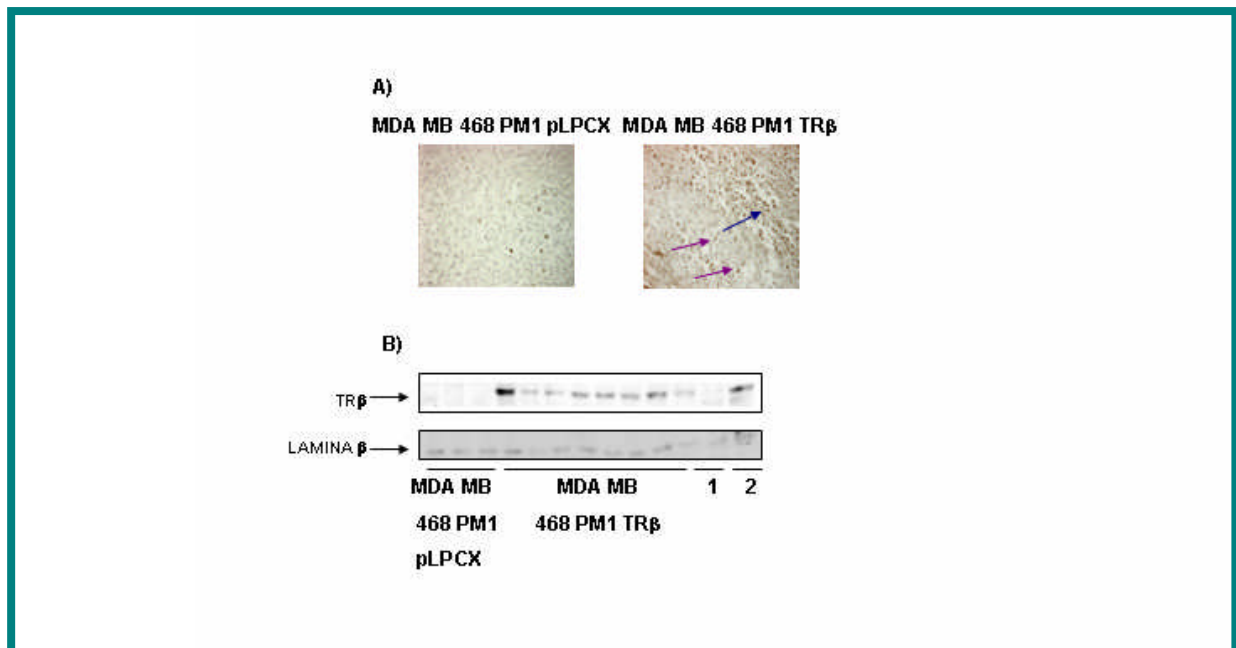


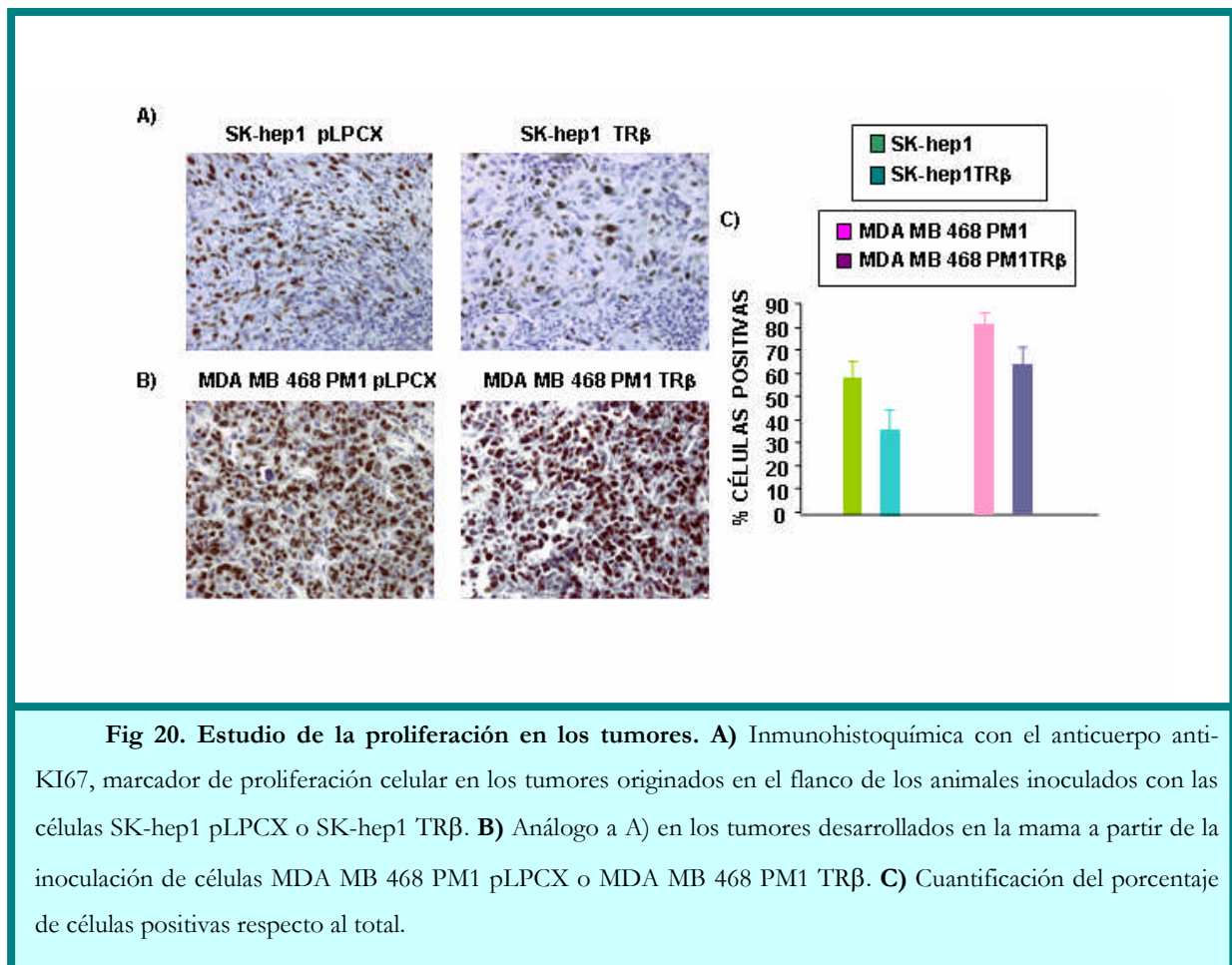
Fig 19. Análisis de los niveles de expresión de TR β en los tumores originados por las células de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1. A) Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-TR β en los tumores desarrollados en la mama de los ratones inoculados con las células MDA MB 468 PM1 pLPCX y MDA MB 468 PM1 TR β a los 35 días de la inoculación. Las flechas moradas indican trazas de tinción positiva en las células tumorales. Las flechas azules indican tinción positiva en células del estroma del entorno del tumor. **B)** Western blot con el anticuerpo anti-TR β realizado en los cultivos celulares obtenidos de explantes de los tumores realizados en el momento de extirpar los tumores (día 35). Se emplearon explantes de 3 animales inoculados con las células parentales y de 8 animales inoculados con células que expresaban TR β . El n° 1 representa a las células MDA MB 468 PM1 pLPCX inoculadas en los animales, y el n° 2 a las células MDA MB 468 PM1 TR β .

El hecho de que en el modelo de hepatocarcinoma se pierda la expresión del receptor de hormonas tiroideas aproximadamente en el momento en el que se iguala la aparición y tamaño de los tumores entre los dos grupos, a diferencia de lo que ocurre en el modelo de adenocarcinoma de mama, es coherente con el hecho de que en los tumores desarrollados por las células MDA MB 468 PM1 el efecto protector de TR β sobre el volumen de los tumores sea más potente y se aprecie hasta más tarde en el tiempo.

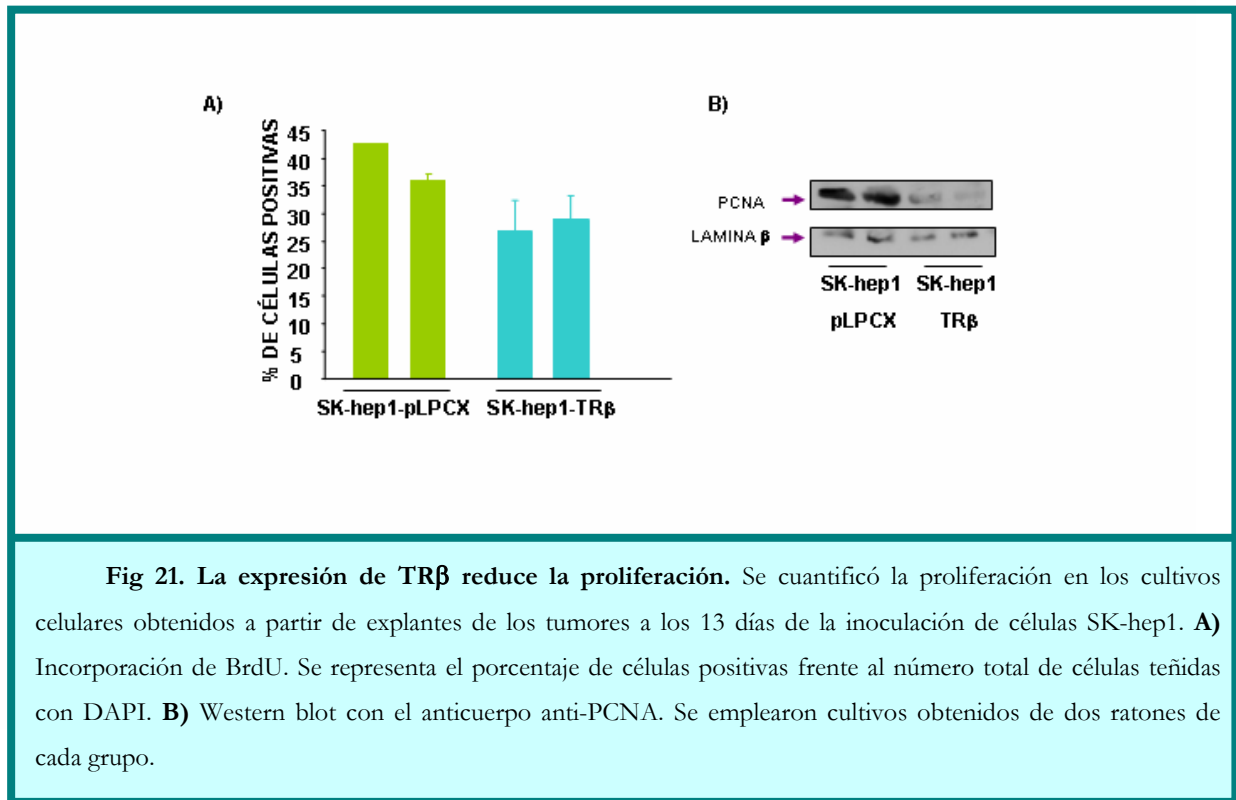
La expresión de TR β reduce la proliferación de los tumores

Dado el efecto del receptor de hormonas tiroideas como supresor tumoral que observamos *in vivo*, analizamos el grado de proliferación en los distintos tumores, realizando inmunohistoquímicas con un anticuerpo contra el marcador de proliferación KI67. En las inmunohistoquímicas de los tumores subcutáneos originados por las células de hepatocarcinoma observamos un descenso de la proliferación en

los tumores originados por células que expresaban el receptor de hormonas tiroideas que alcanza el 40% (Fig 20A, C). En el caso de los tumores desarrollados en la mama el efecto inhibitor del TR β sobre la proliferación de estas células es mucho menor, alcanzando el 20% (Fig 20B, C). Por tanto, aunque en ambos modelos se observa que la proliferación está disminuida en los tumores originados por células que expresaban TR β , el efecto del receptor es más evidente en el modelo de hepatocarcinoma. Los tumores originados por las células MDA MB 468 PM1 han sido extraídos cuando presentaban un gran volumen y por tanto presentan un alto índice de proliferación de manera independiente a la expresión del receptor.



En las células de hepatocarcinoma apenas se aprecian diferencias en el tamaño del tumor en el momento de sacrificar a los animales y extirpar los tumores. Con el objetivo de comprobar si las diferencias en el grado de proliferación son mayores cuando la diferencias en el volumen de los tumores entre los grupos es mayor, analizamos la proliferación en los explantes a día 13 de la inoculación. En este momento aún se mantiene la expresión de TR β y se aprecian las mayores diferencias en el volumen de los tumores. Analizamos, en los cultivos celulares obtenidos a partir de los explantes de los tumores, la incorporación *in vitro* de BrdU y analizamos mediante western blot los niveles de expresión del marcador de proliferación PCNA. En estos cultivos celulares se observa que las células que expresan TR β presentan una disminución en la incorporación de BrdU de, aproximadamente, un 30% (Fig 21A), así como una drástica disminución de la expresión del marcador de proliferación PCNA (Fig 21B).



La expresión de TRβ reduce la angiogénesis y aumenta el área necrótica de los tumores.

La supervivencia y crecimiento de las células tumorales depende de un adecuado suministro de oxígeno y nutrientes, así como de la eliminación de las sustancias tóxicas que se producen en la célula. Para ello, a medida que aumenta el tamaño del tumor se necesita la creación de nuevos vasos sanguíneos que lo irrigen. Este proceso se conoce con el nombre de **angiogénesis** (Folkman y cols., 1986). Además, al haber nuevos vasos en el tumor, el proceso de angiogénesis también favorece el proceso de intravasación de las células tumorales en el torrente circulatorio para su posterior diseminación por el cuerpo y colonización de nuevos órganos diana para la formación de metástasis.

En los tumores originados a partir de las células de hepatocarcinoma SK-hep1 apenas se aprecia la formación de nuevos vasos sanguíneos, siendo el área necrótica central de un gran tamaño. Cuantificamos el tamaño del área necrótica respecto al área tumoral total comprobando que era aproximadamente un 30% superior en aquellos tumores originados por células SK-hep1 que expresaban TRβ que en los formados por las células parentales (Fig 22A, B).

Para determinar el grado de angiogénesis de los tumores realizamos inmunohistoquímicas, empleando el anticuerpo contra el marcador de endotelios CD31, en los distintos tumores originados por las células de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1 pLPCX y MDA MB 468 PM1 TRβ. En los distintos tumores de mama se aprecia la existencia de un proceso de angiogénesis, detectándose la formación de nuevos vasos. El grado de angiogénesis (nº vasos neoformados/área del campo) es bajo en todos los tumores, detectándose una gran área necrótica central. De todas maneras, el grado de

angiogénesis es claramente inferior, aproximadamente un 40%, en los tumores formados por células que expresan TR β (Fig 22C, D).

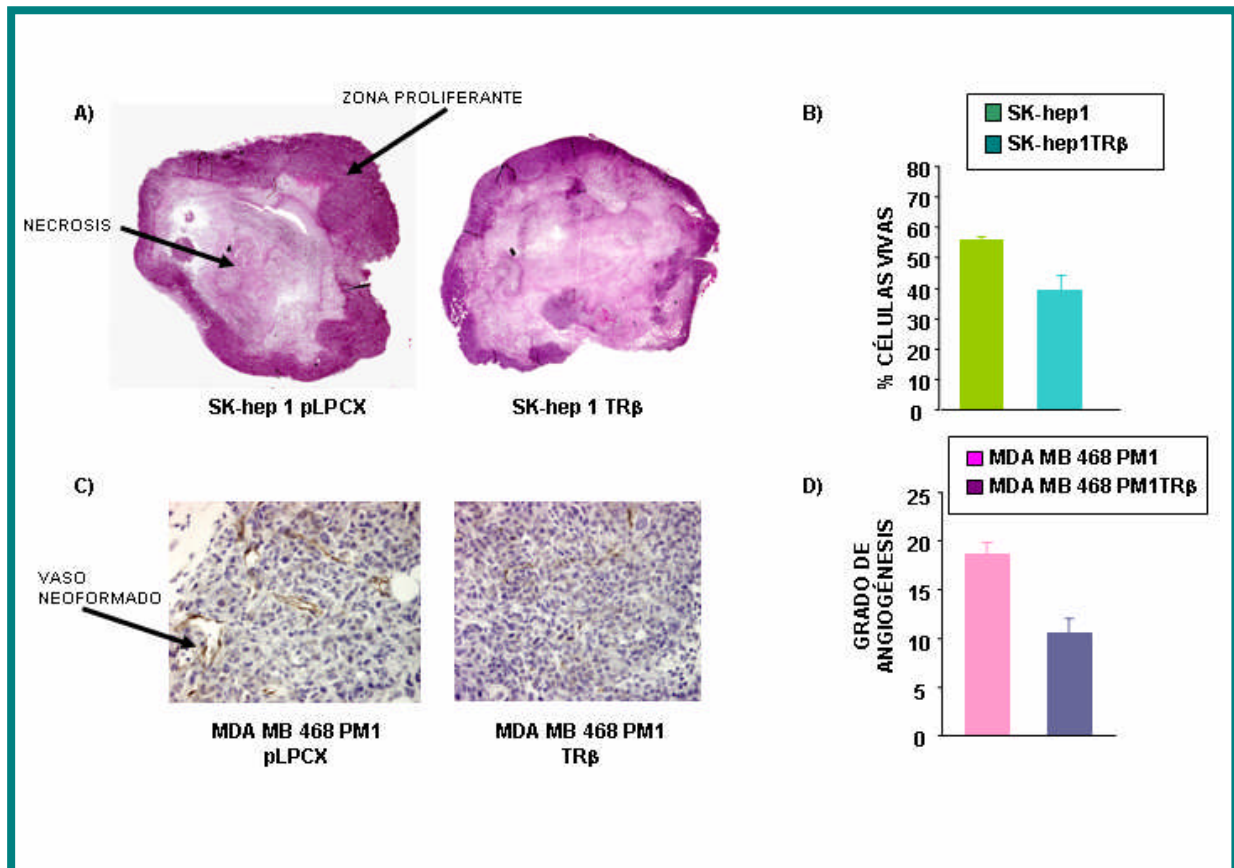


Fig 22. La expresión de TR β reduce el grado de angiogénesis. A) Foto panorámica de las secciones teñidas con hematoxilina-eosina de los tumores originados por células SK-hep1. B) Cuantificación de la región necrótica respecto al área tumoral total. Se representa el porcentaje de células vivas respecto al total. C) Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-CD31 en células MDA MB 468 PM1. D) Representación gráfica del número de vasos neoformados respecto al área del corte.

TR β produce una reversión parcial de la transición epitelio-mesénquima

A medida que aumenta la agresividad del tumor se produce una disminución en el grado de diferenciación de las células tumorales y de la adhesión célula-célula, así como también de la adhesión célula-matriz extracelular. Mediante una tinción con hematoxilina-eosina observamos que los tumores originados por células que expresaban el receptor de hormonas tiroideas, tanto en el modelo de hepatocarcinoma (Fig 23A) como en el de adenocarcinoma de mama (Fig 23B), presentan un fenotipo más diferenciado. Este fenotipo más diferenciado se caracteriza por la presencia de un mayor volumen celular que se corresponde con un mayor volumen citoplasmático, así como por la presencia de una morfología más poligonal o redondeada frente a la morfología más fusiforme de las células parentales que no expresan TR β .

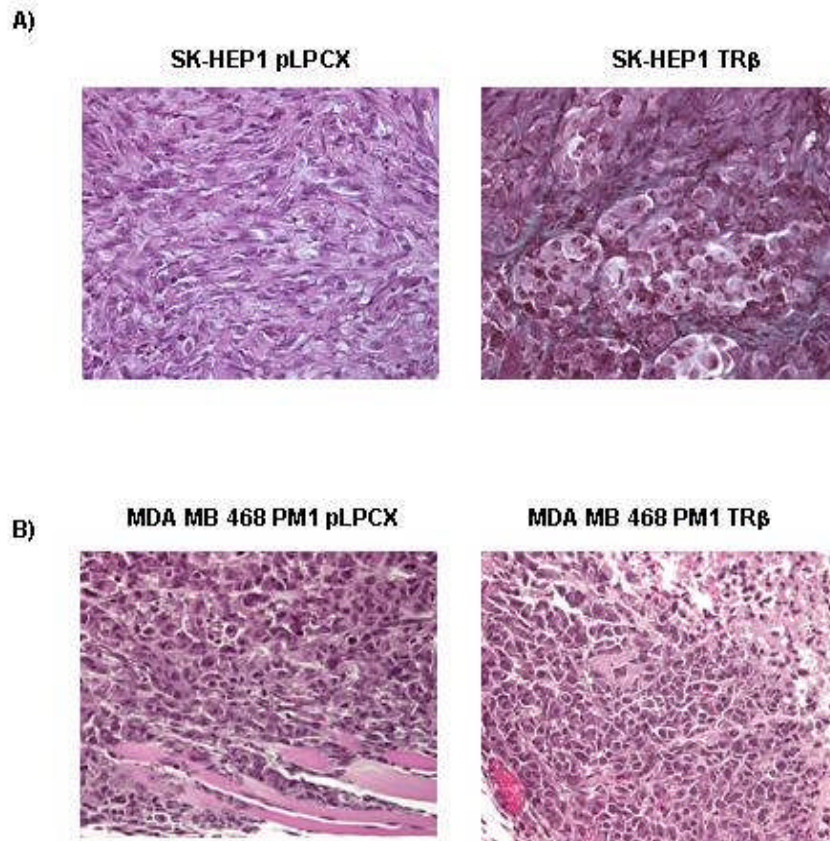


Fig 23. Análisis histológico del grado de diferenciación de los tumores. A) Se realizó una tinción con hematoxilina eosina de los tumores originados por las células SK-hep1 para estudiar la morfología de las células del tumor. **B)** Análogo a A) en las células MDA MB 468 PM1.

La **transición epitelio-mesénquima (EMT)** es un proceso clave en la progresión tumoral y supone la desdiferenciación de un fenotipo epitelial a otro fenotipo con características fibroblastoides, con una alta capacidad invasiva y migratoria (Behrens y cols., 1992; Christophori y Semb, 1999; Christofori, 2006). Esta transición se caracteriza por la disminución en la expresión de las proteínas de adhesión (cadherina E y citoqueratinas) y la reexpresión de proteínas mesenquimales (vimentina y cadherina N), produciéndose de este modo una drástica remodelación del citoesqueleto y del sistema de adhesión.

Realizamos distintas inmunohistoquímicas con anticuerpos contra distintos marcadores de la EMT. De este modo observamos que tanto los tumores originados por las células SK-hep1 (Fig 24) como los que se desarrollan a partir de la inoculación de las células de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1 (Fig 25) son tumores muy desdiferenciados, sin expresión de los marcadores epiteliales cadherina E (dato no mostrado) y β catenina, con muy baja expresión del marcador epitelial citokeratina 8/18 y con una alta expresión del marcador mesenquimal vimentina. Por el contrario, los tumores originados por las células de hepatocarcinoma SK-hep1 que expresaban TR β presentan unos mayores niveles de β catenina y queratina 8/18, así como unos niveles claramente menores de vimentina (Fig 24). El patrón de expresión de β catenina que observamos en los tumores originados por las células de hepatocarcinoma que

expresaban TR β es el típico de las células epiteliales, presentando el característico patrón de distribución de membrana plasmática. Se ha descrito la existencia en tumores de distintas mutaciones en el gen de β catenina, mutaciones que producen la deslocalización de esta proteína hacia el núcleo y que están implicadas en la pérdida de funcionalidad de esta proteína, impidiendo de esta manera su función como molécula de adhesión.

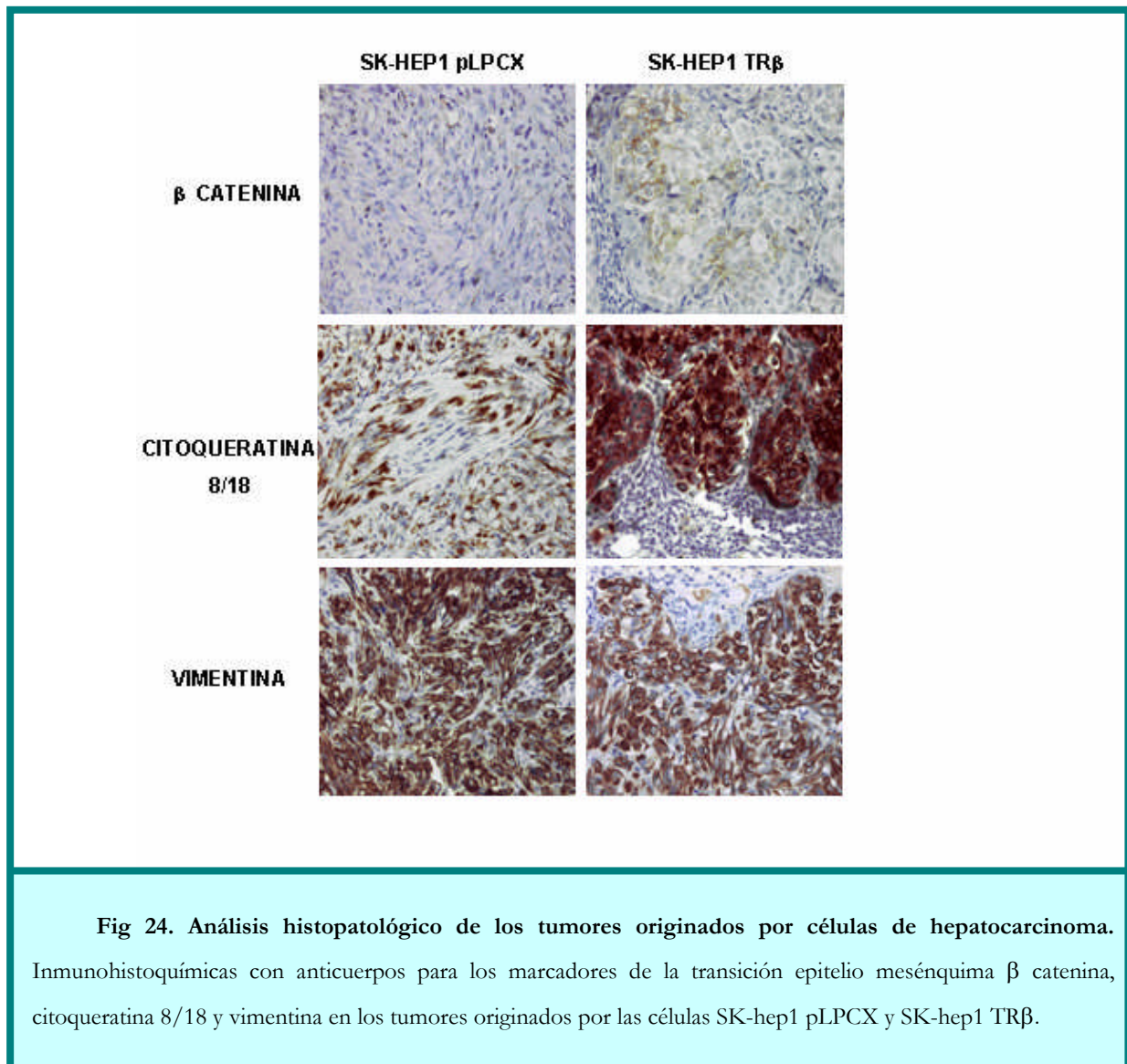


Fig 24. Análisis histopatológico de los tumores originados por células de hepatocarcinoma. Inmunohistoquímicas con anticuerpos para los marcadores de la transición epitelio mesénquima β catenina, citoqueratina 8/18 y vimentina en los tumores originados por las células SK-hep1 pLPCX y SK-hep1 TR β .

En el caso de los tumores originados por las células de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1 TR β se aprecia que la presencia del receptor de hormonas tiroideas produce también un aumento en la expresión del marcador epitelial citokeratina 8/18, así como la disminución de la expresión del marcador mesenquimático vimentina. Por el contrario no se observa ningún efecto sobre la expresión de β catenina (dato no mostrado) (Fig 25).

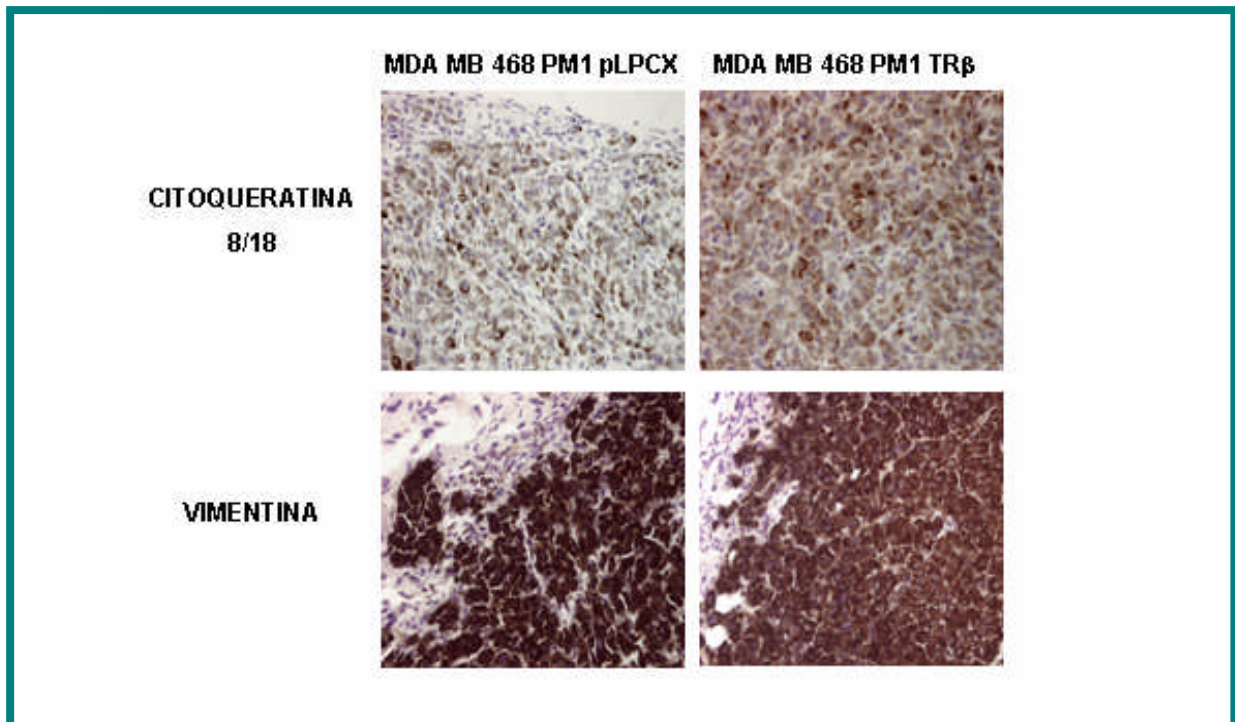


Fig 25. Análisis histopatológico de los tumores originados por células de adenocarcinoma de mama. Inmunohistoquímicas con anticuerpos para los marcadores de la transición epitelio-mesénquima citoqueratina 8/18 y vimentina en los tumores originados por las células MDA MB 468 PM1 pLPCX y MDA MB 468 PM1 TR β .

El aumento en los niveles de expresión de la proteína citokeratina 8/18 ha sido comprobado también mediante inmunofluorescencia en las células SK-hep1, en cultivos *in vitro*, antes de ser inoculadas en los animales (Fig 26). El tratamiento con T3 no produce ningún efecto adicional sobre la expresión de citokeratina 8/18 en estas células.

En resumen, los datos que hemos obtenido demuestran que en ambos modelos celulares la expresión de TR β produce un claro aumento en el grado de diferenciación de las células tumorales, así como una reversión parcial de la transición epitelio-mesénquima.

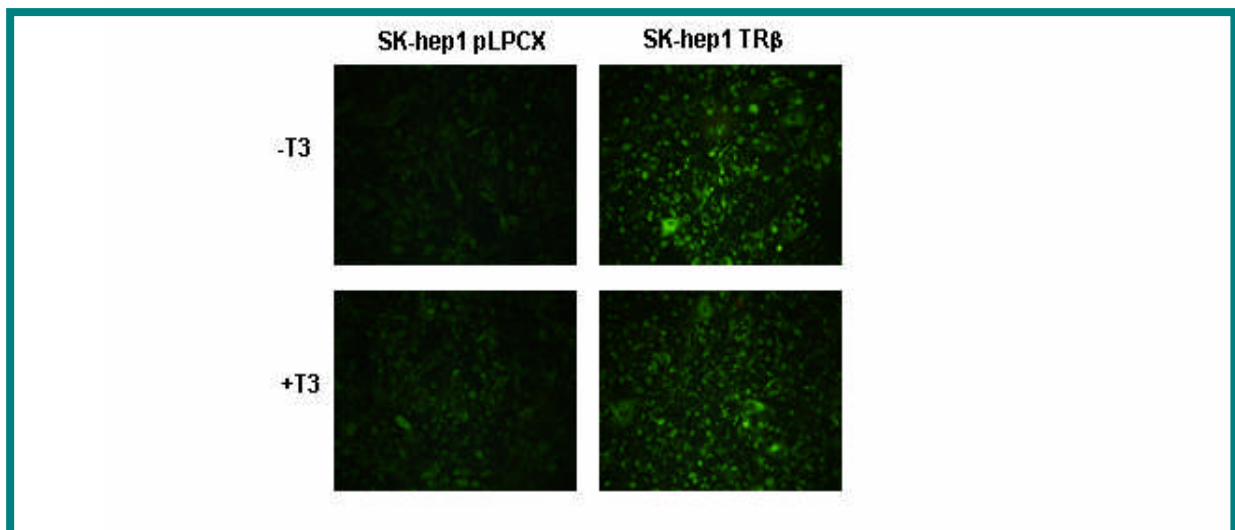


Fig 26. Inmunofluorescencia de citokeratina 8/18 en las células SK-hep1 inoculadas en los animales. Inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-citoqueratina 8/18 en las células SK-hep1. En los casos indicados se incubaron las células durante 36 h con 5 nM T3.

TR β reduce la capacidad de infiltrar tejidos adyacentes

El tumor se encuentra delimitado por la **membrana o lámina basal**, que ha de ser degradada y atravesada por las células tumorales para la diseminación del tumor por el organismo (Friedl y Wolf, 2003). Además, para la formación de metástasis en órganos lejanos al tumor primario es necesaria la **infiltración de vasos sanguíneos y/o linfáticos**, para lo cual se requiere la degradación de la pared de los vasos y capilares, por los que luego las células viajan hasta llegar a los órganos diana de las células tumorales.

En los tumores originados por las células de hepatocarcinoma humano SK-hep1, la expresión del receptor TR β produce un patrón de crecimiento nodular del tumor en lugar del crecimiento infiltrante y difuso que presentan las células parentales (Fig 27A). En los tumores subcutáneos originados por las células parentales, se aprecia la invasión del músculo y de la piel próxima al tumor en un 60 y 85% de los animales, respectivamente, así como la invasión de los vasos sanguíneos y linfáticos en un 80% de los animales inoculados. Por el contrario, la expresión del receptor de hormonas tiroideas en estas células bloquea por completo la capacidad de infiltrar el músculo, y reduce esta invasividad al 40% en la piel y al 20% en el caso de la invasión de los vasos sanguíneos y linfáticos (Fig 27B, C, D).

En condiciones de hipotiroidismo, en los animales inoculados con las células SK-hep1 que no expresan TR β , la invasión de la piel y del músculo, así como la infiltración de los vasos en la totalidad de los animales inoculados. En estas condiciones de hipotiroidismo, la presencia del receptor de hormonas tiroideas reduce la incidencia de la invasividad en músculo a un 20% de los animales y elimina por completo la capacidad de infiltrar los vasos sanguíneos y/o linfáticos (Fig 27B, C, D).

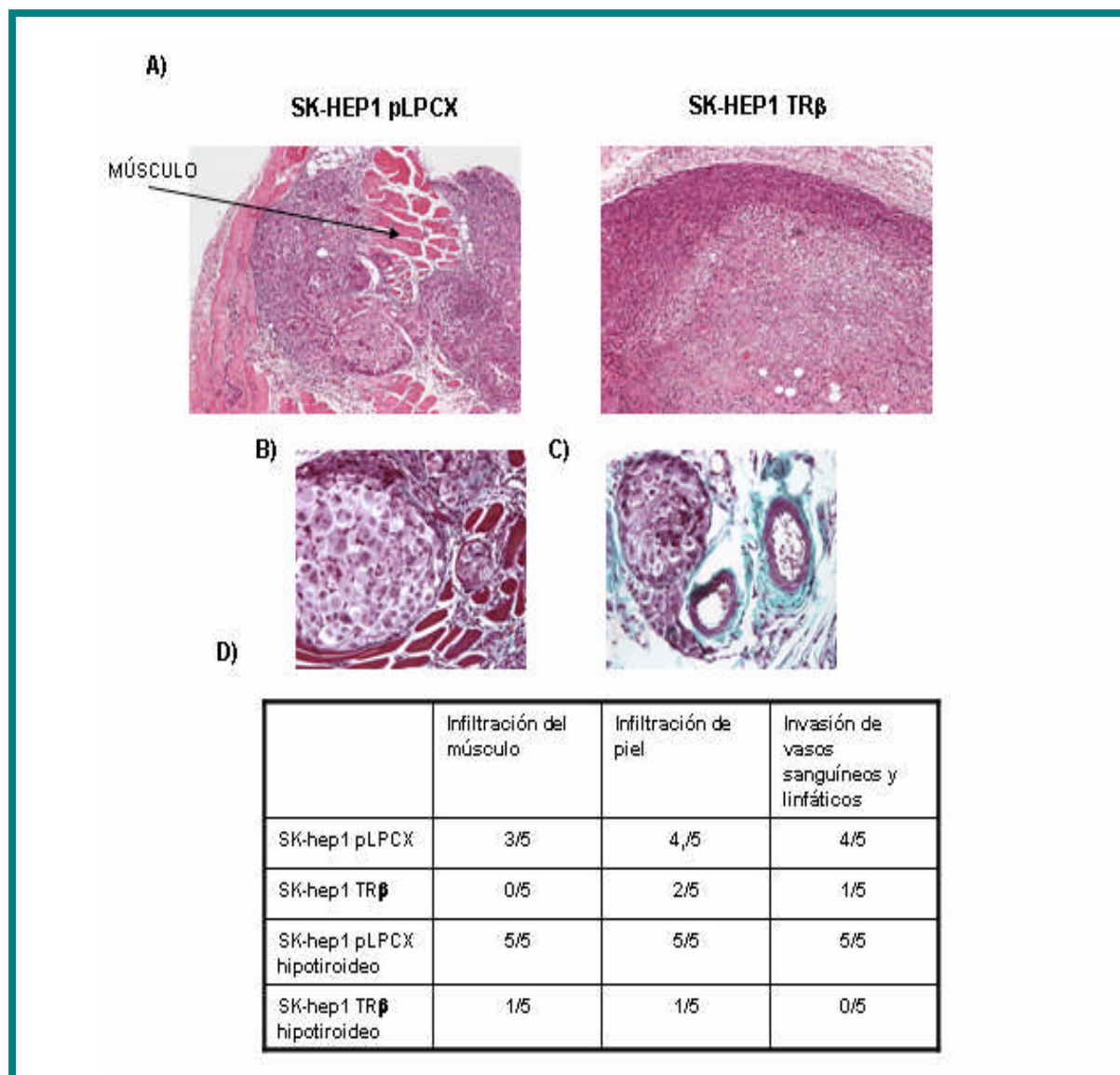


Fig 27. Análisis de la capacidad invasión de los tumores subcutáneos originados por las células SK-hep1. A) Tinción con hematoxilina-eosina de los tumores originados por células que expresan o no el receptor de hormonas tiroideas. Se muestra una fotografía del fenotipo infiltrante de los tumores originados por las células SK-hep1 pLPCX así como una fotografía del fenotipo no invasivo de los tumores originados por células SK-hep1 TR β . B) Fotografía de un corte teñido con Tricrómico de Masson en el que se observa el detalle de la invasión del músculo. C) Fotografía de un corte teñido con Tricrómico de Masson en el que se observa el detalle de la infiltración de vasos. D) Cuantificación del porcentaje de animales en los que se detecta invasión o infiltración de tejidos adyacentes.

Aunque en el modelo de hepatocarcinoma el porcentaje de animales que presentan invasión de los tejidos adyacentes es alto, esta malignidad tumoral tan sólo se detecta en algunas áreas muy concretas del tumor, áreas que presentan un fenotipo muy desdiferenciado y agresivo. Por el contrario, en el modelo de adenocarcinoma de mama el comportamiento agresivo e invasivo está mucho más extendido por todo el tumor. Las células MDA MB 468 PM1 son muy agresivas, con una alta **capacidad invasiva** de los tejidos adyacentes. Estas células presentan un patrón de crecimiento difuso y altamente infiltrativo. Por el

contrario, los tumores formados a partir de células MDA MB 468 PM1 que expresan el receptor de hormonas tiroideas presentan una estructura más compacta, con un patrón de crecimiento nodular y se encuentran rodeados por una **pseudocápsula** de colágeno y células inflamatorias que impiden la invasión de los tejidos adyacentes por las células tumorales (Fig 28A). La invasión del músculo adyacente se observa en un 60% de los animales y la infiltración de los vasos sanguíneos y linfáticos se produce en aproximadamente el 80% de los animales inoculados con las células parentales. Por el contrario, la expresión de TR β reduce este comportamiento agresivo e invasivo a tan sólo un 10% de los animales inoculados (Fig 28B, C, D).

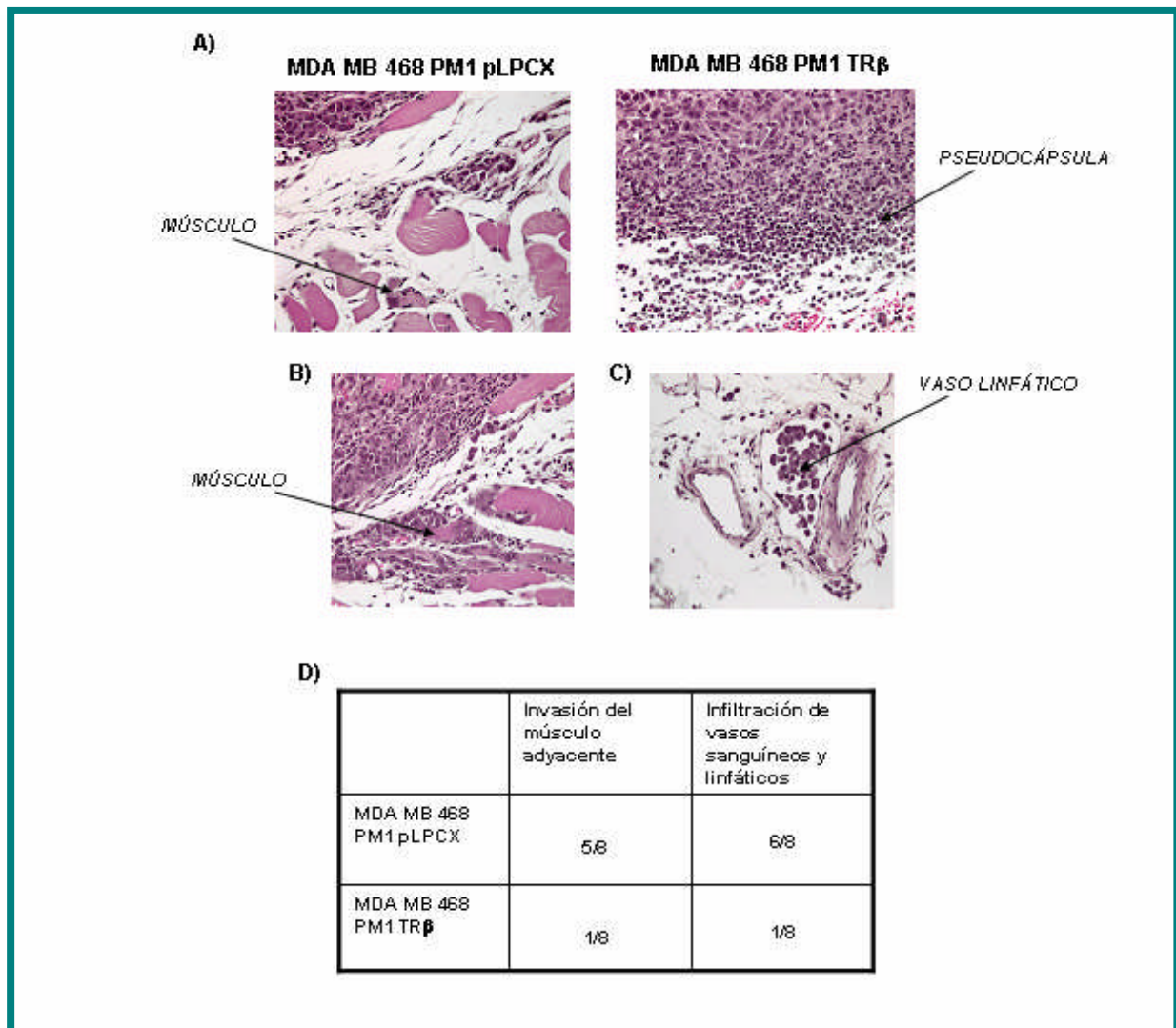
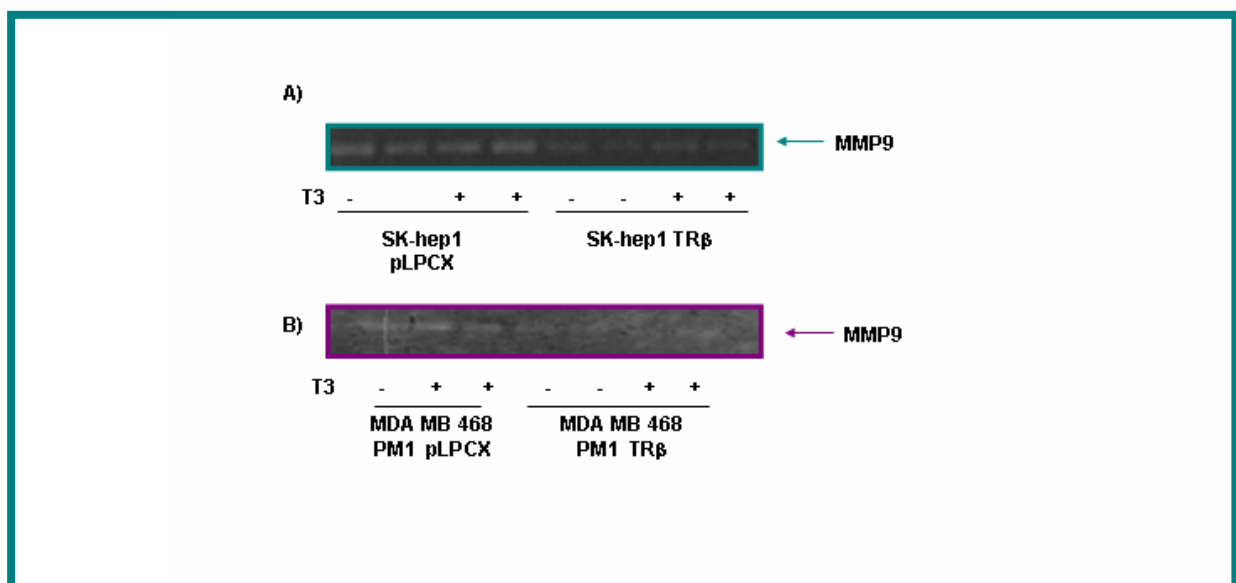


Fig 28. Análisis de la capacidad invasiva de los tumores originados en la mama de ratones atímicos desnudos por la inoculación de las células MDA MB 468 PM1. **A)** Tinción con hematoxilina-eosina de los tumores originados por células que expresan o no el receptor de hormonas tiroideas. Se muestra una foto del fenotipo infiltrante de los tumores originados por las células MDA MB 468 PM1 pLPCX así como una foto del fenotipo no infiltrante, con presencia de pseudocápsula, en los tumores formados por células que expresaban TR β . **B)** Fotografía en la que se muestra en detalle la invasión del músculo. **C)** Fotografía en la que se observa en detalle la infiltración de vasos sanguíneos y linfáticos. **D)** Cuantificación del número de animales en los que se detecta invasión o infiltración de tejidos adyacentes.

La expresión de TR β regula la expresión y la actividad de metaloproteasas (MMPs)

La degradación de la lámina basal, necesaria para la invasión de tejidos adyacentes, así como la degradación de las paredes endoteliales de los capilares y vasos sanguíneos y linfáticos necesaria para la diseminación de las células tumorales por el organismo, es en gran medida consecuencia del aumento de la expresión, secreción y actividad de proteasas. Las **MMPs** son una familia de proteasas implicadas en la progresión de las células transformadas a un fenotipo invasivo (Westermarck y Kahari, 1999). El análisis de la expresión de MMPs en pacientes indica que la alta expresión de MMP-2 y MMP-9 se asocia con la progresión tumoral, la invasividad y la formación de metástasis (Deryugina y Quigley., 2006). Para analizar la actividad proteasa de las proteínas MMP-2 y MMP-9, pertenecientes a la familia de las colagenasas, realizamos zimogramas empleando como sustrato gelatina. En estos ensayos observamos como la degradación de la gelatina y por tanto la actividad proteasa de la MMP-9, es mucho mayor en las células SK-hep1 parentales que en las que expresan el receptor TR β (Fig 29A). Esta misma disminución en la actividad de la proteasa MMP9 se observa en las células MDA MB 468 PM1 TR β con respecto a las que no expresan el receptor de hormonas tiroideas (Fig 29B). La actividad de la MMP-9, y por tanto la capacidad de degradar las estructuras necesarias para la diseminación de las células tumorales y para la formación de metástasis, es inhibida por la expresión del receptor de hormonas tiroideas. Por el contrario, no observamos ningún efecto adicional del ligando, la T3, sobre la actividad de la MMP9. Tampoco se aprecia ningún efecto, en ninguno de los dos modelos, ni en presencia ni ausencia de ligando, sobre la actividad de otra colagenasa de esta misma familia, la MMP-2 (datos no mostrados).

Analizamos también, mediante RT-PCR cuantitativa, los niveles de expresión del ARNm de la metaloproteasa MMP-9, observando que ésta se encuentra claramente disminuida en el modelo de hepatocarcinoma, en aquellas células que expresan el receptor de hormonas tiroideas (Fig 29C). El efecto inhibitorio de TR β es menor en el modelo de adenocarcinoma de mama, alcanzando tan sólo un 30%. Por el contrario, el tratamiento de las células MDA MB 468 PM1 TR β durante 48 h con T3 sí produce un mayor descenso en la expresión de MMP-9, superando al 60% (Fig 29D).



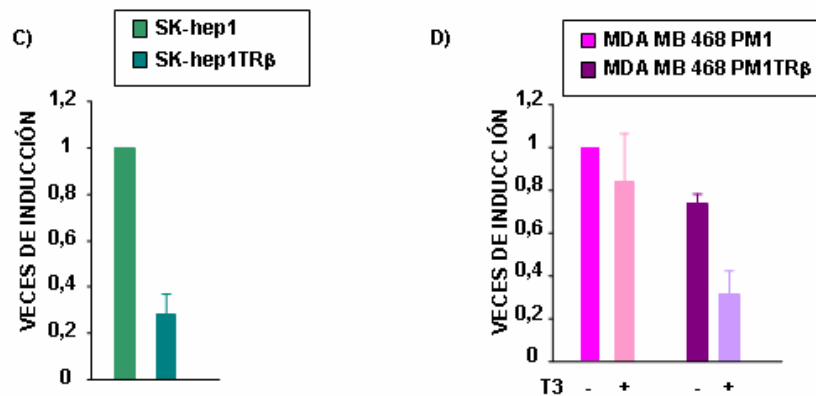


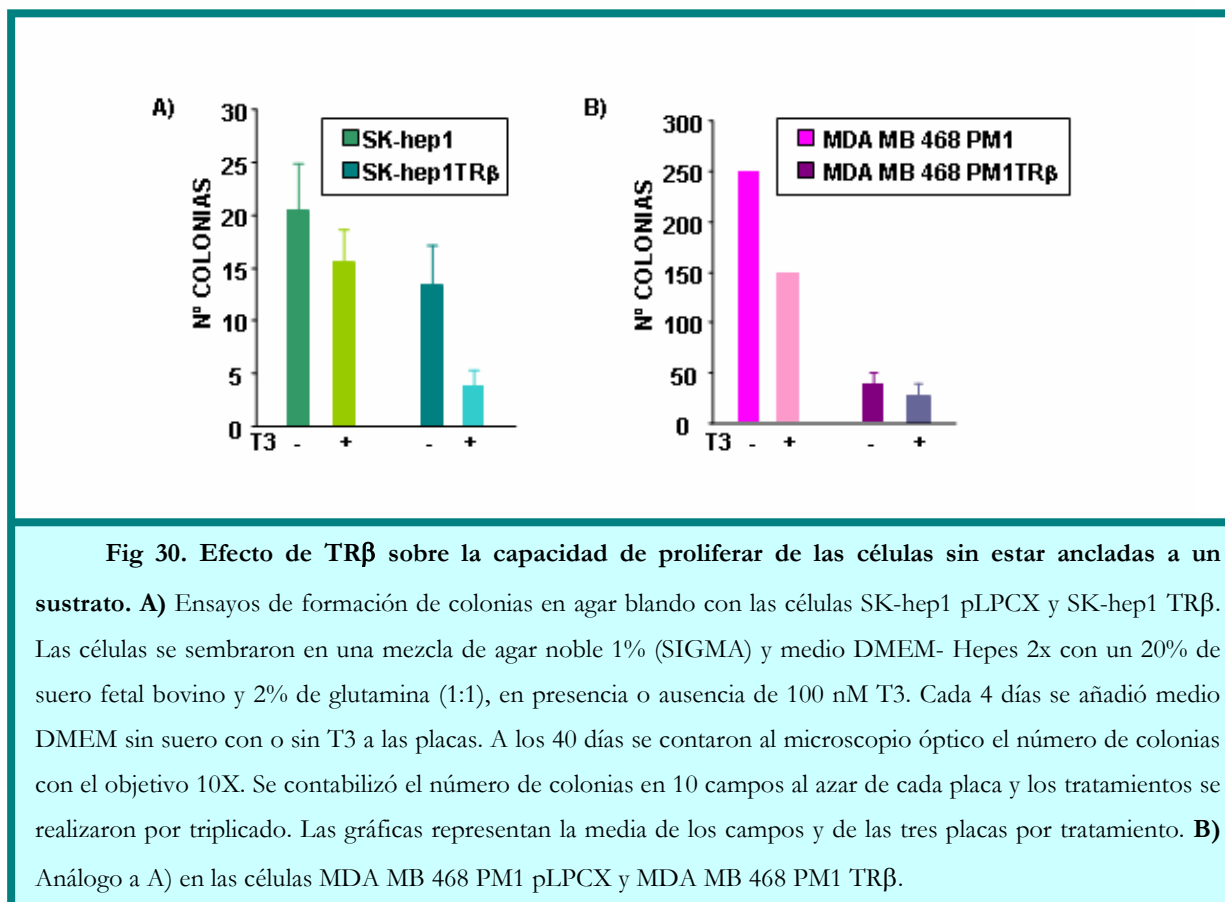
Fig 29. Cuantificación de la actividad y expresión de la metaloproteasa MMP-9. **A)** Zimograma realizado con los medios condicionados de las células SK-hep1 obtenidos tras mantener las células durante 24 h en ausencia de suero. El tratamiento con 5 nM T3 se realizó durante estas 24 h. El medio de cultivo correspondiente a 10 μ g de proteína se cargó en un gel de acrilamida al 10% con gelatina al 0,05%. Las metaloproteasas se reactivaron incubando el gel durante 36h en el tampón 40 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M benzamidina (SIGMA) y 10 mM Cl_2Ca . Finalmente se tiñó el gel con Azul de Coomassie. **B)** Análogo a A) en células MDA MB 468 PM1. **C)** Cuantificación de la expresión del ARNm de MMP-9 mediante RT-PCR cuantitativa en células SK-hep1. **D)** Cuantificación de la expresión del ARNm de MMP-9 mediante RT-PCR cuantitativa en células MDA MB 468 PM1, en ausencia o presencia de 5 nM T3 durante 48 h.

La expresión de TR β reduce la capacidad de proliferación sin anclaje a un sustrato

La capacidad de proliferar sin estar ancladas a un sustrato sólido es un proceso clave en las células tumorales para la adquisición de un fenotipo invasivo y metastático. En el tumor primario las células están ancladas sobre la lámina basal, y para la formación de las metástasis no sólo se produce la degradación de la lámina basal, sino que también es necesaria la pérdida de esta adhesión, el movimiento a través del microentorno del tumor, la entrada en el torrente circulatorio y la supervivencia en la circulación sanguínea y/o linfática. Para que todos estos procesos tengan lugar es necesario que las células sean capaces de sobrevivir y proliferar sin estar ancladas a un sustrato.

Por tanto, analizamos el efecto del TR β en ensayos de crecimiento en agar blando. En estos ensayos, tan sólo las células capaces de sobrevivir y proliferar sin estar ancladas a un sustrato proliferan hasta formar pequeñas colonias de células. Se consideran colonias a aquellos acúmulos de más de 40 células. En el modelo de hepatocarcinoma se ve una disminución del 40% en el número de colonias formadas a los 40 días en las células que expresan TR β . Además, esta inhibición alcanza el 80% cuando se incuban las células con T3 (Fig 30A). En el modelo de adenocarcinoma de mama la presencia del receptor de hormonas tiroideas bloquea casi por completo la capacidad de proliferar y formar colonias en estas

condiciones de ausencia de sustrato. El efecto de TR β es tan potente que no se aprecia ningún efecto adicional tras el tratamiento con la hormona tiroidea (Fig 30B).



Analizamos también la capacidad de sobrevivir y proliferar de estas células al ser sometidas a movimiento y a la pérdida de anclaje a un sustrato. Para ello sometimos a las células a un proceso de agitación. De este modo observamos que, en el caso de las células SK-hep1, la presencia de TR β impide completamente la proliferación en estas condiciones tras 36 h en condiciones de suspensión y agitación (Fig 31A). En las células de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1 el receptor de hormonas tiroideas no bloquea la proliferación por completo tras 48 h de agitación, pero sí la reduce aproximadamente en un 40% (Fig 31B).

Los ensayos de formación de colonias y crecimiento demuestran que la presencia del receptor de hormonas tiroideas reduce e incluso elimina por completo la capacidad de las células tumorales de proliferar sin estar ancladas a un sustrato. Este efecto del receptor TR β debe influir de manera importante sobre la capacidad de proliferar una vez que las células empiezan a disgregarse y separarse del tumor primario. La expresión del receptor de hormonas tiroideas también podría afectar a la proliferación de las células tumorales una vez que éstas llegan a los órganos diana para la formación de metástasis, antes de ser capaces de adherirse al estroma del órgano diana.

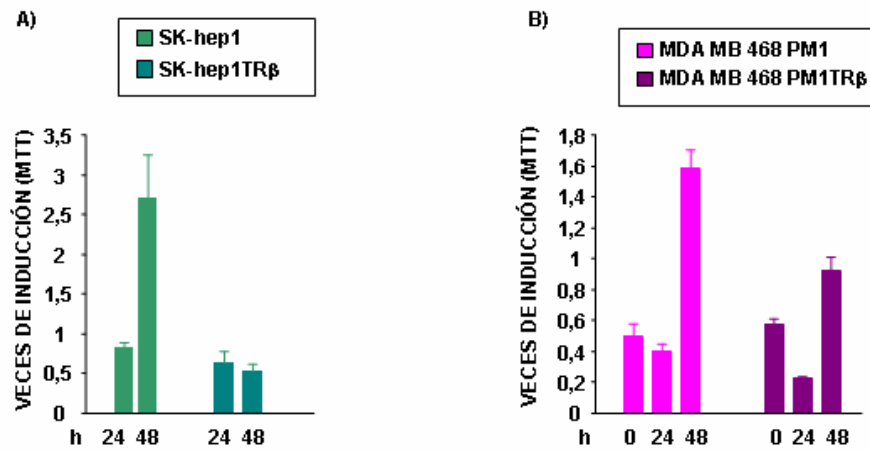


Figura 31. La expresión de TRβ inhibe el crecimiento en suspensión. A) Ensayo de supervivencia celular en suspensión en las células de hepatocarcinoma. Las células se mantuvieron a 37°C en agitación durante 36 h. Tras este tiempo se centrifugaron y se sembraron en pocillos donde se mantuvieron durante 4 h en medio fresco antes de hacer un ensayo de viabilidad celular con el reactivo MTT. Los valores se normalizaron con los valores obtenidos de células que se han mantenido en cultivo en placas durante el tiempo que duró la agitación. **B)** Análogo a A) en células de adenocarcinoma de mama.

La expresión de TRβ reduce la capacidad de invasión *in vitro*

Para estudiar la capacidad invasiva *in vitro* de estas células realizamos experimentos de invasión a través de una matriz de matrigel en cámaras transwell. La matriz de matrigel en estos ensayos simula la lámina basal y consiste en una matriz de distintos polímeros característicos de la matriz extracelular, que incluyen laminina, proteoglicanos, fibronectina y distintos tipos de colágeno. Las células invasivas son capaces de desplazarse y atravesar esta matriz. En estos experimentos observamos que, en el modelo de células de hepatocarcinoma, la presencia de TRβ disminuye en un 50% la capacidad migratoria e invasiva de estas células, llegando esta disminución a ser completa al tratar las células que expresan el receptor de hormonas tiroideas con T3 (Fig 32A). En el modelo de células de adenocarcinoma de mama la presencia del receptor de hormonas tiroideas bloquea por completo la capacidad invasiva de estas células, equiparándola a la observada en el control negativo con BSA. Las células MDA MB 468 PM1 TRβ son incapaces de degradar y atravesar esta matriz de matrigel. El efecto del receptor en este caso es tan drástico que no se aprecia ningún efecto a mayores con el tratamiento con la hormona tiroidea (Fig 32B).

La drástica disminución de la capacidad invasiva que se observa en aquellas células que expresan el receptor de hormonas tiroideas tiene un claro efecto sobre la capacidad metastásica de los tumores originados por estas células. La reducción o bloqueo de la capacidad de degradar proteínas de la matriz extracelular impide tanto la degradación de dicha matriz como la degradación de las paredes de los capilares y vasos, necesarias ambas para la diseminación de las células tumorales por el organismo y para la colonización de nuevos órganos donde se desarrollarán las metastásis.

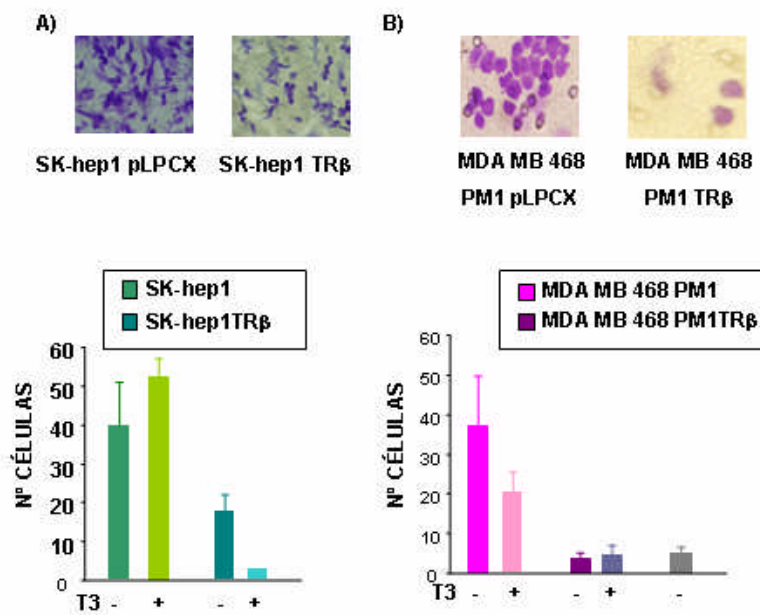


Fig 32. Ensayos de invasión. Se realizaron en cámaras Transwell en las que se añadieron 2 μg de matrigel en la cara superior de cada filtro. Las células se cultivaron en medio sin suero durante 24h, en presencia o ausencia de 5 nM T3, y tras este periodo se sembraron 10x10⁴ células en cada inserto superior. Se dejaron migrar durante 16 horas hacia medio condicionado por células NIH3T3. El tratamiento con T3 se realizó durante las 24h en ausencia de suero y durante las 16h de la migración. Como control negativo se puso en la parte inferior del Transwell medio sin suero con un 2% de BSA. Los filtros fueron fijados con glutaraldehído y se tiñeron con cristal violeta. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. **A)** Ensayos de invasión en células SK-hep1. **B)** Ensayos en células MDA MB 468 PM1.

La presencia de TRβ impide la proliferación inducida por el tratamiento con la citoquina TGFβ

La transición a un carcinoma invasivo es precedida o ocurre simultáneamente en el tiempo a la activación del estroma o microentorno del tumor (Tomakidi, 1999). El estroma está compuesto por una gran variedad de tipos celulares que incluyen células inmunes, células inflamatorias, músculo liso, fibroblastos, adipocitos y células vasculares (Park y cols., 2000; Pollard, 2004). Estas células interactúan de manera continua con las células del tumor (Hayward, 2002; Kopfstein y Christofori, 2006); siendo importantes en esta interacción las señales paracrinas producidas por el estroma, que inducen la proliferación, supervivencia e invasividad de las células tumorales (Mueller y Fusenig, 2004). Las células tumorales a su vez secretan factores de crecimiento y citoquinas que activan a las células del microentorno. Los fibroblastos con frecuencia secretan citoquinas como TGFβ (factor de crecimiento transformante) y HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) que actúan estimulando a las células tumorales.

La citoquina TGFβ tiene un efecto dual en el proceso de carcinogénesis. En estadios iniciales inhibe la proliferación de células epiteliales y promueve la apoptosis mientras que por el contrario, a

medida que se produce la progresión tumoral a un fenotipo con capacidad metastásica, la citoquina TGF β tiene el efecto contrario sobre las células tumorales, promoviendo su proliferación, invasividad, motilidad y capacidad metastásica (Roberts y Wakefield, 2003).

Analizamos la proliferación de las células tumorales inducida por el tratamiento con la citoquina TGF β . En ensayos de incorporación de timidina tritiada, en las células SK-hep1, tal y como se parecía en la [Figura 33A](#), el tratamiento con TGF β durante 48 h produce un incremento del 50% en la proliferación de estas células. Por el contrario, al realizar este mismo tratamiento sobre las células de hepatocarcinoma que expresan el receptor de hormonas tiroideas no se observa ningún efecto sobre la proliferación celular. El bloqueo de la proliferación por parte del receptor de hormonas tiroideas es completo, de manera que no se aprecia ningún efecto al tratar estas células con el ligando T3.

Para comprobar la estimulación de la proliferación causada por el tratamiento con esta citoquina, así como el efecto inhibitorio del TR β , realizamos también ensayos de viabilidad celular empleando el reactivo MTT. Este ensayo se basa en la capacidad que presentan las células vivas de reducir, gracias a la actividad mitocondrial, el compuesto MTT de color amarillo dando lugar a otro compuesto de color púrpura. La cuantificación colorimétrica proporciona un valor cuantitativo de la proliferación de estas células. De esta manera comprobamos que el tratamiento con TGF β produce una clara estimulación de la proliferación en las células SK-hep1 que no expresan TR β . De nuevo, la presencia del receptor inhibe el efecto del tratamiento con TGF β ([Fig 33B](#)). El tratamiento con el ligando T3 tampoco tiene ningún efecto sobre la proliferación inducida por la citoquina TGF β .

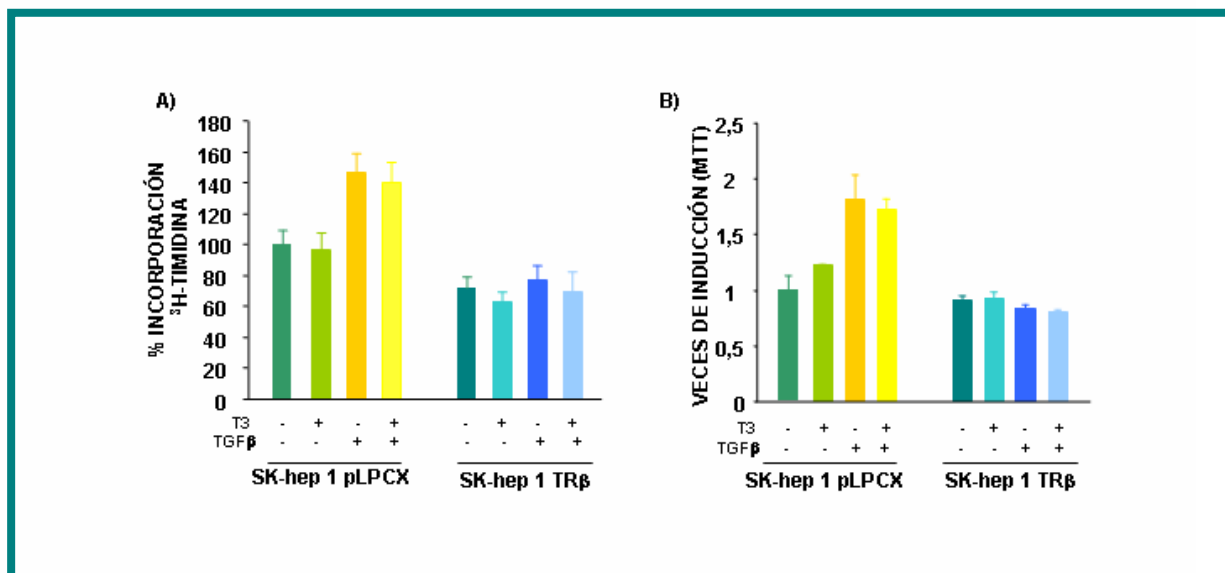


Fig 33. Efecto del tratamiento con TGF β sobre la proliferación en células SK-hep1 pLPCX y SK-hep1 TR β . A) Ensayos de incorporación de timidina tritiada. B) Ensayos de viabilidad celular con el reactivo MTT. En ambos ensayos las células se mantuvieron durante 48 h en ausencia de suero. Tras este tiempo se trataron con 5 ng/ml TGF β y en su caso 5 nM T3. Los datos se representan relativos a la incorporación de timidina tritiada o a los valores obtenidos en el ensayo de viabilidad con el reactivo MTT en las células SK-hep1 sin tratar.

En las células de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1 los experimentos de incorporación de timidina tritiada muestran el incremento de la proliferación tras el tratamiento durante 48 h con la citoquina TGFβ. De nuevo, la expresión de TRβ en este modelo inhibe por completo la proliferación inducida por el tratamiento con TGFβ (Fig 34A). En los ensayos de viabilidad celular con el reactivo MTT se observan unos resultados muy similares a los obtenidos en los ensayos de incorporación de timidina tritiada, se aprecia la estimulación de la proliferación por la citoquina, así como el efecto inhibitorio del receptor de hormonas tiroideas (Fig 34B). El tratamiento con la hormona tiroidea no tiene ningún efecto sobre la proliferación ni en los ensayos de incorporación de timidina tritiada ni en los de viabilidad celular.

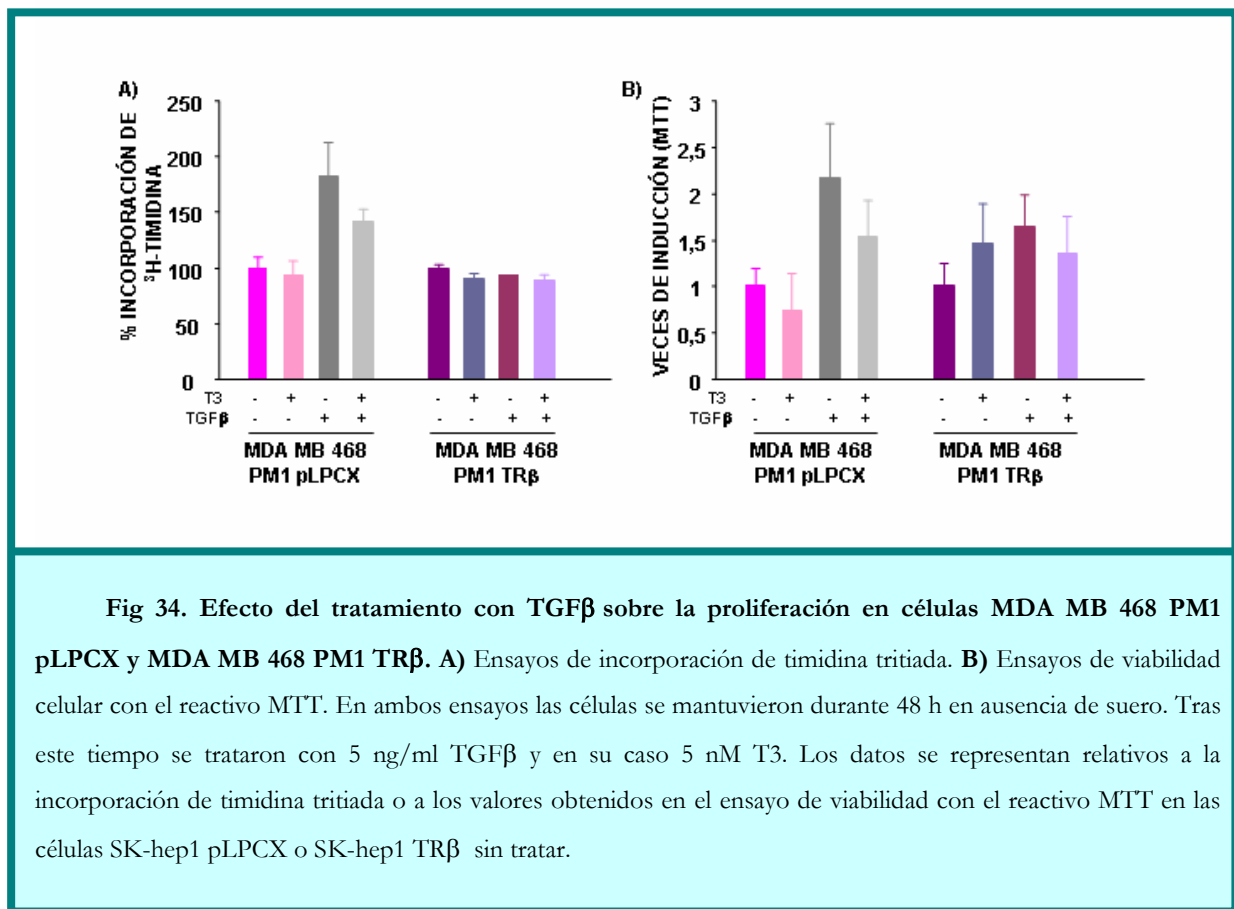


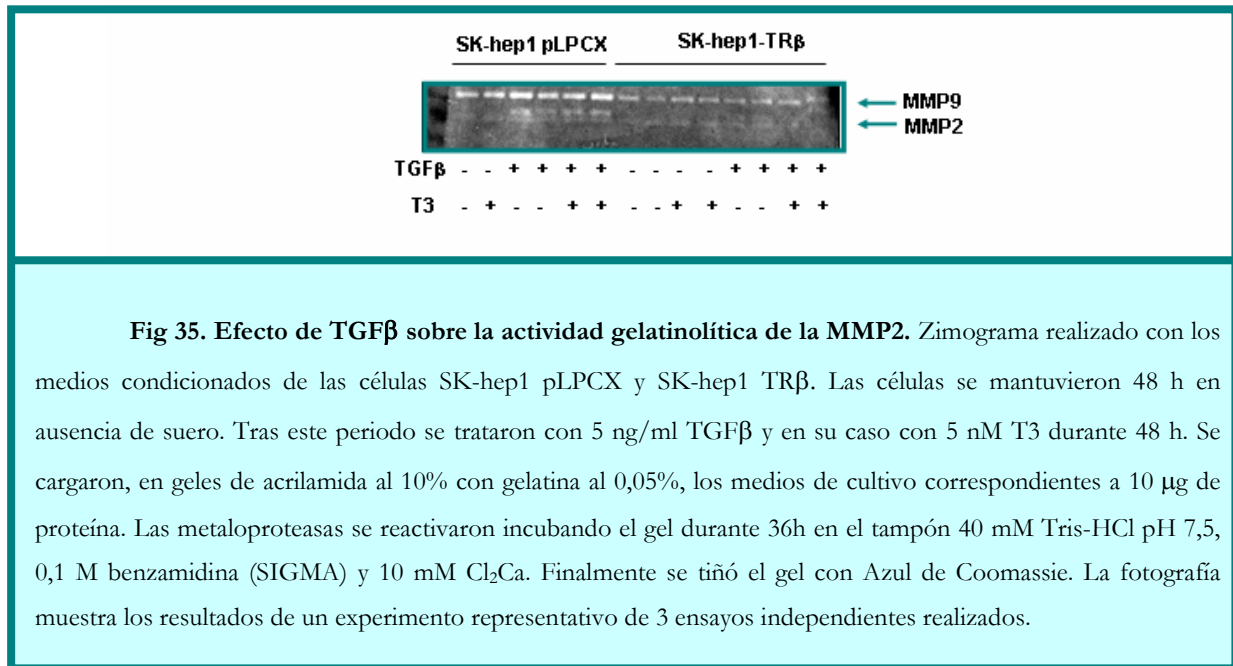
Fig 34. Efecto del tratamiento con TGFβ sobre la proliferación en células MDA MB 468 PM1 pLPCX y MDA MB 468 PM1 TRβ. A) Ensayos de incorporación de timidina tritiada. B) Ensayos de viabilidad celular con el reactivo MTT. En ambos ensayos las células se mantuvieron durante 48 h en ausencia de suero. Tras este tiempo se trataron con 5 ng/ml TGFβ y en su caso 5 nM T3. Los datos se representan relativos a la incorporación de timidina tritiada o a los valores obtenidos en el ensayo de viabilidad con el reactivo MTT en las células SK-hep1 pLPCX o SK-hep1 TRβ sin tratar.

La expresión de TRβ bloquea la estimulación de la actividad de MMP2 por la citoquina TGFβ

Para analizar si la interacción entre la expresión del receptor de hormonas tiroideas y los efectos de la citoquina TGFβ se limitaban únicamente a la proliferación realizamos zimogramas para analizar la actividad colagenasa de distintas MMPs. Se ha descrito la inducción de las MMP-2 y MMP-9 en respuesta al tratamiento con TGFβ en distintas líneas celulares. Empleando gelatina como sustrato observamos que el tratamiento con TGFβ, en las células de hepatocarcinoma SK-hep1, produce un aumento en la degradación de la gelatina, y por tanto en la actividad proteasa, de la MMP-2. Por el contrario, este aumento no se detecta en las células que expresan el receptor de hormonas tiroideas (Fig 35). En este caso tampoco se observa ningún efecto sobre la inducción de la actividad de MMP-2 por TGF-β al tratar

las células con la hormona T3. Al estudiar la actividad de la MMP-9 comprobamos que no se detecta ningún efecto del tratamiento con TGFβ sobre su actividad, aunque se puede observar de nuevo la menor actividad en las células que expresan TRβ.

En las células de adenocarcinoma de mama, al realizar estos mismos ensayos, no se detecta la estimulación de la actividad proteasa de las MMP-2 y MMP-9 en respuesta al tratamiento con TGFβ, ni en presencia ni en ausencia del receptor de hormonas tiroideas o su ligando T3 (dato no mostrado).



La presencia de TRβ impide la proliferación inducida por distintos factores de crecimiento

Para determinar si el bloqueo por parte de TRβ sobre la respuesta a TGFβ era específico de esta citoquina, realizamos ensayos para estudiar la proliferación inducida por el tratamiento de las células con otros factores de crecimiento tales como EGF (factor de crecimiento epidérmico) e IGF-1 (factor de crecimiento similar a insulina 1). Estos factores de crecimiento son muy importantes en el control autocrino y paracrino de la proliferación e invasividad de cánceres como los carcinomas de mama. Además, en la línea celular MDA MB 468 PM1, se encuentran sobreexpresados los receptores de estos factores de crecimiento.

En experimentos de viabilidad celular con el reactivo MTT, se aprecia también el aumento de la proliferación de las células de hepatocarcinoma SK-hep1, producida por el tratamiento durante 48 h con estos dos factores de crecimiento, así como el drástico efecto protector del receptor de hormonas tiroideas (Fig 36A, B). En las células de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1, comprobamos que tanto el tratamiento con EGF como con IGF-1 produce un claro aumento de la proliferación (Fig 36C, D) y que, de nuevo, la expresión de TRβ impide por completo la respuesta a EGF e IGF-1. No se aprecia ningún efecto del tratamiento con el ligando T3 ni en las células de hepatocarcinoma ni en las de adenocarcinoma de mama.

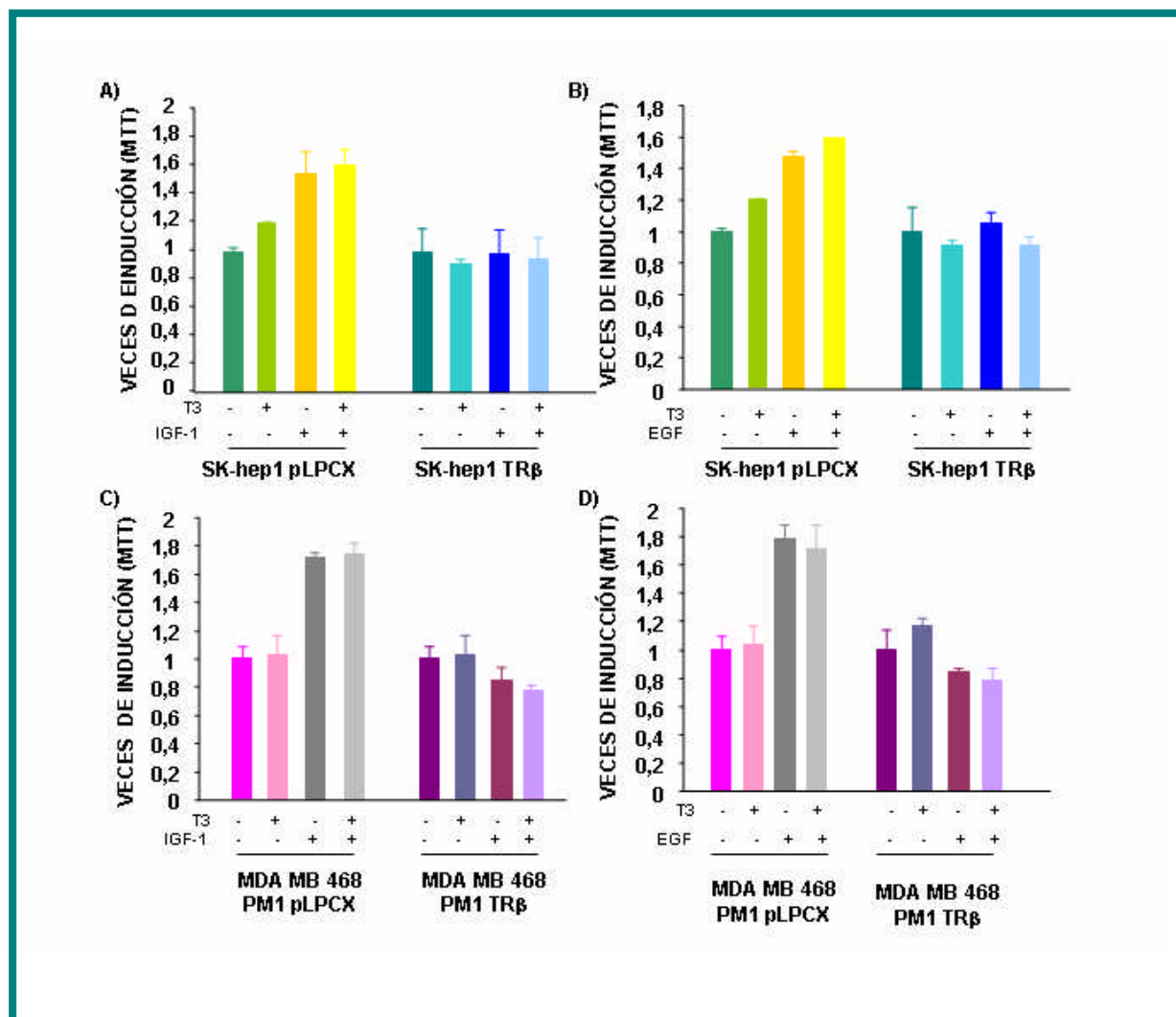


Fig 36. Efecto del tratamiento con los factores de crecimiento EGF e IGF-1 sobre la proliferación de células SK-hep1 y MDA MB 468 PM1. **A)** Se realizaron ensayos de viabilidad celular con el reactivo MTT añadiendo el factor de crecimiento IGF-1 en células SK-hep1. **B)** Análogo a A) con el factor de crecimiento EGF. **C)** Análogo a A) en células MDA MB 468 PM1. **D)** Análogo a B) en células MDA MB 468 PM1. Las células se mantuvieron durante 48 h en ausencia de suero. Tras este tiempo se trataron durante otras 48 h con 25 ng/ml EGF (A) o 15 nM de IGF-1 (B) y en su caso 5 nM T3. Los datos se representan relativos a los valores obtenidos en el ensayo de viabilidad con el reactivo MTT en las células sin tratar.

Tampoco se observa ningún efecto del tratamiento con estos factores de crecimiento sobre la actividad proteasa de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, estudiada mediante zimogramas realizados tanto en las células de hepatocarcinoma como de adenocarcinoma de mama, empleando gelatina como sustrato (datos no mostrados).

La vía de las proteínas Smads está implicada en el efecto de TRβ sobre la señalización por TGFβ

La acción de la citoquina TGFβ comienza con la unión al receptor de membrana tipo II (TβR-II), que permite la asociación con el receptor tipo I (TβR-I) (Massague, 1998). TβRI requiere ser activado

mediante fosforilación por T β R-II para ser funcional y de esta manera ser capaz de unir ligando por sí mismo (Wrana y cols., 1994). La expresión de TR β , tanto en las células SK-hep1 como en las MDA MB 468 PM1 inhibe la respuesta a esta citoquina. Para caracterizar si el receptor de hormonas tiroideas ejerce su efecto inhibitorio a nivel del receptor de membrana T β R-II analizamos, mediante RT-PCR cuantitativa, la expresión del ARNm de dicho receptor. De este modo observamos que, tanto en el modelo de hepatocarcinoma como en el de adenocarcinoma de mama, los niveles de expresión de T β R-II no se encuentran modificados ni por la presencia del receptor de hormonas tiroideas ni por el tratamiento con el ligando T3 (datos no mostrados).

Los efectos de la citoquina TGF β en las células están mediados por la activación de distintas vías de transducción de señales intracelulares. Una de las principales rutas implicadas es la vía de las proteínas Smads. Para analizar la importancia de esta vía de señalización en la respuesta de las células a TGF β transfectamos, de manera transitoria, la construcción reportera p3TP-lux, que contiene la región de respuesta a TGF β del promotor del gen PAI-1, y que depende de la ruta de transducción de señales de las proteínas Smad. En las células SK-hep1 el tratamiento con TGF β produce la activación de este promotor y la presencia de TR β bloquea por completo este efecto de la citoquina (Fig 37A). En las células de adenocarcinoma de mama, la estimulación del promotor de PAI-1 por el tratamiento con la citoquina TGF β se ve parcialmente inhibida cuando se encuentra expresado el receptor TR β , si bien esta inhibición no es total. El bloqueo de la activación sí es completo cuando se tratan las células con el ligando T3 (Fig 37B).

La vía de las Smads está implicada en la señalización por TGF β en ambos modelos celulares. Para comprobar que en la activación transcripcional de este promotor, causada por el tratamiento con la citoquina TGF β , sólo está implicada la ruta de señalización de las Smads, tratamos también las células, una vez transfectadas de manera transitoria con este promotor, con el inhibidor de las quinasas MEK UO 126, ya que TGF β también produce la activación de esta vía. De este modo comprobamos que el tratamiento con el inhibidor UO 126 no tiene ningún efecto sobre la estimulación del promotor de PAI-1 producida por el tratamiento con la citoquina TGF β en células SK-hep1 (Fig 37C), demostrando de esta manera que el efecto de la citoquina sobre este promotor tan sólo parece depender de la vía de señalización de las proteínas Smads.

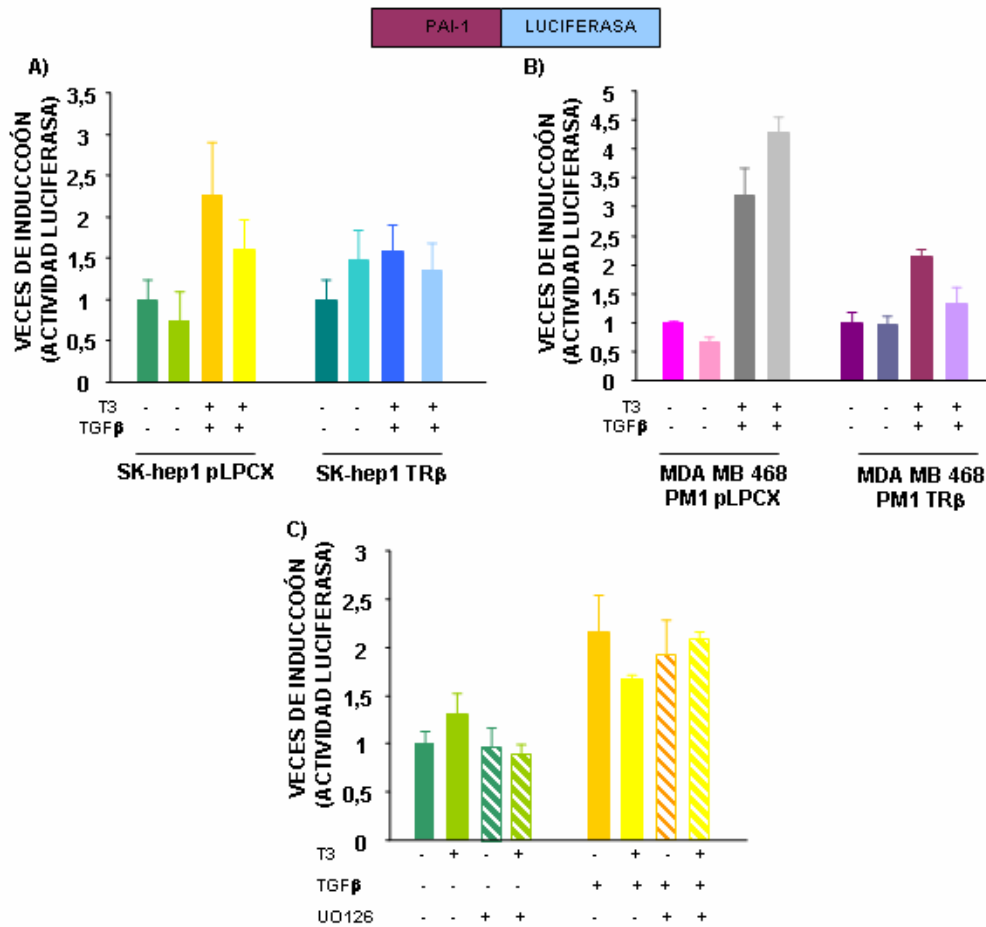
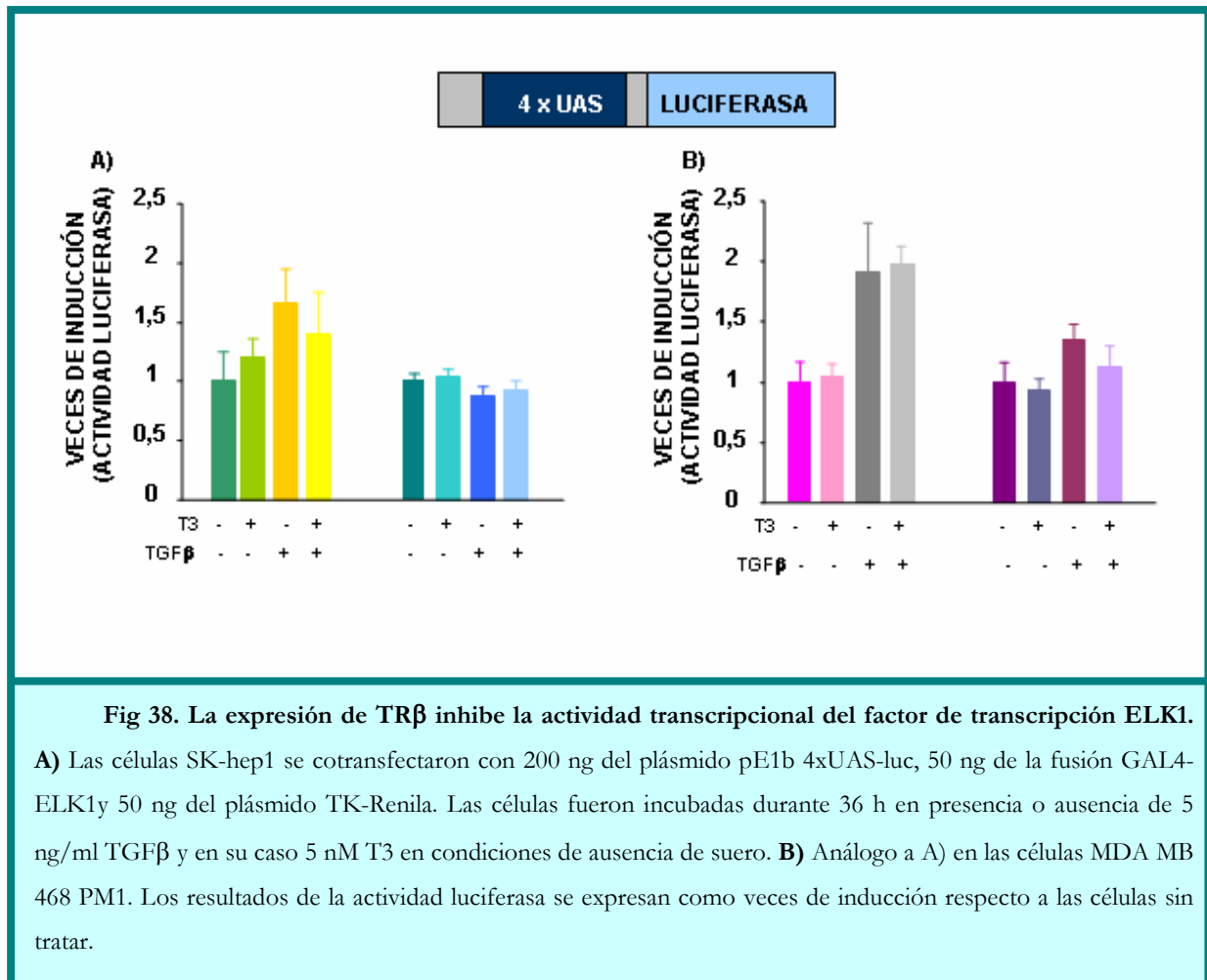


Fig 37. Efecto del tratamiento con la citoquina TGFβ sobre el promotor 3TP-lux en células de hepatocarcinoma SK-hep1 y de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1. **A)** Las células SK-hep1 pLPCX y SK-hep1 TRβ fueron transfectadas con 500 ng del plásmido 3TP-lux y 50 ng del plásmido TK-Renila. Los ensayos de actividad luciferasa se realizaron 36 h después de la adición, en los casos en los que se indica, de 5 ng/ml de TGFβ y de 5 nM de T3. Los tratamientos se realizaron en condiciones de ausencia de suero. **B)** Experimento análogo al anterior realizado en las células MDA MB 468 PM1. **C)** Ensayo análogo al A) realizado en células SK-hep1 pLPCX incubando las células durante las 36 h del tratamiento con 10 mM del inhibidor de MEK UO126. Los datos se representan como veces de inducción respecto a las células SK-hep1 sin tratar.

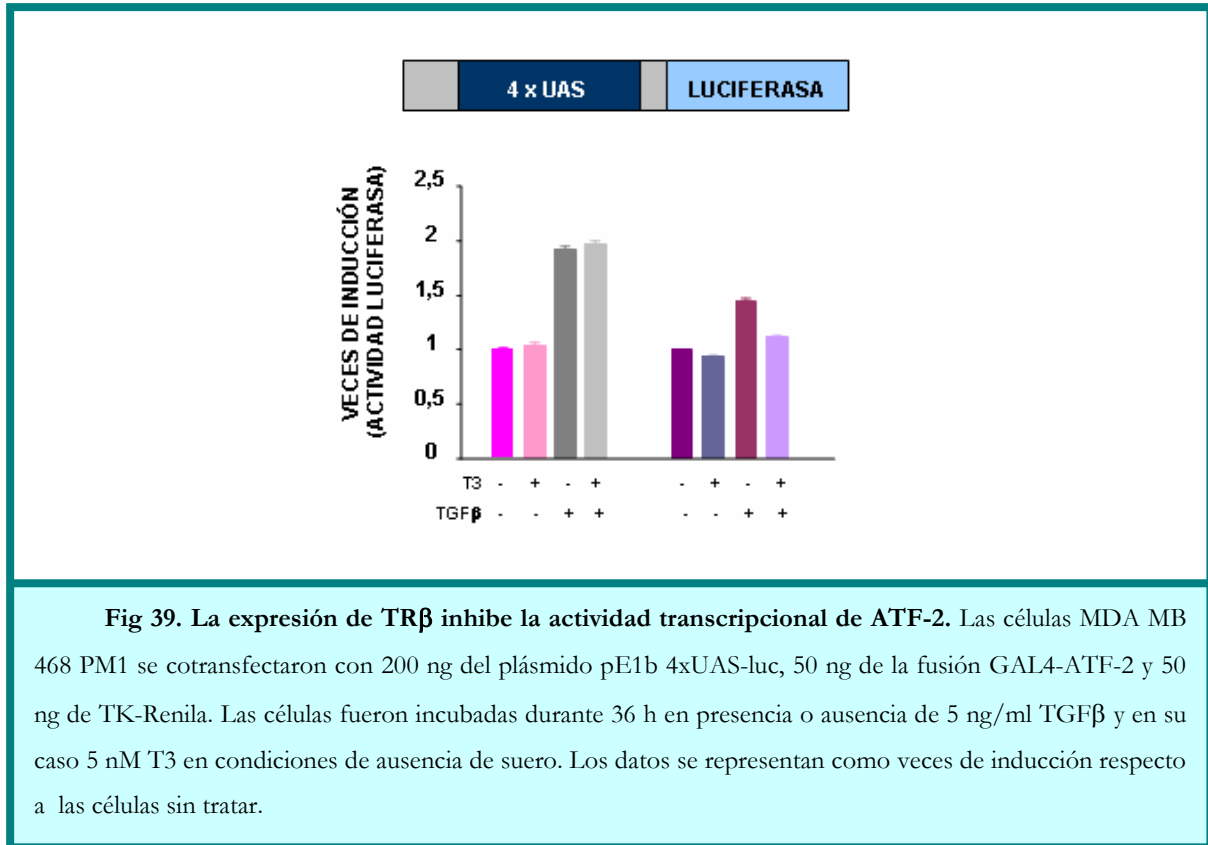
La ruta Raf/MEK/ERK también está implicada en el efecto de TRβ sobre la señalización por la citoquina TGFβ

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la citoquina TGFβ no sólo actúa a través de la vía de señalización de las Smads, también son importantes otras rutas como la vía RAF/MEK/ERK. Para determinar la importancia de la vía de RAF/MEK/ERK en la señalización por TGFβ realizamos ensayos de tipo “un híbrido” con la construcción Gal-ELK1, que expresa el dominio de transactivación (residuos 307-428) del factor de transcripción ELK-1 fusionado con el DBD de GAL4 (Janknecht y Hunter, 1997).

El factor de transcripción ELK es una diana directa de la quinasa ERK. En ambos modelos celulares el tratamiento con TGF β produce la estimulación de la actividad transcripcional del factor de transcripción ELK, mientras que la presencia de TR β bloquea por completo el efecto de esta citoquina (Fig 38A, B). Estos resultados indican que el efecto del receptor de hormonas tiroideas sobre la señalización mediada por la citoquina TGF β implica no sólo a la ruta de las Smads sino que también, al menos en parte, TR β interacciona y bloquea la ruta de RAF/MEK/ERK.



Para analizar si la inhibición por el receptor de hormonas tiroideas de la transactivación mediada por ELK1 era específica de este factor de transcripción, realizamos los mismos ensayos de tipo “un híbrido” empleando el plásmido Gal-ATF-2. En estos ensayos de nuevo observamos que, el tratamiento con TGF β , en la línea celular MDA MB 468 PM1, produce la estimulación de la actividad transcripcional del factor de transcripción ATF-2. La presencia de TR β inhibe significativamente el efecto de la citoquina (Fig 39) y éste se bloquea totalmente en presencia del ligando T3..



La expresión de TRβ regula la expresión de los receptores para los factores de crecimiento EGF e IGF-1.

La unión del factor de crecimiento EGF a sus receptores produce un cambio conformacional que permite la dimerización y autofosforilación del receptor (Burgess y cols., 2003; Hubbard, 2005). Como la proliferación inducida por el tratamiento con este factor de crecimiento se encuentra bloqueada en aquellas células que expresan TRβ, analizamos los niveles de expresión de los ARNm de los receptores EGFR, ERBB2 y ERBB3 mediante RT-PCR cunatitativa. En ambos modelos celulares la expresión del receptor de hormonas tiroideas regula negativamente la expresión de los receptores EGFR y ERBB3. Por el contrario no afecta a la expresión del receptor ERBB2 (Fig 40A, B).

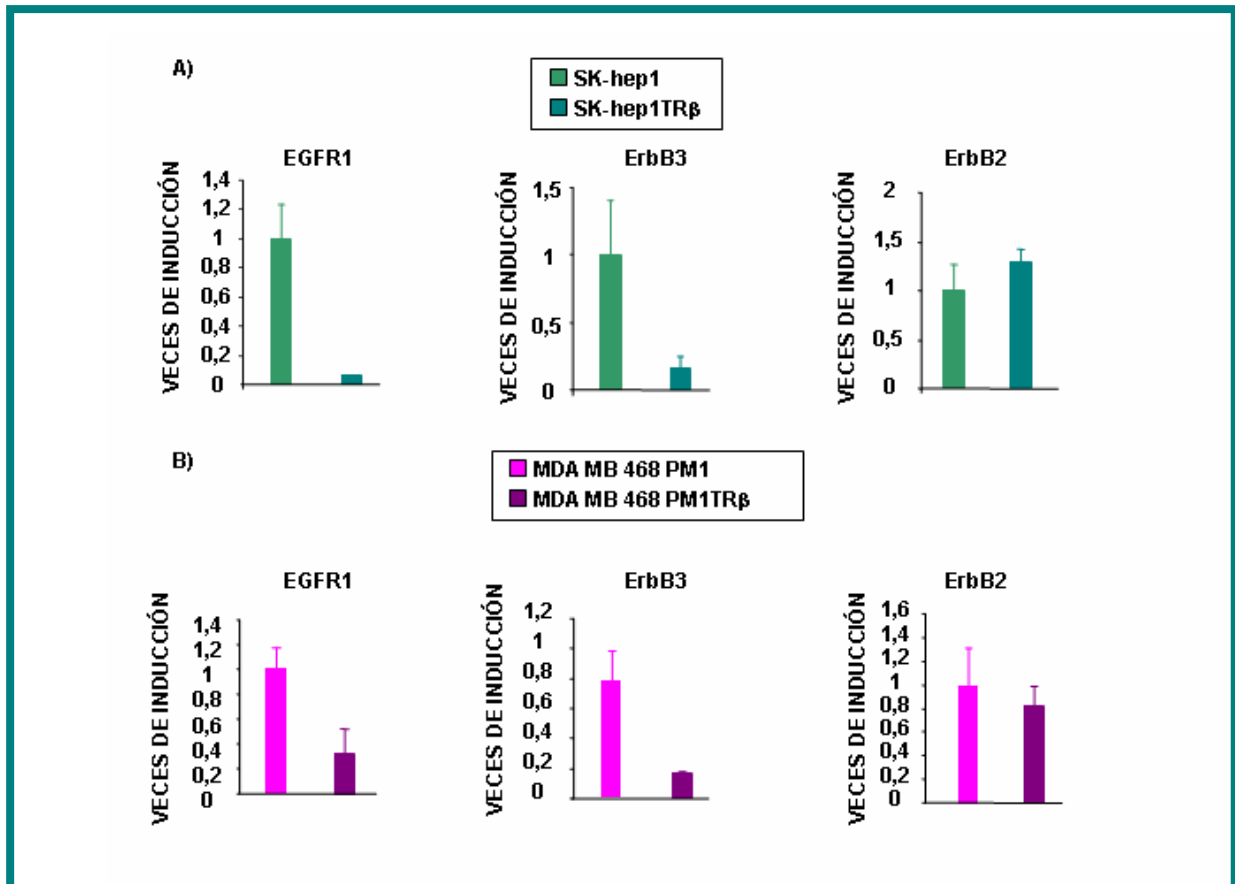
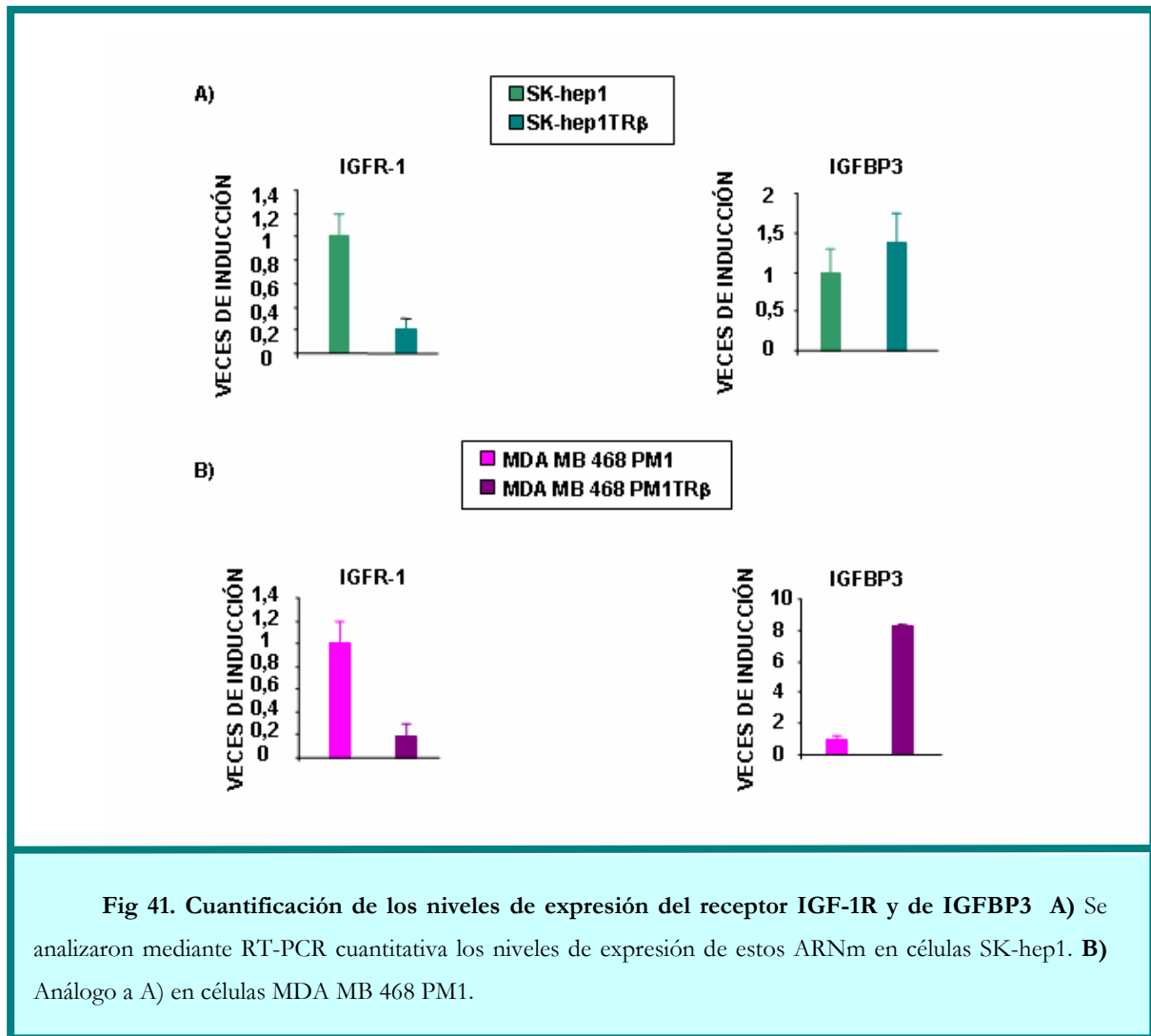


Fig 40 Niveles de expresión de los receptores para EGF en las células SK-hep1 y MDA MB 468 PM1. A) Se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa los niveles de expresión de los ARNm para los receptores EGFR, ErbB3 y ErbB2 en células SK-hep1. **B)** Análogo a A) en células MDA MB 468 PM1.

El factor de crecimiento IGF-1 interacciona con el receptor de membrana IGF-IR, receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa. Dada la incapacidad de las células SK-hep1 y MDA MB 468 PM1 que expresan el receptor de hormonas tiroideas para responder al tratamiento con el factor de crecimiento IGF-1, analizamos también la expresión del ARNm del receptor IGF-IR mediante RT-PCR cuantitativa. Los niveles de expresión de ARNm de IGF-IR se encuentran drásticamente disminuidos en aquellas células que expresan TRβ, tanto en las células de hepatocarcinoma como en las de adenocarcinoma de mama (Fig 41A, B).

Además, la actividad biológica de IGF-1 está modulada por la familia de proteínas IGFBP-1-6, que se encuentran en la circulación y en los fluidos extracelulares. Esta familia de proteínas actúa uniéndose a IGF-1, afectando a su vida media e impidiendo de este modo su unión a los receptores de membrana. Los niveles de expresión del ARNm de IGFBP3 están muy aumentados en aquellas células que expresan el receptor de hormonas tiroideas, tanto en células de hepatocarcinoma SK-hep1 como de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1 (Fig 41A, B).

Los bajos niveles de expresión de IGF-IR, así como la sobreexpresión de IGFBP3 explican, al menos en parte, que tanto las células de hepatocarcinoma como las de adenocarcinoma de mama que expresan el receptor de hormonas tiroideas sean incapaces de proliferar y responder al tratamiento con el factor de crecimiento IGF-1.



La ruta de RAF/MEK/ERK está implicada en el efecto de TR β sobre la señalización por los factores de crecimiento EGF e IGF-1.

Los efectos fisiológicos de los factores de crecimiento EGF e IGF-1 se explican, al menos en parte, por la activación de la vía de señalización RAF/MEK/ERK. Para determinar la importancia de esta vía en la señalización por ambos factores de crecimiento realizamos transfecciones transitorias con el plásmido reportero Gal-ELK. En ambos modelos celulares el tratamiento con EGF o IGF-1 produce una fuerte estimulación de la actividad transcripcional de este factor de transcripción, mientras que la presencia de TR β bloquea por completo esta estimulación (Fig 42A, B, C, D). No se observa ningún efecto del tratamiento con el ligando T3 sobre la estimulación del factor de transcripción ELK por ninguno de los dos factores de crecimiento y en ninguno de los dos modelos. Estos resultados indican que el efecto del receptor de hormonas tiroideas sobre la señalización mediada por EGF e IGF-1 implica, al menos en parte, la ruta de RAF/MEK/ERK y que la actividad de la quinasa ERK se ve modificada por la expresión del receptor de hormonas tiroideas.

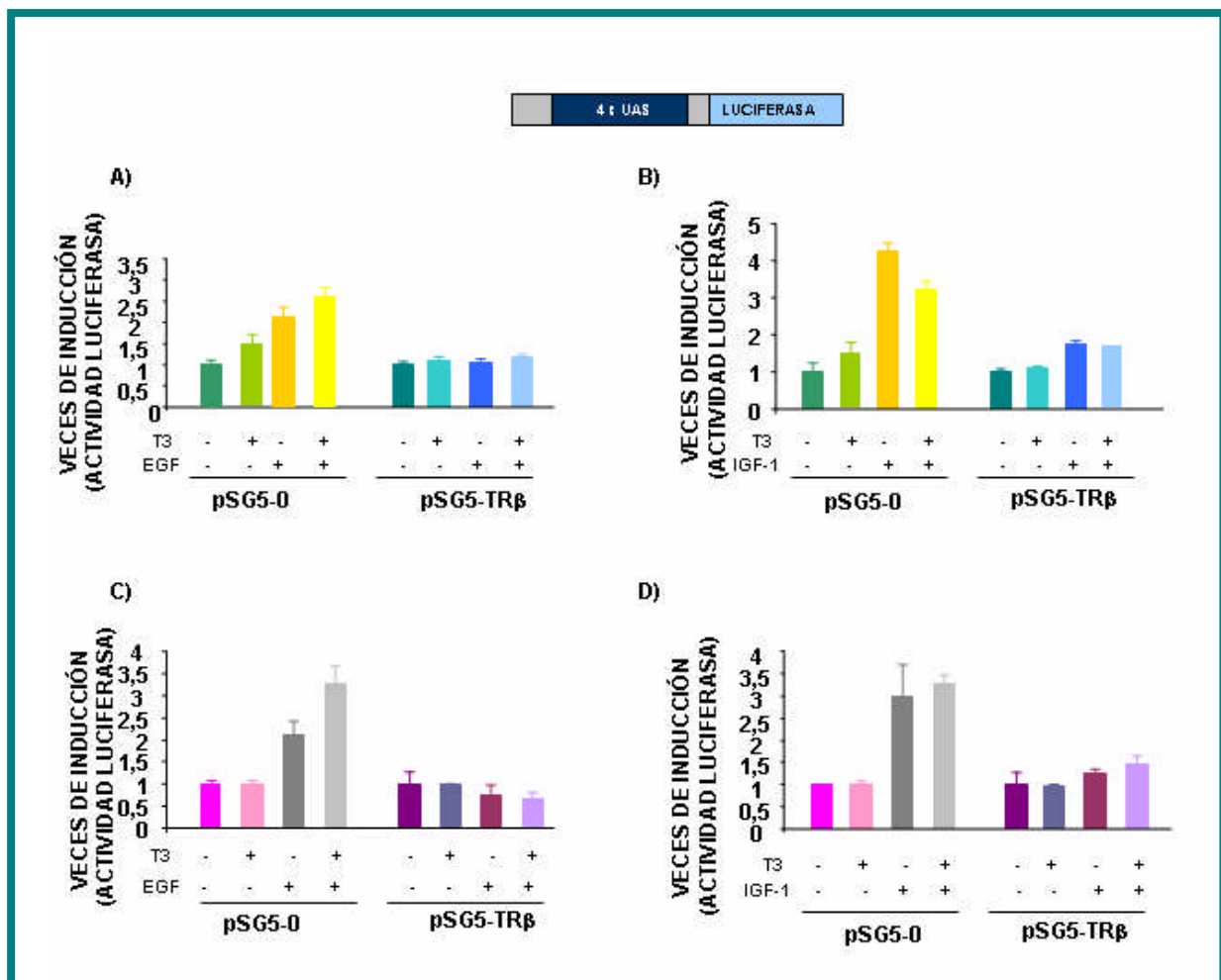


Fig 42. La expresión de TRβ inhibe la activación del factor de transcripción ELK1 por factores de crecimiento. A) Las células SK-hep1 se cotransfectaron con 200 ng del plásmido pE1b 4xUAS-luc, 50 ng de la fusión GAL4-ELK1 y 50 ng de TK-Renila. Las células fueron incubadas, en ausencia de suero, durante 36 h en presencia o ausencia de 25 ng/ml EGF y en su caso 5 nM T3. **B)** Análogo a A) incubando las células con 15 nM de IGF-1. **C)** Análogo a A) en células MDA MB 468 PM1. **D)** Análogo a B) en células MDA MB 468 PM1. Los datos se representan relativos a las actividades medidas en las células sin tratar.

Para determinar si el efecto de EGF e IGF-1 estaba mediado, al menos en parte, por la acción del factor de transcripción ATF-2, realizamos también ensayos de tipo “un híbrido” con el plásmido Gal-ATF-2 en las células de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1. En estos ensayos de nuevo se aprecia que el tratamiento con estos factores de crecimiento provoca la estimulación de la actividad transcripcional del factor de transcripción ATF-2. La presencia de TRβ en la líneas celular MDA MB 468 PM1 bloquea por completo el efecto de los factores de crecimiento EGF e IGF-1 (Fig 43A, B). El tratamiento con el ligando T3 no tiene ningún efecto sobre el factor de transcripción ATF-2.

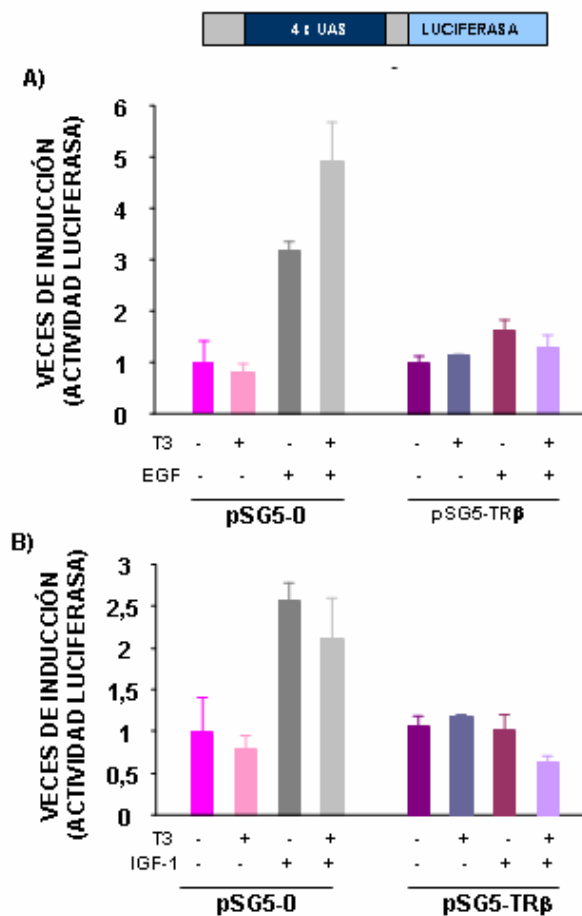
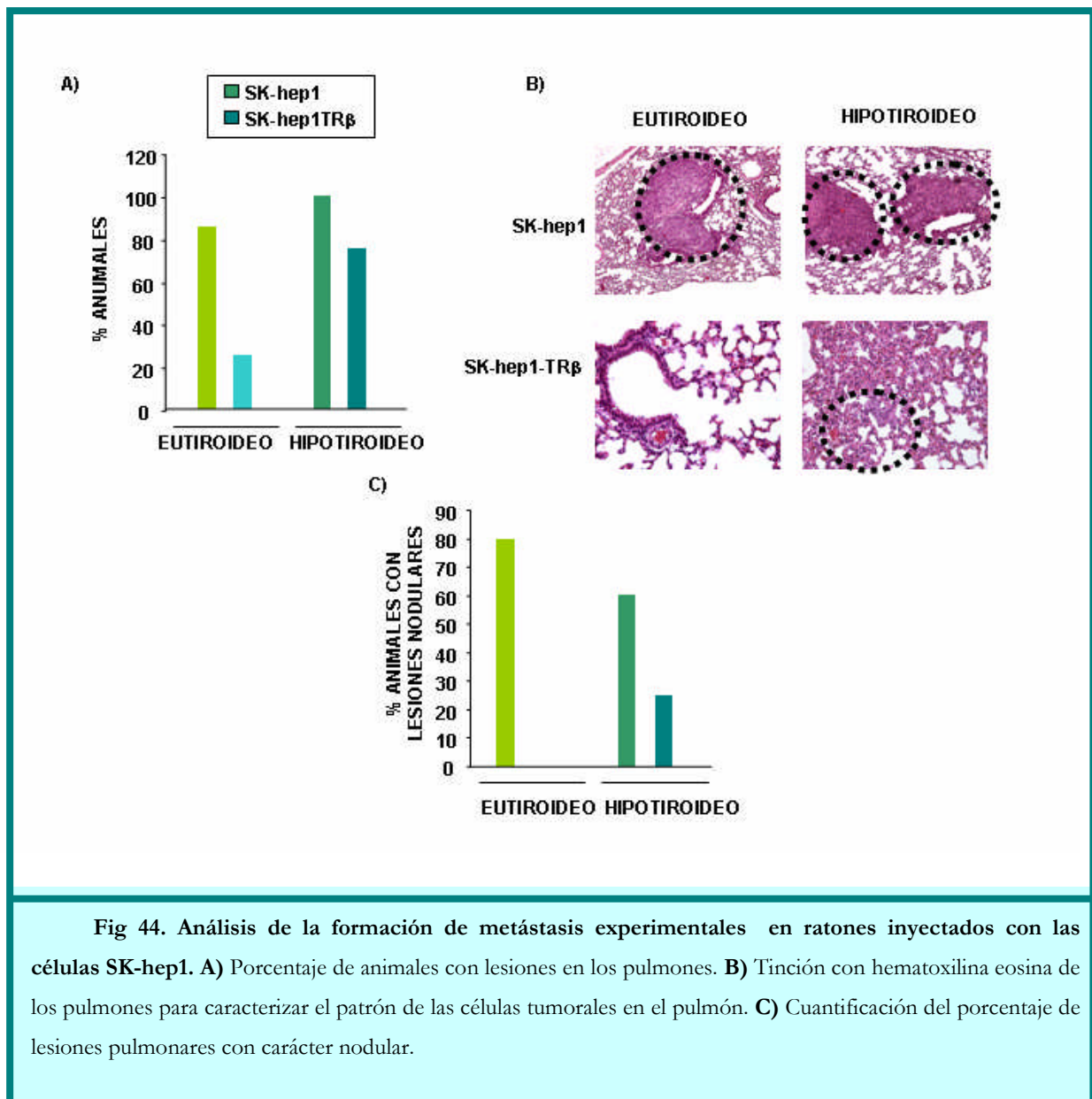


Fig 43. La expresión de TR β inhibe la activación de ATF-2 por factores de crecimiento. A) Las células MDA MB 468 PM1 se cotransfectaron con 200 ng del plásmido pE1b 4xUAS-luc, 50 ng de la fusión GAL4-ATF-2 y 50 ng de TK-Renila. Las células fueron incubadas durante 36 h en presencia o ausencia de 25 ng/ml EGF y en su caso 5 nM T3 en condiciones de ausencia de suero. **B)** Experimento análogo a A) tratando las células con 15 nM IGF-1. Los datos se representan como veces de inducción respecto a las células sin tratar.

La expresión de TR β disminuye la extravasación de las células tumorales y su capacidad de formar micro y macrometástasis.

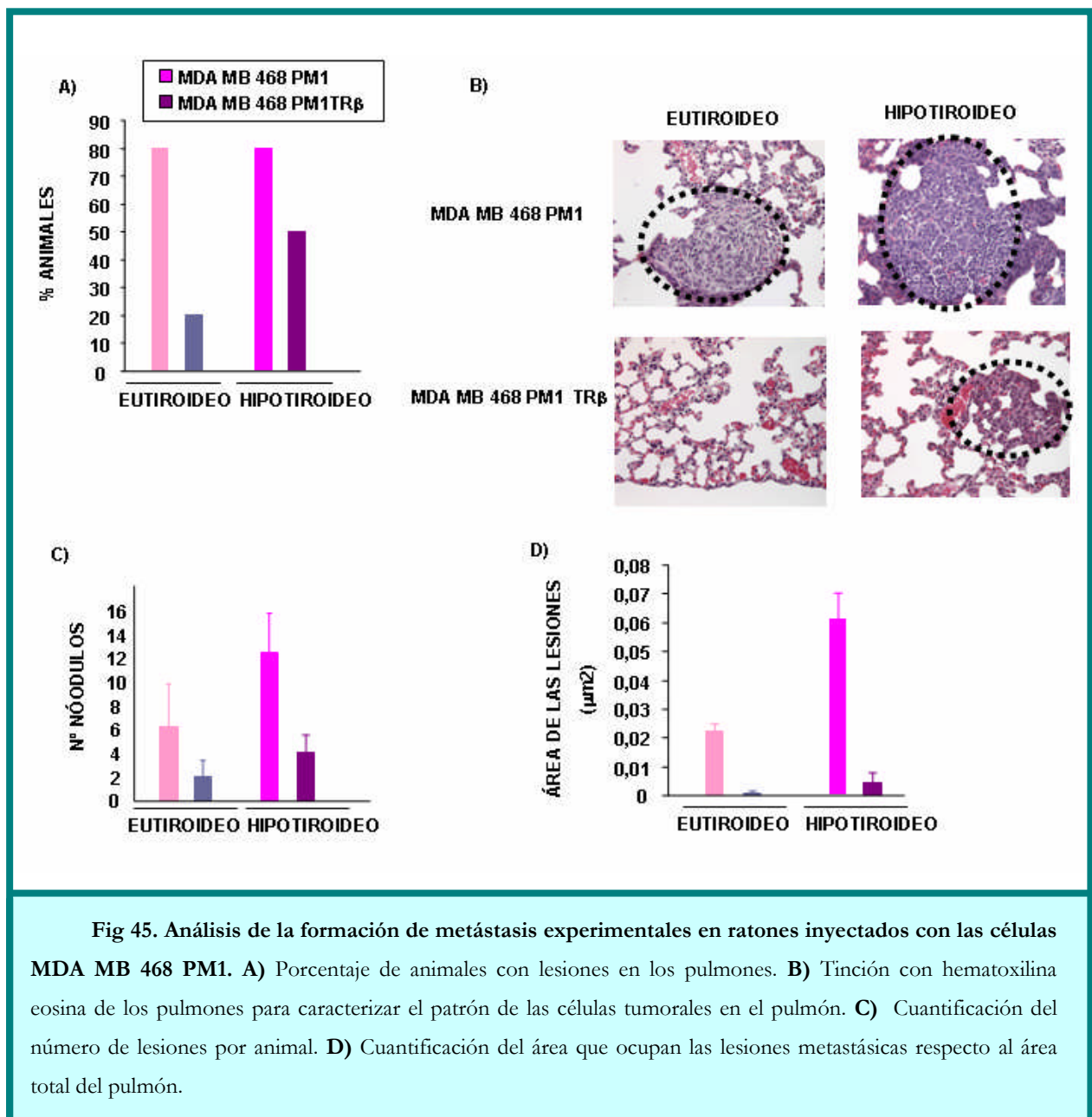
Para estudiar el papel del TR β en la formación de metástasis *in vivo* inoculamos las células de adenocarcinoma MDA MB 468 PM1 y las células de hepatocarcinoma SK-hep1, así como las transfectadas de manera estable con TR β , en la vena de la cola de ratones inmunosuprimidos. Realizamos la inoculación tanto en animales eutiroides como en animales hipotiroideos, con el objetivo de analizar la importancia de los niveles del ligando T3 en la formación de metástasis experimentales. Este sistema de inoculación permite que las células tumorales viajen directamente hasta el pulmón, donde si están capacitadas para ello dan lugar a nódulos metastásicos. En el caso de las células de hepatocarcinoma el 80% de los animales eutiroides inoculados con células SK-hep1 parentales presentan lesiones

carcinomatosas en los pulmones a los 30 días, mientras que en los inoculados con células que expresan TR β este porcentaje alcanza únicamente el 25% (Fig 44A). Además, cabe destacar que las lesiones originadas por las células SK-hep1 en los pulmones presentan una morfología de grandes nódulos metastásicos, mientras que todas las que provienen de las células que expresan TR β muestran un patrón de células intersticiales, sin agruparse en forma de nódulos (Fig 44B, C). En condiciones de hipotiroidismo el 100% de los ratones inoculados con las células SK-hep1 pLPCX presentan lesiones en el pulmón, todas ellas de carácter nodular. Por el contrario, en presencia del receptor de hormonas tiroideas el 80% presentan lesiones carcinomatosas en los pulmones, de las cuales tan sólo la mitad son nódulos metastásicos, mientras que la otra mitad presentan un patrón de células intersticiales.



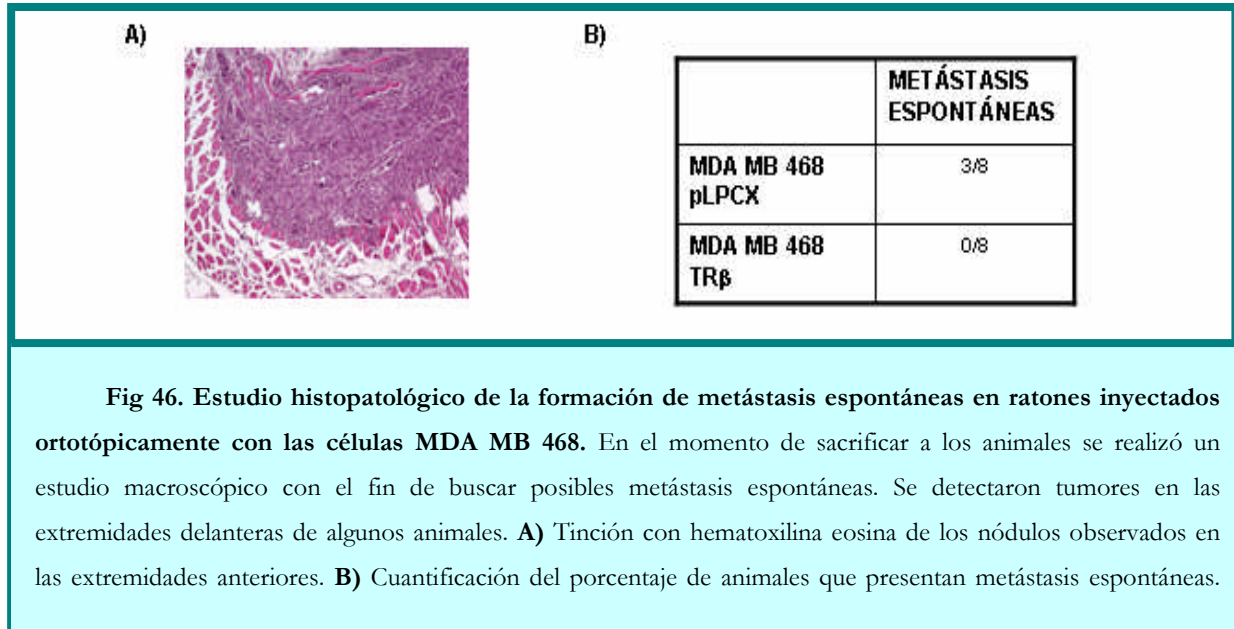
Quando se inoculan las células de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1 en la vena de la cola, la expresión del receptor de hormonas tiroideas reduce la incidencia de nódulos metastásicos de un 80% a un 20% de los animales. Los pulmones de los animales se extrajeron y analizaron a los 40 días de la

inoculación. En condiciones de hipotiroidismo el efecto protector del TR β es menor, siendo el porcentaje de animales con lesiones nodulares de un 80% en ausencia de TR β y de un 50% cuando se expresa el receptor de hormonas tiroideas (Fig 45A, B). Analizamos también el número de nódulos que se desarrollaron en los pulmones de los distintos animales, comprobando que en condiciones de eutiroidismo se forma un número medio de 6 nódulos metastáticos por animal, y que la expresión del receptor provoca una disminución aproximada del 65%. En condiciones de hipotiroidismo el número de nódulos aumenta hasta una media de 12 nódulos por animal y la expresión de TR β reduce esta incidencia en un 60% (Fig 45C).



En el modelo ortotópico de inoculación de las células tumorales MDA MB 468 PM1 directamente en la grasa de la mama, una vez extirpado el tumor primario mantuvimos los animales vivos

durante otros 30 días. Transcurrido este tiempo analizamos la formación de metástasis espontáneas en distintos órganos. Detectamos que aproximadamente el 40% de los animales inoculados con las células MDA MB 468 PM1 presentaban metástasis espontáneas cutáneas en las extremidades delanteras. Ninguno de los animales inoculados con las células que expresaban el receptor de hormonas tiroideas desarrollaron ningún tipo de metástasis (Fig 46A, B).



Con el objetivo de estudiar si la expresión del receptor de hormonas tiroideas impide la extravasación de las células tumorales en el pulmón o si, por el contrario, bloquea la capacidad de anclaje y colonización del estroma de este órgano, marcamos tanto las células de hepatocarcinoma como las de adenocarcinoma de mama, con ¹²⁵IrdU. Este marcaje se realizó incubando las células durante las 24 h previas a la inoculación con el compuesto radiactivo. Estas células se inocularon en la vena de la cola de ratones inmunosuprimidos y los animales se sacrificaron a distintos tiempos recogiendo los pulmones. En el modelo de hepatocarcinoma, al medir la radiactividad incorporada en los pulmones observamos que ya a tiempos tan cortos como las 8h se aprecia una inhibición superior a 12 veces en la radiactividad medida en los pulmones de los animales inoculados con células que expresaban TRβ (Fig 47A). En el modelo de adenocarcinoma de mama, tal y como se muestra en la Figura 47B, el efecto del receptor se aprecia a un tiempo todavía más corto, a las 4h, siendo la inhibición de un 50%, aproximadamente.

Esta inhibición a tiempos tan cortos indica que la expresión del receptor de hormonas tiroideas está impidiendo ya la extravasación de las células tumorales en el pulmón, y no sólo la capacidad de anidar y proliferar en el estroma.

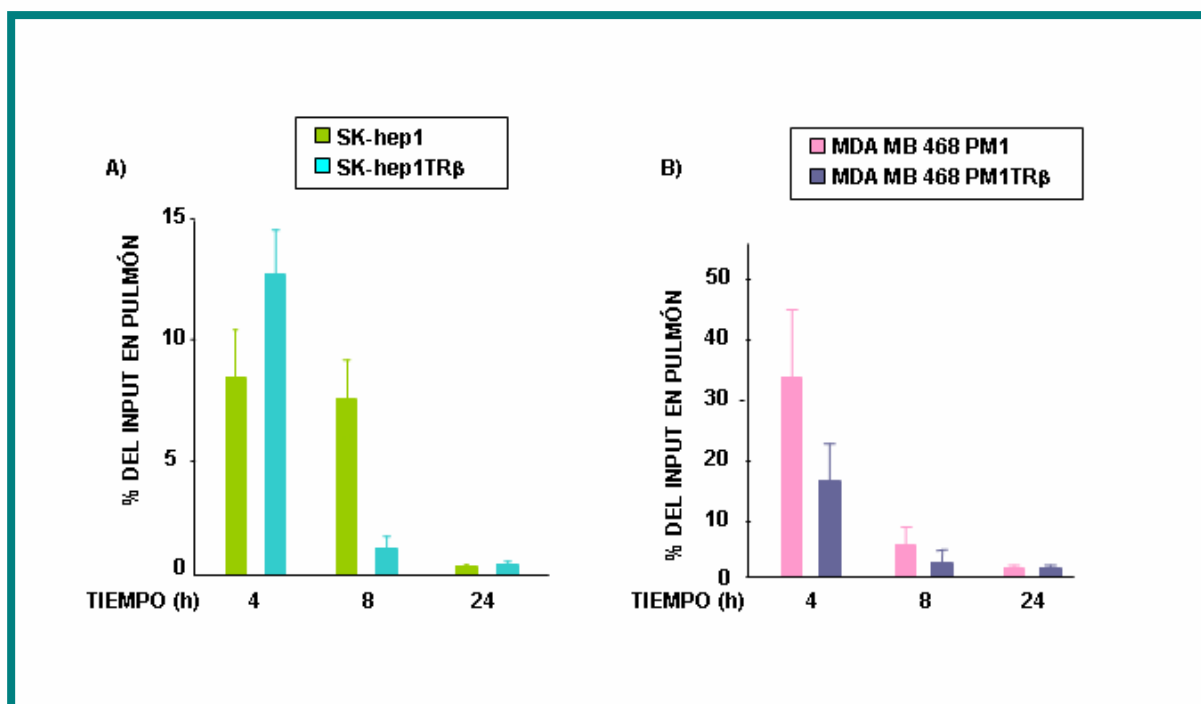


Fig 47. Análisis de la biodistribución de las células tumorales. A) Las células SK-hep1 fueron cultivadas durante 24 h en presencia de 2,5 μ Ci de 125 IrdU. Estas células se inocularon en la vena de la cola de ratones atómicos desnudos. Los animales se dividieron en 2 grupos de 6 ratones y se inyectaron 5×10^5 células en un volumen de 100 μ l en la vena de la cola de cada animal. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical a los tiempos indicados y se exanguinaron mediante punción intracardiaca en el ventrículo derecho. Esta sangre se empleó como control negativo. Se recogieron los pulmones y se colocaron en viales con etanol al 70%. Se reemplazó el etanol diariamente durante 3 días para eliminar la radioactividad no incorporada. Transcurrido este tiempo se midió la radioactividad incorporada en los pulmones y se representó respecto a la radioactividad incorporada por las células en el cultivo (INPUT). **B)** Análogo a A) en células MDA MB 468 PM1.

La expresión de TRβ regula los niveles de moléculas importantes en la formación de metástasis

Dado que la expresión de TRβ inhibe casi por completo la formación de metástasis en el pulmón, tanto por parte de las células de hepatocarcinoma SK-hep1 como por las de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1, analizamos la expresión de diversos marcadores del proceso de formación de metástasis. CXCR4 es el receptor para CXCL12, quimioquina que se encuentra, entre otros órganos, en el pulmón. Ligando y receptor son responsables de que algunas líneas celulares desarrollen metástasis en determinados órganos diana y no en otros, es decir, de la especificidad de órgano para desarrollar las metástasis a partir de un tumor primario. Analizamos los niveles de expresión de ARNm de CXCR4 mediante RT-PCR cuantitativa, observando que las células que expresan TRβ presentan unos niveles casi nulos de CXCR4, tanto en el modelo de hepatocarcinoma como en el adenocarcinoma de mama (Fig 48). No se detecta ningún efecto adicional del tratamiento con el ligando T3 sobre los niveles de expresión de ARNm de CXCR4 (dato no mostrado).

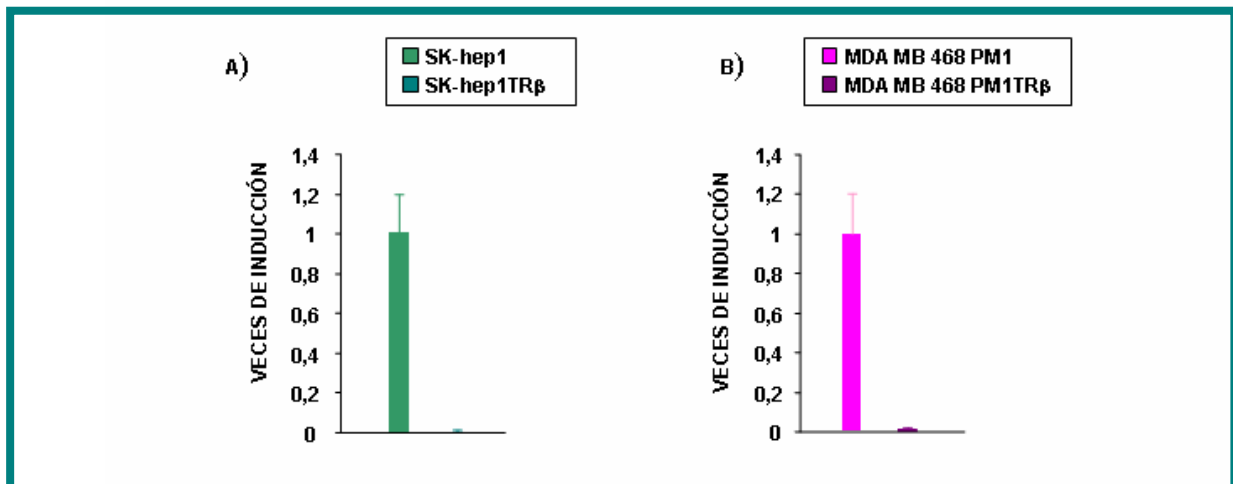


Fig 48. Análisis de los niveles de expresión del ARNm de CXCR4. **A)** Se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa los niveles de expresión del mRNA de CXCR4 en las células SK-hep1. **B)** Análogo a A) en células MDA MB 468.

La expresión del receptor de quimoquinas CCR6 también está relacionada con los procesos de diseminación tumoral y con un mal pronóstico de la enfermedad. Al analizar mediante RT-PCR los niveles de los transcritos este receptor en células de hepatocarcinoma humano SK-hep1 observamos que la expresión del receptor de hormonas tiroideas produce también una clara disminución en los niveles de expresión de CCR6 (Fig 49).

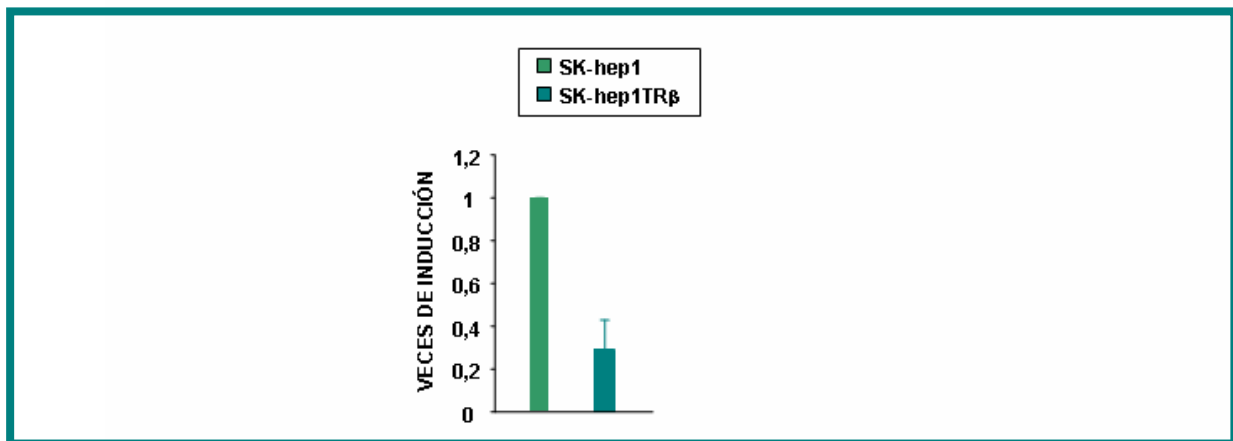
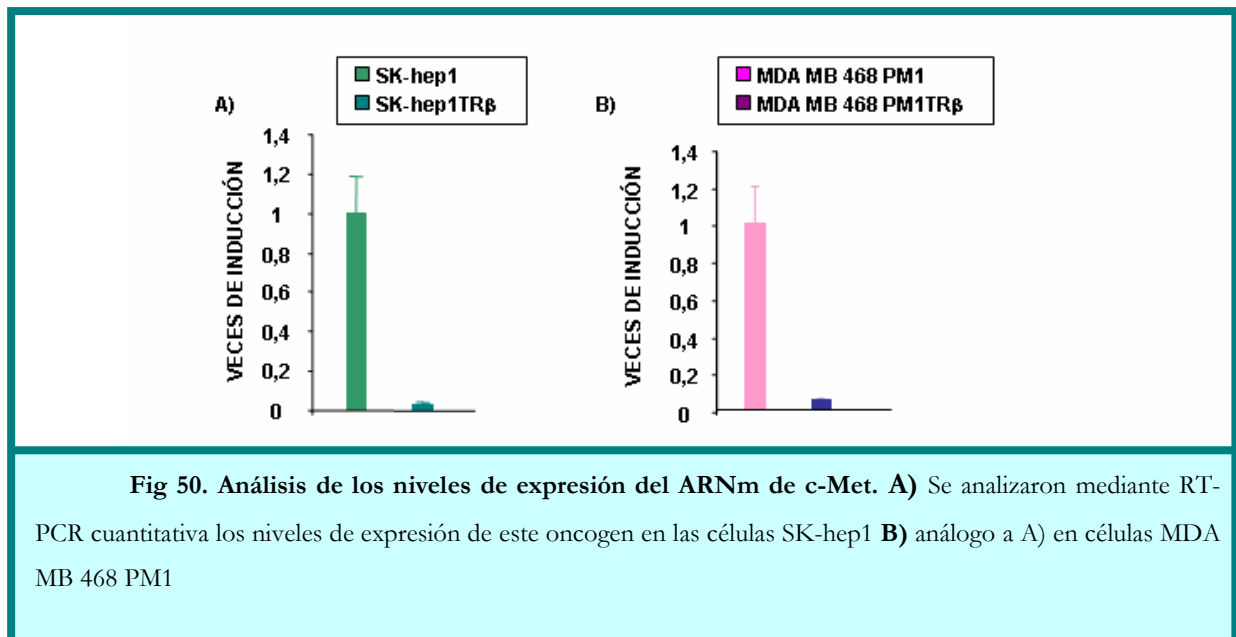


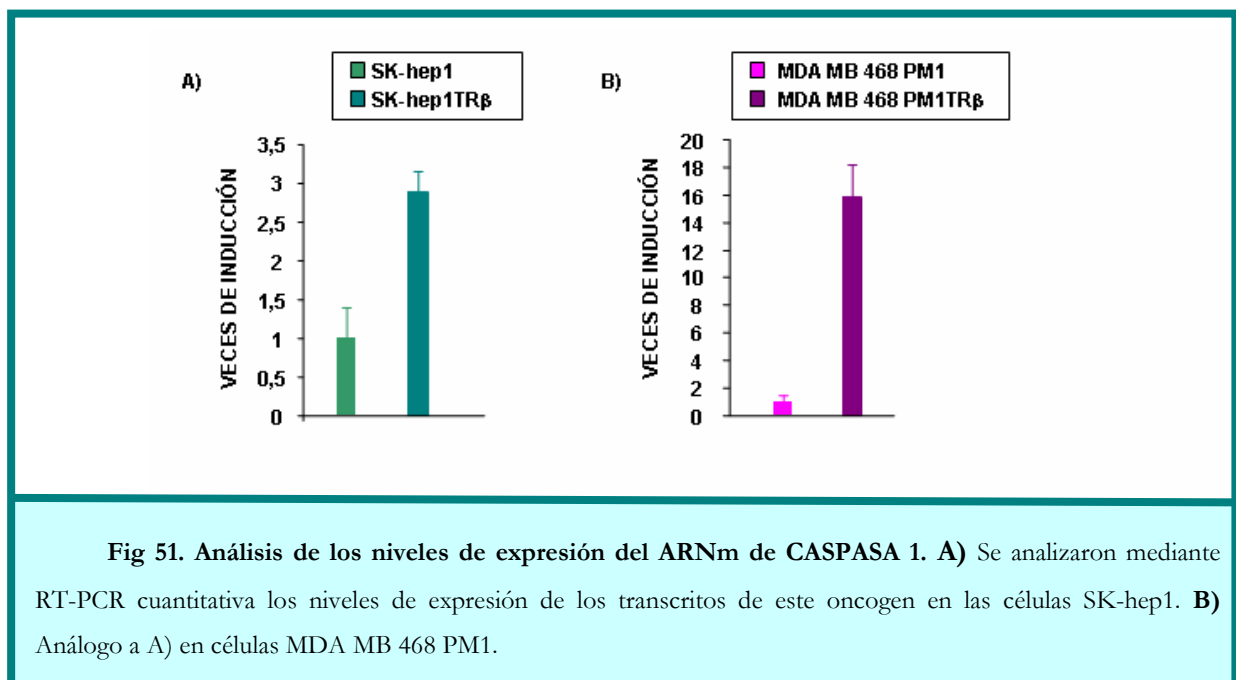
Fig 49. Análisis de los niveles de expresión del ARNm de CCR6. Se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa los niveles de expresión de CCR6 en las células SK-hep1. Los niveles de expresión de CCR6 en las células SK-hep1.

Otra proteína importante en el proceso de formación de metástasis es la proteína c-Met, receptor de membrana para la citoquina HGF (factor de crecimiento de hepatocitos). La sobreexpresión del oncogen c-Met se correlaciona directamente con la tendencia a formar metástasis y con un mal pronóstico de la enfermedad tumoral. Analizamos mediante RT-PCR cuantitativa los niveles de ARNm de c-Met en ambos modelos. La expresión de TRβ también inhibe de manera totalmente drástica la expresión de este

oncogén en ambos modelos celulares (Fig 50). De nuevo no se observa ningún efecto del tratamiento con T3 sobre la expresión de ARNm del oncogén c-Met (no mostrado).



Las caspasas son una familia de proteasas que desempeñan papeles clave en el desarrollo tumoral. No sólo están implicadas en el proceso de apoptosis sino que también juegan un papel fundamental en la activación proteolítica de citoquinas. La caspasa 1 (cisteinil proteasa relacionada con apoptosis 1) forma parte de la familia de cisteinil-proteasas y la pérdida de expresión se asocia con el desarrollo de metástasis en los nódulos linfáticos y con una baja supervivencia (Jee y cols., 2005). Cuando analizamos mediante RT-PCR cuantitativa los niveles de ARNm de esta proteasa observamos que están claramente aumentados en las células que expresan el receptor de hormonas tiroideas, tanto en el modelo de hepatocarcinoma como en el de adenocarcinoma de mama (Fig 51).



DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

La regulación del promotor de ciclina D1 por el oncogen ras en células de hepatoma HepG2

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que la expresión de TR β inhibe la transcripción, proliferación, transformación y tumorigénesis mediada por el oncogén ras y que el gen de la ciclina D1 parece ser una diana importante para los efectos antiproliferativos y anti-transformantes del receptor (García-Silva y Aranda., 2004).

Nuestros datos muestran que la regulación del promotor de ciclina D1 por Ras en células de hepatocarcinoma humano HepG2 depende de la integridad de los sitios CRE y Sp1 del promotor, tal y como se ha demostrado transfectando de manera transitoria mutantes del promotor en estos sitios, así como mediante la transfección transitoria de plásmidos con actividad dominante negativa para los factores Sp1 y ATF-2, un factor de transcripción de la familia CREB que se une a los sitios CRE. La importancia del sitio CRE se corroboró también mediante ensayos de tipo “un híbrido” con la construcción GAL-ATF-2. En la línea celular de neuroblastoma N2a β la respuesta del oncogen está mayoritariamente mediada por los sitios CRE del promotor (García-Silva y Aranda., 2004). Por el contrario, en las líneas de trofoblastos JEG-3 y CHO o en las células Mv1.Lu la estimulación por Ras parece estar mediada por secuencias de tipo AP-1 localizadas a -954 (Albanese y cols., 1995). También se ha descrito la importancia de los factores Sp1 en la inducción por el oncogén en células de endotelio vascular (Nagata y cols., 2001).

Recientemente se ha observado que la mutación PV del TR β es incapaz de reprimir la actividad del promotor de ciclina D1, al contrario de lo que ocurre con el receptor nativo, y que el sitio CRE también es responsable del efecto del receptor (Furumoto y cols., 2005). Esta mutación causa la aparición de tumores de tiroides y se ha postulado que la falta de represión del gen de la ciclina D1 por el receptor mutante es un factor importante en la tumorigénesis. En nuestro laboratorio se ha descrito la existencia de una interacción directa entre el TR y CREB que causaría de forma ligando-dependiente la inactivación de este factor de transcripción (Mendez-Pertuz y cols., 2003). El mutante PV presenta una capacidad de unión a CREB similar a la de la forma salvaje del receptor, aunque en el caso del mutante no observaron un aumento de la unión en presencia del ligando.

Nuestros resultados muestran la existencia de un antagonismo transcripcional entre el oncogén ras y T3 en las células de hepatoma, cuando se transfecta de manera transitoria TR β . La incubación con T3 produce la inhibición tanto de la actividad basal del promotor de ciclina D1 como de la estimulación inducida por Ras. Este antagonismo no es específico de esta línea celular sino que ha sido descrito previamente en distintos modelos celulares donde se expresan TRs (García-Silva y Aranda., 2004). En las células HepG2 el efecto de la hormona parece depender, al menos en parte, de los factores de transcripción ATF-2 puesto que el tratamiento con la hormona inhibe de manera drástica la transactivación mediada por el oncogén en ensayos de tipo “un híbrido” con el plásmido GAL-ATF-2. Lo mismo ocurre con la actividad de GAL-CREB (datos no mostrados).

La quinasa MSK fosforila a distintos factores de transcripción que incluyen a los factores CREB y ATF-2. Nuestros resultados muestran que la inhibición de esta quinasa, tanto mediante la transfección transitoria de plásmidos con actividad dominante negativo como con inhibidores sintéticos, reduce de manera muy sensible el efecto estimulador del oncogén sobre el promotor de ciclina D1. Además, la transfección con el dominante negativo de MSK bloquea también el efecto de la T3 sobre la transactivación mediada por el oncogén ras. Esto explicaría, al menos en parte, el bloqueo por la T3 de la transactivación de GAL-ATF-2 por el oncogén ras. El modelo de actuación que proponemos sería que la T3 inhibe la actividad de MSK y de este modo disminuye la actividad de los factores ATF-2/CREB que estimulan el promotor de ciclina D1 mediante la unión al sitio CRE del promotor.

En nuestro laboratorio también se ha observado que la T3 antagoniza la actividad transcripcional mediada por CREB en respuesta a forskolina, estimulador de la vía del AMPc. En este antagonismo estaría implicada una interacción directa entre CREB y TR que impediría la fosforilación de CREB por PKA (Mendez-Pertuz y cols., 2003). También se ha comprobado que la T3 inhibe la fosforilación de CREB por esteres de forbol o por los ligandos de distintos receptores tirosina quinasa que activan quinasas diferentes de PKA. Al contrario de lo que ocurre con el TR, el ácido retinoico causa la activación de CREB en células neuronales y esta activación que está mediada por ERK provoca la expresión de c-fos y otros genes que carecen de RAREs en su promotor pero si presentan CREs en él (Canon y cols., 2004).

Recientemente se ha descrito que la inducción de los genes diana de la progesterona requiere la activación de las quinasas ERK y MSK. El tratamiento con progesterona produce la rápida activación de ERK que permite la fosforilación del receptor de la progesterona (PR) y la activación de MSK. En este modelo la MSK fosforila la histona H3 que desplaza a HP1 γ y produce el reclutamiento de Brg1 y de la ARN polimerasa II. Se ha demostrado que existe una interacción directa entre PR, ERK y MSK (Vicent y cols., 2006).

El antagonismo de T3 sobre la activación del promotor de ciclina D1 y sobre la transformación mediada por el oncogén ras es dependiente de la integridad del DBD y de la hélice 1 del LBD.

El tratamiento con T3 no sólo inhibe la transactivación del promotor de ciclina D1 por Ras, sino que también bloquea de manera drástica la transformación de fibroblastos murinos NIH3T3 por este oncogén. Nuestros resultados demuestran que el antagonismo de T3 sobre la transcripción mediada por el oncogén ras no depende de la unión de coactivadores, dado que los receptores con las mutaciones K288I y E452Q, que no unen coactivadores y son incapaces de activar la transcripción dependiente de ligando de genes que contienen TREs, mantienen la capacidad de bloquear la estimulación del promotor de ciclina D1 por Ras. Estos resultados demuestran que los mecanismos implicados en este antagonismo transcripcional son diferentes a los responsables de la regulación transcripcional clásica a través de elementos TRE. Por otra parte, estos datos guardan similitud con los descritos en el estudio de la transrepresión del complejo AP-1 por los retinoides (Benkoussa y cols., 2002). Los receptores mutantes que no unen coactivadores también mantienen la capacidad de inhibir la formación de focos de transformación por el oncogén en fibroblastos NIH3T3, demostrando que los fenómenos de

transrepresión (entre los que se incluiría la inhibición de la expresión del gen de ciclina D1), son un componente fundamental en los efectos anti-transformantes de los TRs, mientras que la estimulación de genes con TREs que pudieran inhibir la formación de focos de transformación no parece jugar un papel importante.

Nuestros datos también demuestran que la integridad del DBD y de la hélice 1 del LBD del TR β , requerida para la interacción con correpresores, sí son necesarias para la inhibición del efecto del oncogén tanto sobre el promotor de ciclina D1 como sobre la transformación de los fibroblastos. Así, la mutación del residuo C102G que es fundamental para la estructura del primer dedo de zinc, abole tanto la transactivación como la transrepresión. Sin embargo, ya que esta mutación podría producir un cambio importante en la estructura global del dominio, hemos generando nuevos mutantes que cambian la secuencia de reconocimiento en el DNA sin afectar la estructura de dedos de zinc. Uno de estos mutantes (GS120) afecta a la denominada caja P del receptor que determina la especificidad de unión a ADN transformando dicha secuencia en la reconocida por la subfamilia de receptores de glucocorticoides. Este mutante no es capaz de mediar efectos antitransformantes potentes. Lo mismo ocurre con el mutante AA120, que no se une a elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TREs) ni a elementos de respuesta a glucocorticoides. Por tanto, estos resultados permiten concluir de nuevo que en la inhibición de la transformación parecen más importantes mecanismos de “transrepresión” que mecanismos clásicos de unión a un TRE, ya que hemos comprobado que ninguno de estos receptores es capaz de inducir la activación transcripcional de un gen reportador conteniendo elementos de respuesta a hormonas tiroideas en ensayos de transfección transitoria. En nuestro laboratorio se ha descrito previamente que mutaciones en el DBD bloquean la interacción de los TRs con CREB y que estos mutantes no inhiben la actividad transcripcional de este factor (Mendez-Pertuz y cols., 2003), por lo que no se puede descartar que el defecto en estas interacciones proteína-proteína impidan la transrepresión.

Nuestros resultados demuestran que la mutación de la denominada caja CoR de unión a corepresores (el mutante AHT en la hélice 1 del LBD), inhibe el efecto anti-transformante del receptor. Ello indicaría que la unión de corepresores participa en dicho efecto. Sin embargo, esta mutación no sólo inhibe la unión a los corepresores, sino que también tiene un efecto importante sobre la estructura global y la estabilidad del LBD (Pissios y cols., 2000), por lo que hemos utilizado el mutante puntual P214R con una capacidad disminuida de unión a corepresores. Cuando se ha testado la potencia de este receptor para inhibir transformación se ha podido observar que, como el mutante en la caja CoR, presenta una menor capacidad anti-transformante, sugiriendo otra vez un papel de los corepresores y por tanto de las deacetilasas de histonas (HDACs) que se unen a éstos en las acciones anti-transformantes del receptor. A este respecto, se ha descrito que los correpresores NcoR y SMRT desempeñan un papel activo en evitar la proliferación inducida por tamoxifeno en células de cáncer de mama (Keeton y Brown., 2005).

En conjunto los resultados obtenidos indican que en los efectos anti-transformantes del receptor juegan un papel importante dominios del receptor que son diferentes a los implicados en la regulación transcripcional clásica que implican unión del receptor a un elemento de respuesta en el DNA y el reclutamiento de coactivadores. Por otra parte, el paralelismo entre los efectos anti-transformantes y los efectos antagonistas de la transcripción del gen de ciclina D1, confirman que los mecanismos de

transrepresión transcripcional son fundamentales en la represión del efecto del oncogén ras por los receptores de hormonas tiroideas.

La expresión de TR β reduce la formación de tumores *in vivo*

En nuestro laboratorio se había demostrado anteriormente que la T3 inhibe la proliferación en las células de neuroblastoma de ratón N2a β , en las que reprime la expresión de ciclina D1, aumenta los niveles del inhibidor del ciclo celular p27 y bloquea la actividad de complejos ciclina-CDK2 causando un aumento de los niveles de Rb hipofosforilado (Perez-Juste y Aranda, 1999). Asimismo, el tratamiento de estas células con T3 reduce los niveles de ARNm y proteína del oncogén c-Myc (Pérez-Juste y cols., 2000). En fibroblastos NIH3T3 los TRs no sólo inhiben la inducción de ciclina D1 por Ras y los efectos transformantes del oncogén, sino que también tiene potentes efectos antitumorígenicos *in vivo* en ratones desnudos. El receptor es capaz de reprimir el crecimiento de los tumores causados por fibroblastos transformados por Ras, ya que la expresión de TR β bloquea por completo la formación de dichos tumores, y la de TR α retrasa muy significativamente su formación (García-Silva y Aranda., 2004). Otros datos de nuestro laboratorio también confirman los efectos antitumorígenicos de los TRs, ya que en un modelo de carcinogénesis química en piel de ratón tras una exposición prolongada al promotor tumoral TPA el tamaño de los tumores formados es mayor en los ratones knock-out para los TRs que en los salvajes. Adicionalmente, en algunos de estos animales los tumores muestran signos de transición a carcinoma, frente a los papilomas que se detectan en los animales que expresan los receptores.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, se han encontrado evidencias que demuestran una expresión aberrante y mutaciones en los genes de los TRs en distintas neoplasias humanas. En pacientes con hepatocarcinoma se han detectado mutaciones en el gen TR α 1 y TR β 1 en el 65% y 76% de los pacientes, respectivamente (Lin y cols., 1999). Recientemente, se ha descrito que distintos mutantes del TR β detectados en pacientes con hepatocarcinomas presentan defectos en la capacidad de unión de la hormona T3. Esta deficiente unión trae como consecuencia que en presencia de T3 no se produce la liberación de correpresores y el reclutamiento de coactivadores, lo que imposibilita la activación de la transcripción (Chan y Privalsky., 2006). Estos mutantes tampoco son capaces de inhibir la función de AP-1 dependiente de T3, además de actuar como dominantes negativos que imposibilitan la actividad de los receptores TR β salvajes. Por todo esto el hepatocarcinoma es un excelente modelo para estudiar la posible inhibición de la tumorigénesis por TR β .

En este trabajo mostramos como la reexpresión de TR β mediante infección viral, en la línea celular de hepatocarcinoma SK-hep1, que no expresa este receptor de manera endógena, retrasa la formación de los tumores cuando estas células se inoculan subcutáneamente en el flanco de ratones atímicos desnudos. Los tumores no sólo tardan más tiempo en aparecer cuando las células expresan TR β , sino que presentan un menor volumen. Esta inhibición de la tumorigénesis causada por la expresión de TR β no sólo no se observa sino que es aun más evidente y se mantiene durante más tiempo en animales en los que se ha inducido un estado de hipotiroidismo mediante el tratamiento con compuestos anti-

tiroideos. Esto último sugiere que el efecto inhibitor del receptor, al menos en parte, podría ser independiente de la presencia del ligando. Además, los tumores formados por las células de hepatoma que no expresan el receptor tardan más tiempo en desarrollarse en animales hipotiroideos. Estos resultados coinciden con resultados previos de nuestro laboratorio que muestran que el estado tiroideo de los animales desempeña cierto papel en la tumorigénesis mediada por Ras al inocular en los animales células NIH3T3 transfectadas de manera estable con este oncogén (García-Silva y Aranda, 2004). Los tumores en este caso también se desarrollan con retraso en los animales hipotiroideos con independencia de la expresión de TRs. Esto se puede deber al hecho de que los animales hipotiroideos presentan graves alteraciones metabólicas que afectan a los niveles de distintos factores de crecimiento, o a efectos de la hormona en el entorno del tumor que influyan en el desarrollo del mismo de manera paracrina. También se puede deber a acciones no genómicas de la hormona. Además se ha descrito que el tratamiento con T3 regula los niveles de TRs mediante la ruta de la ubiquitinización (Dace y cols., 2000) y recientemente se ha observado que la T3 regula de manera negativa la expresión de los TRs, afectando a la estabilidad del ARN (Monden y cols., 2006). Estos resultados sugieren que la expresión de TR β en la células del tumor podría ser menor en ratones eutiroideos que en animales hipotiroideos. Otros resultados de estudios en animales muestran que el hipotiroidismo se asocia con frecuencias más bajas de neoplasias y un retraso en el crecimiento de tumores transplantados (Gernsey y cols., 1983).

Se ha descrito que el tratamiento con T3 de células de hepatocarcinoma HepG2, transfectadas de manera estable con TRs, produce un descenso en la proliferación. Éste efecto se debe a una prolongación de la fase G0/G1 y se acompaña de la represión de la expresión de CDK2 y ciclina E, así como del aumento en la expresión de p21 (Lin y cols., 1994; Yen y cols., 2006). El efecto de la hormona no se observa en las células parentales que expresan muy bajos niveles endógenos de TRs. Por el contrario, se ha descrito que el tratamiento con T3 produce un aumento en el índice de incorporación de BrdU en carcinomas inducidos en ratas, aunque los niveles de expresión de los TRs en este hepatocarcinoma se desconocen (Ledda-Columbano y cols., 2000). Sin embargo, los datos obtenidos en este estudio indican que la administración de T3 provoca una disminución del 70% en el número de lesiones positivas a GST, marcador de lesiones preneoplásicas y que el tratamiento prolongado con la hormona provoca una disminución del 50% en la incidencia de hepatocarcinomas y un bloqueo completo de la incidencia de metástasis (Ledda-Columbano y cols., 2000). El efecto inhibitor de la T3 sobre la tumorigénesis no sólo se limita a los estadios iniciales, ya que también se aprecia cuando el tratamiento con T3 se realiza al cabo de 8 meses (Ledda-Columbano y cols., 2003).

Las mutaciones y alteraciones en los TRs también son frecuentes en otras patologías neoplásicas, entre las que se encuentra el cáncer de mama (González-Sancho y cols., 2003; Silva y cols., 2002), habiéndose observado además un grado variable de metilación y el silenciamiento de TR β por hipermetilación del promotor en etapas tempranas de la carcinogénesis mamaria y en distintas líneas celulares de cáncer de mama (Li y cols., 2002). Por ello el modelo de adenocarcinoma de mama es otro modelo excelente para confirmar el papel de TR β como supresor tumoral. La línea celular empleada, MDA MB 468 PM1 de adenocarcinoma lobulillar de mama, es altamente proliferante e invasiva, pudiéndose de esta manera estudiar el posible efecto del receptor en un carcinoma más agresivo. En este

caso la inoculación de las células de cáncer de mama se realizó siguiendo un modelo ortotópico. Al inocular las células directamente en la grasa de la mama se simulan mejor las condiciones fisiológicas en las que se origina este tipo de cáncer. Las células del entorno del tumor secretan distintos factores y sustancias que activan y producen distintos efectos en las células tumorales de manera paracrina.

En la línea celular MDA MB 468 PM1, la reexpresión de TR β también produjo una clara inhibición de la tumorigénesis. El retraso en la aparición de los tumores es menor, si bien las diferencias en el volumen tumoral causada por la expresión del TR β es aún más evidente que en el modelo de células de hepatocarcinoma. De este modo, las mayores diferencias observadas en este modelo tras la expresión de TR β se pueden deber no sólo al modelo de mama sino también al modelo ortotópico de inoculación y a la importancia de los factores paracrinos sobre las células tumorales. Al inocular las células de adenocarcinoma de mama en animales hipotiroideos apenas se aprecia el efecto protector del TR β , posiblemente debido a que los factores paracrinos compensen el efecto de la T3.

Nuestros datos muestran que en las células SK-hep1 se produce una pérdida paulatina de la expresión del TR β , tanto en las células en cultivo como *in vivo* durante el crecimiento tumoral y que esta pérdida coincide en el tiempo con el momento en el que se deja de apreciar el efecto protector del receptor. A los 25 días de la inoculación apenas se detecta expresión del receptor TR β y es justo en este momento cuando se iguala el tamaño de los tumores y se deja de observar el retraso del crecimiento tumoral por la expresión de TR β . Esta disminución en los niveles de expresión de TR β podría explicarse por el hecho de que se inocula una mezcla de células que, en su conjunto, expresan TR β y responden al tratamiento con el ligando pero que presentan un distinto grado de expresión del receptor. De esta manera, a lo largo del crecimiento tumoral se seleccionarían aquellas células de la mezcla con unos menores niveles de expresión de TR β , dado que éste supone una desventaja para el crecimiento tumoral.

Sorprendentemente, en el modelo de adenocarcinoma de mama no se detecta la drástica disminución en los niveles de expresión de TR β en el momento de extirpar los tumores (día 35). Esto podría explicar que el efecto de la expresión de TR β sea más evidente y que incluso no lleguen a igualarse los tamaños de los tumores.

La expresión de TR β bloquea la capacidad de las células de responder al tratamiento con TGF β o factores de crecimiento.

Nuestros resultados muestran que la proliferación tanto de las células SK-hep1 como de las células MDA MB 468 PM1 aumenta en respuesta al tratamiento con TGF β , EGF o IGF-1. Por el contrario, la expresión de TR β en ambos modelos celulares bloquea por completo la respuesta a estos tratamientos. Es importante señalar que esta inhibición no requiere la adición de hormona al medio de cultivo, sugiriendo que el receptor vacío (o al menos en presencia de concentraciones de ligando extremadamente bajas) es capaz de bloquear la respuesta a factores de crecimiento o transformantes. La expresión de TR β en las células SK-hep1 no solamente bloquea la proliferación mediada por TGF β , sino también otras respuestas como la estimulación de la actividad de la MMP-2. La incapacidad de responder a

esta citoquina podría contribuir a explicar el fenotipo menos agresivo de los tumores originados por células que expresan TR β (menor angiogénesis, reversión parcial de la EMT, mayor grado de diferenciación y menor invasividad y formación de metástasis).

En la línea celular MDA MB 468 PM1 se encuentran sobreexpresados los receptores de TGF β y existía la posibilidad de que la falta de respuesta a este factor se debiese a que el TR β reprimiese la expresión de estos receptores. Sin embargo, hemos comprobado que ni en estas células ni en las células de hepatoma existe una disminución del receptor T β R-II tras la expresión de TR β . El efecto de TGF β sobre ambos modelos celulares parece que implica tanto a la ruta de señalización de las Smads como a la de RAF/MEK/ERK, tal y como se aprecia en los ensayos de transfección transitoria de un promotor inducible por las proteínas Smads (p3TP-lux), así como al realizar ensayos de tipo “un híbrido” con las construcciones GAL-ELK y GAL-ATF-2. Mediante experimentos empleando las células epiteliales de mama Eph4 parentales y transformadas con el oncogén H-ras se ha descrito que la vía de RAF/MEK/ERK es necesaria para la inducción de la EMT, la tumorigénesis y metástasis por el TGF β (Janda y cols., 2002), por lo que la inhibición de esta ruta por el TR β podría explicar parte de los efectos antitumorigénicos del receptor.

Como hemos mencionado, el TR β antagonizaría no solamente la vía de Ras, sino también la vía de las Smads, lo que supone la definición de un nuevo papel de estos receptores como moduladores de esta vía de señalización. Se ha descrito que los correpresores Ski se unen directamente a los correpresores NcoR/SMRT y mSin3A y que éste complejo parece ser necesario para la represión transcripcional mediada por receptores nucleares (Nomura y cols., 1999). Adicionalmente, Ski interacciona directamente con Smad 2, 3 y 4 en un elemento de respuesta a TGF β de un promotor reprimiendo su capacidad de activar sus genes diana (Sun y cols., 1999; Luo y cols., 1999; Akiyoshi y cols., 1999; Xu y cols., 2000). Como hemos mencionado, la interacción del TR β con correpresores parece necesaria para la inhibición de la transformación de los fibroblastos NIH3T3 por el oncogén Ras. Además, mediante microarrays realizados en las células SK-hep1 parentales y transfectadas de manera estable con TR β , tenemos datos preliminares que indican que la expresión de TR β aumenta de manera drástica la expresión del correpresor NcoR. Estos datos sugieren que los complejos corepresores podrían estar implicados en el antagonismo de la actividad transcripcional de las Smads por los TRs, aunque serán necesarios nuevos experimentos para comprobar esta hipótesis.

Los factores de crecimiento EGF e IGF-1 son potentes mitógenos (Di Fiore y cols., 1990; Culig y cols., 1996) que regulan la proliferación tanto por bucles autocrinos como paracrinos, y de este modo promueven la tumorigénesis y formación de metástasis. Nuestros resultados muestran que en ambos modelos celulares el efecto de TR β sobre las respuestas a EGF e IGF-1 parece implicar la ruta de señalización RAF/MEK/ERK, tal y como se aprecia en los ensayos de tipo “un híbrido” con las construcciones GAL-ELK y GAL-ATF-2, en los que la presencia de TR β impide la estimulación por el tratamiento con EGF o IGF-1. Sin embargo, no hemos observado ningún efecto sobre la fosforilación de Akt o p38 (datos no mostrados), indicando que estas vías no parecen afectadas por el TR.

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que el tratamiento con EGF o IGF-1 estimulan al promotor de ciclina D1 en células N2a, si bien esta estimulación no se observa en células N2a β . Además, la sobreexpresión de TR en células N2a inhibe la inducción del promotor por IGF-1. Estos datos sugieren que la presencia de niveles altos de TRs podrían bloquear las vías de señalización inducidas por la unión de estos factores a sus receptores tirosina-quinasa.

En la línea celular MDA MB 468 PM1 se encuentran sobreexpresados los receptores de EGF (Riedemann y cols., 2007). Nuestros resultados demuestran que la expresión de TR β disminuye los niveles de ARNm de los receptores EGFR1, ErbB3 e IGFR1 en ambos modelos celulares, lo cual podría tener un papel importante en los efectos anti-tumorigénicos y anti-metastásicos del receptor. También se encuentran aumentados los niveles de ARNm de la proteína IGFBP3 que se une a IGF-1, compitiendo de este modo la unión del factor al receptor IGFR1. La sobreexpresión de EGFR se ha detectado en distintos tumores y líneas celulares tumorales (Liebermann y cols., 1984; Sainsbury y cols., 1985; Neal y cols., 1985; Liebermann y cols., 1985; Gullick y cols., 1986; Yamamoto y cols., 1986; Radinsky y cols., 1995). Se ha descrito que el bloqueo del EGFR con anticuerpos disminuye la proliferación (Connolly y Rose, 1991; Fong y cols., 1992) y reduce la fosforilación de EGFR (Fong y cols., 1992; Sherwood y cols., 1998). El bloqueo de EGFR inhibe la actividad constitutiva de ERK2 en líneas celulares de cáncer de próstata (Putz y cols., 1999).

El promotor de EGFR presenta distintos sitios de unión para factores Sp1 y complejos AP-1 (Ishii y cols., 1985; Johnson y cols., 1988) y también se ha descrito la estimulación de este promotor por p53 (Deb y cols., 1994). Se ha descrito que los TRs suprimen la transactivación dependiente de Sp1 del promotor de EGFR mediante competición por los sitios de unión (Xu y cols., 1993) y es también conocida la transrepresión dependiente de ligando ejercida por TR sobre la actividad de AP-1 (Jun/Fos) (Pfahl, 1993). Recíprocamente, AP-1 inhibe la transactivación mediada por estos receptores nucleares. Los receptores también pueden regular negativamente la actividad de promotores que contienen elementos de unión para AP-1, NF- κ B o CREB sin unirse directamente a dichos elementos (Gottlicher y cols., 1998; Karin y cols., 2001; Pfahl, 1993; Sánchez-Pacheco y cols., 1995; Mendez-Pertuz y cols., 2003; García-Silva y cols., 2004), por lo que la inhibición de la expresión de EGFR observado en las células SK-hep1 y MDA MB 468 PM1 podría ser consecuencia de la interferencia transcripcional con estos factores.

La expresión de TR β inhibe la angiogénesis y aumenta la necrosis en los tumores

Nuestros resultados muestran que los tumores originados por las células SK-hep1 presentan una gran área necrótica central y un bajo grado de angiogénesis. La expresión de TR β en este modelo aumenta el área necrótica. En el caso de los tumores originados por las células MDA MB 468 PM1 sí se observa un cierto grado de angiogénesis en los tumores. Las inmunohistoquímicas con el anticuerpo marcador de endotelios CD31 muestra una clara disminución del número de vasos en los tumores originados por células que expresan TR β .

Existen distintas evidencias de que diferentes receptores nucleares pueden regular la angiogénesis. Así, se ha descrito que la hormona T4 favorece el proceso de angiogénesis en experimentos empleando el

modelo de la membrana corioalantoica de pollo (Davis y cols., 2004) y que este efecto requiere la interacción de la hormona en la membrana plasmática con la integrina $\alpha V\beta 3$ (Bergh y cols., 2005). Nuestros resultados no correlacionarían con este fenómeno ya que está mediado por el receptor nuclear que tendría más bien efectos anti-angiogénicos. Por otra parte, en células endoteliales (MVEC) cultivadas sobre una matriz de fibrina en presencia de $TNF\alpha$ y FGF, simulando la situación *in vivo*, se aprecia la disminución de la formación de los túbulos característicos de la angiogénesis tras el tratamiento con testosterona y dexametasona, así como la estimulación de la misma por el tratamiento con ácido retinoico. No se observó ningún efecto tras el tratamiento con hormona tiroidea, posiblemente debido a la ausencia de expresión de TRs en esta línea celular (Lansink y cols., 1998). La $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3, ligando del receptor nuclear VDR, presenta también un potente efecto bloqueante de la angiogénesis (Iseki y cols., 1999). El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es clave en el proceso de angiogénesis. El tratamiento con la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3, en distintos modelos celulares, reduce la expresión del ARNm de VEGF que induce la activación, migración, proliferación y formación del tubo en las células endoteliales (Fernandez-Garcia., 2005; Nakagawa y cols., 2005). Aún no conocemos si el receptor de hormonas tiroideas pudiera también reprimir la expresión de VEGF.

La citoquina $TGF\beta$ secretada por las células promueve la angiogénesis tumoral favoreciendo así el crecimiento tumoral por medio de la inducción de VEGF (Pepper, 1997; Pardali y Moustakas, 2007). El tratamiento de tumores con péptidos latentes o anticuerpos contra $TGF\beta$ provocan la disminución de la densidad de vasos sanguíneos (Tuxhorn y cols., 2002). La incapacidad de las células que expresan $TR\beta$ de responder a $TGF\beta$ podría explicar la disminución de la angiogénesis tumoral observada. El tratamiento con $TGF\beta$ también produce la secreción de VEGF por células de músculo liso A10 (Yamamoto y cols. 2001). Recientemente se ha descrito que los ligandos dexametasona y corticosterona suprimen el efecto de $TGF\beta$, mientras la T3 no tiene ningún efecto sobre estas células (Tanabe y cols., 2006).

La estimulación con EGF de las células endoteliales HMVECs induce la formación del tubo (Okamura y cols., 1992; van Crujisen y cols., 2005; Hirata y cols., 2002). Además, la activación de la vía de EGFR aumenta la producción de moléculas proangiogénicas en una gran variedad de patologías tumorales (Goldman y cols., 1993; Akagi y cols., 2003). En carcinoma de páncreas se ha observado que el descenso en la expresión de VEGF y IL-8 observado tras semanas de tratamiento con el inhibidor de EGFR PKI 166 va acompañado de la disminución en la activación de EGFR (Bruns y cols., 2000; Bruns y cols., 2000). Por tanto, la incapacidad de responder a EGF podría también explicar el menor grado de angiogénesis observado en las células MDA MB 468 PM1 $TR\beta$.

En células linfohematopoiéticas se ha descrito que el eje ligando-receptor CXCL12-CXCR4 estimula la secreción de VEGF (Kijowski y cols., 2001). Además, la expresión de VEGF promueve la invasión de carcinomas de mama, de una manera autocrina, regulando al receptor CXCR4. Los tumores formados por células de cáncer de próstata PC3 que sobrexpresan CXCR4 presentan un mayor número de vasos sanguíneos que en las células parentales que expresan unos niveles normales del receptor (Darash-Yahana y cols., 2004). Tanto en las células SK-hep1 como en las células MDA MB 468 PM1, la expresión

de TR β produce una drástica disminución en los niveles de ARNm de CXCR4, lo cual también podría contribuir al menor grado de angiogénesis en los tumores que expresan el receptor de hormonas tiroideas.

TR β produce una reversión parcial de la transición epitelio-mesénquima

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso clave en la progresión tumoral que se caracteriza por la progresiva pérdida de expresión de las proteínas de adhesión (cadherina E, β catenina y citoqueratinas) y la reexpresión de proteínas mesenquimales (vimentina y cadherina N), dando lugar a tumores invasivos con las características migratorias de las células mesenquimales (Tse y Kalluri, 2007).

Las moléculas de cadherina E se conectan a los filamentos de actina de una manera indirecta a través de la α y β catenina en el citoplasma (Gottardi y Gumbiner., 2001). Así, el control no sólo de la actividad de cadherina E sino también de β catenina es de gran importancia para la adquisición del fenotipo metastático. La EMT se correlaciona con la presencia de β catenina en el núcleo (Gottardi y cols., 2001; Stockinger y cols., 2001).

Nuestros resultados muestran que las células SK-hep1 dan lugar a tumores en los que no se detecta expresión de los marcadores epiteliales cadherina E y β catenina. Por el contrario, la expresión de TR β en estas células produce una reexpresión parcial de la proteína de adhesión β catenina, aunque no se observa ningún efecto sobre la expresión de cadherina E. Además, la β catenina se distribuye en la membrana plasmática, pudiendo así desarrollar su función en el sistema de adhesión y anclaje de las células.

Las citoqueratinas (KRT) son proteínas estructurales específicas de células epiteliales que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto (Sommers y cols., 1992; Sommers y cols., 1994). La expresión de KRT 18 en las células tumorales se asocia con una reducida capacidad invasiva *in vitro* y una menor capacidad tumorigénica, así como con una menor resistencia a fármacos. Las KRT 8 y 18 caracterizan la zona más diferenciada de los carcinomas de mama. Se ha descrito que el 80% de los carcinomas de mama muestran una disminución en la expresión de las KRT 8/18 asociadas a diferenciación y que esta pérdida está asociada a un mal pronóstico de la enfermedad (Schaller y cols., 1996). Una correlación similar entre la expresión de KRT 8/18 y la capacidad tumorigénica ha sido descrita al inocular en ratones células de carcinoma de páncreas murino (Pankov y cols., 1997). La reexpresión de KRT 18 en la línea celular MDA MB 231, que expresa bajos niveles endógenos de esta proteína, reduce la invasividad y el potencial metastático y aumenta la expresión de proteínas de adhesión (Bühler y Schaller, 2005).

Nuestros resultados muestran que la expresión de TR β provoca un claro aumento en la expresión de KRT 8/18, tanto en los tumores originados por células SK-hep1 como por células MDA MB 468 PM1. Esta regulación se aprecia también en las células en cultivo antes de ser inoculadas en los animales.

Se ha descrito que el ácido retinoico y la T3 reprimen la transcripción de las queratinas 5, 14, 6, 16 y 17 (Tomic-Canic y cols., 1992; Radoja y cols., 1997; Jho y cols., 2005). Sin embargo nuestros resultados muestran la estimulación de la KRT 8/18. Además, se ha descrito que muchas KRT se regulan por

distintas formas de AP-1 en queratinocitos (Ma y cols., 1997; Rossi y cols., 1998; Radoja y cols., 2004) y la transrepresión de estos sitios por los TRs podría contribuir a su inhibición por la T3. Por el contrario nuestros resultados muestran la estimulación de la KRT 8/18.

En cáncer la expresión de vimentina (vim), proteína típica de los filamentos del citoesqueleto de células mesenquimales, se asocia con un fenotipo desdiferenciado, alta motilidad, resistencia a fármacos y mal pronóstico clínico (Sommers y cols., 1992; Thompson y cols., 1992; Sommers y cols., 1994). El aumento en la motilidad y el comportamiento invasivo se revierte al transfectar nucleótidos antisentido para vim (Hendrix y cols., 1997). Además, la sobreexpresión de vim en las células de carcinoma de mama MCF-7 aumenta la motilidad e invasividad *in vitro* (Hendrix y cols., 1997). La sobreexpresión de vim y su relación con la formación de metástasis se ha descrito en distintas patologías tumorales (Ben Ze'ev y Raz., 1985; Domagala y cols., 1994; Hendrix y cols., 1997; Moch y cols., 1999; Lang y cols., 2002). Además, la expresión de vim aumenta en células que sufren la EMT y en muchos tumores metastásicos (Bussemakers y cols., 1992).

Recientemente se ha comparado la expresión de vim en líneas celulares de un hepatocarcinoma primario (H2-P) y de las metástasis desencadenadas por él (H2-M) (Wen y cols., 2002), observándose que se encontraba aumentada en la línea celular metastásica (Hu y cols., 2004). Al analizar 60 parejas de tumor primario y metástasis se observó expresión de vim en el 11% de los primarios y en el 45% de las metástasis. Por otra parte, el tratamiento de las células de carcinoma de próstata humano DU-145 con el retinoide sintético 4-HPR produce una clara disminución de los niveles de vim, así como de la invasividad y motilidad (Hendrix y cols., 1997; Webber y cols., 1999).

Nuestros resultados muestran que los tumores originados por las células SK-hep1 y MDA MB 468 PM1 presentan una alta expresión de vim y que la expresión de TR β produce una drástica disminución en la expresión de esta proteína, lo cual podría jugar un papel importante en la reducida invasividad de las células que expresan el receptor. Esta inhibición concuerda con datos previos obtenidos en la línea de glioblastoma murino B3.1. En estas células la expresión de TR α produce una disminución en la proliferación tanto en presencia como en ausencia de T3 que se encuentra acompañada por la disminución en la expresión de distintos genes, entre los que se encuentra la vim (Iglesias T y cols., 1994).

Se ha descrito que la expresión de vim se encuentra regulada por sitios de unión AP-1 (Rittling y cols., 1989; Sommers y cols., 1994), así como por sitios NF- κ B (Lilienbaum y Paulin., 1993) del promotor. El tratamiento con TGF β de las células esqueléticas C2C12 no sólo evita la regulación negativa de vim sino que aumenta su expresión. Los sitios AP-1 en tandem son necesarios para este efecto de la citoquina TGF β , si bien también se requiere la unión de Smad 3 y factores Sp1/Sp3 (Wu y cols., 2006). Por tanto también en este caso la transrepresión de estos sitios podría ser el mecanismo por el que TR β reprime la expresión de vim.

La expresión de vim también se regula por el ciclo celular (Ferrari y cols., 1986), factores de crecimiento (Ferrari y cols., 1986; Carey y Zehner., 1995; Sommers y cols., 1994; van de Klundert y cols., 1995) y citoquinas como INF- γ (Izmailova y cols., 2000). La no respuesta a factores de crecimiento de las células que expresan TR β podría explicar las diferencias que observamos en los niveles de vim.

En conjunto nuestros resultados muestran que la expresión de TR β aumenta la expresión de los marcadores epiteliales β catenina y KRT 8/18 y disminuye la expresión del marcador mesenquimático vim, produciendo de esta manera una reversión parcial de la EMT. La expresión de TR β tanto en las células SK-hep1 como en las MDA MB 468 PM1 provoca la evolución de las células hacia un fenotipo más epitelial, con un mayor grado de diferenciación.

La expresión de TR β reduce la capacidad invasiva tanto *in vitro* como *in vivo*

Nuestros resultados demuestran que las células SK-hep1 y especialmente las MDA MB 468 PM1 son células que presentan un fenotipo altamente infiltrante e invasivo. Por el contrario, la expresión de TR β en ambas líneas celulares provoca el crecimiento por expansión de los tumores, frente al crecimiento infiltrante e invasivo. La invasión de los tejidos adyacentes al tumor (músculo y piel), así como la infiltración de vasos sanguíneos y linfáticos, se ve drásticamente disminuida por la expresión de TR β . Para que ocurra este comportamiento invasivo ha de degradarse la lámina basal que rodea al tumor, así como las paredes endoteliales de los capilares y vasos sanguíneos y linfáticos. Esta degradación es en parte llevada a cabo por colagenasas, entre las que destacan la MMP-2 y la MMP-9. Tanto la actividad como la expresión de la MMP-9 se encuentra disminuída en las células, tanto de hepatoma como de adenocarcinoma de mama, que expresan TR β . En el caso de las células MDA MB 468 PM1 el efecto del receptor por sí sólo es menor, siendo necesario el tratamiento con T3 para observar una fuerte disminución.

La capacidad de proliferar de las células sin estar ancladas a un sustrato, así como de sobrevivir en suspensión y en movimiento están drásticamente inhibidas, sino totalmente eliminadas, en las células SK-hep1 y MDA MB 468 PM1 que expresan TR β . En los experimentos de formación de colonias en agar blando, en las células de hepatocarcinoma, el efecto del TR β se ve potenciado cuando se tratan las células con T3.

En los ensayos de invasión en cámaras transwell la expresión de TR β de nuevo reduce en las células SK-hep1 y elimina en las MDA MB 468 PM1 la capacidad de migrar y atravesar la matriz de matrigel. En el modelo de células de hepatocarcinoma, la presencia de TR β disminuye en un 50% la capacidad migratoria e invasiva de estas células, llegando esta disminución a ser completa al tratar con T3 las células que expresan el receptor. La drástica disminución de la capacidad invasiva que se observa en las células que expresan TR β tiene una clara relación con la capacidad metastásica de los tumores originados por estas células. La reducción o bloqueo de la capacidad de degradar proteínas de la matriz extracelular impide tanto la degradación de dicha matriz como de las paredes de los capilares y vasos, necesarias ambas para la diseminación de las células tumorales por el organismo y para la colonización de nuevos órganos donde se desarrollarán las metástasis.

La expresión de EGFR se relaciona también con la migración celular, invasión y metástasis (Kondapaka y cols., 1997; Aaronson., 1991-1992; Chakrabarty y cols., 1995; Rajkumar y Gullick., 1994a y b). La línea celular MCF-7, que expresa bajos niveles de EGFR (Davidson y cols., 1987) muestra tan sólo una limitada capacidad migratoria cuando se tratan las células con TGF α . Por el contrario, las células

MDA MB 468 que sí expresan altos niveles de EGFR (Davidson y cols., 1986) muestran una elevada y constante capacidad migratoria tras la estimulación con este ligando. La sobreexpresión de EGFR en células MCF-7 provoca un patrón de migración similar al de las células MDA MB 468 (Kruger y Reddy, 2003). La disminución en la expresión de EGFR podría explicar, al menos parcialmente, el comportamiento menos agresivo de las células que expresan TR β .

La fibronectina es una proteína clave en la interacción entre las células y la ECM y desempeña un papel fundamental en la adhesión celular, migración, proliferación y en el mantenimiento de la morfología celular (Hynes, 1985a, b; Pankov y Yamada, 2002). Asimismo es uno de los componentes que forman parte del matrigel empleado para los ensayos de invasión. Recientemente se ha descrito que el tratamiento con T3 en células de hepatocarcinoma humano HepG2, transfectadas de manera estable con TRs, aumenta los niveles de expresión de fibronectina (Lin y cols., 2004).

La MMP-9 es una proteínasa que desempeña un papel fundamental en los procesos de invasión, intravasación y extravasación y se ha descrito que el tratamiento con EGF estimula la producción de MMP-9 en distintas líneas de cáncer de ovario (Ellerbroek y cols., 1998). El promotor de MMP-9 contiene sitios putativos para AP-1 (-533, -79), NF- κ B (-600), Sp1 (-558) y PEA3 (-540) (Sato y cols., 1993). A través de estos sitios de unión, la expresión de MMP9 se regula por distintos factores de crecimiento, citoquinas y oncogénos (Liu y cols., 2002; Zeigler y cols., 1999; Hozumi y cols., 2001). La presencia de sitios de unión para factores de transcripción regulables por TRs, así como la activación por factores de crecimiento, podrían de nuevo explicar la menor expresión y actividad de la MMP9 en células que expresan TR β .

El tratamiento de las células de hepatoma Huh7 con el ligando CXCL12 produce la activación de la expresión de MMP-9. En este efecto están implicados tanto el receptor CXCR4 como la señalización por MAPK (Chu y cols., 2007; Sutton y cols., 2007). Además CXCR4/CXCL12 está implicado en la secreción de MMP9 y MMP2 en células de hepatocarcinoma murino Hca-F y Hca-P (Hou y cols., 2001; Chu y cols., 2007). Cuando se bloquea el receptor CXCR4 mediante tratamiento con un anticuerpo específico, la cantidad de MMP-9 y MMP-2 secretada disminuye drásticamente. Se ha descrito que CXCR4 también media la secreción de MMP9 en carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Samara y cols., 2004). CXCL12 induce la secreción de formas latentes de MMPs en distintos tipos celulares, incluyendo células tumorales (Janowska-Wieczorek y cols., 2000; Libura y cols., 2002). La expresión de TR β tanto en las células SK-hep1 como en las MDA-MB 468 produce una drástica disminución en los niveles del receptor CXCR4 lo que podría también estar relacionado con los menores niveles de MMP9.

La expresión de receptores nucleares inhibe la expresión de MMP-1 pero su promotor carece de HREs (Schroen y Brinckerhoff, 1996). La sobreexpresión del correceptor SMRT inhibe la estimulación de este promotor por IL-1, PMA o v-Src (Schroen y cols., 1997). SMRT inhibe una región proximal (321 pb) que contiene sitios de unión AP-1 y Ets. La mutación del sitio AP-1 de la posición -77 de este promotor produce el mismo efecto que la sobreexpresión de SMRT. Heterodímeros RARs/RXR, a través de interacciones con c-Jun, se unen de manera indirecta al sitio AP-1 proximal del promotor de MMP-1 (Pan y cols., 1995; Schroen y Brinckerhoff, 1996). No se puede descartar que el TR β utilice un mecanismo similar para inhibir la expresión de otras MMPs.

Tal y como se ha mencionado anteriormente se han realizado ratones “knock-in” para una forma mutada de TR β (TR β PV), y ratones homocigotos para esta mutación desarrollan carcinomas de tiroides de manera espontánea, presentando invasión capsular, invasión vascular, anaplasia y metástasis en pulmón y corazón pero no en los nódulos linfáticos (Suzuki y cols., 2002). TR β PV interacciona físicamente con la subunidad p85 α de PI3K de una manera más fuerte que la forma salvaje del receptor. Mediante esta interacción se activan distintas MMPs que incluyen a la MMP2 y a la proteasa catépsina D (Furuya y cols., 2006; Kato y cols., 2004; Furuya y cols., 2006; Ying y cols., 2003).

La expresión de TR β bloquea la capacidad de formar metástasis *in vivo*

Observamos que el TR β tiene un efecto drástico sobre la formación de metástasis *in vivo*. Su expresión inhibe completamente la formación de metástasis nodulares y tan sólo se observa en algún pulmón células aisladas siguiendo un patrón intersticial. En animales hipotiroideos el efecto del receptor TR β es menor, mostrando que es necesaria la presencia de ligando y receptor para observar el máximo efecto supresor de la formación de metástasis. Esto coincide con la mayor agresividad observada en el estudio histopatológico de los tumores primarios desarrollados en animales hipotiroideos. Las células MDA MB 468 PM1 son mucho más agresivas y metastásicas que las SK-hep1, observándose en ambas el efecto de TR β . Incluso en los animales inoculados en la grasa de la mama con células MDA MB 468 PM1 se desarrollaron metástasis espontáneas cutáneas en las extremidades delanteras en el 20% de los animales, mientras que no se detectó este fenómeno en ningún animal inoculado con las células que expresan TR β .

En modelos de cáncer de mama en ratón, la señalización por TGF β promueve la formación de metástasis en pulmón (Siegel y cols., 2003; Muraoka-Cook y cols., 2004) y en hueso (Yin y cols., 1999). El efecto del TR β sobre la formación de metástasis podría explicarse, al menos en parte, por la incapacidad de estas células de responder a TGF β .

Mediante ensayos de biodistribución de las células tumorales, en los que se incubaron las células con ¹²⁵IrdU, en el modelo de hepatocarcinoma al medir la radiactividad incorporada en los pulmones observamos que ya a tiempos tan cortos como las 8h se aprecia una inhibición superior a 12 veces en la radiactividad medida en los pulmones de los animales inoculados con células que expresaban TR β . En el modelo de adenocarcinoma de mama, el efecto del receptor se aprecia a un tiempo todavía más corto, a las 4h, siendo la inhibición de un 50%, aproximadamente. Esta inhibición a tiempos tan cortos indica que la expresión de TR β está impidiendo ya la extravasación de las células tumorales en el pulmón, y no sólo la capacidad de anidar y proliferar en el estroma de este órgano.

La expresión de TR β regula la expresión de moléculas importantes en la formación de metástasis

En los últimos años se ha descrito la implicación de distintas quimoquinas en el crecimiento y diseminación tumoral (Luster., 1998; Wang y cols., 1998). Los niveles de ARN de CXCR4 se encuentran drásticamente disminuídos tanto en células SK-hep1 como en células MDA MB 468 PM1 que expresan

TR β , frente a los niveles que tienen las células transfectadas de manera estable con el vector vacío. CXCR4 es el receptor para la quimoquina CXCL12, quimoquina que se encuentra en pulmón, hígado, médula ósea, nódulos linfáticos y en menor medida en cerebro. La atracción entre CXCR4 y CXCL12 hace que las células de cáncer de mama abandonen el torrente circulatorio y migren a órganos con grandes cantidades de CXCL12, donde estas células proliferan y dar lugar a metástasis lejanas del foco inicial del tumor. Anticuerpos contra CXCR4 bloquean la formación de metástasis por células de cáncer de mama en pulmón (Muller y cols., 2001) y la inhibición de CXCR4 mediante ARNi reduce significativamente la capacidad invasiva in vitro de células de cáncer de mama (Chen y cols., 2003). Se ha descrito la existencia de sitios de unión para NF- κ B en el promotor de CXCR4 (-230 a-240) (Caruz y cols., 1998).

Se ha descrito la existencia de un aumento significativo en la expresión del receptor de quimoquinas CCR6 en distintos tipos de cánceres (Shimizu y cols., 2001; Rubie y cols., 2006; Rubie y cols., 2006) y que la expresión de CCR6 se asocia a la formación de metástasis intrahepáticas por células de hepatocarcinoma (Dellacasagrande y cols., 2003; Uchida y cols., 2006). También se ha descrito una alta expresión de CCR6 en las metástasis hepáticas formadas a partir de cáncer colorrectal frente a los niveles del tumor primario (Rubie y cols., 2006). Además, los niveles del ligando de CCR6, CCL20, son mayores en el hígado que en otros órganos, lo que coincide con el hecho de que es el hígado el primer sitio de formación de metástasis para este tipo de cáncer. Nuestros resultados indican que los niveles de ARN de CCR6 se encuentran también drásticamente disminuidos en células SK-hep1 que expresan el receptor, frente a los niveles que tienen las células transfectadas de manera estable con el vector vacío, lo que también concuerda con su menor capacidad metastásica.

El oncogén c-met es un receptor tirosina-kinasa de membrana (Park y cols., 1987; Chan y cols., 1988) al que se une la citoquina HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) (Bottaro y cols., 1991). Se ha visto que en muchos tumores c-met se encuentra sobreexpresado y los niveles de esta proteína se relacionan con la tendencia a formar metástasis y con un mal pronóstico de la enfermedad. Existe una correlación positiva entre la sobreexpresión de c-met y el riesgo de progresión tumoral y la mortalidad en cáncer de mama (Ghoussoub y cols., 1998; Lengyel E. y cols., 2005). La sobreexpresión de c-met en hepatocarcinoma también juega un papel clave en el desarrollo y progresión de la enfermedad y su nivel de expresión está inversamente correlacionado con la supervivencia de los pacientes (Luo YQ y cols., 1999; Tavian y cols., 2000). Mediante RT-PCR cuantitativa también demostramos que los niveles de ARNm de c-met están disminuidos en aquellas células que expresan el receptor TR β , tanto en el modelo de hepatocarcinoma como en células de cáncer de mama. El análisis del promotor de c-met muestra la presencia de una gran variedad de elementos reguladores potenciales, que incluyen sitios Sp1, CRE, AP-1, AP-2 y NF- κ B (Liu., 1998; Gambarotta y cols., 1994).

Las caspasas son una familia de proteasas que desempeñan papeles clave en el desarrollo tumoral. No sólo están implicadas en el proceso de apoptosis sino que también juegan un papel fundamental en la activación proteolítica de citoquinas. La expresión de caspasa 1 está claramente aumentada en las células que expresan el receptor de hormonas tiroideas, tanto en el modelo de hepatocarcinoma como en el de adenocarcinoma de mama, lo cual también podría estar relacionado con su actividad antimetastásica (Jee y cols., 2005).

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

- 🌿 La estimulación del promotor de ciclina D1 por Ras oncogénico en células de hepatocarcinoma depende de los factores de transcripción Sp1 y ATF-2. La hormona tiroidea reprime la actividad transcripcional de ATF-2, diana de la quinasa MSK.

- 🌿 Tanto la represión del promotor de ciclina D1 como la inhibición de la transformación por T3 requieren la integridad del DBD así como de la caja CoR localizada en la hélice 1 del LBD, mientras que es independiente del dominio AF-2 del TR β . Los dominios implicados en estos efectos de la T3 son por tanto diferentes a los implicados en la regulación transcripcional clásica que implican unión del receptor a un elemento de respuesta en el DNA y el reclutamiento de coactivadores.

- 🌿 La expresión de TR β en células de hepatocarcinoma humano SK-hep1 y de adenocarcinoma de mama MDA MB 468 PM1 retrasa la formación de tumores en ratones desnudos.

- 🌿 La expresión de TR β aumenta el grado de necrosis y disminuye la angiogénesis en los tumores. También produce una reversión parcial de la EMT, aumentando la expresión de los marcadores epiteliales β catenina y citokeratina 8/18 y disminuyendo la expresión del marcador mesenquimático vimentina.

- 🌿 La capacidad de sobrevivir y proliferar sin anclaje a un sustrato, así como la capacidad invasiva, tanto *in vivo* como *in vitro* se ve drásticamente inhibida por el TR β en ambos modelos celulares.

- 🌿 El TR β bloquea la formación de metástasis tanto experimentales como espontáneas, impidiendo la extravasación en los órganos diana.

- 🌿 El TR β bloquea las respuestas al TGF β y a los factores de crecimiento EGF y IGF-1. El TR β bloquea tanto la vía de las Smads como la vía de RAF/MEK/ERK y disminuye la expresión de los receptores EGFR, ERBB3 e IGFR1, mientras que aumenta la expresión de IGFBP3.

- 🌿 La expresión de TR β regula la expresión de moléculas importantes para la formación de metástasis como CXCR4, CCR6, c-Met y caspasa 1.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Aaronson S. A.** (1991). Growth factors and cancer. *Science*. 254: 1146-53.
- Aaronson S. A.** (1991-1992). Influences of growth factors and their signaling pathways in malignancy. 87: 17-34.
- Ahn S., Olive M., Aggarwal S., Krylov D., Ginty D. y Vinson C.** (1998). A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos. *Mol Cell Biol*. 18: 967-77.
- Akagi M., Kawaguchi M., Liu W., McCarty M. F., Takeda A., Fan F., Stoeltzing O., Parikh A. A., Jung Y. D., Bucana C. D., Mansfield P. F., Hicklin D. J. y Ellis L. M.** (2003). Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells. *Br J Cancer*. 88: 796-802.
- Akiyoshi S., Inovee H., Hanai J., Kusanagi K., Nemoto N., Miyazono K. y Kawabata M.** (1999). c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads. *J Biol Chem*. 274: 35269-77.
- Albanese C., Johanson J., Watanabe G., Eklund N., Vu D., Arnold A. y Pestell R. G.** (1995). Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem*. 270: 23589-97.
- Al-Mehdi A. B., Tozawa K., Fisher A. B., Shientag L., Lee A. y Muschel R. J.** (2000). Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med*. 6: 100-2.
- Alessi D. R.** (1997). The protein kinase C inhibitors Ro 318220 and GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1beta (Rsk-2) and p70 S6 kinase. *FEBS Lett*. 402121-3.
- Ali IU, L. R. y Callahan R.** (1989). Presence of two members of c-erbA receptor gene family (c-erbA beta and c-erbA2) in smallest region of somatic homozygosity on chromosome 3p21-p25 in human breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 81: 1815-20.
- Alroy I. y Yarden Y.** (1997). The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett*. 410: 83-6.
- Andrulis I. L., Bull S., Blackstein M. E., Sutherland D., Mak C., Sidlofsky S., Pritzker K. P., Hartwick R. W., Hanna W., Lickley L., Wilkinson R., Qizilbash A., Ambus U., Lipa M., Weizel H., Katz A., Baida M., Mariz S., Stoik G., Dacamara P., Strongitharm D., Geddie W. y McCready D.** (1998). neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group. 16 1340-9.
- Anido J., Scaltriti M., Bech Serra J. J., Santiago Josef B., Todo F. R., Baselga J. y Arribas J.** (2006). Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J*. 25: 3234-44.
- Aranda A. y Pascual A.** (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*. 81: 1269-304.
- Arteaga C. L.** (2003). EGF receptor as a therapeutic target: patient selection and mechanisms of resistance to receptor-targeted drugs. *J Clin Oncol*. 21: 289-91.

- Attisano L. y Wrana J.** (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. 296: 1646-7.
- Auerbach W. y Auerbach R.** (1994). Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol Ther.* 63: 265-311.
- Ballin M., Gómez D. E., Sinha C. C. y Thorgeirsson U. P.** (1988). Ras oncogene mediated induction of a 92 kDa metalloproteinase; strong correlation with the malignant phenotype. *Biochem Biophys Res Commun.* 154: 832-8.
- Bancroft J. D y Stevens A.** (1982). *Theory and practice of histological techniques.* Churchill Livingstone. 135 y 323.
- Baniahmad A., Leng X., Burris T. P., Tsai S. Y., Tsai M. J. y O'Malley B. W.** (1995). The tau 4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing. *Mol Cell Biol.* 15: 76-86.
- Barbacci E. G., Guarino B., Stroh J. G., Singleton D. H., Rosnack K. J., Moyer J. D. y Andrews G. C.** (1995). The structural basis for the specificity of epidermal growth factor and heregulin binding. *J Biol Chem.* 270: 9585-9.
- Barbacid M.** (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem.* 56: 779-827.
- Bargmann C. I., Hung M. y Weinberg R. A.** (1986). The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature.* 319: 226-30.
- Barlow C., Meister B., Lardelli M., Lendahl U. y Vennstrom B.** (1994). Thyroid abnormalities and hepatocellular carcinoma in mice transgenic for v-erbA. *EMBO J.* 13: 4241-50.
- Barrera-Hernandez G., Zhan Q., Wong R. y Cheng S. Y.** (1998). Thyroid hormone receptor is a negative regulator in p53-mediated signaling pathways. 1998 Sep;17(9):743-50. 17: 745-50.
- Beato M., Herrlich P. y Schutz G.** (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83: 851-7.
- Behrens J., Frixen U., Schipper J., Weidner M. y Birchmeier W.** (1992). Cell adhesion in invasion and metastasis. *Semin Cell Biol* 3: 169-78.
- Belandia B., Latasa M., Villa A. y Pascual A.** (1998). Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the beta-amyloid precursor protein gene. *J Biol Chem.* 273: 30366-71.
- Bellacosa A., d. Feo D., Godwin A. K., Bell D. W., Cheng J. Q., Altomare D. A., Wan M., Dubeau L., Scambia G., Masciullo V., Ferrandina G., Benedetti Panici P., Mancuso S., Neri G. y Testa J. R.** (1995). Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer.* 64: 280-5.
- Ben-Ze'ev A. y Raz A.** (1985). Relationship between the organization and synthesis of vimentin and the metastatic capability of B16 melanoma cells. *Cancer Res.* 45: 2632-41.
- Bergers G. y Benjamin L.** (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 3: 401-10.
- Bergh J. J., Lin H., Lansing L., Mohamed S. N., Davis F. B., Mousa S. y Davis P. J.** (2005). Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology.* 146: 2864-71.

Bernhard E. J., Gruber S. y Muschel R. J. (1994). Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 4293-7.

Bhat M. K., Yu C., Yap N., Zhan Q., Hayashi Y., Seth P. y Cheng S. (1997). Tumor suppressor p53 is a negative regulator in thyroid hormone receptor signaling pathways. *J Biol Chem.* 272: 28989-9.

Bjorbaek C., Zhao Y. y Moller D. E. (1995). Divergent functional roles for p90rsk kinase domains. *J Biol Chem.* 270: 18848-52.

Bodenner D. L., Mroczynski M. A., Weintraub B. D., Radovick S. y Wondisford F. E. (1991). A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone inhibitory element in the human thyrotropin beta-subunit gene. *J Biol Chem.* 266: 21666-73.

Bos J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49: 4682-9.

Bos J. L. (1995). A target for phosphoinositide 3-kinase: Akt/PKB. *Trends Biochem Sci.* 20: 441-2.

Bottaro D. P., Rubin J., Faletto D. L., Chan A. M., Kmieciak T. E., Vande Woude G. F. y Aaronson S. A. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science.* 251: 802-4.

Bresnick E. H., Dalman F., Sanchez E. R. y Pratt W. B. (1989). Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* 269: 4992-7.

Bronnegard M., Torring O., Boos J., Sylven C., Marcus C. y Wallin G. (1994). Expression of thyrotropin receptor and thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 79: 384-9.

Bruns C. J., Harbison M., Davis D. W., Portera C. A., Tsan R., McConkey D. J., Evans D. B., Abbruzzese J. L., Hicklin D. J. y Radinsky R. (2000). Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin Cancer Res.* 6: 1936-48.

Bruns C. J., Solorzano C., Harbison M. T., Ozawa S., Tsan R., Fan D., Abbruzzese J., Traxler P., Buchdunger E., Radinsky R. y Fidler I. J. (2000). Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 60: 2926-35.

Buck M., Poli V., van der Geer P., Chojkier M. y Hunter T. (1999). Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP beta is required for hepatocyte proliferation induced by TGF alpha. *Mol Cell.* 4: 1087-92.

Buhler H y Schaller G. (2005). Transfection of keratin 18 gene in human breast cancer cells causes induction of adhesion proteins and dramatic regression of malignancy in vitro and in vivo. *Mol Cancer Res.* 3: 365-71.

Bulavin D. V., Saito S., Hollander M. C., Sakaguchi K., Anderson C. W., Appella E. y Fornace A. J. Jr. (1999). Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J.* 18: 6845-54.

Bulavin D. V., Higashimoto Y., Popoff I. J., Gaarde W. A., Basrur V., Potapova O., Appella E. y Fornace A. J. Jr. (2001). Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* 411: 102-7.

Bulavin D. V., Demidar O., Saito S., Kauraniemi P., Phillips C., Amundson S. A., Ambrosino C., Sauter G., Nebreda A. R., Anderson C. W., Kallioniemi A., Fornace A. J. Jr y Appella E. (2002). Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat Genet.* 31: 210-5.

Burgess A. W., Cho H., Eigenbrot C., Ferguson K. M., Garrett T. P., Leahy D. J., Lemmon M. A., Sliwkowski M. X., Ward C. W. y Yokoyama S. (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell.* 12: 541-52.

Bussemakers M. J., Verhaegh G., van Bokhoven A., Debruyne F. M. y Schalken J. A. (1992). Differential expression of vimentin in rat prostatic tumors. *Biochem Biophys Res Commun.* 182: 1254-9.

Cailleau R. Y cols., (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro.* 14: 911-15.

Campbell P. M. y Der C. (2004). Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 14: 105-14.

Canon E., Cosgaya J., Scsucova S. y Aranda A. (2004). Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell.* 15: 5583-92.

Cao X., Kambe F., Moeller L. C., Refetoff S. y Seo H. (2005). Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol.* 19: 102-12.

Carey I. y Zehner Z. (1995). Regulation of chicken vimentin gene expression by serum, phorbol ester, and growth factors: identification of a novel fibroblast growth factor-inducible element. *Cell Growth Differ.* 6: 899-908.

Caruz A., Samsom M., Alonso J. M., Alcamí J., Baleux F., Virelizier J. L., Parmentier M. y Arenzana-Seisdedos F. (1998). Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene. *FEBS Lett.* 426: 271-8.

Casanova J., Helmer E., Selmi-Ruby S., Qi J. S., Au-Fliegner M., Desai-Yajnik V., Koudinova N., Yarm F., Raaka B. M. y Samuels H. H. (1994). Functional evidence for ligand-dependent dissociation of thyroid hormone and retinoic acid receptors from an inhibitory cellular factor. *Mol Cell Biol.* 14: 5765-65.

Cavallaro U. y Christofori G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer.* 4: 118-32.

Collingwood T. N., Wagner R., Matthews C. H., Clifton-Bligh R. J., Gurnell M., Rajanayagam O., Agostini M., Fletterick R. J., Beck-Peccoz P., Reinhardt W., Binder G., Ranke M. B., Hermus A., Hesch R. D., Lazarus J., Newrick P., Parfitt V., Raggatt P., de Zegher F. y Chatterjee V. K. (1998). A role for helix 3 of the TRbeta ligand-binding domain in coactivator recruitment identified by characterization of a third cluster of mutations in resistance to thyroid hormone. *EMBO J.* 17: 4760-70.

Connolly J. M. y Rose D. (1991). Autocrine regulation of DU145 human prostate cancer cell growth by epidermal growth factor-related polypeptides. *Prostate.* 19: 173-80.

Crespo P. y Leon J. (2000). Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci.* 57: 1613-36.

Culig Z., Hobisch A., Cronauer M. V., Radmayr C., Hittmair A., Zhang J., Thurnher M., Bartsch G. y Klocker H. (1996). Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *Prostate.* 28: 392-405.

Chakrabarty S. y Rajagopal S. y Huang S. (1995). Expression of antisense epidermal growth factor receptor RNA downmodulates the malignant behavior of human colon cancer cells. *Clin Exp Metastasis*. 13: 191-5.

Chakravarti D., LaMorte V., Nelson M. C., Nakajima T., Schulman I. G., Juguilon H., Montminy M. y Evans RM. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383: 99-103.

Chambers A. F., Groom A. y MacDonald IC. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2: 563-72.

Chan A. M., K. H., Deakin EA, Tempest PR, Hilkens J, Kroezen V, Edwards DR, Wills AJ, Brookes P, Cooper CS. (1988). Characterization of the mouse met proto-oncogene. *Oncogene*. 2: 539-9.

Chan I. H. y Privalsky M. L. (2006). Thyroid hormone receptors mutated in liver cancer function as distorted antimorphs. *Oncogene*. 25: 3576-88.

Chang L. y Karin M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 410: 37-40.

Chen H. W. y Privalsky M. L. (1993). The erbA oncogene represses the actions of both retinoid X and retinoid A receptors but does so by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*. 13: 5970-80.

Chen J. D y Evans R. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*. 377: 454-7.

Chen Y., Stamatoyannopoulos G. y Song C. Z. (2003). Down-regulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion in vitro. *Cancer Res*. 63: 4801-4.

Christofori G. (2006). New signals from the invasive front. *Nature* 441: 444-50.

Christofori G. y Semb H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*. 24: 73-6.

Chu H., Zhou H., Liu Y., Liu X., Hu Y. y Zhang J. (2007). Functional expression of CXC chemokine receptor-4 mediates the secretion of matrix metalloproteinases from mouse hepatocarcinoma cell lines with different lymphatic metastasis ability. *Int J Biochem Cell Biol*. 39: 197-205.

Dace A., Zhao L., Park K. S., Furuno T., Takamura N., Nakanishi M., West B. L., Janover J. A., Cheng S. 2000. Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 8985-90.

Damm K., Thompson C. C. y Evans R. M. (1989). Protein encoded by v-erbA functions as a thyroid-hormone receptor antagonist. *Nature*. 339: 593-7.

Danielian P. S, White R., Lees J. A. y Parker M. G. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J*. 11: 1025-33.

Darash-Yahana M., Pivarsky E., Abramovitch R., Zeira E., Pal B., Karplus R., Beider K., Avniel S., Kasem S., Galun E. y Peled A. (2004). Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J*. 18: 1240-2.

David M., Wong L., Flavell R., Thompson S. A., Wells A., Larner A. C. y Johnson G. R. (1996). STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1. *J Biol Chem*. 271: 9185-8.

Davidson N. E., Gelmann E., Lippman M. E. y Dickson R. B. (1987). Epidermal growth factor receptor gene expression in estrogen receptor-positive and negative human breast cancer cell lines. *Mol Endocrinol.* 1: 216-23.

Davies S. P., Reddy H., Caivano M. y Cohen P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.* 351: 95-105.

Davis R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239-52.

Davis F. B., Mousa S., O'Connor L., Mohamed S., Lin H. Y., Cao H. J. y Davis P. J. (2004). Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface. *Circ Res.* 94:1500-6.

Davis P. D, Elliott L., Harris W., Hill C. H., Hurst S. A., Keech E., Kumar M. K., Lawton G., Nixon J. S. y Wilkinson S. E. (1992). Inhibitors of protein kinase C. 2. Substituted bisindolylmaleimides with improved potency and selectivity. *J Med Chem.* 35: 994-1001.

Deak M., Clifton A., Lucocq L. M. y Alessi D. R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* 17: 4426-41.

Deb S. P., Munoz R., Brown D. R. y Subler M. A. (1994). Wild-type human p53 activates the human epidermal growth factor receptor promoter. *Oncogene.* 9: 1341-9.

Dellacasagrande J., Schreurs O., Hofgaard P. O., Omholt H., Steinsvoll S., Schenck K., Bogen B. y Dembic Z. (2003). Liver metastasis of cancer facilitated by chemokine receptor CCR6. *Scand J Immunol.* 57: 534-44.

Dent P., Yacoub A., Fisher P. B., Hagan M. P. y Grant S. (2003). "MAPK pathways in radiation responses." *Oncogene.* 22: 5885-96.

Derynck R., Akhurst R. y Balmain A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 29: 117-29.

Deryugina E. I. y Quigley J. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 25: 9-34.

Desbois C., Aubert D., Legrand C., Pain B. y Samarut J. (1991). A novel mechanism of action for v-ErbA: abrogation of the inactivation of transcription factor AP-1 by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Cell* 67: 731-40.

Di Fiore P. P., Segatto O., Taylor W. G., Aaronson S. A. y Pierce J. H. (1990). EGF receptor and erbB-2 tyrosine kinase domains CONFER cell specificity for mitogenic signaling. *Science.* 248: 79-83.

Domagala W., Striker G., Szadowska A., Dukowicz A., Harezga B. y Osborn M. (1994). p53 protein and vimentin in invasive ductal NOS breast carcinoma--relationship with survival and sites of metastases. *Eur J Cancer.* 30A: 1527-34.

Douville E. y Downward J. (1997). EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. *Oncogene.* 15: 373-83.

Drouin J., Trifiro M. A., Plante R. K., Nemer M., Eriksson P. y Wrangé O. (1989). Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol Cell Biol.* 9: 5305-14.

Dumont N. y Arteaga C. L. (2000). Transforming growth factor-beta and breast cancer: Tumor promoting effects of transforming growth factor-beta. *Breast Cancer Res.* 2: 125-32.

Durand B., Saunders M., Gaudon C., Roy B., Losson R. y Chambon P. (1994). Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J.* 13: 5370-82.

Eckey M., Moehren U. y Baniahmad A. (2003). Gene silencing by the thyroid hormone receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 213: 13-22.

Ellerbroek S. M., Hudson L. G. y Stack M. S. (1998). Proteinase requirements of epidermal growth factor-induced ovarian cancer cell invasion. *Int J Cancer.* 78: 331-7.

Ennessy B. T., Smith D. L., Ram P. T., Lu Y. y Mills G. B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 4: 988-1004.

Escriva H., Safi R., Hanni C., Langlois M. C., Saumitou-Laprade P., Stehelin D., Capron A., Pierce R. y Laudet V. (1997). Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 6803-8.

Esteva F. J., Hortobagay G. N., Sahin A. A., Smith T. L., Chin D. M., Liang S. Y., Pusztai L., Buzdar A. U. y Bacus S. S. (2001). Expression of erbB/HER receptors, heregulin and P38 in primary breast cancer using quantitative immunohistochemistry. *Pathol Oncol Res.* 7: 171-7.

Fernandez-Garcia N. I., Peinado H., Garcia M., Gonzalez-Martin A., del Rio M., Baretino D., Volpert O., Munoz A. y Jimenez B. (2005). 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of Id1 and Id2 genes and the angiogenic phenotype of human colon carcinoma cells. *Oncogene.* 24: 6533-44.

Fernandez Y., Espana L., Manas S., Fabra A. y Sierra A. (2000). Bcl-xL promotes metastasis of breast cancer cells by induction of cytokines resistance. *Cell Death Differ.* 7: 350-9.

Ferrari S., Battini R., Kaczmarek L., Rittling S., Calabretta B., de Riel J. K., Philiponis V., Wei J. F. y Baserga R. (1986). Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene. *Mol Cell Biol.* 6: 3614-20.

Fidler I. J. (2002). Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol.* 12: 89-96.

Fidler I. J. (2002). The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation.* 70: 498-505.

Fischer O. M., Hart S., Gschwind A. y Ullrich A. (2003). EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans.* 31: 1203-8.

Foghj J., editor. (1975). Human tumor cells in vitro. New York:: Plenum Press. 115-159.

Folgueras A. R., Pendas A. M., Sanchez L. M. y Lopez-Otin C. 2004. Matriz metalloproteinases in cancer: rom new functions to improved inhibition strategies. 48: 411-24.

Folkman J. (1986). How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res.* 46: 467-73.

Folkman J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 29: 15-8.

Fondell J. D., Ge H. y Roeder R. G. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 8329-33.

Fong C. J., Sherwood E., Mendelsohn J., Lee C. y Kozlowski J. M. (1992). Epidermal growth factor receptor monoclonal antibody inhibits constitutive receptor phosphorylation, reduces

autonomous growth, and sensitizes androgen-independent prostatic carcinoma cells to tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res.* 52: 5887-92.

Forgacs E., Biesterveld E., Sekido Y., Fong K., Muneer S., Wistuba I. I., Milchgrub S., Brezinschek R., Virmani A., Gazdar A. F. y Minna J. D. (1998). Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer. *Oncogene.* 17: 1557-65.

Forman B. M. Y Samuels H. H (1990). Interaction among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model. *Mol Endocrinol* 4: 1293-1301.

Forrest D., Erway L. C., Ng L., Altschuler R. y Curran T. (1996). Thyroid hormone receptor beta is essential for development of auditory function. *Nat Genet.* 13: 354-7.

Forrest D. y Venstromm B. (2000). Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid.* 10: 41-52.

Fraichard A., Chassande O., Plateroti M., Roux J. P., Trouillas J., Dehay C., Legrand C., Gauthier K., Keding M., Malaval L., Rousset B. y Samarut J. (1997). The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *EMBO J.* 16: 4412-20.

Frederick L., Wang X., Eley G. y James C. D. (2000). Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res.* 60: 1383-7.

Freije J. M., Balbin M., Pendas A. M., Sanchez L. M., Puente X. S., Lopez-Otin C. 2003. Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv. Exp. Med. Biol.* **532: 91-107**

Friedl P, W. K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms.2003. *Nat Rev Cancer.* 3: 362-74.

Frisch S. M. y Ruoslahti E. (1997). Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol.* 9: 701-6.

Frodin M., Antal T. L., Dummler B. A., Jensen C. J., Deak M., Gammeltoft S. y Biondi R. M. (2002). A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J.* 21: 5396-407.

Frodin M. y Gammeltoft S. (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol.* 151: 65-77.

Fruman D. A., Meyers R. E. y Cantley L. C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem.* 67: 481-507.

Furumoto H., Ying H., Chandramouli G. V., Zhao L., Walker R. L., Meltzer P. S., Willingham M. C. y Cheng S. Y. (2005). An unliganded thyroid hormone beta receptor activates the cyclin D1/cyclin-dependent kinase/retinoblastoma/E2F pathway and induces pituitary tumorigenesis. *Mol Cell Biol.* 25: 124-35.

Furuya F., Hanover J. A. y Cheng SY. (2002). Retinoic acid receptors inhibit AP1 activation by regulating extracellular signal-regulated kinase and CBP recruitment to an AP1-responsive promoter. *Mol Cell Biol.* 22: 4522-34.

Furuya F., Hanover J. A. y Cheng S. Y. (2006). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by a mutant thyroid hormone beta receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 1780-5.

Futreal P. A., Cochran C., Marks J. R., Iglehart J. D., Zimmerman W., Barrett J. C. y Wiseman R. W. (1994). Mutation analysis of the THRA1 gene in breast cancer: deletion/fusion of the gene to a novel sequence on 17q in the BT474 cell line. *Cancer Res.* 54: 1791-4.

Futreal P. A., Soderkvist P., Marks J. R., Iglehart J. D., Cochran C., Barrett J. C. y Wiseman R. W. (1992). Detection of frequent allelic loss on proximal chromosome 17q in sporadic breast carcinoma using microsatellite length polymorphisms. *Cancer Res.* 52: 2624-7.

Gambarotta G., Pistoï S., Giordano S., Comoglio P. M. y Santoro C. (1994). Structure and inducible regulation of the human MET promoter. *J Biol Chem.* 269: 12852-7.

Garcia-Silva S y Aranda. A. (2004). The thyroid hormone receptor is a suppressor of ras-mediated transcription, proliferation, and transformation. *Mol Cell Biol.* 24: 8514-23.

Ge B., Gram H., Di Padova F., Huang B., New L., Ulevitch R. J., Luo Y., Han J. (2002). MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science.* 295: 1291-4.

Gernsey D. L., Borek C., Fisher P. B. y Edelman I. S. (1983). In "Genes and Proteins in oncogenesis". Ed. Weinstein I. B. And Vogel H. J. (Academic New York). 197-209.

Ghossoub R. A., Dillon D. A., D'Aquila T., Rimm E. B., Fearon E. R. y Rimm D. L. (1998). Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. *Cancer.* 82: 1513-20.

Giguere V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20: 689-725.

Gimbrone M. A. Jr., Cotran R. S. y Folkman J. (1974). Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J. Cell Biol.* 60: 673-84.

Gimbrone M. A. Jr., Cotran R. S., Leapman S. B. y Folkman J. (1974). Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst.* 52: 413-27.

Glass, C. K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear hormone monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15: 391-407.

Goldman C. K, Kim J., Wong W. L., King V., Brock T. y Gillespie G. Y. (1993). Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell.* 4: 121-33.

Gomez N. y Cohen P. (1991). Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* 353: 170-3.

Gonzalez-Sancho J. M., Garcia V., Bonilla F. y Munoz A. (2003). Thyroid hormone receptors/THR genes in human cancer. *Cancer Lett.* 192: 121-32.

Gothe S., Wang Z., Ng L., Kindblom J. M., Barros A. C., Ohlsson C., Vennstrom B. y Forrest D. (1999). Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *13:* 1329-41.

Gottardi C. J. y Gumbiner B. M. (2001). Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr Biol.* 11: 792-4.

Gottardi C. J., Wong E. y Gumbiner B. M. (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol.* 153: 1049-60.

Gottlicher M., Heck S. y Herrlich P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med.* 76: 480-9.

Gronemeyer H., Gustafsson J. y Laudet V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov.* 3: 950-64.

Grunert S., Jechlinger M. y Beug H. (2003). Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4: 657-65.

Gullberg H., Rudling M., Forrest D., Angelin B. y Vennstrom B. (2000). Thyroid hormone receptor beta-deficient mice show complete loss of the normal cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A) response to thyroid hormone but display enhanced resistance to dietary cholesterol. *Mol Endocrinol.* 14: 1739-49.

Gullick W. J., Marsden J. J., Whittle N., Ward B., Bobrow L. y Waterfield M. D. (1986). Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian, and vulval carcinomas. *Cancer Res.* 46: 285-92

Gum R., Lengyel E., Juarez J., Chen J. H., Sato H., Seiki M. y Boyd D. (1996). Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem.* 271: 10672-80.

Guo W. y Giancotti F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5: 816-26.

Gupta G. P. y Massague J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 127: 679-95.

Guy P. M., Platko J. V., Cantley L. C., Cerione R. A. y Carraway K. L. (1994). Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 8132-6.

Hackel P. O., Zwick E., Prenzel N. y Ullrich A. (1999). Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 11: 184-9.

Han J., Lee J., Bibbs L. y Ulevitch R. J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265: 808-11.

Hayashi H., Abdollah S., Qiu Y., Cai J., Xu Y. Y., Grinnell B. W., Richardson M. A., Topper J. N., Gimbrone M. A. Jr, Wrana J. L. y Falb D. (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell.* 89: 1165-73.

Hendrix M. J., Seftor E., Seftor R. E. y Trevor K. T. (1997). Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am J Pathol.* 150: 483-95.

Henttu P. M., Kalkhoven E. y Parker M. G. (1997). AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Mol Cell Biol.* 17: 4832-9.

Herber B., Truss M., Beato M. y Muller R. (1994). Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene.* 9: 2105-7.

Herbst R. S., Maddox A. M., Rothenberg M. L., Small E. J., Rubin E. H., Baselga J., Rojo F., Hong W. K., Swaisland H., Averbuch S. D., Ochs J. y LoRusso P. M. (2002). Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small-cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol.* 20: 3815-25.

Hirata A., Ogawa S., Kometani T., Kuwano T., Naito S., Kuwano M. y Ono M. (2002). ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res.* 62: 2554-60.

Hiratsuka S., Nakamura K., Iwai S., Murakami M., Itoh T., Kijima H., Shipley J. M., Senior R. M. y Shibuya M. (2002). MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell*. 2: 289-300.

Hiratsuka S., Watanabe A., Aburatani H. y Maru Y. (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol*. 8: 1369-75.

Holbrook N. J., Liu Y y Fornace A. J. Jr. (1996) Signaling events controlling the molecular response to genotoxic stress. *EXS*. 77: 273-88.

Hodin R. A., Lazar M. A., Wintman B. I., Darling D. S., Koenig R. J., Larsen P. R., Moore D. D. y Chin W. W. (1989). Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* 144: 76-9.

Hollenberg A. N., Monden T., Flynn T. R., Boers M. E., Cohen O. y Wondisford F. E. (1995). The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol*. 9: 540-50.

Hong S. H., Wong. C. W. y Privalsky M. L. (1998). Signaling by tyrosine kinases negatively regulates the interaction between transcription factors and SMRT¹ (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) corepressor. *Mol Endocrinol*. 12: 1161-71.

Hood J. D y Cheresch D. A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*. 2: 91-100.

Horlein A. J., Naar A. M., Heinzl T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Soderstrom M. y Glass C. K. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 377: 397-404.

Hou, Y. L., Y.H. Jia, B. Wang, Y. Xin and M.Y. Ling et al., (2001). Molecular mechanism about lymphogenous metastasis of hepatocarcinoma cells in mice. *World J. Gastroenterol*. 7: 532-536.

Hozumi A., Nishimura Y., Nishiuma T., Kotani Y. y Yokoyama M. (2001). Induction of MMP-9 in normal human bronchial epithelial cells by TNF-alpha via NF-kappa B-mediated pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 281: 1444-52.

Hynes R. O (1985-1986). Fibronectins: a family of complex and versatile adhesive glycoproteins derived from a single gene. *Harvey Lect*. 81: 133-52.

Hu L., Lau S. H., Tzang C. H., Wen J. M., Wang W., Xie D., Huang M., Wang Y., Wu M. C., Huang J. F., Zeng W. F., Sham J. S., Yang M. y Guan X. Y. (2004). Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncogene*. 23: 298-302.

Hu X. y Lazar M. A. (1999). The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature*. 402: 93-6.

Hubbard S. R. (2005). EGF receptor inhibition: attacks on multiple fronts. *Cancer Cell* 7: 287-8.

Huber M. A., Kraut N. y Beug H. (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*. 17: 548-58.

Hynes N. E., Lane H. A. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-87.

Hynes N. E., Lane H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 5: 341-54.

Hynes R. (1985). Molecular biology of fibronectin. *Annu Rev Cell Biol*. 1: 67-90.

Iglesias T., Llanos S., Lopez-Barahona M., Perez-Aranda A., Rodriguez-Pena A., Bernal J., Hohne A., Seliger B. y Munoz A. (1994). c-erbA and v-erbA modulate growth and gene expression of a mouse glial precursor cell line. *Cell Growth Differ.* 5: 697-704.

Iseki K., Tatsuta M., Uehara H., Iishi H., Yano H., Sakai N. y Ishiguro S. (1999). Inhibition of angiogenesis as a mechanism for inhibition by 1 α -hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of colon carcinogenesis induced by azoxymethane in Wistar rats. *Int J Cancer.* 81: 730-3.

Ishii S., Xu Y. H., Stratton R. H., Roe B. A., Merlino G. T. y Pastan I. (1985). Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82: 4920-4.

Izmailova E. S., Snyder S. R, y Zehner Z. E. (2000). A Stat1 α factor regulates the expression of the human vimentin gene by IFN- γ . *J Interferon Cytokine Res.* 20: 13-20.

Jainchill J. L., Aaronson S. A. y Todaro G. J. (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol.* 4: 549-53.

Janda E., Lehmann K., Killisch I., Jechlinger M., Herzig M., Downward J., Beug H. y Grunert S. (2002). Ras and TGF β cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol.* 156: 299-313.

Janknecht R. y Hunter T. (1997). Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1 α . *EMBO J.* 16: 1620-7.

Janowska-Wieczorek A., Marquez L. A., Dobrowsky A., Ratajczak M. Z. y Cabuhat M. L. (2000). Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(+) cells in response to chemokines. *Exp Hematol.* 28: 1274-85.

Jee C. D., Lee H. S., Bae S. I., Yang H. K., Lee Y. M., Rho M. S y Kim W. H. (2005). Loss of caspase-1 gene expression in human gastric carcinomas and cell lines. *Int J Oncol.* 26: 1265-71.

Jennings M. T y Pietenpol J. A. (1998). The role of transforming growth factor beta in glioma progression. *J Neurooncol.* 36: 123-40.

Jho S. H., Vouthounis C., Lee B., Stojadinovic O., Im M. J., Brem H., Merchant A., Chau K. y Tomic-Canic M. (2005). The book of opposites: the role of the nuclear receptor co-regulators in the suppression of epidermal genes by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *J Invest Dermatol.* 124: 1034-43.

Jimenez C., Jones D. R., Rodriguez-Viciano P., Gonzalez-Garcia A., Leonardo E., Wennstrom S., von Kobbe C., Toran J. L., R-Borlado L., Calvo V., Copin S. G., Albar J. P., Gaspar M. L., Diez E., Marcos M. A., Downward J., Martinez-A C., Merida I. y Carrera A. C. (1998). Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J.* 17: 743-53.

Johnson A. C, Ishii S., Jinno Y., Pastan I. y Merlino G. T. (1988). Epidermal growth factor receptor gene promoter. Deletion analysis and identification of nuclear protein binding sites. *J Biol Chem.* 263: 5693-9.

Johnson G. L y Lapadat R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-2.

Juretic N., Santibanez J. F, Hurtado C. y Martinez J. (2001). ERK 1,2 and p38 pathways are involved in the proliferative stimuli mediated by urokinase in osteoblastic SaOS-2 cell line. *J Cell Biochem.* 83: 92-8.

Kalkhoven E. (2004). CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol.* 68: 1145-55.

Kamiya Y., Puzianowska-kuznicka M., McPhie P., Nauman J., Cheng S. Y. y Nauman A. (2002). Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors is associated with human renal clear cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 23: 25-33.

Kaneshige M., Kaneshige K., Zhu X., Dace A., Garrett L., Carter T. A., Kazlauskaitė R., Pankratz D. G., Wynshaw-Boris A., Refetoff S., Weintraub B., Willingham M. C., Barlow C. y Cheng S. (2000). Mice with a targeted mutation in the thyroid hormone beta receptor gene exhibit impaired growth and resistance to thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 13209-14.

Kaplan R. N., Riba R. D., Zacharoulis S., Bramley A. H., Vincent L., Costa C., MacDonald D. D., Jin D. K., Shido K., Kerns S. A., Zhu Z., Hicklin D., Wu Y., Port J. L., Altorki N., Port E. R., Ruggero D., Shmelkov S. V., Jensen K. K., Rafii S. y Lyden D. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438: 820-7.

Kato Y., Ying H., Willingham M. C. y Cheng S. Y. (2004). A tumor suppressor role for thyroid hormone beta receptor in a mouse model of thyroid carcinogenesis. *Endocrinology.* 145: 4430-8.

Kawamura N., Nagay H., Bando K., Koyama M., Matsumoto S., Tajiri T., Onda M., Fujimoto J., Ueki T., Konishi N., Shiba T. y Emi M. (1999). PTEN/MMAC1 mutations in hepatocellular carcinomas: somatic inactivation of both alleles in tumors. *Jpn J Cancer Res.* 90: 413-8.

Khandwala H. M., McCutcheon I. E., Flyvbjerg A. y Friend K. E. (2000). The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev.* 21: 215-44.

Kijowski J., Baj-krzyworzeka M., Majka M., Reca R., Marquez L. A., Christofidou-Solomidou M., Janowska-Wieczorek A. y Ratajczak M. Z. (2001). The SDF-1-CXCR4 axis stimulates VEGF secretion and activates integrins but does not affect proliferation and survival in lymphohematopoietic cells. *Stem Cells.* 19: 453-66.

Kim G. Y., Mercer S. E., Ewton D. Z., Yan Z., Jin K. y Friedman E. (2002). The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277: 29792-802.

Kim H. H., Vijapurkar U., Hellyer N. J., Bravo D. y Koland J. G. (1998). Signal transduction by epidermal growth factor and heregulin via the kinase-deficient ErbB3 protein. *Biochem J.* 334: 189-95.

Knowles B. B., Howe C. C. y Aden D. P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science.* 209: 497-9.

Kondapaka S. B., Fridman R. y Reddy K. B. (1997). Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer.* (70).

Kopfstein L. y Christofori G. (2006). Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell Mol Life Sci.* 63: 449-68.

Knowles B. B. y cols.(1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science.* 209: 497-499.

Kruger J. S. y Reddy K. B. (2003). Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of cell migration in epidermal growth factor receptor-overexpressing cells. *Mol Cancer Res.* 1: 801-9.

Kyriakis J. M., App H., Zhang X. F., Banerjee P., Brautigan D. L., Rapp U. R. y Avruch J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358: 417-21.

Kyriakis J. M. y Avruch J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 81: 807-69.

Lacroix H., Iglehart J. D., Skinner M. A. y Kraus M. H. (1989). Overexpression of erbB-2 or EGF receptor proteins present in early stage mammary carcinoma is detected simultaneously in matched primary tumors and regional metastases. *Oncogene.* 4: 145-51.

Laemmli (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-5.

Lang S. H., Hyde C., Reid I. N., Hitchcock I. S., Hart C. A., Bryden A. A., Villette J. M., Stower M. J. y Maitland N. J. (2002). Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *Prostate.* 52: 253-63.

Lansink M., Koolwijk P., van Hinsbergh V. y Kooistra T. (1998). Effect of steroid hormones and retinoids on the formation of capillary-like tubular structures of human microvascular endothelial cells in fibrin matrices is related to urokinase expression. *Blood.* 92: 927-38.

Lanz R. B. y Rusconi S. (1994). A conserved carboxy-terminal subdomain is important for ligand interpretation and transactivation by nuclear receptors. *Endocrinology.* 135: 2183-95.

Laudet V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol.* 19: 207-26.

Lavoie J. N., L. Allemain G., Brunet A., Muller R. y Pouyssegur J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem.* 271: 20608-16.

Lazar M. A. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev.* 14: 184-93.

Lebel J. M., Dussault J. H. y Puymirat J. (1994). Overexpression of the beta 1 thyroid receptor induces differentiation in neuro-2a cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 2644-8.

Ledda-Columbano G. M., Perra A., Concas D., Cossu C., Molotzu F., Sartori C., Shinozuka H. y Columbano A. (2003). Different effects of the liver mitogens triiodo-thyronine and ciprofibrate on the development of rat hepatocellular carcinoma. *Toxicol Pathol.* 31: 113-20.

Ledda-Columbano G. M., Perra A., Loi R., Shinozuka H. y Columbano A. (2000). Cell proliferation induced by triiodothyronine in rat liver is associated with nodule regression and reduction of hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 60: 603-9.

Leduc F., Brauch H., Hajj C., Dobrovic A., Kaye F., Gazdar A., Harbour J. W., Pettengill O. S., Sorenson G. D. y van den Berg A. (1989). Loss of heterozygosity in a gene coding for a thyroid hormone receptor in lung cancers. *Am J Hum Genet.* 44: 282-7.

Lee S. H., Eom M., Lee S. J., Kim S., Park H. J. y Park D. (2001). BetaPix-enhanced p38 activation by Cdc42/Rac/PAK/MKK3/6-mediated pathway. Implication in the regulation of membrane ruffling. *J Biol Chem.* 276: 25066-72.

Leevers S. J., Paterson H. F. y Marshall C. J. (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 369: 411-4.

Lengye E., Singh B., Gum R., Nerlov C., Sabichi A., Birrer M. y Boyd D. (1995). Regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by the v-mos oncogene. *Oncogene.* 11: 2639-48.

Lengyel E., Prechtel D., Resau J. H., Gauger K., Welk A., Lindemann K., Salanti G., Richter T., Knudsen B., Vande Woude G. F. y Harbeck N. (2005). C-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu. *Int J Cancer*. 113: 678-82.

Leon J., Guerrero I. y Pellicer A. (1987). Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol*. 7: 1535-40.

LeRoith D. y Roberts C. J. (2003). The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett*. 195: 127-37.

Li F., Tiede B., Massagué J y Kang Y. (2007). Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Research*. 17: 3-14.

Li Z., Meng Z. H., Chandrasekaran R., Kuo W. L., Collins C. C., Gray J. W. y Dairkee S. H. (2002). Biallelic inactivation of the thyroid hormone receptor beta1 gene in early stage breast cancer. *Cancer Res*. 62: 1939-43.

Liebermann T. A., Razon N., Bartal A. D., Yarden Y., Schlessinger J. y Soreq H. (1984). Expresión of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. *Cancer Res*. 44: 753-60

Liebermann T. A., Nusbaum H. R., Razon N., Kris R., Lax I., Soreq H., Whittle N., Waterfield M. D., Ullrich A. Y Schlessinger J. (1985). Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature*. 313: 144-7.

Libura J., Drukala J., Majka M., Tomescu O., Navenot J. M., Kucia M., Marquez L., Peiper S. C., Barr F. G., Janowska-Wieczorek A. y Ratajczak M. Z. (2002). CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood*. 100: 2597-606.

Lilienbaum A. y Paulin D. (1993). Activation of the human vimentin gene by the Tax human T-cell leukemia virus. I. Mechanisms of regulation by the NF-kappa B transcription factor. *J Biol Chem*. 238: 2180-8.

Lin H. M., Zhao L. y Cheng S. Y. (2002). Cyclin D1 Is a Ligand-independent Co-repressor for Thyroid Hormone Receptors. *J Biol Chem*. 277: 28733-41.

Lin K. H., Chen C. Y., Chen S. L., Yen C. C., Huang Y. H., Shih C. H., Shen J. J., Yang R. C. y Wang C. S. (2004). Regulation of fibronectin by thyroid hormone receptors. *J Mol Endocrinol*. 33: 445-58.

Lin K. H., Lin Y. W., Parkison C. Y Cheng S. Y. (1994). Stimulation of proliferation by 3,3',5-triiodo-L-thyronine in poorly differentiated human hepatocarcinoma cells overexpressing beta 1 thyroid hormone receptor. *Cancer Letter* 85: 189-194.

Lin K. H., Shieh H. Y., Chen S. L. y Hsu H. C (1999). Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Carcinog*.

Lin K. H., Wu Y. H. y Chen S. L. (2001). Impaired interaction of mutant thyroid hormone receptors associated with human hepatocellular carcinoma with transcriptional coregulators. *Endocrinology*. 142: 653-62.

Lin K H., Zhu X. G., Hsu H. C., Chen S. L., Shieh H. Y., Chen S. T., McPhie P. y Cheng S. Y. (1997). Dominant negative activity of mutant thyroid hormone alpha1 receptors from patients with hepatocellular carcinoma. *Endocrinology*. 138: 5308-15.

Liotta L.A (1985). Mechanisms of cancer invasion and metastasis. *Important Adv Oncol*: 28-41.

- Liotta L. A.** (1986). Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res.* 46: 1-7.
- Liotta L. A.** (1990). The role of cellular proteases and their inhibitors in invasion and metastasis. Introductory overview. *Cancer Metastasis Rev.* 9: 285-7.
- Lippman M. E., Dickson R. B., Kasid A., Gelmann E., Davidson N., McManaway M., Huff K., Bronzert D., Bates S., Swain S, y cols.** (1986). Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer. *J. Steroid Biochem.* 24: 147-54.
- Liu J. F., Crepin M., Liu J. M., Barritault D. y Ledoux D.** (1998). The human hepatocyte growth factor receptor gene: complete structural organization and promoter characterization. *Gene.* 215: 159-69.
- Liu J. F., Crepin M., Liu J. M., Barritault D. y Ledoux D.** (2002). FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 293: 1174-82.
- Lowy D. R. y Willumsen B. M** (1993). Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem.* 62: 851-91.
- Luo K., Stroschein S. L., Wang W., Chen D., Martens E., Zhou S. y Zhou Q.** (1999). The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev.* 13: 2196-206.
- Luo Y. Q., Wu M. C. y Cong W. M.** (1999). Gene expression of hepatocyte growth factor and its receptor in HCC and nontumorous liver tissues. *World J Gastroenterol.* 5: 119-121.
- Luster A. D.** (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 338: 436-45.
- Llorens A., Rodrigo I., Lopez-Barcons L., Gonzalez-Garrigues M., Lozano E., Vinyals A., Quintanilla M., Cano A. y Fabra A.** (1998). Down-regulation of E-cadherin in mouse skin carcinoma cells enhances a migratory and invasive phenotype linked to matrix metalloproteinase-9 gelatinase expression. *Lab Invest.* 78: 1131-42.
- Ma S., Rao L., Freedberg I. M. Y Blumenberg M.** (1997). Transcriptional control of K5, K6, K14, and K 17 keratin genes by AP-1 and NF-kappaB family members. *Gene Expr.* 6: 361-70.
- Maehama T. y Dixon J. E.** (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* 273: 13375-8.
- Mahajan M. A. y Samuels H.** (2005). Nuclear hormone receptor coregulator: role in hormone action, metabolism, growth, and development. *Endocr Rev.* 26: 583-98.
- Malumbres M., Barbacid M.** (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer.* 1: 223-31.
- Malumbres M., Pellicer A.** (1998). RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci.* 3: 887-912.
- Marimuthu A., Feng W., Tagami T., Nguyen H., Jameson J. L., Fletterick R. J., Baxter J. D. y West B. L.** (2002). TR surfaces and conformations required to bind nuclear receptor corepressor. *Mol Endocrinol.* 16: 271-86.
- Massague J.** (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67: 753-91.
- Massague J y Chen. Y.** (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 14: 627-44.

- Mendez-Pertuz M, Sánchez-Pacheco A. y Aranda A.** (2003). The thyroid hormone receptor antagonizes CREB-mediated transcription. *EMBO J* 22: 3102-12.
- Moch H., Schraml P., Bubendorf L., Mirlacher M., Kononen J., Gasser T., Mihatsch M. J., Kallioniemi O. P. y Sauter G.** (1999). High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol.* 154: 981-6.
- Moeller L. C., Cao X., Dumitrescu A. M., Seo H. y Refetoff S.** (2006). Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nucl Recept Signal.* 200 4.
- Monden T., Nagajima Y., Hashida T., Ishii S., Tomaru T., Shibusawa N., Hashimoto K., Satoh T., Yamada M. y Mori M.**(2006). Expression of thyroid hormone receptor isoforms down-regulated by thyroid hormone in human medulloblastoma cells. *Endocr J.* 53: 181-7.
- Moore J. M. y Guy R. K** (2005). Coregulator interactions with the thyroid hormone receptor. *Mol Cell Proteomics.* 4: 475-82.
- Moras D. y Gronemeyer H.** (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 10: 384-91.
- Mueller M. M. y Fusenig N. E.** (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer.* 4: 839-49.
- Mulder K. M.** (2000). Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11: 23-35.
- Muller A., Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M. E., McClanahan T., Murphy E., Yuan W., Wagner S. N., Barrera J. L., Mohar A., Verastegui E. y Zlotnik A.** (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 410: 50-6.
- Muraoka-Cook R. S., Kurokawa H., Koh Y., Forbes J. T., Roebuck L. R., Barcellos-Hoff M. H., Moody S. E., Chodosh L. A. y Arteaga C. L.** (2004). Conditional overexpression of active transforming growth factor beta1 in vivo accelerates metastases of transgenic mammary tumors. *Cancer Res.* 64: 9002-11.
- Myers M. P., Pass I., Batty I. H., Van der Kaay J., Stolarov J. P., Hemmings B. A., Wigler M. H., Downes C. P. y Tonks N. K.** (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor supressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 13513-8.
- Nagata D., Suzuki E., Nishimatsu H., Satonaka H., Goto A., Omata M. y Hirata Y.** (2001). Transcriptional activation of the cyclin D1 gene is mediated by multiple cis-elements, including SP1 sites and a cAMP-responsive element in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 276: 662-9.
- Nagy L., Kao H. Y, Love J. D., Li C., Banayo E., Gooch J. T., Krishna V., Chatterjee K., Evans R. M. y Schwabe J. W.** (1999). Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev.* 13: 3209-16.
- Nakagawa K., Sasaki Y., Kato S., Kubodera N. y Okano T.** (2005). .22-Oxa-1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Carcinogenesis.* 26: 1044-54.
- Nakajima T., Fukamizu A., Takahashi J., Gage F. H., Fisher T., Blenis J., Montminy M. R.** (1996). The signal-dependent coactivator CBP is a nuclear target for pp90RSK. *Cell* 86: 465-74.
- Nakao A., Imamura T., Souchelnytskyi S., Kawabata M., Ishisaki A., Oeda E., Tamaki K., Hanai J., Heldin C. H., Miyazono K. y ten Dijke P.** (1997). TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J.* 16: 5353-62.

- Nash G. F., Turner L., Scully M. F., Kakkar A. K.** (2002). Platelets and cancer. *Lancet Oncol.* 3: 425-30.
- Neal D. E., Marsh C., Bennett M. K., Abel P. D., Hall R. R., Sainsbury J. R. y Harris A. L.** (1985). Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet.* 1: 366-8.
- Nebreda A. R y Porras A.** (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci.* 25: 257-60.
- Ng L., Hurley J. B., Dierks B., Srinivas M., Salto C., Vennstrom B., Reh T. A. y Forrest D.** (2001). A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat Genet.* 27: 94-8.
- Nomura T., Khan M. M., Kaul S. C., Dong H. D., Wadhwa R., Colmenares C., Kohno I y Ishii S.** (1999). Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes Dev.* 13: 412-23.
- Okamura K., Morimoto A., Hamanaka R., Ono M., Kohno K., Uchida Y. y Kuwano M.** (1992). A model system for tumor angiogenesis: involvement of transforming growth factor-alpha in tube formation of human microvascular endothelial cells induced by esophageal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 186: 1471-9.
- Overall C. M. y Kleinfeld O.** (2006). Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 6: 227-39.
- Paget S.** (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet.* 1: 571-3.
- Palmer A., Gavin A. y Nebreda A. R.** (1998). A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J.* 17: 5037-47.
- Pan L., Eckhoff C. y Brinckerhoff C. E.** (1995). Suppression of collagenase gene expression by all-trans and 9-cis retinoic acid is ligand dependent and requires both RARs and RXRs. *J Cell Biochem.* 57: 575-89.
- Pankov R., Simcha I., Zoller M., Oshima R. G. y Ben-Ze'ev A.** (1997). Contrasting effects of K8 and K18 on stabilizing K19 expression, cell motility and tumorigenicity in the BSp73 adenocarcinoma. *J Cell Sci.* 110: 965-74.
- Pankov R. y Yamada K. M.** (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 115: 3861-3.
- Pardali K. y Moustakas. A.** (2007). Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1775: 21-62.
- Park C. C., Bissell M. J y Barcellos-Hoff MH. T** (2000). The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today.* 6: 324-9.
- Park J. G, Yug Y., Rhim H., Yi S. Y. y Yoo Y. S.** (2002). Role of p38 MAPK in the regulation of apoptosis signaling induced by TNF-alpha in differentiated PC12 cells. *J Biochem Mol Biol.* 35: 267-72.
- Park M., Dean M., Kaul K., Braun M. J., Gonda M. A. y Vande Woude G.** (1987). Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84: 6379-83.
- Pear W. S., Nolan G. P, Scott M. L. y Baltimore D.** (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 8392-6.

Peinado H., Portillo F. y Cano A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 365-75

Pepper M. S. (1997). Transforming growth factor- β : vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8: 21-43.

Perez-Juste G. y Aranda A. (1999). The cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) is involved in thyroid hormone-mediated neuronal differentiation. *J Biol Chem.* 19: 5026-31.

Perez-Juste G., García-Silva S. y Aranda A. (2000). An element in the region responsible for premature termination of transcription mediates repression of c-myc gene expression by thyroid hormone in neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 275: 1307-14.

Perissi V., Staszewski L. M., McInerney E. M., Kurokawa R., Kronen A., Rose D. W., Lambert M. H., Milburn M. V., Glass C. K. y Rosenfeld MG. (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev.* 13: 3198-208.

Petersohn D. y Thiel G. (1996). Role of zinc-finger proteins Sp1 and zif268/egr-1 in transcriptional regulation of the human synaptobrevin II gene. *Eur J Biochem.* 239: 827-34.

Pfahl M. (1993). Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev.* 14: 651-8.

Philp A. J., Campbell I. G., Leet C., Vincan E., Rockman S. P., Whitehead R. H., Thomas R. J. y Phillips W. A. (2001). The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res.* 61: 7426-9.

Piek E., Heldin C. H y Ten Dijke P. (1999). Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J.* 13: 2105-24.

Pierce D. F. Jr., Gorska A., Chytil A., Meise K. S., Page D. L., Coffey R. J. Jr. y Moses H. L. (1995). Mammary tumor suppression by transforming growth factor beta 1 transgene expression. *Proc Natl acad Sci USA.* 92: 4254-8.

Pietras R. J., Arboleda J., Reese D. M., Wongvipat N., Pegram M. D., Ramos L., Gorman C. M., Parker M. G., Sliwkowski M. X. y Slamon D. J. (1995). HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene.* 10: 2435-46.

Piiper A., Stryjek-Kaminska D. y Zeuzem S. (1997). Epidermal growth factor activates phospholipase C-gamma 1 via G(i)1-2 proteins in isolated pancreatic acinar membranes. *Am J Physiol.* 272: 1276-84.

Pissios P., Tzamelis I., Kushner P. y Moore D. D. (2000). Dynamic stabilization of nuclear receptor ligand binding domains by hormone or corepressor binding. *Mol Cell.* 6: 245-53.

Plowman G. D., Culouscou J. M., Whitney G. S., Green J. M., Carlton G. W., Foy L., Neubauer M. G. y Shoyab M. (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 1746-50.

Plowman G. D., Green J. M., Culouscou J. M., Carlton G. W., Rothwell V. M. y Buckley S. (1993). Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *366: 473-5.*

Pollard J. W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 4: 71-8.

Porras A., Zuluaga S., Black E., Valladares A., Alvarez A. M., Ambrosino C., Benito M. y Nebreda A. R. (2004). p38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell.* 15: 922-33.

Pramanik R., Qi X., Borowicz S., Choubey D., Schultz R. M., Han J. y Chen G. (2003). p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun. The determinant roles of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity. *J Biol Chem.* 278: 4831-9.

Putz T., Culig Z., Eder I. E., Nessler-Menardi C., Bartsch G., Grunicke H., Uberall F. y Klocker H. (1999). Epidermal growth factor (EGF) receptor blockade inhibits the action of EGF, insulin-like growth factor I, and a protein kinase A activator on the mitogen-activated protein kinase pathway in prostate cancer cell lines. *Cancer Res.* 59: 227-33.

Puzianowska-Kuznicka M., Krystyniak A., Madej A., Cheng S. Y. y Nauman J. (2002). Functionally impaired TR mutants are present in thyroid papillary cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 1120-8.

Rachez C., Lemon B. D., Suldan Z., Bromleigh V., Gamble M., Naar A. M., Erdjument-Bromage H., Tempst P. y Freedman L. P. (1999). Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* 398: 824-8.

Rachez C., Suldan Z., Ward J., Chang C. P., Burakov D., Erdjument-Bromage H., Tempst P. y Freedman L. P. (1998). A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev.* 12: 1787-800.

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

Radoja N., Diaz D. V., Minars T. J., Freedberg I. M., Blumenberg M. y Tomic-Canic M. (1997). Specific organization of the negative response elements for retinoic acid and thyroid hormone receptors in keratin gene family. *J Invest Dermatol.* 109: 566-72.

Radoja N., Stojadinovic O., Waseem A., Tomic-Canic M., Milisavljevic V., Teebor S. y Blumenberg M. (2004). Thyroid hormones and gamma interferon specifically increase K15 keratin gene transcription. *Mol Cell Biol.* 24: 3168-79.

Rajkumar T. y Gullick W. J. (1994). A monoclonal antibody to the human c-erbB3 protein stimulates the anchorage-independent growth of breast cancer cell lines. *Br J Cancer.* 70: 459-65.

Rajkumar T., Gullick W. J. (1994). The type I growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 29: 3-9.

Rastinejad F., Perlmann T., Evans R. M. y Sigler P. B. (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature.* 375: 203-11.

Renaud J. P., Rochel N., Ruff M., Vivat V., Chambon P., Gronemeyer H. y Moras D. (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* 378: 681-9.

Rennefahrt U., Illert B., Greiner A., Rapp U. R. y Troppmair J. (2004). Tumor induction by activated JNK occurs through deregulation of cellular growth. *Cancer Lett.* 215: 113-24.

Rittling S. R., Coutinho L., Amram T. y Kolbe M. (1989). AP-1/jun binding sites mediate serum inducibility of the human vimentin promoter. *Nucleic Acids Res.* 17: 1319-33.

- Roberts A. B. y Wakefield L. M.** (2003). The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 8621-3.
- Robinson M. J, y Cobb M.** (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 9: 180-6.
- Rochette-Egly C.** (2003). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal.* 15: 355-66.
- Rochette-Egly C., Adam S., Rossignol M., Egly J. M. y Chambon P.** (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell.*
- Rodriguez-Viciano P., Wame P. H., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry M. J., Waterfield M. D. y Downward J.** (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370: 527-32.
- Rodriguez-Viciano P., Wame P. H., Vanhaesebroeck B., Waterfield M. D. y Downward J.** (1996). Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J.* 15: 2442-51.
- Rose J. K., Buonocore L. y Whitt M. A.** (1991). A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *Biotechniques.* 10: 520-5.
- Ross J. S. y Fletcher J.** (1999). The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Semin Cancer Biol.* 9: 128-35.
- Rossi A., Jang S. I, Ceci R., Steinert P. M. y Markova N. G.** (1998). Effect of AP1 transcription factors on the regulation of transcription in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 110: 34-40.
- Rubie C., Frick V. O., Wagner M., Weber C., Kruse B., Kempf K., Konig J., Rau B. y Schilling M.** (2006). Chemokine expression in hepatocellular carcinoma versus colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol.* 12: 6627-33.
- Rubie C., Oliveira-Frick V., Rau B., Schilling M. y Wagner M.**(2006). Chemokine receptor CCR6 expression in colorectal liver metastasis. *J Clin Oncol.* 24: 5173-4.
- Rubie C., Oliveira V., Kempf K., Wagner M., Tilton B., Rau B., Kruse B., Konig J. y Schilling M.** (2006). Involvement of chemokine receptor CCR6 in colorectal cancer metastasis. *Tumour Biol.* 27: 166-74.
- Ruoslahti E.** (1997). Stretching is good for a cell. *Science.* 276: 1345-6.
- Saatcioglu F., Deng T. y Karin M.** (1993). A novel cis element mediating ligand-independent activation by c-ErbA: implications for hormonal regulation. *Cell* 75: 1095-105.
- Sachs L. M.** (2004). Corepressor requirement and thyroid hormone receptor function during *Xenopus* development. *Vitam Horm.* 68: 209-30.
- Sainsbury J. R., Malcolm A. J., Appleton D. R., Farndon J. R. y Harris A. L.** (1985). Presence of epidermal growth factor receptor as an indicator of poor prognosis in patients with breast cancer. *J Clin Pathol.* 38: 1225-8.
- Samara G. J., Lawrence D. M., Chiarelli C. J., Valentino M. D., Lyubsky S., Zucker S. y Vaday GG.** (2004). CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 214: 231-41.

Sanchez-Pacheco A., Palomino T. y Aranda A. (1995). Retinoic acid induces expression of the transcription factor GHF-1/Pit-1 in pituitary prolactin- and growth hormone-producing cell lines. *Endocrinology*. 136: 5391-8.

Sap J., Munoz A., Damm K., Goldberg Y., Ghysdael J., Leutz A., Beug H. y Vennstrom B. (1986). The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324: 635-40.

Sarkar D., Su Z. Z., Lebedeva I. V., Sauane M., Gopalkrishnan R. V., Valerie K. y Dent P, Fisher PB. (2002). mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 10054-9.

Sato H., Kita M. y Seiki M. (1993). v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *J Biol Chem*. 268: 23460-8.

Scaltriti M., Baselga J. (2006). The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 12: 5268-71.

Schaller G., Fuchs I., Pritze W., Ebert A., Herbst H., Pantel K., Weitzel H. y Lengyel E. (1996). Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2: 1879-85.

Schroen D. J. y Brinckerhoff C. E. (1996). Nuclear hormone receptors inhibit matrix metalloproteinase (MMP) gene expression through diverse mechanisms. *Gene Expr*. 6: 197-207.

Schwabe J. W., Chapman L., Finch J. T. y Rhodes D. (1993). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. 5: 567-78.

Seger R. y Krebs E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. 9: 726-35.

Seth A., Gonzalez F. A., Gupta S., Raden D. L. y Davis R. J. (1992). Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 267: 24796-804.

Seton-Rogers S. E., Lu Y., Hines L. M., Koundinya M., LaBaer J., Muthuswamy S. K y Brugge J. S. (2004). Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 1257-62.

Shao D. y Lazar M. A. (1999). Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J Clin Invest*. 103.

Shayesteh L., Lu Y., Kuo W. L., Baldocchi R., Godfrey T., Collins C., Pinkel D., Powell B., Mills G. B. y Gray J. W. (1999). PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet*. 21: 99-102.

Sherwood E. R., Van Dongen J. L., Wood C. G., Liao S., Kozlowski J. M. y Lee C. (1998). Epidermal growth factor receptor activation in androgen-independent but not androgen-stimulated growth of human prostatic carcinoma cells. *Br J Cancer*. 77: 855-61.

Shi Y. y Massague J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700.

Shibusawa N., Hollenberg A. y Wondisford F. E. (2003). Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative gene regulation. *J Biol Chem*. 278: 732-8.

Shibusawa N., Hashimoto K., Nikrodhanond A. A., Liberman M. C., Applebury M. L., Liao X. H., Robbins J. T., Refetoff S., Cohen R. N. y Wondisford F. E. (2003). Thyroid hormone action in the absence of thyroid hormone receptor DNA-binding in vivo. *J Clin Invest.* 112: 588-97.

Shields J. M., Pruitt K., McFall A., Shaub A. y Der C. J. (2000). Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol.* 10: 147-54.

Shikama N., Lyon J. y La Thanue N. B. (1998). The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends Cell Biol* 7: 230-36S.

Shimizu Y., Murata H., Kashii Y., Hirano K., Kunitani H., Higuchi K. y Watanabe A. (2001). CC-chemokine receptor 6 and its ligand macrophage inflammatory protein 3 α might be involved in the amplification of local necroinflammatory response in the liver. *Hepatology.* 34.

Siegel P. M., Shu W., Cardiff R. D., Muller W. J. Y Massague J. (2003). Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 8430-5.

Silva J. M., Dominguez G., Gonzalez-Sancho J. M., Garcia J. M., Silva J., Garcia-Andrade C., Navarro A., Munoz A. y Bonilla F. (2002). Expression of thyroid hormone receptor/erbA genes is altered in human breast cancer. *Oncogene.* 21: 4307-16.

Singh A. B. y Harris R. C. (2005). Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal.* 17: 1183-93.

Sisley K., Curtis D., Rennie I. G. y Rees R. C. (1993). Loss of heterozygosity of the thyroid hormone receptor B in posterior uveal melanoma. *Melanoma Res.* 3: 457-61.

Slamon D. J., Clarck G. M., Wong S. G., Levin W. J., Ullrich A. y McGuire W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 232: 177-82.

Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goetze N. M., Olson B. J. y Klenk D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150: 76-85.

Sole E., Calvo R., Obregon M. J. y Meseguer A. (1996). Effects of thyroid hormone on the androgenic expression of KAP gene in mouse kidney. *Mol Cell Endocrinol.* 119:147-59.

Soloaga A., Thomsom S., Wiggin G. R., Rampersaud N., Dyson M. H., Hazzalin C. A., Mahadevan L. C. y Arthur J. S. (2003). MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J.* 22: 2788-98.

Sommers C. L., Byers S. W., Thompson E. W., Torri J. A. y Gelmann E. P. (1994). Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 31: 325-35.

Sommers C. L., Heckford S. E., Skerker J. M., Worland P., Torri J. A, Thompson E. W., Byers S. W. y Gelmann E. P. (1992). Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 52: 5190-7.

Sommers C. L. , Skerker J., Chrysogelos S. A., Bosseler M. y Gelmann E. P. (1994). Regulation of vimentin gene transcription in human breast cancer cell lines. *Cell Growth Differ.* 5: 839-46.

Souchelnytskyi S., Tamaki K., Engstrom U., Wernstedt C., ten Dijke P. y Heldin C. H. (1997). Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* 272: 28107-15.

Stambolic V., Suzuki A., de la Pompa J. L., Brothers G. M., Mirtsos C., Sasaki T., Ruland J., Penninger J. M., Siderovski D. P. y Mak T. W. N (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 98: 29-39.

Stockinger A., Eger A., Wolf J., Beug H. y Foisner R. (2001). E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J Cell Biol.* 154: 1185-96.

Stokoe D., MacDonald S. G., Cadwallader K., Symons M. y Hancock J. F. (1994). Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 264: 1463-7.

Stove C. y Bracke M. (2004). Roles for neuregulins in human cancer. *Clin Exp Metastasis.* 21: 665-84.

Sun Y., Liu X., Eaton E. N., Lane W. S., Lodish H. F. y Weinberg R. A. (1999). Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling. *Mol Cell.* 4: 499-509.

Sutherland C., Leighton I. A. y Cohen P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J.* 296: 15-9.

Sutton A., Friand V., Brule-Donneger S., Chaigneau T., Ziol M., Sainte-Catherine O., Poire A., Saffar L., Kraemer M., Vassy J., Nahon P., Salzmann J. L., Gattegno L. y Charnaux N. (2007). Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. *Mol Cancer Res.* 5: 21-33.

Suzuki H. , Willingham M. C. y Cheng S. Y. (2002). Mice with a mutation in the thyroid hormone receptor beta gene spontaneously develop thyroid carcinoma: a mouse model of thyroid carcinogenesis. *Thyroid.* 12: 963-9.

Takeichi M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol.* 7: 619-27.

Tanabe K., Tokuda H., Takai S., Matsushima-Nishiwaki R., Hanai Y., Hirade K., Katagiri Y., Dohi S. y Kozawa O. (2006). Modulation by the steroid/thyroid hormone superfamily of TGF-beta-stimulated VEGF release from vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem.* 99: 187-95.

Tang H. Y., Lin H. Y., Zhang S., Davis F. B. y Davis P. J. (2004). Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. *Endocrinology.* 145: 3265-72.

Tavian D., De Petro G., Benetti A., Portolani N., Giulini S. M. y Barlati S. (2000). u-PA and c-MET mRNA expression is co-ordinately enhanced while hepatocyte growth factor mRNA is down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 87: 644-9.

Templeton D. J. (2001). Protein kinases: getting NEKed for S6K activation. *Curr Biol.* 11: 596-9.

Thiery J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2: 442-54.

Thomas S. M. , Coppelli F. M., Wells A., Gooding W. E., Song J., Kassis J., Drenning S. D. y Grandis J. R. (2003). Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase Cgamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 63: 5629-35.

Thompson D. M. y Gill G. N. (1985). The EGF receptor: structure, regulation and potential role in malignancy. *Cancer Surv.* 4: 767-88.

Thompson E. W., Newgreen D. y Tarin D. (2005). Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res.* 65: 5991-5.

Thompson E. W., Paik S., Brunner N., Sommers C. L., Zugmaier G., Clarke R., Shima T. B., Torri J., Donahue S., Lippman M. E. (1992). Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol.* 150: 534-44.

Thorgeirsson U. P., Turpeenniemi-Hujanen T., Williams J. E., Westin E. H., Heilman C. A., Talmadge J. E. y Liotta L. A. (1985). NIH/3T3 cells transfected with human tumor DNA containing activated ras oncogenes express the metastatic phenotype in nude mice. *Mol Cell Biol.* 5: 259-62.

Thormeyer D. y Baniahmad A. (1999). The v-erbA oncogene (review). *Int J Mol Med.* 4: 351-8.

Tibbles L. A. y Woodgett J. R. (1999). The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci.* 55: 1230-54.

Tomakidi P., Mirancea N., Fusenig N. E., Herold-Mende C., Bosch F. X. y Breikreutz D. (1999). Defects of basement membrane and hemidesmosome structure correlate with malignant phenotype and stromal interactions in HaCaT-Ras xenografts. *Differentiation.* 64: 263-75.

Tomic-Canic M., Day D., Samuels H. H., Freedberg I. M. y Blumenberg M. (1996). Novel regulation of keratin gene expression by thyroid hormone and retinoid receptors. *J Biol Chem.* 271: 1416-23.

Tomic-Canic M., Sunjevaric I., Freedberg I. M. y Blumenberg M. (1992). Identification of the retinoic acid and thyroid hormone receptor-responsive element in the human K14 keratin gene. *J Invest Dermatol.* 99: 842-7.

Treisman R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol.* 8: 205-15.

Trusolino L, Bertotti. A. y Comoglio P. M. (2001). A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* 107: 643-54.

Tse J. C. y Kalluri R. (2007). Mechanisms of metastasis: Epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem.* 2007.

Tuxhorn J. A., Mc Alhany S., Yang F., Dang T. D. y Rowley D. R. (2002). Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model." *Cancer Res.* 62: 6021-5.

Uchida H., Iwashita Y., Sasaki A., Shibata K., Matsumoto T., Ohta M. y Kitano S. (2006). Chemokine receptor CCR6 as a prognostic factor after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 21: 161-8.

Ullrich A., Coussens L., Hayflick J. S., Dull T. J., Gray A., Tam A. W., Lee J., Yarden Y., Libermann T. A. y Schlessinger J. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature.* 309: 418-25.

Umesono K., Giguere V., Glass C. K., Rosenfeld M. G. y Evans R. M. (1988). Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature.* 336: 262-5.

Van Crujisen H., Giaccone G. y Hoekman K. (2005). Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies. *Int J Cancer.* 117: 883-8.

Van de Klundert F. A., Jansen H. J. y Bloemendal H. (1995). Negative regulation of a special, double AP-1 consensus element in the vimentin promoter: interference by the retinoic acid receptor. *J Cell Physiol.* 164: 85-92.

Verrecchia F. y Mauviel A. (2002). Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol.* 118: 211-5.

Vicent G. P., Ballare C., Nacht A. S., Clausell J., Subtil-Rodriguez A., Quiles I., Jordan A. y Beato M. (2006). Induction of progesterone target genes requires activation of Erk and Msk kinases and phosphorylation of histone H3. *Mol Cell.* 24: 367-81.

Voegel J. J., Heine M. J., Zechel C., Chambon P. y Gronemeyer H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15: 3667-75.

Wada T. y Penninger J. M. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene.* 23: 2838-49.

Wagner R. L., Apriletti J. W., McGrath M. E., West B. L., Baxter J. D. y Fletterick R. J. (1995). A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature.* 378: 690-7.

Wakefield L. M. y Roberts A. M. (2002). TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 12: 22-9.

Wang C. S., Lin K. H. y Hsu Y. C. (2002). Alterations of thyroid hormone receptor alpha gene: frequency and association with Nm23 protein expression and metastasis in gastric cancer. *Cancer Lett.* 175: 121-7.

Wang H. Y., Cheng Z. y Malbon C. C. (2003). Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. *Cancer Lett.* 191: 229-37.

Wang J. M., Deng X., Gong W. y Su S. (1998). Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods.* 220: 1-17.

Waskiewicz A. J. y Cooper J. A. (1995). Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr Opin Cell Biol.* 7: 798-805.

Webber M. M., Bello-DeOcampo D., Quader S., Deocampo N. D., Metcalfe W. S. y Sharp R. M. (1999). Modulation of the malignant phenotype of human prostate cancer cells by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR). *Clin Exp Metastasis.* 17: 255-63.

Webster N. J., Green S., Jin J. R. y Chambon P. (1988). The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* 54: 199-207.

Wehling M. (1997). Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol.* 59: 365-93.

Wells A. (1999). EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 31: 637-43.

Wen J. M., Huang J. F., Hu L., Wang W., Zhang M., Sham J. S. T., Xu J., Zeng W-F, Xie D., Liang L. y Guan X-Y. (2002). Establishment and characterization of human metastatic hepatocellular carcinoma cell line. *Cancer Genet. Cytogenet.* 135: 91-95.

Westermarck J. y Kahari V. M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 13: 781-92.

Westermarck J., Li S. P., Kallunki T., Han J. y Kahari V. M. (2001). p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Mol Cell Biol.* 21: 2373-83.

- Widmann C., Gibson S., Jarpe M. B. y Johnson G. L.** (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79: 143-80.
- Wikstrom L., Johansson C., Salto C., Barlow C., Campos Barros A., Baas F., Forrest D., Thoren P. y Vennstrom B.** (1998). Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *EMBO J.* 17: 455-61.
- Williams** (2000). Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol.* 20: 8329-42.
- Wittinghofer A. y Pai E. F.** (1991). The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem Sci.* 16.
- Wong E. V., Schaefer A. W., Landreth G. y Lemmon V.** (1996). Involvement of p90rsk in neurite outgrowth mediated by the cell adhesion molecule L1. *J Biol Chem.* 271: 18217+23.
- Wrana J. L., Attisano L., Wieser R., Ventura F. y Massague J.** (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature.* 370: 341-7.
- Wu X., Senechal K., Neshat M. S., Whang Y. E. y Sawyers C. L.** (1998). The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 15587-91.
- Wu Y., Zhang X., Salmon M., Lin X. y Zehner Z. E.** (2006). TGFbeta1 regulation of vimentin gene expression during differentiation of the C2C12 skeletal myogenic cell line requires Smads, AP-1 and Sp1 family members. *Biochim Biophys Acta.*
- Wurtz J. M., Bourguet W., Renaud J. P., Vivat V., Chambon P., Moras D. y Gronemeyer H.** (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol.* 3: 206.
- Xing J., Ginty D. y Greenberg M. E.** (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science.* 273: 959-63.
- Xu J., Thompson K., Shephard L. B., Hudson L. G. y Gill G. N.** (1993). T3 receptor suppression of Sp1-dependent transcription from the epidermal growth factor receptor promoter via overlapping DNA-binding sites. *J Biol Chem.* 268: 16065-73.
- Xu W., Angelis K., Danielpour D., Haddad M. M., Bischof O., Campisi J., Stavnezer E. y Medrano E. E.** (2000). Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type beta transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 5924-9.
- Yamamoto T., Ikawa S., Akiyama T., Semba K., Nombra N., Miyajima N., Saito T y Toyoshima K.** (1986). Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature.* 319: 230-4.
- Yamamoto T., Kozawa O., Tanabe K., Akamatsu S., Matsuno H., Dohi S. y Uematsu T.** (2001). Involvement of p38 MAP kinase in TGF-beta-stimulated VEGF synthesis in aortic smooth muscle cells. *J Cell Biochem.* 82: 591-8.
- Yanagisawa J., Yanagi Y., Masuhiro Y., Suzawa M., Watanabe M., Kashiwagi K., Toriyabe T., Kawabata M., Miyazono K. y Kato S.** (1999). Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science* 283: 1317-21.
- Yang J. Q., Zhao W., Duan H., Robbins M. E., Buettner G. R., Oberley L. W. y Domann F. E.** (2001). v-Ha-RaS oncogene upregulates the 92-kDa type IV collagenase (MMP-9) gene by increasing cellular superoxide production and activating NF-kappaB. *Free Radic Biol Med.* 31.

Yang X. J., Ogryzko V. V., Nishikawa J., Howard B. H. y Nakatani Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. 382: 319-24.

Yarden Y. y Sliwkowski M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 127-37.

Yee A. S., Paulson E. K, McDevitt M. A., Rieger-Christ K., Summerhayes I., Berasi S. P., Kim J., Huang C. Y y Zhang X. (2004). The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. *Gene.* 336: 1-13.

Yen C. C., Huang Y. H., Liao C. Y., Liao C. J., Cheng W. L., Chen W. J. y Lin K. H. (2006). Mediation of the inhibitory effect of thyroid hormone on proliferation of hepatoma cells by transforming growth factor-beta. *J Mol Endocrinol.* 36: 9-21.

Yin J. J, Selander K., Chirgwin J. M., Dallas M., Grubbs B. G., Wieser R., Massague J., Mundy G. R. y Guise T. A. (1999). TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest.* 103: 197-206.

Ying H., Suzuki H., Furumoto H., Walker R., Meltzer P., Willingham M. C. y Cheng SY. (2003). Alterations in genomic profiles during tumor progression in a mouse model of follicular thyroid carcinoma. *Carcinogenesis.* 24: 1467-79.

Yordy J. S. y Muise-Helmericks R. C. (2000). Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene.* 19: 6503-13.

Yosimichi G., Nakanishi T., Nishida T., Hattori T., Takano-Yamamoto T. y Takigawa M. (2001). CTGF/Hcs24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and proliferation through a p44/42 MAPK/extracellular-signal regulated kinase (ERK). *Eur J Biochem.* 268: 6058-65.

Zeigler M. E, Chi Y., Schmidt T. y Varani J. (1999). Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol.* 180: 271-84.

Zhan M., Zhao H. y Han Z. C. (2004). Signalling mechanisms of anoikis. *Histol Histopathol.* 19: 973-83.

Zhang J., Zamir I. y Lazar M. A. (1997). Differential recognition of liganded and unliganded thyroid hormone receptor by retinoid X receptor regulates transcriptional repression. *Mol Cell Biol.* 17: 6887-97.

Zhang Y., Liu G. y Dong Z. (2001). MSK1 and JNKs mediate phosphorylation of STAT3 in UVA-irradiated mouse epidermal JB6 cells. *J Biol Chem.* 276.

Zhao Y., BJORBAEK C. y MOLLER D. E. (1996). Regulation and interaction of pp90(rsk) isoforms with mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 271: 29773-9.

Zwijssen R. M., Wientjens E., Klompmaker R., van der Sman J., Bernards R. y Michalides R. J. (1997). CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell.* 88: 405-15.

