

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA C ALFA EN CÁNCER DE TIROIDES

Campos Haedo, Mateo Nicolás – LU1066820
Licenciatura en Biotecnología

Tutor:
Rosemblit, Cinthia
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UCA-CONICET
Co-Tutor:
Crivaro, Luis Pablo Andrés
UADE

Marzo, 2021



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

Dedicado a ustedes,

Ma y pa, por estar siempre y apoyarme en todo lo que me propongo

Tomás y Joaquín, mis amigos más valiosos

Lu, por darme tanta felicidad y estar a mi lado cuando más lo necesitaba

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Cin por darme la oportunidad de participar en este proyecto que es a la vez final y comienzo de dos grandes etapas en mi carrera. Por las charlas, los consejos y las enseñanzas que me ayudan a mejorar cada día, por aparte de ser mi tutora, ser mi compañera. A Gra, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y hacerme sentir que pertenezco a él. A Cele, por estar siempre dispuesta a explicarme lo que no entiendo con una sonrisa. A Joha y a Mechi, por las incontables veces que me prestaron su ayuda con tanta predisposición. A Ale, Ali, Flor y Lenki por las charlas y consejos que aprecio de corazón. A María Laura por su generosidad conmigo ofreciéndome siempre lo que podía necesitar. A todos mis compañeros del BIOMED por siempre tenderme una mano cuando lo necesité y hacerme sentir bienvenido en todo momento.

También quiero agradecer a Ro por permitirme conocer este maravilloso laboratorio del que me siento tan feliz de formar parte, a Za por siempre ayudarme a no perder la perspectiva y darme ánimos, y a ambas por estar siempre, hasta en los momentos más difíciles y las decisiones más importantes.

A Luis, por ser mi co-tutor, por las charlas de tantos temas interesantes, pero más importante, por ser un ejemplo de dedicación y vocación en la enseñanza.

A Fede Prada y al equipo docente de UADE por estar siempre para lo que necesité y abrirme las puertas a este increíble mundo que es la biotecnología.

Resumen

La incidencia del cáncer de tiroides ha aumentado significativamente en las últimas décadas en Argentina como en el resto del mundo. La hormona estimulante de la tiroides (TSH, del inglés *Thyroid Stimulating Hormone*) controla la función tiroidea al unirse a su receptor (TSHR, del inglés *TSH Receptor*) acoplado a la proteína G. La hiperactivación de TSH podría estar involucrada en enfermedades de la tiroides y cáncer. La proteína quinasa C (PKC, del inglés *Protein Kinase C*), una proteína quinasa de serina/treonina, ha sido ampliamente implicada en la transformación maligna, en la supervivencia celular, la migración y la invasión. Las PKC clásicas y nuevas se activan mediante la activación de fosfolipasa C (PLC, del inglés *Phospholipase C*) vía receptores tirosina-quinasa y receptores acoplados a proteína G (GPCR, del inglés *G Protein Coupled Receptor*). Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado previamente que las hormonas tiroideas (HTs) se unen a su receptor de membrana induciendo la activación de PKC ζ , que conduce a la fosforilación de la quinasa regulada por señal extracelular 1/2 (ERK1/2, del inglés *Extracellular signal Regulated Kinase*) en células de linfoma T. Esto a su vez activa al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B, del inglés *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), involucrado en la proliferación celular. Numerosos estudios establecieron que las PKC se sobreexpresan en cáncer humano y que su expresión correlaciona con la agresividad tumoral en cáncer de próstata, pulmón, mama y glioma. Sin embargo, el papel de las PKC en cáncer de tiroides permanece poco estudiado. Aquí, abordamos el papel potencial de PKC α en las vías de transducción de los receptores de TSHR y de las HTs involucradas en la proliferación celular y la tumorigénesis. El análisis de la expresión de PKC en líneas celulares de cáncer de tiroides humano reveló niveles elevados de proteína y ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en relación con líneas celulares inmortalizadas no tumorales. El tratamiento de las células de cáncer de tiroides con TSH o HTs indujo un aumento en la proliferación celular en comparación con las células no tratadas mediante ensayo de Cell Titer Blue (CTB). El tratamiento con inhibidores de PKC, Staurosporina y GF109203X, dio como resultado una inhibición significativa de la proliferación mediada por TSH y HTs en comparación con el control en cada línea celular estudiada por CTB. Además, el tratamiento con inhibidores de PKC disminuyó la activación de timoma de la sepa murina AKR (AKT, del

inglés *AKR mouse strain Thymoma*) y ERK en células estimuladas con TSH y HTs mediante Western blot. Finalmente, en células en las que se inhibió a PKC α por ácido ribonucleico pequeño de interferencia (siRNA, del inglés *Short Interfering RiboNucleic Acid*) se redujo significativamente la proliferación inducida por TSH y HTs por CTB. Nuestros hallazgos establecen un papel potencial de PKC α en el control de la proliferación inducida por hormonas que puede explorarse como tratamiento para eliminar eficazmente las células cancerosas de la tiroides.

Abstract

The incidence of thyroid cancer has increased significantly within last decades in Argentina as in the rest of the world. Thyroid stimulating hormone (TSH) controls thyroid function by binding to TSH receptor (TSHR) coupled to G protein. TSH hyperactivation could be involved in thyroid diseases and cancer. Protein kinase C (PKC), a serine/threonine protein kinase, has been widely implicated in malignant transformation, cell survival, motility, and invasion. Classical and novel PKC are activated by Phospholipase C (PLC) activation via tyrosine kinases and G protein-coupled receptors (GPCR). On the other hand, our group has previously demonstrated that thyroid hormones (THs) bind to their membrane receptor inducing PKC ζ , activation which leads to Extracellular signal regulated kinase (ERK) phosphorylation in T-cell lymphoma cells. This in turn activates the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), involved in cell proliferation. Numerous studies established that PKC is overexpressed in human cancer and its expression correlates with tumor aggressiveness in prostate, lung, and breast cancer. However, the role of PKC in thyroid cancer remains poorly studied. We here addressed the potential role of PKC α in TSHR and THs receptor transduction pathways involved in cellular proliferation and tumorigenesis. Analysis of PKC expression in human thyroid cancer cell lines revealed high protein and messenger ribonucleic acid (mRNA) levels relative to “normal” immortalized cell lines. Treatment of thyroid cancer cells either with TSH or THs induced an increase in cellular proliferation compared to untreated cells by Cell Titer Blue assay (CTB). Treatment with pan-PKC inhibitors, Staurosporine and GF109203X, resulted in a significant inhibition of TSH- and THs-mediated proliferation compared to control in every cell line studied by CTB. Also, treatment with PKC inhibitors diminished AKR mouse strain Thymoma (AKT) and ERK activation in TSH- and THs-stimulated cells by Western blot. Finally, PKC α -depleted cells by short interfering ribonucleic acid (siRNA) reduced significantly TSH- and THs-induced proliferation by CTB. Our findings establish a potential role for PKC α in the control of hormone-induced proliferation that can be explored as treatment to effectively eliminate thyroid cancer cells.

Todos estos resultados forman parte de un manuscrito en preparación próximo a ser enviado:

Rosemblit C, **Campos Haedo MN**, Perona M, Díaz Albuja, JA, Cayrol MF, Barreiro Arcos ML, Debernardi MM, Sterle HA, Paulazo MA, Klecha AJ, Juvenal GJ, Diaz Flaqué MC, Cremaschi GA. PKC α activation by THs through its membrane receptor plays a key role in thyroid cancer cell proliferation. Trabajo en preparación.

Parte del trabajo realizado en esta tesis de licenciatura ha sido publicado en:

Comunicaciones en congresos internacionales:

1. **Campos Haedo MN**, Diaz Flaqué MC, Díaz Albuja JA, MN, Perona M, Cayrol MF, Debernardi MM, Sterle HA, Juvenal GJ, Cremaschi GA, Rosemblit C. Dual BRAF and PKC α inhibition diminishes cell viability in thyroid cancer cells. ICE 2021 Virtual:19th International Congress of Endocrinology, 4th Latin American Congress of Endocrinology and 13th Congress of the Argentine Federation of Endocrinology Societies. Rev Argent Endocrinol Metab. Vol 58, Supl I. 2021.

2. Rosemblit C, Diaz Flaqué MC, Diaz Albuja JA, Barreiro Arcos ML, Cayrol MF, Perona M, Juvenal GJ, Cremaschi GA. PKC alpha activation by TSH plays a key role in thyroid cancer cell proliferation. XVII Latin American Thyroid Society Congress. Buenos Aires, Argentina. Archives of Endocrinology and Metabolism volume 63, issue supplement 02. Abstract nr 40. 2019.

Comunicaciones en congresos nacionales:

1. **Campos Haedo MN**, Diaz Flaqué MC, Díaz Albuja JA, Perona M, Debernardi MM, Cayrol MF, Barreiro Arcos ML, Sterle HA, Juvenal GJ, Cremaschi GA, Rosemblit C. BRAF inhibition diminishes cell viability via PKC alpha (PKCa) in thyroid cancer cells. Reunión Anual de Sociedades de Biociencias SAIC, SAI, SAFIS. 10-13 November 2020, Modalidad virtual. MEDICINA (Bs As), ISSN 0025-7680, 2020, 80 (Supl.V): abstract nr 233.

2. Rosemblit C, Díaz-Flaqué MC, Díaz Albuja JA, Barreiro Arcos ML, Cayrol F, Sterle HA, Debernardi MM, Paulazo MA, Klecha AJ, Cremaschi GA. Molecular mechanisms of action in TSH-mediated regulation of thyroid cancer. Reunión Conjunta SAIC, SAI, SAFIS 14-17 November 2018, Mar del Plata, Argentina. MEDICINA (Bs As), ISSN 0025-7680, 2018, 78 (Supl.III): 185.

Índice

Resumen	3
Abstract	5
1 Introducción	9
2 Antecedentes	11
2.1 Glándula tiroides	11
2.2 Hormona estimulante de la tiroides	13
2.3 Hormonas tiroideas	14
2.3.1 Síntesis y metabolismo de hormonas tiroideas	14
2.3.2 Efectos biológicos de las hormonas tiroideas	16
2.3.3 Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas	17
2.3.3.1 Acciones genómicas de las hormonas tiroideas	17
2.3.3.2 Acciones no genómicas de las hormonas tiroideas	19
2.3.3.2.1 La integrina $\alpha\beta 3$ como receptor de membrana de las hormonas tiroideas	19
2.4 Proteína Quinasa C (PKC)	21
2.4.1 Isoformas de PKC	21
2.4.2 Activación de PKC	23
2.4.3 PKC y cáncer	24
2.4.3.1 PKC α y cáncer	27
2.5 Cáncer de tiroides	29
3 Hipótesis	31
4 Metodología	32
4.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo	32
4.2 Hormonas e inhibidores	33
4.3 Ensayos de viabilidad celular	33
4.4 Extracción de ARN	33
4.5 Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscripta (rtPCR)	34
4.6 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, cuantitativa (qPCR)	34
4.7 Obtención de extractos protéicos totales	36
4.8 Ensayos de Western Blot	36
4.9 Transfecciones con ARN de interferencia (siRNA)	37
4.10 Citometría de flujo	37
4.11 Análisis estadístico	38
5 Resultados	39
5.1 PKC α está sobre expresada en células de cáncer de tiroides	39
5.2 Expresión del TSHR en líneas celulares de tiroides	40
5.3 Las líneas celulares de tiroides expresan los receptores nucleares y de membrana de las hormonas tiroideas	42
5.4 La combinación de hormonas tiroideas en concentraciones fisiológicas induce proliferación de células de cáncer de tiroides	43
5.5 PKC participa en los efectos proliferativos de la TSH y hormonas tiroideas en células de cáncer de tiroides	45
5.6 PKC α participa en la proliferación inducida por TSH y hormonas tiroideas en células de cáncer de tiroides	48
5.7 Participación de PKC α en la proliferación y apoptosis inducidas por hormonas	49
6 Discusión de resultados	52
7 Conclusiones	60
7.1 PKC α se encuentra sobreexpresada en cáncer de tiroides	60
7.2 PKC α participa en la proliferación inducida por TSH en células de cáncer de tiroides	60
7.3 PKC α participa en la proliferación inducida por hormonas tiroideas a través de su receptor de membrana en la integrina $\alpha\beta 3$ en células de cáncer de tiroides	60

7.4 La proliferación mediada por PKC α en respuesta a TSH y HTs ocurre a través de las vías de ERK y AKT, resultando en el aumento de la expresión de PCNA y aumento de la apoptosis.....	61
8 Bibliografía	63

1 Introducción

La incidencia del cáncer de tiroides ha aumentado significativamente en los últimos años tanto en Argentina como en el resto del mundo y se espera un aumento estimado de la mortalidad hacia el año 2040 ("Global Cancer Observatory", 2020). Al evolucionar a estadios menos diferenciados, los tumores bien diferenciados se vuelven refractarios a las terapias presentando invasión y metástasis ("American Cancer Society", 2020). El tratamiento de primera línea para esta enfermedad consiste en la tiroidectomía parcial o total seguida de ablación tiroidea con ^{131}I para destruir las células cancerosas remanentes (Goldman *et al.*, 1980; Aldinger *et al.*, 1978). Para casos de cáncer de tiroides anaplásico y otros cánceres avanzados que ya no responden a otros tratamientos, se utiliza quimioterapia combinada con radioterapia externa (Haigh *et al.*, 2001; De Crevoisier *et al.*, 2004). Las proteínas quinasas C (PKC, del inglés *Protein Kinase C*) regulan distintos procesos celulares incluyendo proliferación, apoptosis, supervivencia celular y migración. Las PKC clásicas y nuevas se activan por la fosfolipasa C (PLC, del inglés *PhosphoLipase C*) por activación de receptores tirosina-quinasa y receptores acoplados a proteína G (GPCR, del inglés *G Protein Coupled Receptor*) (Newton, 1997; Mochly-Rosen y Gordon, 1998; Jaken, 1996). Numerosos estudios establecieron que distintas PKC están sobreexpresadas en cáncer y su expresión correlaciona con agresividad (Griner y Kazanietz, 2007). Una de las alteraciones más comunes es la sobreexpresión de PKC α en cáncer de mama (Tan *et al.*, 2006), pulmón (Abera y Kazanietz, 2015), melanoma (Chen *et al.*, 2014) y glioma (Mandil *et al.*, 2001). Su sobreexpresión ha sido propuesta como biomarcador de mal pronóstico y resistencia a drogas (Lønne *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2013). Sin embargo, el papel de las PKC en cáncer de tiroides permanece poco estudiado. Teniendo en cuenta que las PKC se activan por GPCR y que la hormona estimulante de la tiroides (TSH, *Thyroid Stimulating Hormone*) controla la función tiroidea al unirse a su receptor (TSHR, *TSH Receptor*) que es un GPCR, las PKC podrían mediar efectos de la TSH en cáncer de tiroides. Por otra parte, en nuestro laboratorio describimos que las hormonas tiroideas T₃ y T₄ (HTs) al unirse a su receptor de membrana la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, activa vías de transducción de señales de PKC ζ que estimulan la proliferación de células de linfoma T (Barreiro Arcos *et al.*, 2011).

Por todo lo expuesto, un mayor estudio de la tumorigénesis y de las bases moleculares que llevan a la actividad hiperproliferativa tiroidea sería crucial para mejorar el enfoque terapéutico de esta patología. Un mayor entendimiento del rol de las PKC en cáncer de tiroides ampliaría las herramientas disponibles para un diagnóstico y/o tratamiento que contribuyan a mejorar la calidad de vida de los pacientes. Debido a esto, es necesario que haya estudios enfocados en la participación de estas enzimas en la proliferación y resistencia a tratamientos oncológicos.

El **objetivo general** de este proyecto es analizar si la sobreexpresión de PKC α confiere una ventaja sobre el crecimiento tumoral. Para ello se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

- Estudiar si PKC α forma parte de la vía de señalización de TSH a través de su receptor en células de cáncer de tiroides. Para ello evaluaremos la participación de PKC α en los efectos inducidos por TSH, mediante la regulación negativa de su expresión por la técnica de ARN de interferencia e inhibidores farmacológicos Finalmente evaluaremos la participación de PKC α en el crecimiento mediado por la unión de TSH a su receptor.
- Estudiar si PKC α forma parte de la vía de señalización de HTs a través de su receptor de membrana, la integrina $\alpha\beta_3$, en células de cáncer de tiroides. Para ello evaluaremos la participación de PKC α en los efectos inducidos por las HTs, mediante la regulación negativa de su expresión por la técnica de ARN de interferencia e inhibidores farmacológicos y analizaremos si se induce su activación por acción de HTs. Finalmente evaluaremos la participación de PKC α en el crecimiento mediado por la unión de HTs a sus receptores.

A continuación, se describen los desarrollos previos a este trabajo, incluyendo aquellos relacionados a la fisiología de la glándula tiroides; hormonas tiroideas y sus mecanismos de acción; la familia de proteínas PKC, particularmente la relación entre PKC α y el cáncer; y el cáncer de tiroides y sus características, enmarcados en la sección de antecedentes. Luego, se detallan los materiales y los procedimientos mediante los cuales se llegó a los resultados expuestos. Finalmente, se muestran los resultados obtenidos y sus conclusiones.

2 Antecedentes

2.1 Glándula tiroides

La tiroides es una glándula neuroendócrina responsable de la regulación del metabolismo del yodo. Sus acciones son llevadas a cabo por las hormonas tiroideas, 3,3'-5 triiodotironina (T₃) y tiroxina (T₄) (Fig. 1), cuyas funciones en la modulación de procesos fisiológicos son críticas para el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular (Mullur *et al.*, 2014).

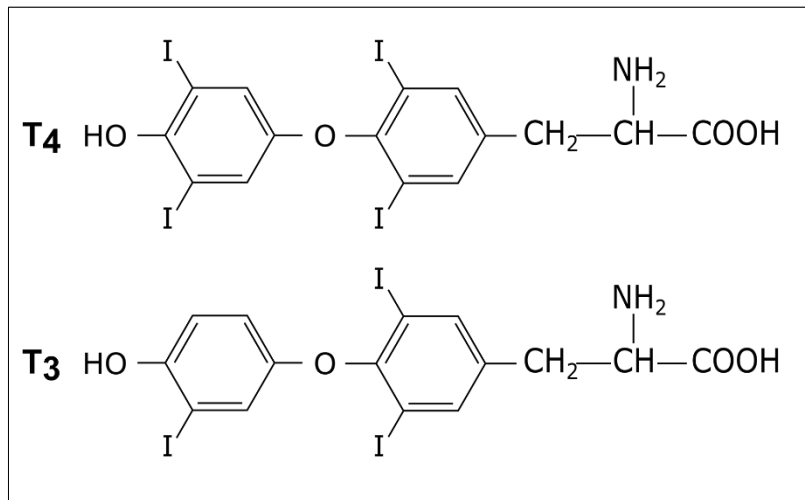


Figura 1: Estructura de las hormonas tiroideas

La glándula tiroides se localiza sobre la tráquea y laringe (Fig. 2). Se encuentra limitada por los cartílagos cricoides y tiroides por arriba, y está compuesta por dos lóbulos laterales unidos por una sección llamada istmo. Desde el istmo hasta el cartílago tiroideo se proyecta un tercer lóbulo más pequeño llamado piramidal. La estructura de la tiroides es lobulada y está cubierta por una cápsula fibrosa (Maenhaut *et al.*, 2000).

A nivel funcional, la tiroides está compuesta por folículos, que son unidades esféricas constituidas por el coloide y el epitelio que lo rodea. El epitelio tiene una región basal (orientada al exterior) y una región apical (orientada al coloide). Las células foliculares son las que producen y secretan hormonas tiroideas (HTs), mientras que el coloide funciona como depósito. La glándula posee, además de células foliculares, células que se encuentran solas o en pequeños grupos entre los folículos llamadas parafoliculares o células C, que secretan calcitonina en respuesta al aumento de calcio en el suero (Ross y Wilson, 2013).

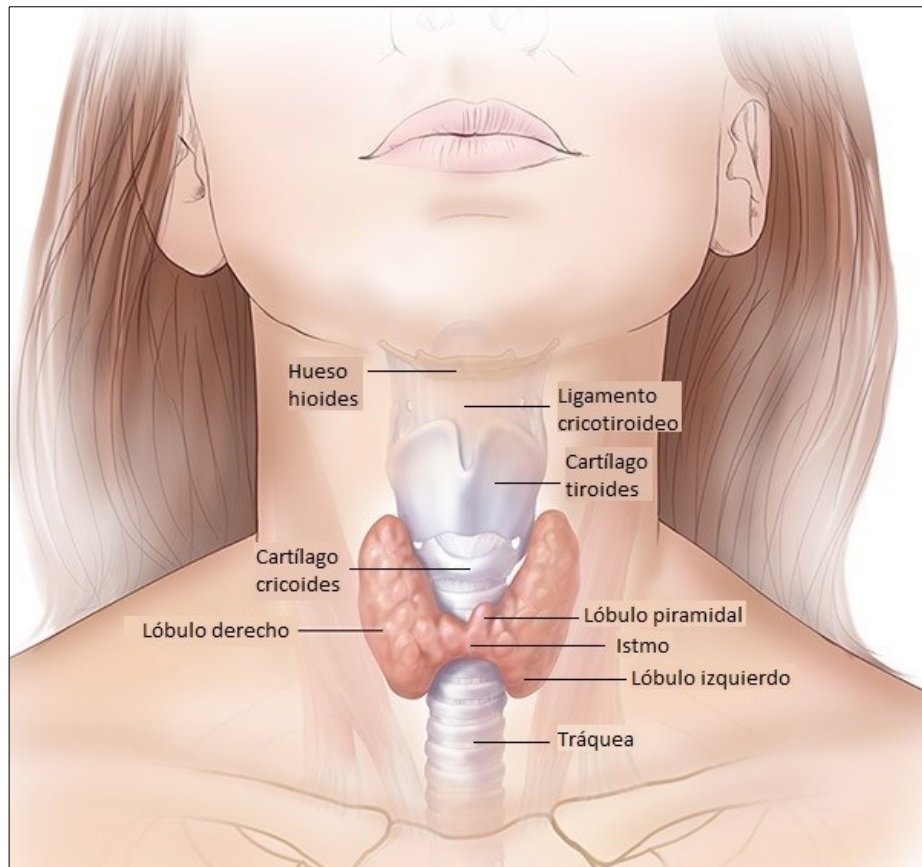


Figura 2: Localización y estructura de la glándula tiroides ("Hypothyroidism (Underactive Thyroid)", 2012)

La síntesis de HTs se encuentra regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. Brevemente, la liberación de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH, del inglés *thyroid releasing hormone*) por parte del hipotálamo induce la secreción de hormona estimulante de la tiroides o tirotrópina (TSH, del inglés *thyroid stimulating hormone*) sintetizada en la hipófisis, que a su vez induce la síntesis y secreción de las HTs en la tiroides (Fig. 3) (Guyton, 2011).

La expresión y secreción de la TSH es regulada por varios factores siendo el principal el sistema de retroalimentación negativa provocado por la concentración de HTs. Es decir, que al bajar la secreción de HTs, ya sea por una deficiencia en la dieta, defectos en el metabolismo del yodo por el consumo de agentes que interfieran con la actividad de las HTs o pérdida de función del tejido tiroideo, se produce una mayor liberación de TSH (Dumont *et al.*, 1992). Este sistema permite mantener los niveles de hormonas ajustados. Esto es importante ya que

un exceso o carencia de HTs puede llevar a situaciones adversas y patologías como el cáncer (Medici *et al.*, 2015; Yen, 2001).

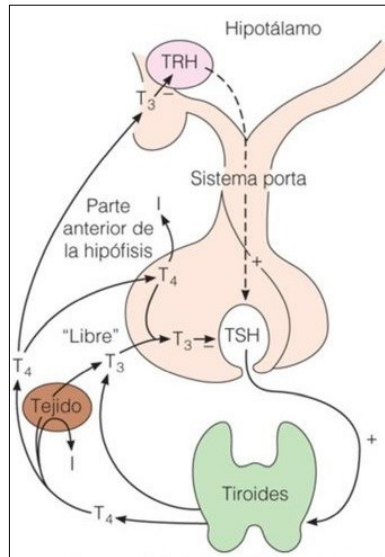


Figura 3: Representación del eje hipotálamo-pituitario-tiroideo (Garner y Shoback, 2015)

2.2 Hormona estimulante de la tiroides

La TSH es una hormona glicoproteica sintetizada en los tirótrofos de la hipófisis compuesta por la unión no covalente entre dos cadenas: α y β , codificadas por genes distintos. Como se mencionó antes, la TSH es considerada la principal responsable de la proliferación y diferenciación tiroideas, incluyendo la modulación de todas las etapas de la síntesis y liberación de HTs. Dichas funciones son desencadenadas por la unión a su receptor (TSHR, del inglés *TSH Receptor*) en las células foliculares tiroideas (Melmed *et al.*, 2011). El TSHR es un receptor acoplado a proteína G con siete pasos transmembrana. Al interactuar la TSH con su receptor, se activan dos vías de señalización (Fig. 4) (Laurent *et al.*, 1987; Rivas y Santisteban, 2003). Por una parte, cuando el TSHR es estimulado por TSH en concentraciones fisiológicas, se acopla a proteína G_s , ocasionando la activación de la adenilato ciclasa, que a su vez aumenta los niveles intracelulares de adenosín monofosfato cíclico (AMPC, del inglés *Cyclic Adenosine MonoPhosphate*), llevando a la proliferación y diferenciación tiroideas por medios tanto dependientes como independientes de la proteína quinasa A (PKA, del inglés *Protein Kinase A*). Por otra parte, en concentraciones suprafisiológicas de TSH, el TSHR se

acopla a proteína G_q , activando a la fosfolipasa C (PLC, del inglés *Phospholipase C*) que resulta en un aumento los niveles de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3 del inglés *Inositol 1,4,5-triPhosphate*) y diacilglicerol (DAG), provocando la modulación del eflujo de yoduro, iodación de tiroglobulina (Tg) y generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Ortiga-Carvalho *et al.*, 2016). El aumento de IP_3 desencadena la liberación de Ca^{2+} , que junto con el DAG provoca la activación de proteínas pertenecientes a la familia proteína quinasa C (PKC, del inglés *Protein Kinase C*). Esta segunda vía de señalización está asociada a la proliferación y desdiferenciación del tejido tiroideo (Rivas y Santisteban, 2003). También se observa un aumento en la invasión y proliferación de células de cáncer de tiroides folicular expuestas a concentraciones fisiológicas de TSH por mecanismos dependientes de PKC e independientes de PKA (Hoelting *et al.*, 1993).

2.3 Hormonas tiroideas

2.3.1 Síntesis y metabolismo de hormonas tiroideas

El proceso de síntesis y secreción comprende una serie de etapas (Fig. 5). La primera etapa (A) consiste en el ingreso activo de yoduro del torrente sanguíneo al tirocito principalmente a través de la proteína transportadora de sodio-yoduro (NIS, del inglés *Na⁺-I symporter*), que ingresa dos átomos de sodio por cada anión de yoduro. Luego de ser ingresado a la célula, el yoduro es transportado a la luz del folículo a través de proteínas específicas (Medici *et al.*, 2015). En la siguiente etapa (B), se produce la oxidación de yoduro a yodonio catalizada por la peroxidasa tiroidea (TPO, del inglés *Thyroid PerOxidase*), encargada también de la incorporación del yodonio a las tirosinas de la Tg. La TPO también es la encargada del acoplamiento (C) de las monoiodotirosinas y diiodotirosinas para formar las tironinas T_3 y T_4 . La TPO requiere para su actividad oxidante su oxidación previa por parte de H_2O_2 que es producido en la luz del folículo por la oxidasa dual 2 (DUOX2, del inglés *Dual Oxidase 2*). Al momento de su secreción, las hormonas unidas a Tg son captadas en gotas de coloide por endocitosis (D). Luego, se produce la ruptura proteolítica (E) de los enlaces de Tg, dando lugar a la separación de las HTs y también a la recaptación de yodo presente en la Tg que no dio lugar a HTs. Por último, ocurre la liberación (F) de las HTs al torrente sanguíneo mediante

transportadores en la membrana basal, mayormente el transportador de monocarboxilato 8 (MCT8, del inglés *MonoCarboxilate Transporter 8*) (Carvalho y Dupuy, 2017).

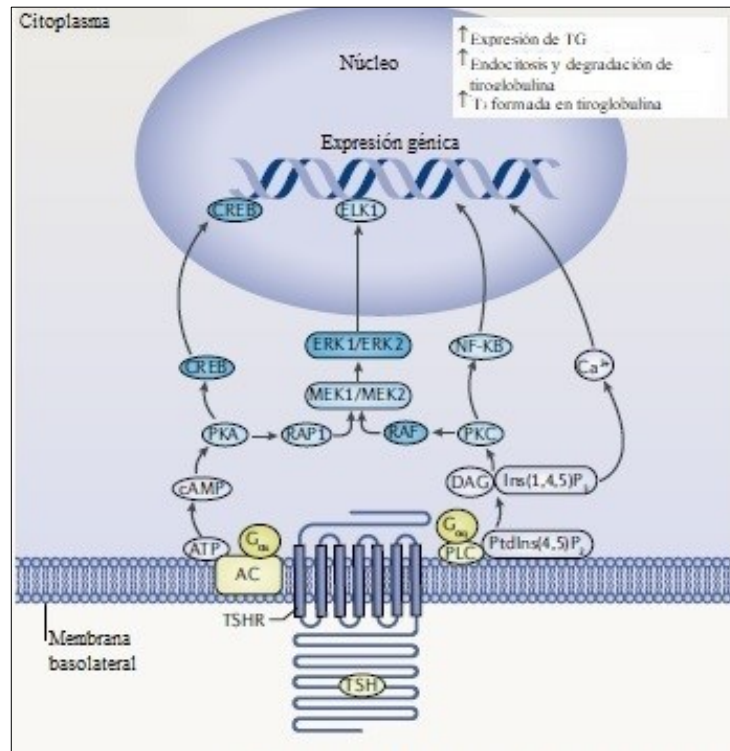


Figura 4: vías de señalización de TSH a través de su receptor en tirocitos (Citterio *et al.*, 2019). AC: adelicato ciclasa. PtdIns(4,5)P₂: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. Ins(1,4,5)P₃: inositol 1,4,5-trifosfato. NF-KB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, del inglés *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*. RAF: sarcoma rápidamente acelerado, del inglés *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*. RAP1: proteína relacionada a RAS 1, del inglés *Ras-related protein 1*. MEK: quinasa activada por mitógeno de señal extracelular del inglés *Mitogen-activated Extracellular signal Kinase*. ERK: quinasa regulada por señal extracelular, del inglés *Extracellular signal Regulated Kinase*. CREB: proteína de unión a sitio de respuesta a adenosín monofosfato cíclico, del inglés *Cyclic adenosine monophosphate Response Element Binding protein*. ELK1: proteína 1 tipo proteína específica a transformación de eritroblastos, del inglés *Erythroblast transformation specific LiKe-1 protein*.

La T₃ es la hormona tiroidea de mayor actividad biológica sobre los receptores nucleares para HTs (TRs, del inglés *Thyroid hormone Receptors*), vía clásica de acción de las HTs. Si bien es la que se encuentra en menor proporción en el torrente sanguíneo, la T₃ también puede ser el producto de la 5'-deiodinación de T₄ de manera local. Esta reacción es catalizada por enzimas deiodinasas. Estas enzimas representan uno de los mecanismos principales de

especificidad de tejido en el modelo clásico de señalización de HTs, siendo capaces de regular su actividad (Little, 2018). El ingreso de las HTs a la célula se da principalmente mediante proteínas transportadoras en la membrana plasmática. La expresión de estas proteínas transportadoras varía entre los distintos tejidos y su ausencia o sobreexpresión es causante de diversas patologías (Braun y Schweizer, 2018). Finalmente, las HTs son metabolizadas periféricamente mediante distintas reacciones para aumentar su hidrosolubilidad y eliminación.

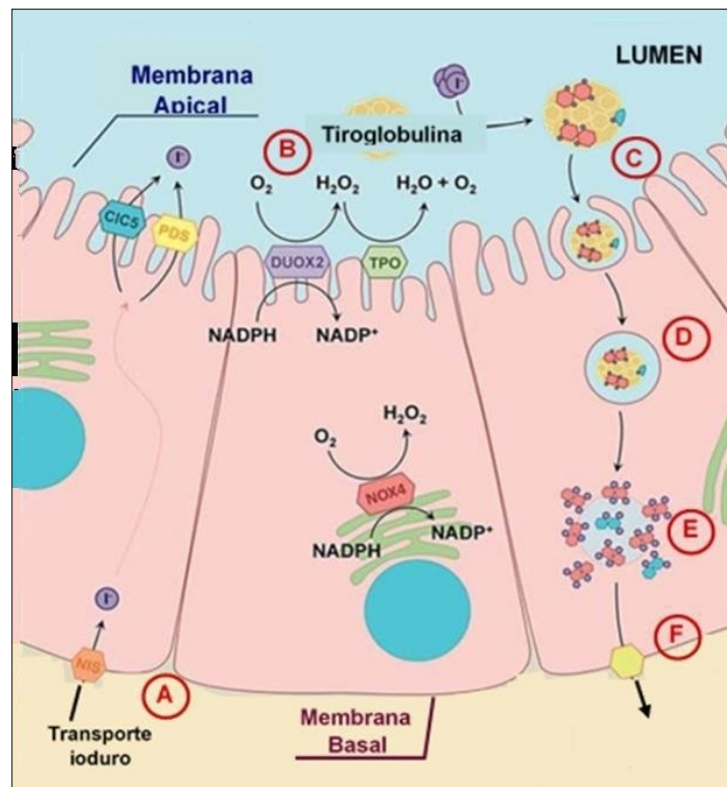


Figura 5: Eventos que llevan a la síntesis y secreción de HTs (Carvalho y Dupuy, 2013). CIC5: canal de cloruro-5, del inglés *Cl⁻ Channel-5*. PDS: pendrina o síndrome de Pendred, del inglés *PenDred Syndrome*. NADPH/NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, del inglés *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*.

2.3.2 Efectos biológicos de las hormonas tiroideas

Las HTs ejercen una serie de acciones fundamentales sobre los órganos y sistemas para el correcto funcionamiento del organismo. Los efectos de las HTs difieren en cada célula o tejido

y etapa del desarrollo en base a la presencia de agentes que las modulan localmente como los niveles de deiodinasas, receptores nucleares, transportadores y moduladores (Mullur *et al.*, 2014). Entre sus efectos sistémicos, podemos encontrar la modulación del metabolismo basal, termogénesis y regulación del consumo energético. Tienen también un rol esencial en el desarrollo fetal y neonatal (Mourouzis *et al.*, 2020).

Cuando el eje endócrino de un individuo funciona correctamente, se lo nomina “eutiroides”. Al producirse una desregulación donde la cantidad de hormonas se ve afectada negativamente, se denomina “hipotiroideo” y cuando se ve un aumento, se denomina “hipertiroideo”. Ambas situaciones tienen repercusiones negativas en el organismo. También se han caracterizado estados subclínicos de hipo- e hipertiroidismo, observados a nivel molecular en un aumento o reducción de la TSH en suero, con los niveles de HTs dentro de los rangos de referencia. Si bien los síntomas son leves o inexistentes, en algunos casos los trastornos subclínicos pueden llevar a complicaciones si no son tratados (Cooper y Biondi, 2012). Hay casos en los que el aumento o disminución de las concentraciones de HTs pueden deberse a patologías hipotalámicas o hipofisarias (Beck-Peccoz *et al.*, 2017; McDermott y Ridgway, 1998).

2.3.3 Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas

Las HTs pueden realizar sus acciones mediante dos mecanismos: a través de la unión entre las HTs y los TRs, o mediante receptores alternativos en la membrana plasmática, citoplasma y membrana mitocondrial. Las primeras son las acciones genómicas o clásicas de las HTs, mientras que las segundas, las acciones no genómicas o no clásicas de las HTs (Cheng *et al.*, 2010).

2.3.3.1 Acciones genómicas de las hormonas tiroideas

Las acciones genómicas afectan la expresión de los genes regulados por las HTs mediante la interacción de T_3 con los TRs, y ocurren exclusivamente dentro del núcleo. Estos receptores son factores de transcripción miembros de la superfamilia de receptores nucleares. Existen 2 genes de TRs que codifican 4 isoformas cada uno (Brent, 2012). La estructura de los TRs es modular en una sola cadena peptídica. Principalmente, la estructura consiste en un dominio de

unión a hormonas (HBD, del inglés *Hormone Binding Domain*) y un dominio de unión a ácido desoxiribonucleico (DBD, del inglés *DeoxiriboNucleic Acid Binding Domain*). Además de estos dominios, en los C- y N-terminales se encuentran regiones con función transactivadora tanto HTs-dependiente como HTs-independiente y entre los dominios de unión a hormonas y a ácido desoxiribonucleico (ADN) se encuentra un módulo bisagra.

Para ejercer su acción, los TRs se unen a secuencias específicas en las regiones no codificantes de los genes blanco a través de sus DBD. Estos sitios son los elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE, del inglés *Thyroid Response Element*) (Sirakov y Plateroti, 2011). Variaciones en estos sitios pueden influenciar la configuración, eficiencia de unión y acciones transcripcionales de los TRs. Así, actúan formando homodímeros, heterodímeros o heterotrímeros (Lazar, 2003; Flamant y Samarut, 2003).

Los TRs se encuentran unidos constitutivamente a correpresores con función histona deacetilasa, que impiden la transcripción de los genes regulados en ausencia de HTs. La T₃, una vez dentro del núcleo, se une a TR. Dicha unión induce un cambio en la conformación del receptor que causa el desacople de correpresores y reclutamiento de coactivadores, promoviendo la transcripción de los genes regulados por HTs (Fig. 6) (Little, 2018). También existen genes regulados negativamente por las HTs, como el gen de TSH β , responsable de los efectos de retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo (Santos *et al.*, 2011; Sasaki *et al.*, 2018).

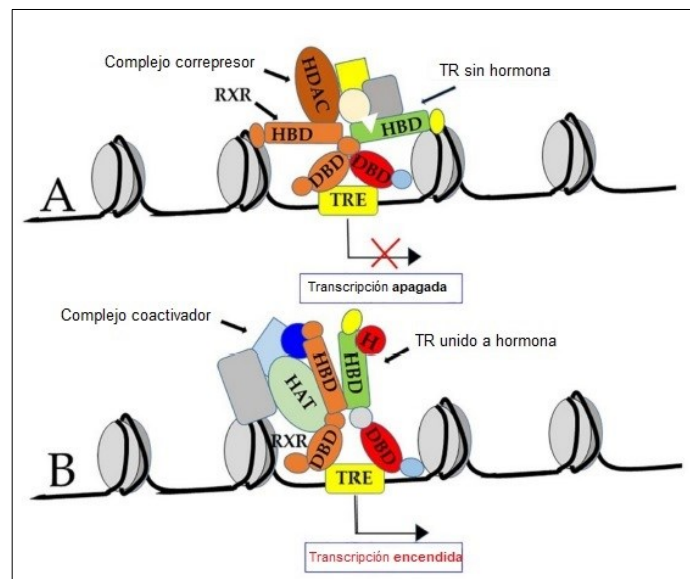


Figura 6: Mecanismo genómico de acción de las hormonas tiroideas (Giammanco *et al.*, 2020). RXR: receptor de retinoides X, del inglés *Retinoid X Receptor*. HAT: Histona AcetilTransferasa. H: hormona. HDAC: Histona DeAcetilasa.

2.3.3.2 Acciones no genómicas de las hormonas tiroideas

Las acciones no genómicas son aquellas que tienen inicio fuera del núcleo, mediante la interacción de las HTs con receptores en la membrana plasmática, en el citoplasma o en la mitocondria. Estos receptores pueden no tener homología con los TRs, como la integrina $\alpha\beta3$ que actúa como receptor de membrana plasmática (mTR) (Davis *et al.*, 2016). Los efectos no genómicos de las HTs resultan en la transducción de señales mediante el control de la disponibilidad de segundos mensajeros y la modificación de los patrones de fosforilación de proteínas intracelulares (Giammanco *et al.*, 2020).

2.3.3.2.1 La integrina $\alpha\beta3$ como receptor de membrana de las hormonas tiroideas

Las integrinas son un grupo de glicoproteínas heterodiméricas cuya función es regular la interacción entre la célula con la matriz extracelular, son críticas para el mantenimiento de la integridad tisular, comunicación intercelular, y angiogénesis (Seguin *et al.*, 2015; Cody *et al.*, 2007). En 2005, Bergh *et al* demostraron la existencia de un sitio de unión a HTs en la integrina $\alpha\beta3$. Esta proteína contiene un sitio de reconocimiento para el péptido RGD (Arginina-Glicina-Aspartato), encontrado en varias proteínas de la matriz extracelular (Bergh *et al.*, 2005).

La interacción de las HTs con la integrina $\alpha\beta3$ induce varios eventos dentro de la célula, entre ellos, el transporte de proteínas del citoplasma al núcleo y la transcripción de genes río abajo de las vías de señalización desencadenadas. Esta proteína posee dos dominios que unen a HTs. El dominio S1 une a T_3 y es capaz de activar la vía de señalización de la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K, del inglés *Phosphatidyl Inositol 3-Kinase*) (Liu *et al.*, 2014) que mediante acción de PKC resulta en la activación del $TR\alpha$ y la expresión de genes blanco. Por otra parte, el dominio S2 une a ambas hormonas y activa la vía de PLC-PKC que a su vez lleva a la activación de la quinasa regulada por señal extracelular 1/2 (ERK1/2, del inglés *Extracellular signal Regulated Kinase*). La activación de ERK1/2 resulta en la activación de $TR\beta1$ y la

expresión de genes asociados a la proliferación celular y la angiogénesis. Mediante estas vías, T₄ y T₃ promueven la angiogénesis y la proliferación de células tumorales a través de su unión a la integrina $\alpha\beta 3$ (Davis *et al.*, 2011).

Las acciones de HTs mediante la integrina $\alpha\beta 3$ aumentan la radio y quimio resistencia y aumentan la proliferación y la evasión de la apoptosis a través de la activación de varias vías de señalización y la modulación de la expresión génica (Davis *et al.*, 2019). Estos efectos han sido observados en distintos tipos de cáncer, entre ellos, cáncer de tiroides (Liu *et al.*, 2019).

Trabajos previos de nuestro laboratorio, el laboratorio de Neuroinmunomodulación y Oncología Molecular (BIOMED-UCA-CONICET), han demostrado que las HTs son capaces de activar distintas vías de señalización mediante la integrina $\alpha\beta 3$ en linfoma de células T. Esto resulta en la activación del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) (Cayrol *et al.*, 2015) y esfingomielinasas (SMasas), llevando a la rápida translocación de PKC ζ (véase Isoformas de PKC) a la membrana plasmática (Barreiro Arcos *et al.*, 2006; 2011). Se identificó a la quinasa regulada por ERK1/2 (Barreiro Arcos *et al.*, 2011) y al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B, del inglés *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) como efectores en ambas vías (Barreiro Arcos *et al.*, 2011; Cayrol *et al.*, 2015; Díaz Flaqué *et al.*, 2019). Finalmente, como un claro ejemplo de superposición de los mecanismos genómicos y no genómicos de las HTs, NF- κ B induce un aumento en la expresión de TR α , activando programas transcripcionales efectuados por las HTs (Fig. 7) (Barreiro Arcos *et al.*, 2011).

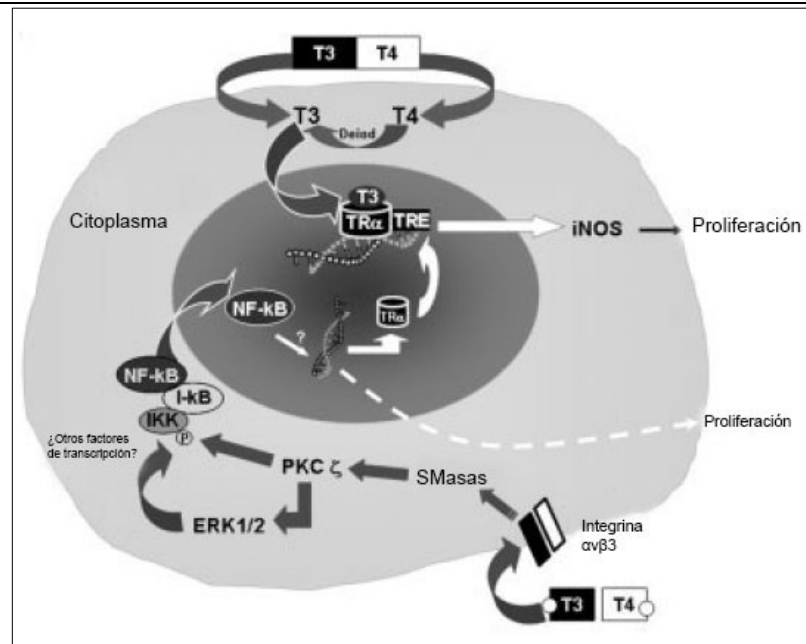


Figura 7: Superposición de efectos genómicos y no genómicos de las HTs (Barreiro Arcos *et al.*, 2011). DEIOD: deiodinasas. iNOS: óxido nítrico sintasa inducible, del inglés *inducible Nitric Oxide Synthase*. I-KB: inhibidor de NF-κB. IKK: I-KB quinasa, del inglés *I-KB Kinase*.

2.4 Proteína Quinasa C (PKC)

Las PKC constituyen una familia de serina/treonina quinasas originalmente descubiertas como el receptor intracelular principal de los ésteres de forbol (EF), agentes ampliamente usados en la investigación por su actividad promotora tumoral. La activación de PKC lleva a la fosforilación de un amplio rango de proteínas intracelulares que participan en vías de señalización asociadas con la proliferación, apoptosis, diferenciación y transformación maligna (Griner y Kazanietz, 2007). Por estos motivos, distintos miembros de la familia PKC han sido propuestos como blancos terapéuticos para numerosas patologías, entre las que encontramos distintos tipos de cáncer (Hsu *et al.*, 2014; Kang, 2014; Kim *et al.*, 2006; Sledge & Gökmen-Polar, 2006; Totoñ *et al.*, 2011).

2.4.1 Isoformas de PKC

La familia PKC comprende por lo menos 10 isoformas codificadas por 9 genes y divididas en tres subfamilias en función de su respuesta a DAG y Ca^{2+} , tal como se observa en la Figura

8. La subfamilia clásica (cPKC: α , β 1, β 2, γ) agrupa a las PKC que son activadas por DAG y Ca^{2+} . La subfamilia nueva o novel (nPKC: δ , ϵ , η , θ) son aquellas isoformas que son activadas por DAG, pero no responden a Ca^{2+} . Finalmente, las PKC miembro de la subfamilia atípica (aPKC: ζ , ι) no son activadas ni por DAG, ni por Ca^{2+} (Wu-Zhang y Newton, 2013).

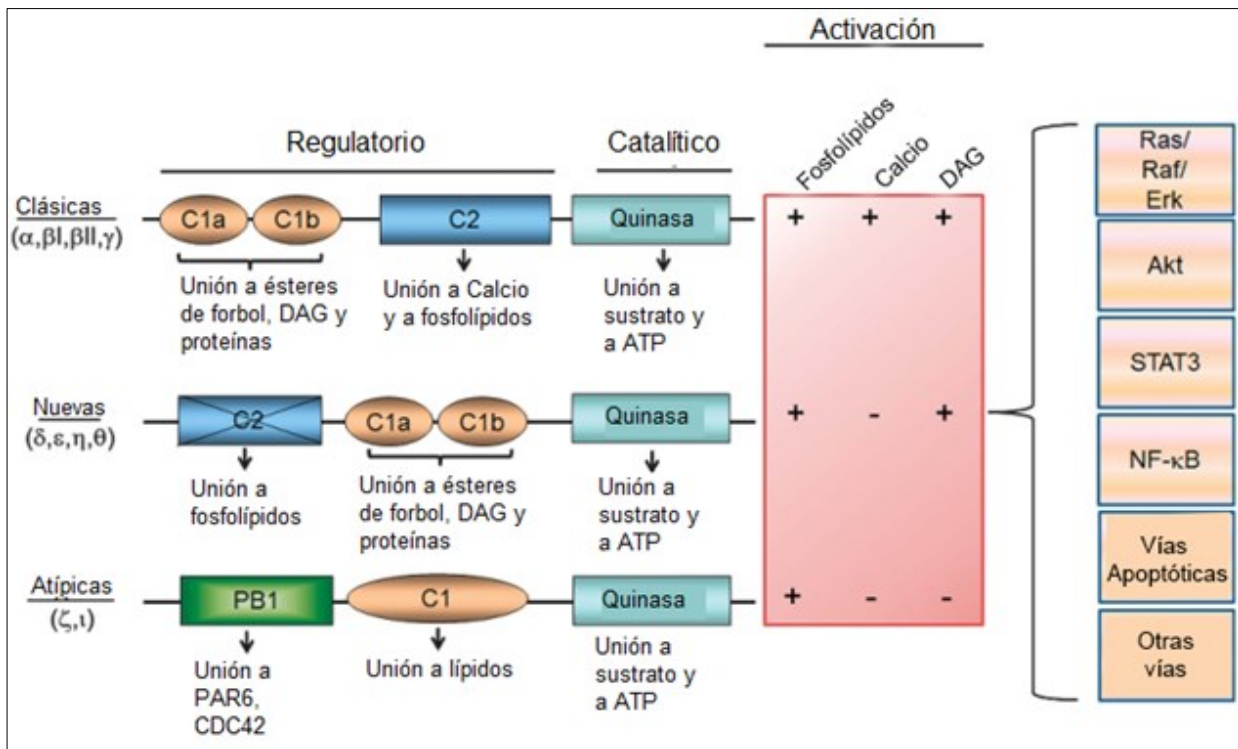


Figura 8: Estructura génica y dependencia a cofactores de las isoformas de PKC (Garg *et al.*, 2014). PAR6: proteína de partición defectuosa 6, del inglés *PARtitioning-defective protein 6*. CDC42: proteína homóloga del control de la división celular 42, del inglés *Cell Division Control protein 42 homolog*. ATP: adenosín trifosfato, del inglés *Adenosine TriPhosphate*. RAS: sarcoma de rata, del inglés *Rat Sarcoma*. RAF: fibrosarcoma rápidamente acelerado, del inglés *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*. Erk: quinasa regulada por señal extracelular, del inglés *Extracellular signal Regulated Kinase*. Akt: timoma de la sepa murina AKR, del inglés *AKR mouse strain Thymoma*. STAT3: transductor de señales y activador de la transcripción 3, del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*.

Estructuralmente, todas las PKC poseen 4 dominios conservados (C1-4) separados por 5 segmentos variables (V1-5). El extremo C-terminal se caracteriza por presentar el sitio de unión a adenosín trifosfato (ATP, del inglés *Adenosine TriPhosphate*) y el dominio catalítico, y representa el área de mayor homología entre las isoformas de las tres subfamilias (Cooke *et al.*, 2017). El segmento V3 actúa como bisagra y separa al C-terminal del N-terminal, que

consiste en dos dominios regulatorios (C1 y C2) responsables de la translocación a la membrana plasmática (Newton, 1995) y una secuencia peptídica que actúa como pseudosustrato (Ps) (House y Kemp, 1987). El Ps se mantiene unido al sitio catalítico impidiendo la interacción con sustratos cuando PKC no se encuentra activada.

Los dominios regulatorios son los sitios de mayor variabilidad entre las subfamilias de PKC. Estos son: el dominio de respuesta a DAG/EF o dominio C1, y el dominio de respuesta a Ca^{2+} y fosfolípidos o dominio C2. Las cPKC poseen dos dominios C1 (a y b) en el extremo N-terminal y un dominio C2 río debajo de estos. Por otra parte, las nPKC tienen estos dominios invertidos, siendo el C2 el que se encuentra en el extremo N-terminal. A diferencia de las cPKC, el C2 de las isoformas nuevas es incapaz de unir a Ca^{2+} . Por este motivo, la translocación de las nPKC a la membrana plasmática es independiente de Ca^{2+} . La translocación sin la interacción del C2 es posible debido a una afinidad del C1 dos veces mayor en las nPKC frente a las cPKC. Por último, las aPKC poseen un C1 truncado incapaz de unir a DAG o EF, y carecen de C2. Dicho C1 interactúa con fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃, del inglés *Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*) y ceramida (Newton, 1995).

2.4.2 Activación de PKC

La activación de PKC se encuentra regulada en tres niveles: la unión a cofactores, el estado de fosforilación y la localización celular (Newton, 2001). En primer lugar, todas las PKC deben pasar por una serie de fosforilaciones para llegar a una conformación madura. Estas fosforilaciones llevan a cambios conformacionales que terminan en la estabilización de la proteína. Una vez madura, PKC inactiva se encuentra en el citosol hasta que un estímulo lleva a su activación y translocación a la membrana plasmática (Newton, 2003).

La activación de las c- y nPKC suele iniciarse por la unión de un ligando extracelular a un receptor acoplado a proteína G o receptor tirosina-quinasa que produce la activación de PLC (Fig.9). Luego, PLC hidroliza fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PIP₂, del inglés *Phosphatidylinositol 4,5-Diphosphate*) resultando en dos productos. Por un lado, la hidrólisis de PIP₂ produce DAG, que promueve la translocación de PKC a la membrana plasmática. Por el otro, produce IP₃ que migra a través del citosol hasta llegar al retículo endoplasmático donde produce la liberación de Ca^{2+} . Este proceso aumenta los niveles de Ca^{2+} en el citosol,

permitiendo la activación de las cPKC (Griner y Kazanietz, 2007). Dado que las aPKC carecen de los dominios necesarios para interactuar con DAG y Ca^{2+} , su activación ocurre a través de mecanismos diferentes a los mencionados (Moscat *et al.*, 2006; Newton, 2003).

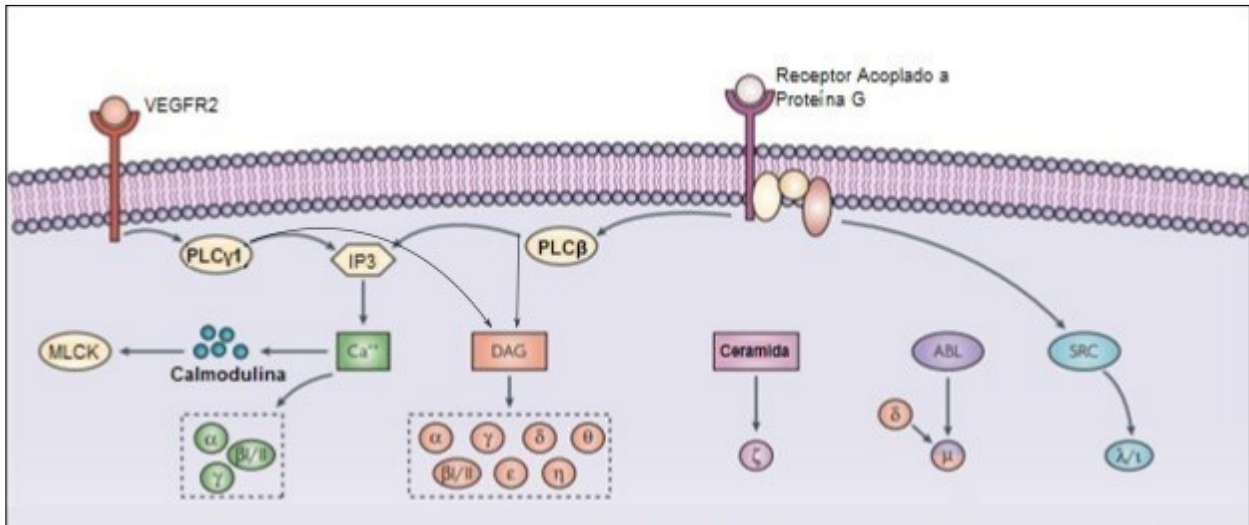


Figura 9: Activación de las diferentes isoformas de PKC (Mackay y Twelves, 2007). VEGFR2: receptor 2 de VEGFR, del inglés *VEGF Receptor 2*. MLCK: quinasa de la cadena ligera de la miosina, del inglés *Myosin Light Chain Kinase*. ABL: leucemia murina de Abelson, del inglés *Abelson Murine Leukemia*. SRC: SaRComa. μ : proteína quinasa $C\mu$.

2.4.3 PKC y cáncer

Como fue mencionado anteriormente, el estudio de PKC en el cáncer se remonta a su descubrimiento como receptor principal de los EF y se encuentra motivado en gran parte por la participación de las distintas isoformas en vías de señalización promotoras o supresoras de cáncer.

Los primeros estudios de PKC en cáncer se realizaron mediante el uso de un agente carcinogénico en concentraciones insuficientes para causar tumores, seguido de la aplicación repetida de un EF, comúnmente 12-miristato 13-acetato (PMA, del inglés *Phorbol Myristate Ester*), sobre la piel de ratones. Esto llevó a lo que se conoce como el modelo de las 2 etapas (Fig. 10) (Griner y Kazanietz, 2007). Este experimento resulta en la formación de un tumor incluso si la aplicación del EF se retrasa un año. Posteriormente, se confirmó la participación de las isoformas de PKC en procesos mitogénicos, de supervivencia y transformación a través

del uso de modelos celulares tanto normales como tumorales (Isakov, 2018). Sin embargo, también se desarrollaron estudios que reportaron un comportamiento opuesto de los EF en algunos contextos (Huberman y Callahan, 1979; Watanabe *et al.*, 1992).

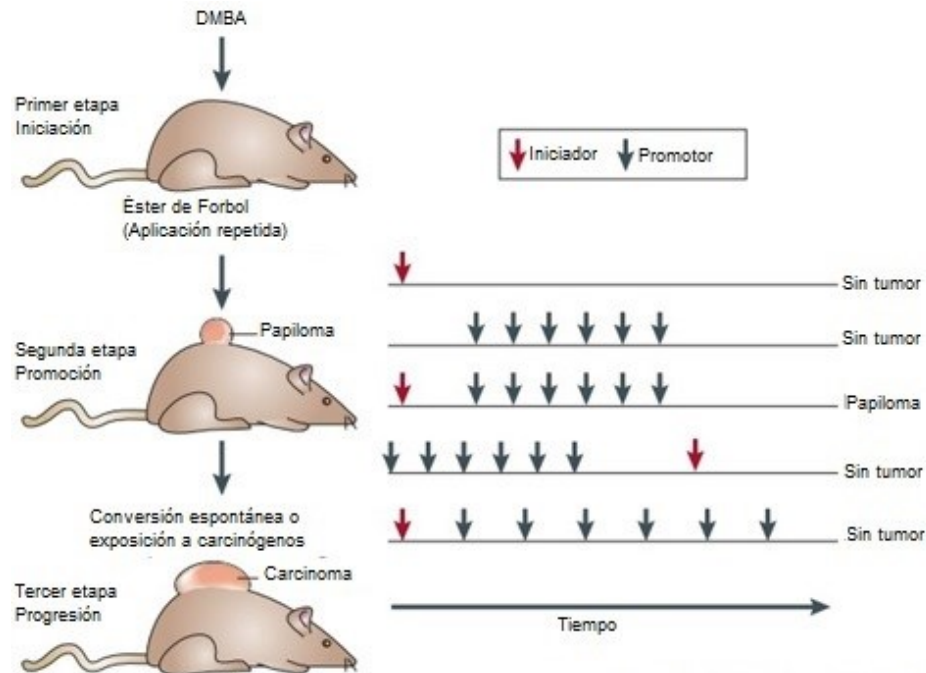


Figura 10: modelo de las 2 etapas, estudios tempranos de PKC en cáncer (Griner y Kazanietz, 2007). DMBA: 7,12-DiMetilBenzo[a]Antraceno.

El estudio de las PKC en cáncer presenta algunas dificultades. En primer lugar, PKC tiene un comportamiento específico determinado por la isoforma y el tipo celular particulares. En segundo lugar, la alta homología entre las distintas isoformas, especialmente en la región catalítica, hace que el desarrollo de fármacos isoforma-específicos sea un desafío extremadamente complejo (Cooke *et al.*, 2017). En 1993, se demostró por primera vez que la actividad basal de PLC era mayor en neoplasias tiroideas al comparar con muestras de tejido sano del mismo paciente (Kobayashi *et al.*, 1993). Por ejemplo, PKC ϵ suele tener un comportamiento antiapoptótico, proliferativo y está involucrado en migración e invasión (Bae *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2006). Así, una de las alteraciones más comunes es la sobreexpresión de PKC ϵ en distintos tipos de cánceres epiteliales incluyendo próstata, pulmón, mama, colon y tiroides (Gorin & Pan, 2009; Griner & Kazanietz, 2007; Jaken, 1996; Mochly-Rosen & Gordon, 1998; Newton, 1997; Totoñ *et al.*, 2011), que está asociada a un fenotipo agresivo

sugiriendo que su inhibición podría resultar en una estrategia efectiva contra estos tipos de cáncer. Por ejemplo, su inhibición con el micro-RNA miR146a disminuye la supervivencia y aumenta la apoptosis en células de cáncer de tiroides papilar (PTC, del inglés *Papillary Thyroid Cancer*) (Zhang *et al.*, 2014). En línea con estos efectos, la inhibición de PKC ϵ con el péptido ϵ V1-2 afecta la capacidad de migración e invasión de células de cáncer de pulmón, y disminuye su diseminación en un modelo murino de metástasis (Budás *et al.*, 2007; Caino *et al.*, 2012). Por el contrario, PKC δ generalmente se comporta como supresor tumoral (Okhrimenko *et al.*, 2005; Symonds *et al.*, 2011) y ha sido caracterizado como proapoptótico y antiproliferativo, ya que media procesos de muerte inducidos por agentes quimioterapéuticos y radioterapia. Generalmente, su expresión es predictor de buen pronóstico y su activación contribuye al arresto del crecimiento en G1 en PTC (Koike *et al.*, 2006) y también tiene efectos antiproliferativos en cáncer de tiroides anaplásico (ATC, del inglés *Anaplastic Thyroid Cancer*) y folicular (FTC, del inglés *Follicular Thyroid Cancer*) señalizando a través de la vía de las quinasas activadas por mitógeno (MAPK, del inglés *Mitogen Activated Protein Kinases*)/timoma de la sepa murina AKR (AKT, del inglés *AKR mouse strain Thymoma*) y *Forkhead box protein O* (FOXO) en cáncer de tiroides (Afrasiabi *et al.*, 2008). Como se mencionó anteriormente, se conocen dos variantes de PKC β , teniendo ambas un rol orientado a la angiogénesis y proliferación en diversos tipos de cáncer, como colon y próstata (Teicher *et al.*, 2002; Gökmen-Polar *et al.*, 2001). El tratamiento con ácido ribonucleico (ARN) de interferencia contra PKC β 1 es capaz de inhibir la fosforilación de ERK1/2 ocasionada por agonistas del receptor de la esfingosina 1-fosfato (S1P1, del inglés *Sphingosine-1-Phosphate receptor 1*) y VEGF en células de FTC (Bergelin *et al.*, 2010). Coincidentemente con este trabajo, el tratamiento con Enzastaurina, un inhibidor específico para PKC β , muestra efectos antitumorales *in vitro* en cáncer de tiroides (Oberschmidt *et al.*, 2005). Se encontraron resultados similares en cáncer de colon y glioblastoma (Graff *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha observado que PKC ζ participa en la proliferación independiente de TSH a través de los fragmentos de 42 y 44kDa de MAPK (p42-p44 MAPK) sin afectar la expresión de Tg en células de cáncer de tiroides (Fernandez *et al.*, 2000) a su vez, PKC ζ participa en la proliferación de células de cáncer de próstata independiente de andrógenos (Stangelberger *et al.*, 2005). Y, como se mencionó más arriba, en nuestro laboratorio identificamos la

participación de PKC ζ en la proliferación ocasionada por la unión de HTs al mTR en linfoma de células T a través de la activación de ERK (Barreiro Arcos *et al.*, 2011).

2.4.3.1 PKC α y cáncer

A diferencia de otras isoformas de PKC que poseen una expresión restringida a ciertos tejidos, PKC α se expresa de forma ubicua en el organismo. Por este motivo, se han realizado estudios en una gran cantidad de tejidos en los que se ha visto que PKC α posee un comportamiento dependiente del tipo celular (Singh *et al.*, 2017). En células de cáncer de mama, la expresión de PKC α correlaciona negativamente con la expresión del receptor de estrógeno (ER, del inglés *Estrogen Receptor*) y el receptor de progesterona (PR, del inglés *Progesterone Receptor*) y es predictor de mal pronóstico del tratamiento con tamoxifeno (Assender *et al.*, 2007; Tonetti *et al.*, 2003). PKC α es también un efector del receptor B2 eritroblástico (ErbB2, del inglés *ERythroBlastic receptor B2*), y dicha sobreexpresión correlaciona con altos niveles de activación de PKC α en muestras de pacientes con cáncer de mama (Magnifico *et al.*, 2007). Más aún, se encontró una alta expresión de PKC α en pacientes con tumores triple negativos (Tan *et al.*, 2006). Por lo tanto, PKC α fue propuesto como biomarcador de mal pronóstico y resistencia a la terapia en pacientes con cáncer de mama. También se encontró que la sobreexpresión de PKC α en tumores de pacientes con melanoma y glioma está asociada a menor supervivencia (Mahapatra *et al.*, 2019; Mandil *et al.*, 2001). En cáncer de pulmón, PKC α participa en la resistencia a drogas, motivo por el cual fue propuesta como biomarcador de resistencia y mal pronóstico (Kang *et al.*, 2013; Abera y Kazanietz, 2015; Kang *et al.*, 2009). Si bien se han observado efectos supresores de tumores de PKC α , estos comprenden una fracción reducida de los casos. Este comportamiento se demostró en cáncer de próstata, de intestino y de páncreas (Truman *et al.*, 2009; Detjen *et al.*, 2000; Hizli *et al.*, 2006).

Los efectos descritos de la sobreexpresión de PKC α suelen apuntar a un fenotipo resistente a drogas quimioterapéuticas, invasivo, y promotor de la supervivencia (Michie y Nakagawa, 2005). En la misma línea, se ha reportado una activación paralela de PKC α en la resistencia a inhibidores del homólogo B de fibrosarcoma rápidamente acelerado (BRAF, del inglés *B-*

homolog of Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) mutado en melanoma (Chen *et al.*, 2014; Parker *et al.*, 2015).

En cuanto a tratamientos contra PKC α , fueron desarrollados distintos compuestos contra esta isoforma. Si bien varias tecnologías fueron probadas para diferentes patologías, los oligonucleótidos *antisense* han sido ampliamente evaluados en el caso de terapias dirigidas en cáncer. Se realizaron ensayos clínicos con Aprinocarsen, un oligonucleótido fosforotioato de 20 bases que tiene como blanco a PKC α , en diversos tipos de cáncer como mama, pulmón, glioma y melanoma, entre otros (Advani *et al.*, 2005; 2004; Grossman *et al.*, 2005). Sin embargo, el uso de esta droga fue limitado debido a su bajo beneficio clínico, en parte debido a los efectos tóxicos de las concentraciones efectivas como agente único (Mochly-Rosen *et al.*, 2012). Por otra parte, se han observado resultados favorables en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, del inglés *Non-Small Cell Lung Cancer*) al combinarse al antisense LY900003 con Cisplatino o Gemcitabina (Villalona-Calero *et al.*, 2004). Sin embargo, en ensayos de fase III, se encontró que LY900003 no aportó grandes beneficios a los regímenes quimioterapéuticos (Teicher, 2006). Aun así, se debe tener en cuenta que, debido a la ausencia de biomarcadores predictivos validados para la respuesta a drogas durante estos ensayos, no fue posible evaluar si existía un grupo de la población que se beneficiara especialmente del tratamiento (Mackay y Twelves, 2007). Además, es importante tomar en cuenta el rol de las isoformas estudiadas en cada tipo tumoral. Varios estudios apuntan a que PKC α no posee un rol *driver* en la proliferación de NSCLC (Clark *et al.*, 2003), siendo esto crucial a la hora de evaluar los resultados mencionados previamente (Mackay y Twelves, 2007). Por otra parte, es importante destacar que no han sido desarrollados ensayos clínicos evaluando el efecto de la inhibición de PKC α en cáncer de tiroides en particular, por lo que, de demostrarse su participación en etiopatogenia de esta neoplasia, una terapia contra esta proteína podría dar buenos resultados. A su vez, la combinación de dicho enfoque con otros agentes permitiría el uso de dosis efectivas más bajas disminuyendo así su potencial toxicidad. Si bien se han realizado algunos estudios sobre PKC α en cáncer de tiroides apuntando a efectos proliferativos (Bergelin *et al.*, 2010), los mecanismos por los cuales esta isoforma actúa particularmente en el tejido tiroideo permanecen poco estudiados.

2.5 Cáncer de tiroides

El cáncer de tiroides es la neoplasia endócrina más frecuente, y representa el 3,4% de todos los cánceres diagnosticados a nivel mundial anualmente (Cao *et al.*, 2021). La incidencia de esta enfermedad ha ido en aumento en las últimas décadas tanto en Argentina como en el resto del mundo (Seib y Sosa, 2019). En un principio, se creyó que esto se debía al refinamiento de las metodologías usadas para el diagnóstico, como la citología por punción aspirativa con aguja fina o el uso de ecografías de alta resolución pero se estima que la causa puede estar asociada a los cambios del estilo de vida del ser humano a lo largo del tiempo (Pellegriti *et al.*, 2013). Un ejemplo de estos cambios es la obesidad, que constituye uno de los factores de riesgo para esta patología (Han *et al.*, 2013).

Actualmente, el cáncer de tiroides puede ser categorizado según las células que lo originan, pudiendo partir de las células foliculares o bien de las parafoliculares. En el primer caso, se puede agrupar a los tumores en: papilares (PTC, del inglés *Papillary Thyroid Cancer*), foliculares (FTC, del inglés *Follicular Thyroid Cancer*) y anaplásicos (ATC, del inglés *Anaplastic Thyroid Cancer*), mientras que en el segundo encontramos a los tumores medulares (MTC, del inglés *Medullary Thyroid Cancer*). Los llamados tumores bien diferenciados (PTC y FTC) comprenden más del 90% de los cánceres de tiroides y suelen tener buen pronóstico cuando el diagnóstico es temprano (Asa, 2019). Por otra parte, los carcinomas menos diferenciados son más agresivos, resultando el ATC en una esperanza de vida media de 6 meses desde el diagnóstico (Pinto-Valdivia *et al.*, 2012).

A nivel molecular, se consideran principales en el desarrollo y proliferación tumoral, así como en la desdiferenciación, las vías de las MAPK y de la PI3K/AKT. Por un lado, la vía de las MAPK sería crucial en la iniciación del PTC a través de las mutaciones de BRAF y de sarcoma de rata (RAS, del inglés *RAt Sarcoma*) o los rearrreglos del gen rearrreglado durante transfección (RET, del inglés *REarranged during Transfection*) (RET/PTC), mientras que la activación de la vía PI3K/AKT es crítica en la iniciación del FTC, mediante la mutación de RAS, la subunidad catalítica alfa de fosfatidil inositol 4,5-bifosfato 3-quinasa (PIK3CA, del inglés *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase, Catalytic subunit Alpha*) y AKT1, y también la inactivación del homólogo a fosfatasa y tensina (PTEN, del inglés *Phosphatase and TENsin homolog*), que regula negativamente esta vía (Prete *et al.*, 2020). En los carcinomas

menos diferenciados, se observa una acumulación de estas mutaciones, así como la presencia de otras, siendo características de los ATC la mutación del antígeno tumoral p53 (p53) y telomerasa transcriptasa reversa (TERT, del inglés *TElomerase Reverse Transcriptase*) (Pozdeyev *et al.*, 2018; Landa *et al.*, 2016). Es por este motivo que la mayoría de las drogas desarrolladas para terapias dirigidas y evaluadas para el tratamiento del cáncer de tiroides tienen como blanco a uno o varios intermediarios de las vías mencionadas.

El tratamiento de primera línea para esta enfermedad consiste en la tiroidectomía parcial o total, seguida de la ablación con ^{131}I , que tiene el objetivo de eliminar el tejido tiroideo residual después de la cirugía, incluyendo potenciales células tumorales remanentes (Haugen *et al.*, 2016; Momesso y Tuttle, 2014). Sin embargo, estos enfoques no suelen ser suficientes para los tumores menos diferenciados y aquellos de estadios más avanzados, cuyas células pierden frecuentemente la capacidad de captar yodo debido a la dediferenciación. Por este motivo, se encuentran en desarrollo alternativas a las terapias convencionales. El uso de drogas quimioterapéuticas es una alternativa que ha demostrado cierta eficacia, si bien con una alta toxicidad. El tratamiento con doxorubicina produce remisión parcial en algunos pacientes de ATC (Cabanillas *et al.*, 2019), siendo sugerido el uso de terapias que combinen la quimioterapia junto con radioterapia externa para una mayor eficacia (Haigh *et al.*, 2001; Cabanillas *et al.*, 2019). Por otra parte, en las últimas décadas se han desarrollado ensayos clínicos para el uso de inhibidores de tirosina-quinasa (TKI, del inglés *Tyrosine Kinase Inhibitor*), como es el caso de los inhibidores dabrafenib y trametinib, cuyo blanco es BRAF^{V600E}, o el inhibidor multi-quinasa sorafenib, que han sido aprobados para el tratamiento de cáncer de tiroides refractario a terapias con ^{131}I (Subbiah *et al.*, 2018; Brose *et al.*, 2014).

Si bien el avance de la biotecnología permitió incorporar tratamientos que disminuyen el uso de la radioterapia (Luster *et al.*, 2005), es necesario encontrar terapias que contribuyan a mejorar la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes, o bien optimizar las terapias existentes para disminuir sus efectos adversos. A pesar de su creciente incidencia y mortalidad en muchos casos, el cáncer de tiroides constituye un área muy poco estudiada en nuestro país.

3 Hipótesis

Teniendo en cuenta lo mencionado previamente, la hipótesis de este trabajo es que PKC α regula vías de transducción involucradas en el control de la proliferación del cáncer tiroideo a través del receptor de la hormona TSH y de los receptores de hormonas tiroideas. Por lo tanto, una terapia dirigida a disminuir la expresión de PKC α o su actividad biológica podría contribuir a la remisión de la patología tumoral.

4 Metodología

4.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizaron las líneas celulares humanas de tiroides listadas en la Tabla I. Las Nthy-ori 3-1 (ORI) y las WRO fueron gentilmente donadas por el Dr. Guillermo Juvenal (Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina). El resto de las líneas fueron gentilmente donadas por la Dra. Judy Meinkoth (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA) fueron seleccionadas a modo de estudiar las variaciones entre diferentes tipos de cáncer de tiroides. Las células fueron cultivadas en condiciones óptimas para su crecimiento en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich), 2mM de Glutamina y antibióticos penicilina y streptomycin (Gibco), y mantenidas a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂. Previo llegar a confluencia, las células fueron repicadas con tripsina-Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, del inglés *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*) 0,25% (Sigma-Aldrich Co).

Tabla I – Líneas celulares humanas de tiroides utilizadas en los ensayos realizados para el presente PFI.

Línea celular	Descripción
Nthy-ori 3-1	Células tiroideas foliculares humanas inmortalizadas no tumorales
TAD-2	Células tiroideas fetales humanas inmortalizadas no tumorales
BCPAP	Células de carcinoma tiroideo indiferenciado (anaplásico) (PTC)
8505C	Células de carcinoma tiroideo indiferenciado (anaplásico, ATC)
Hth83	Células de carcinoma tiroideo indiferenciado (ATC)
Hth104	Células de carcinoma tiroideo indiferenciado (ATC)
TPC-1	Células de carcinoma papilar tiroideo (PTC)
WRO	Células de carcinoma tiroideo folicular (FTC)

Las líneas celulares fueron mantenidas en placas de 100mm o en microplacas de 6 o 96 pocillos para la realización de los distintos ensayos.

Previo al tratamiento de las células en cada experimento, se las sincronizó cultivándolas de 24 a 48 h en medio RPMI sin suplementar con SFB.

4.2 Hormonas e inhibidores

Las células fueron tratadas a distintos tiempos con concentraciones fisiológicas de hormonas tiroideas (HTs) ($T_3= 1\text{nM}$; $T_4= 100\text{ nM}$, Sigma Aldrich Co) o con 10 mIU/ml de la hormona estimulante de la tiroides bovina (bTSH, Sigma-Aldrich Co).

En los casos indicados, se utilizaron los siguientes inhibidores adicionados entre los 30 y 60 min previos a la estimulación hormonal. Los inhibidores de la proteína quinasa C (PKC, del inglés *Protein Kinase C*) Staurosporina (Sigma Aldrich Co) y GF109203X (Bisindolylmaleimide, Tocris Bioscience) y el inhibidor de la integrina $\alpha\beta_3$ Cilengitide (MedKoo) fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). Todas las drogas fueron diluidas en RPMI al menos 1:1000 para alcanzar las concentraciones indicadas en la sección Resultados.

4.3 Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular fue medida con un ensayo fluorométrico de reducción de la resazurina (Cell Titer Blue, Promega), como se describió previamente (Chen *et al.*, 2018). Brevemente, se sembraron 4×10^4 células en un volumen final de 0,1 ml en placas de 96 pocillos de fondo plano y se las trataron o no por 24 o 48 h, como se detalla en la sección resultados.

Se determinó la fluorescencia (560Ex/590Em) utilizando el Novostar Microplate Reader (BMG Labtech). El porcentaje de viabilidad celular fue calculado utilizando el método de los cuadrados mínimos de la curva estándar. Se determinó la fluorescencia a partir de 6 réplicas por cada tratamiento y se normalizaron los valores obtenidos con respecto a los controles correspondientes.

4.4 Extracción de ARN

El ácido ribonucleico (ARN) total fue extraído de las células utilizadas utilizando Tri-Reagent (Genbiotech SRL) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células provenientes de distintas líneas o tratamientos fueron homogeneizadas en 1ml de reactivo Tri-Reagent a temperatura ambiente para su posterior separación en fase orgánica y acuosa por adición de cloroformo y posterior centrifugación. Dado que el ARN permanece en la fase acuosa, se descartó la fase orgánica. Luego, mediante la adición de isopropanol el ARN fue

precipitado, luego lavado con etanol al 70% y resuspendido en agua libre de enzimas degradantes de ARN. Las suspensiones de ARN fueron guardadas a -80°C .

La concentración de ARN de las soluciones obtenidas fue medida por espectrometría a 260nm con un equipo NanoDrop (ThermoFisher). Para determinar la pureza, se midió el cociente entre las absorbancias a 260/280nm.

4.5 Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscripta (rtPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa retrotranscripta (rtPCR, del inglés *reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction*) fue realizada utilizando el kit EasyScript RT (AP-Biotech) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadió $2\mu\text{g}$ de ARN a una mezcla que posee $0,6\mu\text{l}$ de oligo dT, $1\mu\text{l}$ de dNTPs 1mM , $0,5\mu\text{l}$ de EasyScript Transcriptasa reversa M-MLV y $4\mu\text{l}$ de RT Buffer 5X provisto en el kit, mezcla cuyo volumen final junto con la muestra fue de $20\mu\text{l}$. La mezcla fue incubada por 30 min a 42°C en equipo Applied Biosystems 7500. De esta forma se obtuvo el ácido desoxiribonucleico copia (ADNc) que fue congelado a -20°C hasta su cuantificación por PCR cuantitativa (qPCR, del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*).

4.6 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, cuantitativa (qPCR)

A partir del ADNc obtenido en la rtPCR, se realizaron las amplificaciones por qPCR. La cuantificación se determinó utilizando la mezcla maestra comercial que contiene el colorante fluorescente SYBR Green. Ésta contiene todos los componentes necesarios para que la reacción sea llevada a cabo: ADN Polimerasa, colorante fluorescente SYBR Green, Cloruro de Magnesio (MgCl_2), dNTPs y el colorante de referencia ROX y estabilizadores. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un equipo Applied Biosystems 7500. Las secuencias de los primers (Biodynamics SRL) se diseñaron utilizando el software Primer Express versión 3.0 (Applied Biosystems) y fueron localizados preferentemente en uniones exón-exón o dos exones que tuvieran un intrón entre medio para evitar que se transcriba el ADN genómico y diseñados de manera que los amplicones tuvieran 50-200 pb de longitud. Las secuencias de los *primers* utilizados para la misma se especifican en la Tabla II.

La cuantificación de la expresión de los genes evaluados se realizó utilizando el método del umbral de ciclo comparativo (Ct, del inglés *Cycle Threshold*). La detección directa de los productos de PCR se monitoreó midiendo el aumento de la fluorescencia resultante de la unión del colorante al ADN doble cadena.

Tabla II – Secuencias de primers utilizados para qPCR.

Gen	Secuencia (5' → 3')	
PRKCA	AAAGGCTGAGGTTGCTGATG	F
	ATTTAGTGTGGAGCGGATGG	R
PRKCD	CAACTACATGAGCCCCACCT	F
	GGCATTATGGTGCACATTC	R
PRKCE	GTCCCTACCTTCTGCGATCA	F
	TCACATCGACGGTGAACATT	R
PRKCZ	CCAAGAGCCTCCAGTAGACG	F
	CCATCCATCCCATCGATAAC	R
TSHR	CTGCTAACCAGCCACTACAA	F
	GGTCTACAGAGGCAATGAGAAG	R
Sub-unidad αv	AAGTGCCATAGCTCCATTGGGAGA	F
	TCGAGGATTTGAGATGGCACCGAA	R
Sub-unidad $\beta 3$	TTCAATGCCACCTGCCTCAACAAC	F
	ACGCACCTTGGCCTCGATACTAAA	R
$\beta 2$ -microglobulina	AGATGAGTATGCCGTCCGTGTGAA	F
	TGCTGCTTACATGTCTCGATCCCA	R

El gen de referencia ($\beta 2$ -microglobulina) fue utilizado como control interno de normalización de los datos de todas las muestras analizadas. Para calcular las diferencias en la expresión de los genes estudiados entre tratamientos, se utilizó el método de $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001). El programa de amplificación utilizado se detalla en la tabla III.

Tabla III – Programa de amplificación utilizado en los ensayos de qPCR.

Programa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Holding	95°C	5 min	1
Cycling	95°C	10 seg	40
	60°C	15 seg	
	72°C	30 seg	
Melting	95°C	15 seg	1
	60°C	1 min	
	95°C	30 seg	
	60°C	15 segundos	

4.7 Obtención de extractos protéicos totales

Las células tratadas como se indica en cada experimento se recolectaron de las placas de cultivo utilizando un *scraper* y se homogeneizaron en presencia del buffer de extracción (Tris-HCl 50 mM [pH: 7.4], NaCl 150 mM, EDTA 1 M, EGTA 1 mM, glicerol 10% v/v, NP-40 1% v/v, MgCl₂ 1 mM, SDS, 0.1% v/v, e inhibidores de proteasas (*protease inhibitor cocktail*, Sigma-Aldrich) y fosfatasa (*phosphatase inhibitor cocktail Phosphostop*, Roche). El lisado celular se completó mediante ruptura física con una jeringa 25G (Terumo) en frío. El homogenato celular se centrifugó a 12000 g a 4°C durante 25 min y se descartó el *pellet*.

4.8 Ensayos de Western Blot

Los extractos proteicos se corrieron en geles de poliacrilamida desnaturalizante con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). El extracto proteico (50 µg de proteínas) se diluyó en buffer de siembra 3x (Tris-HCl 60 mM [pH: 6.8], SDS 2% p/v, glicerol 10% v/v, 0.7 M 2-Mercaptoetanol y azul de bromofenol 0,1% p/v) y se hirvió durante 5 min. Las muestras se corrieron en geles de 7.5-15% acrilamida-bisacrilamida según el peso molecular de la proteína a revelar. El Precision Plus Protein[™] Standards Dual Color (Bio-Rad) fue utilizado como marcador de peso molecular. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.2 µm, Santa Cruz Biotechnology) y se bloquearon con 5% de leche descremada en PBS-Tween 20 (buffer fosfato salino-Polioxietilen) 0.1% v/v durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios se detallan en la Tabla IV diluidos en 5% p/v (Albúmina Sérica Bovina fracción V, Sigma-Aldrich Co.) en PBS-Tween 20 0.1% v/v durante O.N. a 4°C con agitación.

Se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-Tween 0,1% y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o ratón conjugados a peroxidasa (HRP) (Bio-Rad) diluido 1/2000 en 5% leche descremada en PBS-Tween 20 0.1% v/v durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

El revelado se realizó con el reactivo de quimioluminiscencia ECL documentador de geles ImageQuant (GE). Los análisis densitométricos fueron realizados utilizando el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Tabla IV – Anticuerpos primarios utilizados en ensayos de Western blot.

Anticuerpo	Fabricante	Dilución
PKCα (H-7)	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
PKCβ2	Gibco	1/500
PKCγ	Gibco	1/500
PKCδ	Cell Signaling Technology	1/500
PKCϵ (C-15)	Santa Cruz Biotechnology	1/500
PKCζ	Gibco	1/500
TR$\alpha$$\beta$ (FL-408)	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
β-actina (N-21)	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
Phospho-p44/42 MAPK(Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology	1/1000
Phospho AKT S473	Cell Signaling Technology	1/1000
PCNA (F-2)	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
Caspasa-3 (8G10)	Cell Signaling Technology	1/500
β-tubulina (F-1)	Santa Cruz Biotechnology	1/1000

4.9 Transfecciones con ARN de interferencia (siRNA)

Para cada experimento, fueron transfectadas 300.000 células con 25nM ARN de interferencia (siRNA, *short interfering RNA*) (ONTARGETplus SMART pool, THERMO SCIENTIFIC) específico para PKC α o inespecífico, utilizando el reactivo RNAi Max Lipofectamine (Life Technologies) en medio libre de suero. Luego de 1 hora, el medio fue suplementado con 10% SFB y 16 h más tarde, las células pasaron por un hambreado de 48 h en medio libre de suero, seguido de los tratamientos correspondientes para cada ensayo.

4.10 Citometría de flujo

Se plaquearon células sub-confluentes en placas de 6 pocillos y se cultivaron por 24 h como se indica en la sección Resultados. Las células fueron despegadas con EDTA 10mM en PBS, lavadas con PBS y centrifugadas. Los pellets fueron fijados en formalina al 4%. Luego 6×10^6 de células se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante 1 hora a 37°C (Tabla V).

Luego de la incubación con el anticuerpo primario, se realizó un lavado con PBS seguido de una centrifugación de 5 min a 400g y se procedió a incubar con los anticuerpos secundarios (Tabla V) durante 30 min en oscuridad. Luego de la incubación con el anticuerpo secundario, se realizó otro lavado con PBS seguido por centrifugación. Las células fueron resuspendidas

en buffer de citometría (SFB al 1% y azida al 0,02% en PBS). Posteriormente, se procedió a analizar las suspensiones con el equipo el Accuri (BD Biosciences). El análisis de los datos obtenidos se realizó utilizando el programa Accury C6 software (BD Biosciences). Se construyeron los histogramas o *dot plots* correspondientes y se calcularon los porcentajes de cada subpoblación. Para determinar las marcas inespecíficas se usaron los correspondientes controles de isotipo, que nunca superaron el 1%.

Tabla V – Anticuerpos primarios y secundarios y sus concentraciones utilizados en ensayos de citometría de flujo.

Anticuerpo	Fabricante	Dilución
Integrina $\alpha\beta 3$ (Ab7166)	Abcam	1/100
TRα/β (sc-772)	Santa Cruz Biotechnology	1/50
PE Goat Anti-Mouse Ig (#550589)	BD Biosciences	1/200
FITC Goat Anti-Rabbit IgG (#554020)	BD Biosciences	1/200

4.11 Análisis estadístico

Para todos los experimentos se calcularon las medias, desviaciones estándares y errores estándares de los grupos. Las significancias estadísticas se evaluaron con el software GraphPad PRISM 7.0 Versión para Windows (GraphPad Software Inc.), utilizando la prueba estadística ANOVA de una vía seguido con contraste de Tukey. Las diferencias entre las medias fueron consideradas significativas cuando $p \leq 0.05$. Los resultados están expresados como la media \pm error estándar (SEM).

5 Resultados

5.1 PKC α está sobre expresada en células de cáncer de tiroides

El cambio del patrón de expresión de las isoformas de la proteína quinasa C (PKC, del inglés *Protein Kinase C*) ha sido asociado al desarrollo de distintos tipos de cáncer (Garg *et al.*, 2014). Los miembros de la familia PKC participan en un amplio espectro de respuestas celulares y tienen un comportamiento variable en distintos tejidos dependiendo de la isoenzima y el contexto celular (Cooke *et al.*, 2017). Ciertas isoformas de la familia PKC han sido estudiadas previamente en cáncer de tiroides; se describió a PKC ζ y PKC ϵ como agentes promotores de la proliferación celular en esta patología (Fernandez *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2014), mientras que a PKC δ , como inhibidor del crecimiento, promoviendo el arresto del ciclo celular (Afrasiabi *et al.*, 2008). Como mencionamos previamente en los antecedentes, altos niveles de PKC α se correlacionan con un mal pronóstico en cáncer de mama (Llorens *et al.*, 2019), de pulmón (Abera y Kazanietz, 2015), melanoma (Chen *et al.*, 2014) y glioma (Mandil *et al.*, 2001). Se han realizado también, algunos estudios de PKC α en cáncer de tiroides apuntando a efectos proliferativos (Bergelin *et al.*, 2010), sin embargo, los mecanismos por los cuales esta isoforma actúa y particularmente en el tejido tiroideo permanecen poco estudiados.

En primer lugar, evaluamos el nivel de expresión de diversas PKC comparando entre líneas inmortalizadas no tumorales y de cáncer de tiroides. Como se puede ver en la Figura 11, la expresión de PKC α , PKC ϵ y PKC ζ se encuentra aumentada en las líneas de cáncer de tiroides a nivel de proteína estudiado por Western blot (Fig. 11A, 11B y 11C). En el mismo sentido, se observan resultados similares en cuanto a los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) estudiados por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR, del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*) (Fig. 11D). Se puede observar una expresión alta de PKC α particularmente en las líneas 8505C y Hth108 de cáncer de tiroides anaplásico, y TPC-1 y WRO de cáncer de tiroides papilar y folicular, respectivamente.

Dado que PKC α podría tener un rol importante en la proliferación de células de cáncer de tiroides, decidimos focalizarnos en esta isoenzima para los estudios a continuación.

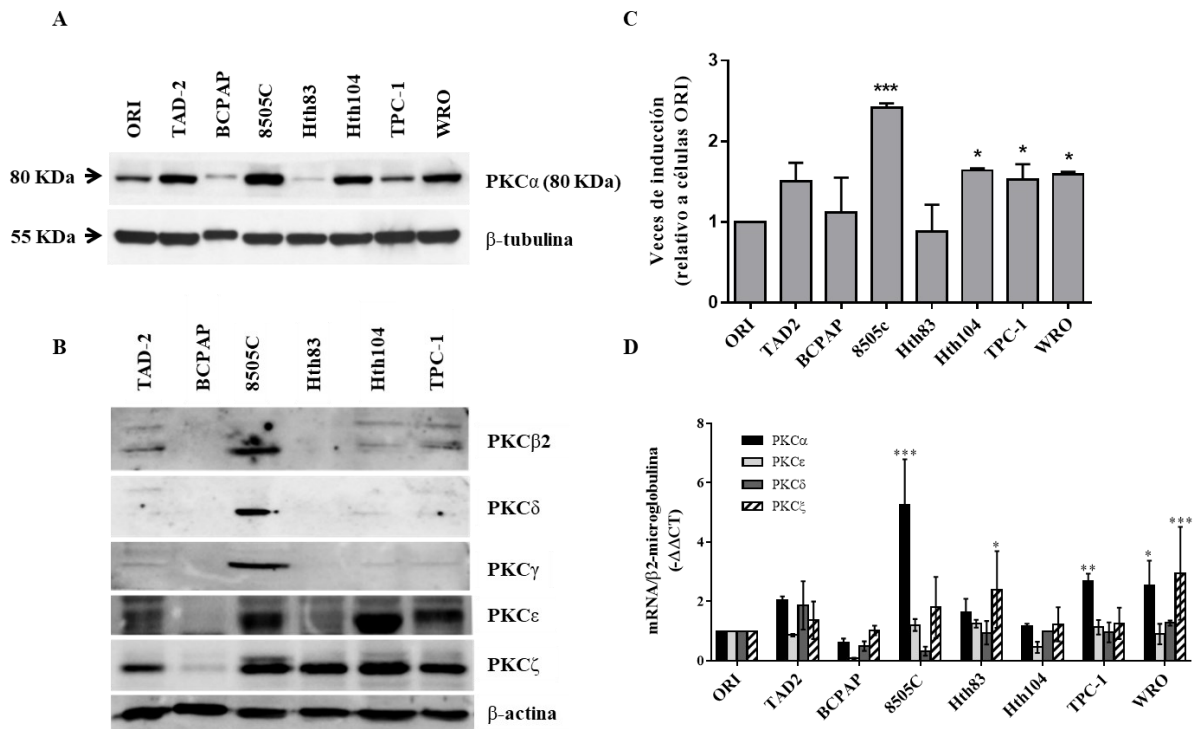


Figura 11: Expresión de PKC en células de tiroides. La expresión de PKCα (A) y PKCβ2, PKCδ, PKCγ, PKCε y PKCζ (B) en células epiteliales tiroideas immortalizadas no tumorales ORI y TAD-2 y en células de cáncer de tiroides fue determinada por Western blot. La expresión de β-tubulina y β-actina fueron utilizadas como control de carga. Se muestran resultados representativos de 3 similares. C. Análisis densitométrico de los niveles de PKCα respecto a los de β-tubulina relativo a los niveles de la línea normal ORI. La expresión de β-tubulina fue utilizada como control de carga. (n=3). Se muestra la media ± SD. ***p<0.0001, *p<0.05, respecto a ORI. D. Se extrajo RNA total de células immortalizadas no tumorales y de cáncer de tiroides y a partir de éste se sintetizó el cDNA con el que se realizó una qRT-PCR con primers específicos para PRKCA, PRKCB, PRKCD, PRKCE y PRKCZ. Se grafican los resultados obtenidos mediante el análisis de ΔΔCt de n=3 ensayos y utilizando como gen normalizador la β2-microglobulina. Se muestra la media ± SD. ***p<0.0001, **p<0.005, *p<0.05, respecto a ORI.

5.2 Expresión del TSHR en líneas celulares de tiroides

La pérdida de marcadores de diferenciación es un evento común en el desarrollo de cáncer, observándose una pérdida progresiva de la expresión de proteínas características del tejido sano. En la transformación de células de tiroides, estas proteínas suelen ser aquellas involucradas en la captación de yodo y producción de hormonas tiroideas (HTs) (Durante *et al.*, 2007), entre ellas, el receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSHR, del inglés

Thyroid Stimulating Hormone Receptor) (Sheils y Sweeney, 1999; Tanaka *et al.*, 2000). Sin embargo, distintos trabajos exponen diferentes posturas sobre la expresión del TSHR en cáncer de tiroides (Lazar *et al.*, 1999; Ohta *et al.*, 1991; Gérard *et al.*, 2003). Debido a la posible pérdida de este receptor en las líneas celulares de cáncer de tiroides utilizadas (Pilli *et al.*, 2009) y para estudiar si PKC α puede estar implicada en las vías de señalización río debajo de este receptor, nos propusimos caracterizar la expresión de esta proteína en dichas líneas celulares. Para ello, extrajimos ARN total a partir de las líneas utilizadas y realizamos qRT-PCR para el gen de TSHR. Si bien hay autores que describen la ausencia del TSHR en algunas de las líneas celulares utilizadas (van Staveren *et al.*, 2007; Rowe *et al.*, 2017), como se puede observar en la Figura 12, encontramos que todas las líneas evaluadas en nuestro estudio expresan en mayor o menor medida el TSHR. Nuestros resultados respaldan la idea de un comportamiento gen- y línea celular-específico debido al origen particular de cada línea de cáncer de tiroides, siendo esto concordante con las células de cáncer de tiroides *in vivo*, donde la expresión del TSHR suele mantenerse preservada o sólo ligeramente disminuida (Rowe *et al.*, 2017).

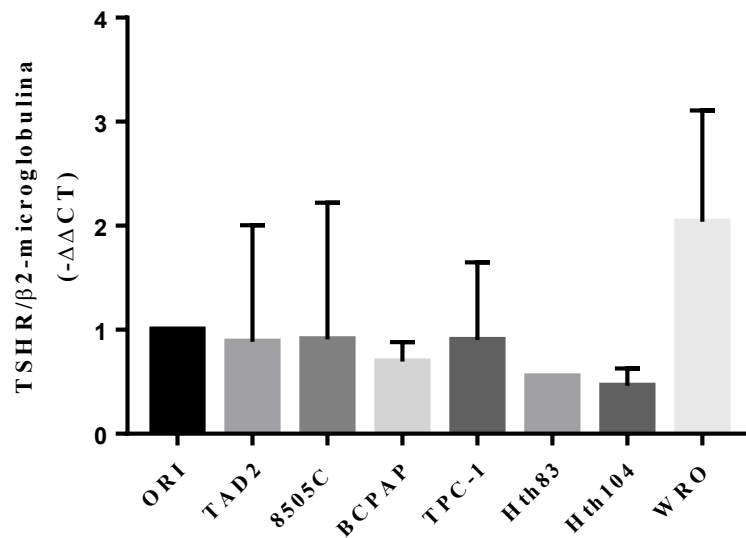


Figura 12: Nivel de expresión del receptor de hormona estimulante de la tiroides. Se extrajo ARN total de células inmortalizadas no tumorales y de cáncer de tiroides y a partir de éste se sintetizó el ADNc con el que se realizaron qRT-PCR con primers específicos para el gen TSHR. Se grafican los resultados obtenidos mediante análisis de $\Delta\Delta C_t$ de n=3 ensayos y utilizando como gen normalizador $\beta 2$ -microglobulina.

5.3 Las líneas celulares de tiroides expresan los receptores nucleares y de membrana de las hormonas tiroideas

Caracterizamos la expresión de los receptores nucleares y de membrana de las HTs en las líneas celulares utilizadas a fin de estudiar posteriormente la participación de PKC α como efectora de los efectos proliferativos de las HTs en dichas células. Como se observa en la Figura 13A, todas las líneas estudiadas presentan niveles similares de expresión de los receptores nucleares por Western blot. Confirmamos estos resultados por citometría de flujo en las líneas ORI, TPC-1 y 8505C (Fig. 13B).

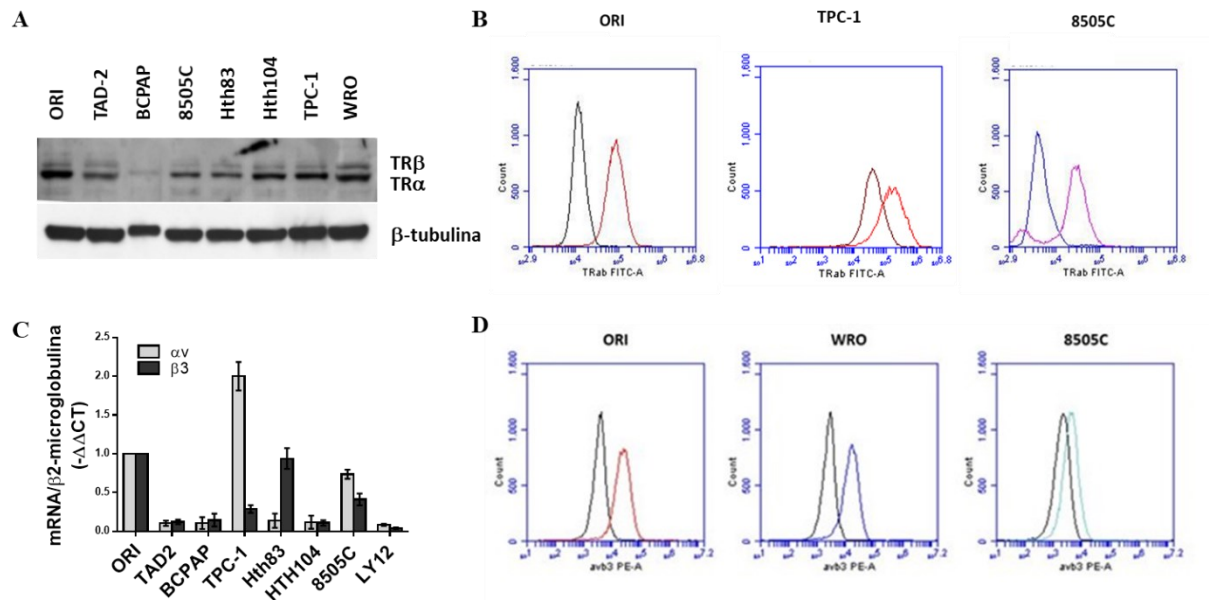


Figura 13: Expresión de receptores de hormonas tiroideas en células de tiroides. **A.** La expresión de ambas subunidades de TR α y β se analizó en células inmortalizadas no tumorales y de cáncer de tiroides por Western blot. La expresión de β -tubulina fue utilizada como control de carga. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes. **B.** Expresión de TR α / β mediante citometría de flujo de las líneas inmortalizada ORI (izquierda), TPC-1 (centro) y de cáncer de tiroides anaplásico 8505C (derecha). Se muestra un experimento representativo de 3. **C.** Se extrajo ARN total y a partir de este se sintetizó el ADNc con el que se realizó una qRT-PCR con primers específicos para las subunidades de integrina αv y $\beta 3$. Se grafican los resultados obtenidos mediante análisis de $\Delta\Delta Ct$ de $n=3$ ensayos y utilizando como gen normalizador $\beta 2$ -microglobulina. Las células LY12 de linfoma se analizaron como control positivo. **D.** Expresión del dímero $\alpha v\beta 3$ mediante citometría de flujo en la línea normal inmortalizada ORI (izquierda) y de cáncer de tiroides folicular WRO (centro) y anaplásico 8505C (derecha).

Trabajos previos tanto de nuestro laboratorio (Cayrol *et al.*, 2015; Barreiro Arcos *et al.*, 2011; Sterle *et al.*, 2014) como de otros (Davis *et al.*, 2006; Glinskii *et al.*, 2009; Rebbaa *et al.*, 2008; Yalcin *et al.*, 2010) describen un efecto proliferativo de las HTs en distintos cánceres a través de su receptor de membrana, la integrina $\alpha\beta3$. En este sentido, encontramos que todas las líneas estudiadas expresan α y $\beta3$ en diferentes niveles por qPCR (Fig. 13C). Luego, confirmamos la presencia del dímero activo por citometría de flujo en las líneas ORI, WRO y 8505C (Fig. 13D).

Estos resultados sugieren que los receptores nucleares y la integrina $\alpha\beta3$ como receptores de las HTs están expresados tanto en las células inmortalizadas no tumorales como de cáncer de tiroides utilizadas.

5.4 La combinación de hormonas tiroideas en concentraciones fisiológicas induce proliferación de células de cáncer de tiroides

Como ya hemos mencionado, las HTs son agentes capaces de estimular la proliferación en varios tipos de cáncer. Las perturbaciones en el estado tiroideo pueden ocasionar un aumento del riesgo de desarrollar la enfermedad y una peor prognosis en diversos tejidos como mama, riñón, colon y tiroides (Schmidinger *et al.*, 2011; Boursi *et al.*, 2015; Søggaard *et al.*, 2016; Medas *et al.*, 2018). Las HTs promueven la proliferación, supervivencia y angiogénesis a través de su interacción con los receptores nucleares, desencadenando programas genéticos, y mayormente por su interacción con la integrina $\alpha\beta3$ (Liu *et al.*, 2019). La participación de estos mecanismos en la proliferación ha sido descripta previamente en líneas celulares de cáncer de tiroides (Lin *et al.*, 2007).

En base a los resultados obtenidos en la sección anterior respecto a la expresión de receptores, y habiendo mencionado previamente los efectos de las HTs en la proliferación de células de tiroides, decidimos medir su participación en la proliferación de las células de cáncer de tiroides que mostraron una expresión aumentada de PKC α . Como puede observarse en la Figura 14, la combinación de ambas hormonas en concentraciones fisiológicas resultó en un aumento diferencial de la proliferación en comparación a los tratamientos con hormonas individuales en las 3 líneas de cáncer de tiroides estudiadas.

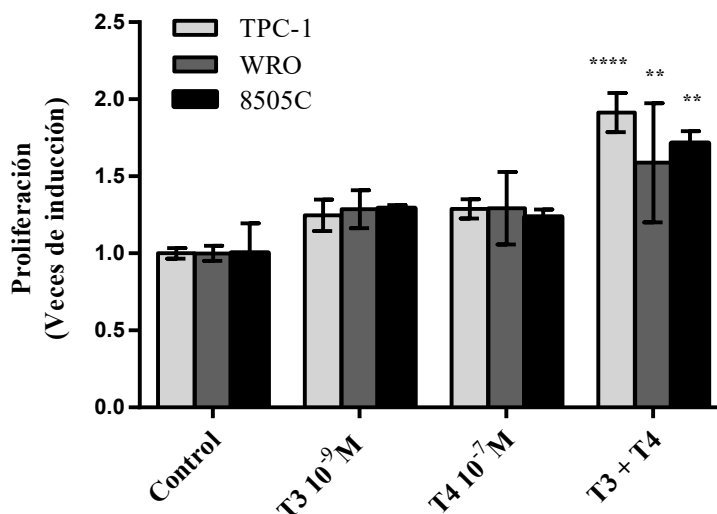


Figura 14: Proliferación inducida por hormonas tiroideas en células de cáncer de tiroides. Las células TPC-1, WRO y 8505C fueron crecidas en ausencia de SFB y luego incubadas con 1nM T₃, 100nM T₄, o una combinación de ambas por 48h. Mediante ensayo de Cell Titer Blue, se determinó el número de células vivas con cada tratamiento. Se utilizó el kit comercial (Promega) tal como lo indica el fabricante. Se muestra la media ± SD. ****p<0.0001 respecto al control, **p<0.001 respecto al control.

Varias evidencias sostienen que la inhibición del mTR ocasiona la disminución de varios procesos promotores del crecimiento tumoral en distintos tipos de cáncer (Sudha *et al.*, 2017). Con el fin de confirmar si el mTR se encuentra involucrado en la proliferación observada en los resultados anteriores, tratamos a las células 8505C con concentraciones crecientes de Cilengitide, en presencia o ausencia de HTs. Este compuesto es un péptido cíclico que contiene la secuencia RGD, y que actúa como inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ (Mas-Moruno *et al.*, 2010). El Cilengitide es el primer antagonista de la integrina $\alpha\beta3$ en llegar a ensayos clínicos, principalmente para glioblastoma, pero también para otros tumores sólidos (Reardon *et al.*, 2008; Tabatabai *et al.*, 2010; Haddad *et al.*, 2017). Estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran un aumento en la proliferación y angiogénesis inducidos por HTs y a través de la integrina $\alpha\beta3$ en linfoma de células T. Consecuentemente, el tratamiento con Cilengitide disminuye estos efectos (Cayrol *et al.*, 2015; Díaz Flaqué *et al.*, 2019). En la misma línea, observamos resultados similares en la Figura 15, evidenciando que el aumento en la proliferación por tratamiento con HTs es inhibido en forma dependiente de la concentración de Cilengitide.

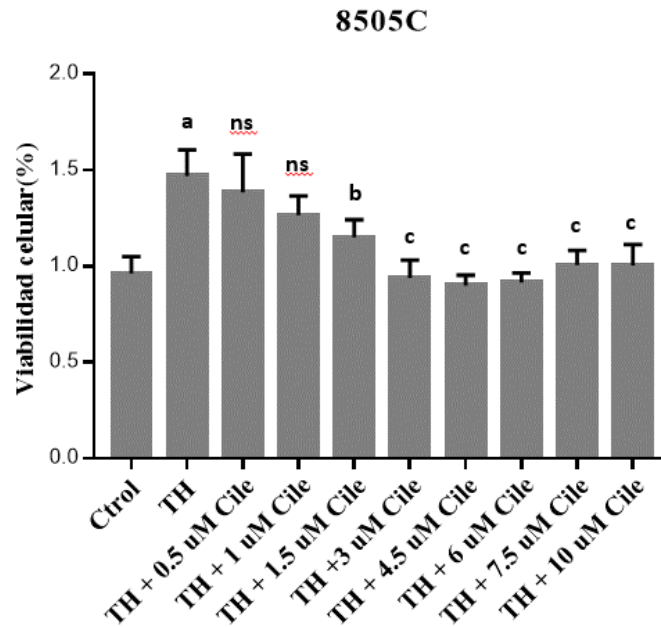


Figura 15: Participación de la integrina $\alpha\beta3$ en la proliferación inducida por hormonas tiroideas. Las células 8505C fueron crecidas en ausencia de SFB y luego pretratadas o no (Ctrl) con concentraciones crecientes de Cilengitide (Cile) y luego incubadas con 1 nM T₃ y 100 nM T₄ en combinación (concentraciones fisiológicas) (TH) por 48 h. Mediante ensayo de Cell Titer Blue, se determinó el número de células vivas con cada tratamiento. Se utilizó el kit comercial (Promega) tal como indica el fabricante. Se muestra la media \pm SD. a: $p < 0,0001$ respecto al control, b: $p < 0,001$ respecto a TH, c: $p < 0,0001$ respecto a TH.

5.5 PKC participa en los efectos proliferativos de las TSH y hormonas tiroideas en células de cáncer de tiroides

Previamente, nuestro grupo describió que las HTs en concentraciones fisiológicas desencadenan programas proliferativos a través de los receptores nucleares de las HTs (TRs, del inglés *Thyroid hormone Receptor*) y el mTR en células de linfoma de células T (Cayrol *et al.*, 2015; Díaz Flaqué *et al.*, 2019). Además, vimos que PKC ζ transloca a la membrana plasmática en la respuesta proliferativa inducida por las HTs a través del mTR (Barreiro Arcos *et al.*, 2006), resultando en la fosforilación de la quinasa regulada por señal extracelular 1/2 (ERK1/2, del inglés *Extracellular signal Regulated Kinase*) y la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B, del inglés *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Barreiro Arcos *et al.*, 2011; Díaz

Flaqué *et al.*, 2019; Cayrol *et al.*, 2015) como mencionamos en los antecedentes. Ambos programas, los iniciados por las HTs a través de su receptor nuclear como a través del mTR, favorecen la supervivencia y proliferación de células de linfoma T, contribuyendo al fenotipo tumoral. A su vez, otros grupos han descrito que PKC participa en la progresión tumoral inducida por TSH en cáncer de tiroides (Hoffmann *et al.*, 2004).

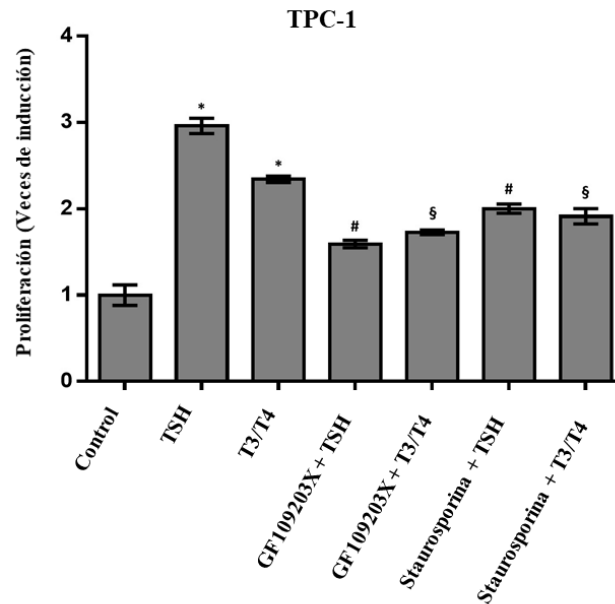


Figura 16: Participación de PKC en la proliferación inducida por la hormona estimulante de la tiroides y hormonas tiroideas. Las células TPC-1 fueron crecidas en ausencia de SFB y luego pretratadas o no (ctrol) con 5 μ M GF109203X o 1 μ M Staurosporina y luego incubadas con 10 mIU/ml TSH o 1 nM T₃ y 100 nM T₄ en combinación (concentraciones fisiológicas) por 48 h. Mediante ensayo de Cell Titer Blue, se determinó el número de células vivas con cada tratamiento. Se utilizó el kit comercial (Promega) tal como indica el fabricante. Se muestra la media \pm SD. * $p < 0.001$ respecto al control, # $p < 0.001$ respecto a TSH, § $p < 0.001$ respecto a las células tratadas con T₃/T₄.

En este trabajo, demostramos que las HTs inducen la proliferación de células de cáncer de tiroides a través de su receptor de membrana (Fig.15). Para estudiar la participación de PKC en la proliferación inducida por las HTs y TSH, realizamos ensayos de Cell Titer Blue en presencia de los inhibidores Staurosporina (St) y GF109203X (GF) con concentraciones fisiológicas de HTs por 48 h (Fig.16). La St es un alcaloide capaz de inhibir a PKC con una alta afinidad (Ōmura *et al.*, 2018) mientras que GF es un inhibidor específico de PKC que,

dependiendo de la concentración usada, inhibe selectivamente a las isoformas clásicas, nuevas o atípicas (Toullec *et al.*, 1991). La concentración utilizada de GF en estos ensayos es inhibitoria de las cPKCs y es comúnmente utilizada en la bibliografía para los estudios de estas isoformas (Lønne *et al.*, 2010; Detjen *et al.*, 2000; Abera y Kazanietz, 2015; Cooke *et al.*, 2018; 2019; Llorens *et al.*, 2019). Comparamos los efectos observados al tratar con HTs o TSH en presencia y ausencia de los inhibidores. Observamos que efectivamente, la TSH induce proliferación y que dicha proliferación, así como la inducida por HTs disminuye significativamente en las células en las que se inhibió a PKC con ambos agentes (Fig.16).

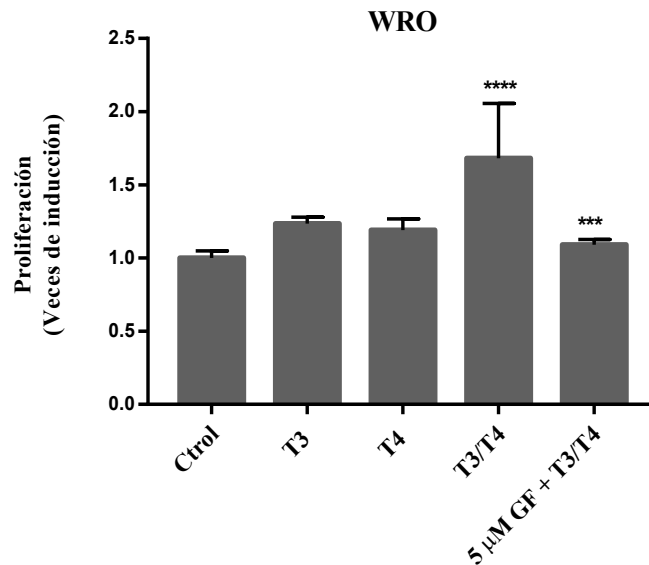


Figura 17: Participación de PKC en la proliferación inducida por hormonas tiroideas. Las células WRO fueron crecidas en ausencia de SFB y luego pretratadas o no (ctrl) con 5 μM GF109203X y luego incubadas con 1 nM T₃ y 100 nM T₄ en combinación (concentraciones fisiológicas) por 24 h. Mediante ensayo de Cell Titer Blue, se determinó el número de células vivas con cada tratamiento. Se utilizó el kit comercial (Promega) tal como indica el fabricante. Se muestra la media ± SD. ****p<0.0001 respecto al control, ###p<0.001 respecto a la combinación T₃ y T₄.

Habiendo observado las propiedades proliferativas de las HTs y TSH en la línea TPC-1, evaluamos el efecto de la inhibición de PKC en la línea WRO en presencia de HTs. Para esto, las células fueron tratadas con concentraciones fisiológicas de HTs por separado, en conjunto y en combinación con GF. Como se puede observar en la Figura 17, los resultados obtenidos fueron similares a los descriptos para la línea TPC-1. En base a estos resultados, podemos

decir que los efectos proliferativos inducidos por la combinación de HTs disminuyen significativamente al inhibir a PKC, demostrando su participación en dicho proceso.

5.6 PKC α participa en la proliferación inducida por TSH y hormonas tiroideas en células de cáncer de tiroides

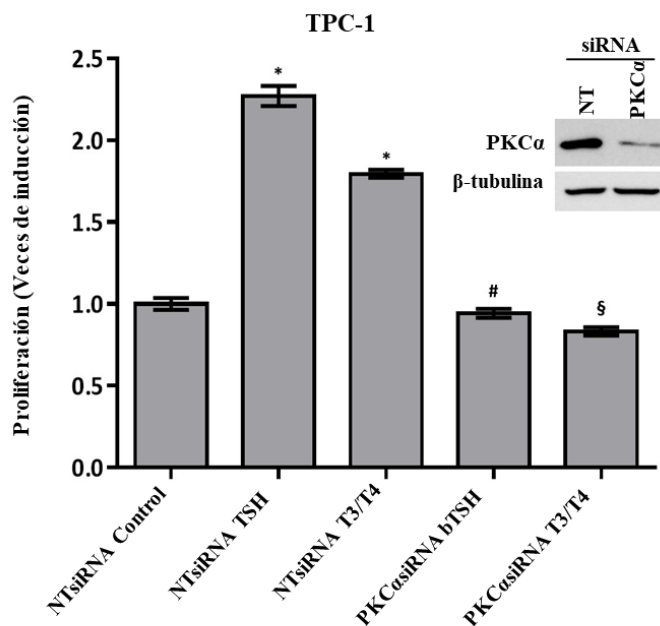


Figura 18: Participación de PKC α en la proliferación inducida por hormonas tiroideas en células de cáncer de tiroides. Las células TPC-1 fueron transfectadas con ARN de interferencia (siRNA) para una secuencia irrelevante non target (NT) o con una para PKC α . Luego fueron crecidas en ausencia de SFB y posteriormente fueron tratadas por 48 h con 10 mIU/ml TSH, 1nM T₃ en combinación con 100 nM T₄ (concentraciones fisiológicas) o permanecieron sin tratar (control). Mediante ensayo de Cell Titer Blue, se determinó el número de células vivas con cada tratamiento. Se utilizó el kit comercial (Promega) tal como indica el fabricante. Se muestra la media \pm SD. *p<0.001 respecto al control, #p<0.001 respecto a TSH y § p<0.001 respecto a las células tratadas con T₃/T₄. **Panel superior.** Las células TPC-1 fueron transfectadas con siRNA NT o si RNA PKC α . A partir de estas células, se obtuvieron las proteínas totales, se evaluaron los niveles proteicos de la proteína PKC α por Western blot. La β -tubulina fue utilizada como control de carga.

Previamente observamos la participación de PKC en la proliferación inducida tanto por las HTs como por la TSH. Para evaluar la participación específica de PKC α en la proliferación de las células TPC-1 tratadas con hormonas, se realizaron ensayos de silenciamiento con siRNA

específico contra PKC α . Esto ocasionó una disminución significativa de la proliferación tanto en la proliferación inducida por HTs como por TSH (Fig. 18).

5.7 Participación de PKC α en la proliferación y apoptosis inducidas por hormonas

Para estudiar la relación entre la expresión de PKC α en la proliferación y apoptosis inducidas por HTs y TSH, evaluamos el efecto de la inhibición de PKC α en los niveles proteicos de PCNA y de caspasa 3 clivada. El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA, del inglés *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) es una proteína que participa en la replicación y el mantenimiento genómico. PCNA se encuentra preferencialmente expresada en células en división y en células transformadas, y es comúnmente utilizada como marcador de la proliferación celular (Boehm *et al.*, 2017; Wang, 2014). Particularmente en cáncer de tiroides, se reportó una correlación de la expresión de PCNA con el diámetro tumoral, calcificación y flujo sanguíneo, así como con el estadio tumoral (Yang *et al.*, 2019). Las caspasas son un grupo de proteasas que llevan a cabo la muerte celular programada o apoptosis (Boice y Bouchier-Hayes, 2020), siendo la evasión de este proceso considerada una de las características principales del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000). Las caspasas se encuentran divididas en iniciadoras, aquellas que son activadas en respuesta a las señales que inician la apoptosis, y efectoras, que participan en la fase de demolición. Caspasa 3 es una efectora de la apoptosis, que al ser clivada se vuelve activa (Boice y Bouchier-Hayes, 2020). En la Figura 19, podemos observar que la inhibición de PKC α lleva a la disminución de la expresión de PCNA mientras que los niveles de expresión de la caspasa 3 clivada aumentan, indicando un descenso en la proliferación y un aumento en la muerte celular.

Con el objetivo de dilucidar los mecanismos que llevan a la proliferación inducida por hormonas mediada por PKC α en cáncer de tiroides, evaluamos la activación de timoma de la sepa murina AKR (AKT, del inglés *AKR mouse strain Thymoma*) y de los fragmentos de 42 y 44 kiloDaltons de la proteína quinasa activada por mitógeno (p42/p44 MAPK, del inglés *42 and 44kDa protein of the Mytogen Activated Protein Kinase*). El tratamiento con HTs y TSH por 5 min indujo la fosforilación de AKT en la Serina 473 y de p42/p44 MAPK en la treonina 202 y tirosina 204 por Western blot en las células TPC-1 (Fig.20), implicando claramente la participación de PKC α en esta vía.

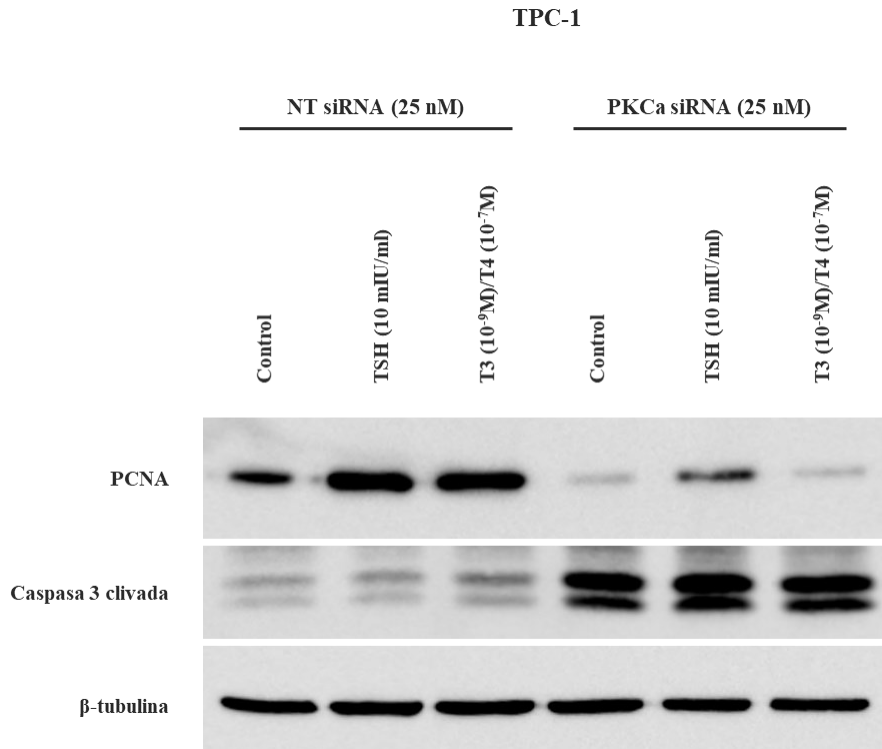


Figura 19: Participación de PKCα en la proliferación y apoptosis inducidas por hormonas. Las células TPC-1 fueron transfectadas con ARN de interferencia (siRNA) para una secuencia irrelevante non target (NT) o con una para PKCα. Luego fueron crecidas en ausencia de SFB y posteriormente fueron tratadas por 48 h con 1nM T₃ en combinación con 100 nM T₄, 10 mIU/ml TSH (concentraciones fisiológicas), o permanecieron sin tratar (control). Los niveles de PCNA y caspasa 3 clivada fueron determinados por Western blot. β-tubulina fue utilizada como control de carga. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

Si bien hace falta estudiar en mayor profundidad algunos aspectos, nuestros resultados apuntan a que la participación de PKCα en las vías de señalización de las HTs a través de la integrina αvβ3 y de TSH a través del TSHR confirieren ventajas sobre la proliferación y la supervivencia de células de cáncer de tiroides, así como en la inhibición de la apoptosis. Dada su participación en estas vías y sus efectores río abajo, PKCα podría actuar como biomarcador pronóstico para la agresividad del cáncer de tiroides. En línea con lo anterior, la inhibición de PKCα podría contribuir a una mejor respuesta a los tratamientos en pacientes con cáncer de tiroides.

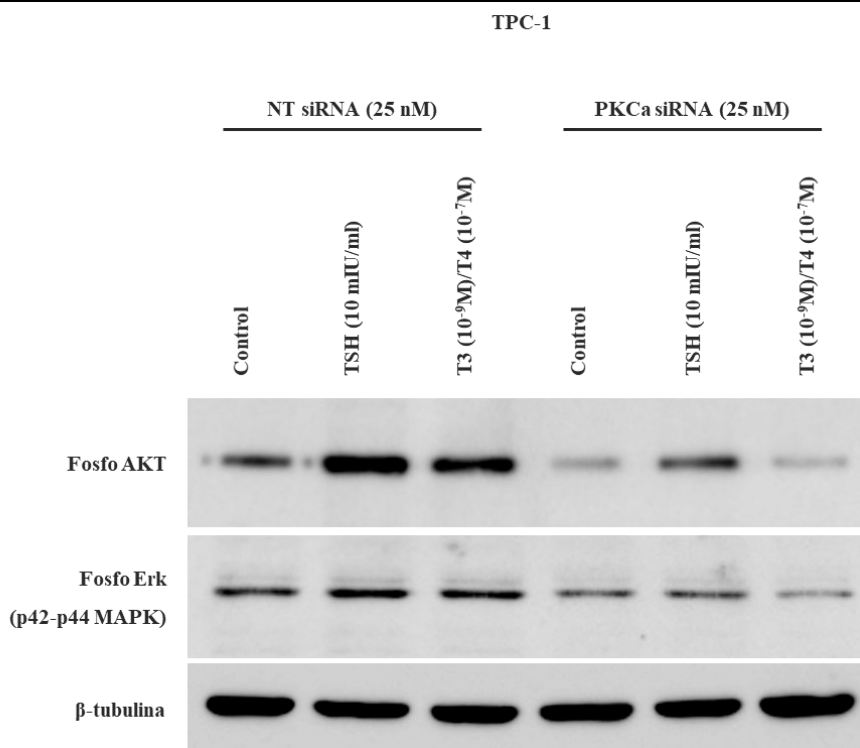


Figura 20: Participación de PKCα en la activación de vías de señalización inducidas por hormonas. Las células TPC-1 fueron transfectadas con ARN de interferencia (siRNA) para una secuencia irrelevante *non target* (NT) o con una para PKCα. Luego fueron crecidas en ausencia de SFB y posteriormente fueron tratadas por 10 min con 1nM T₃ en combinación con 100 nM T₄, 10 mIU/ml TSH (concentraciones fisiológicas) o permanecieron sin tratar (control). Se muestran niveles de fosforilación de AKT y p42/044MAPK por Western blot. β-tubulina fue utilizada como control de carga. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

6 Discusión de resultados

El cáncer de tiroides afecta a una fracción importante de la población mundial y su incidencia ha venido aumentando significativamente de manera constante en las últimas décadas tanto en la Argentina como en el resto del mundo. Cuando el diagnóstico es temprano y el tumor es catalogado como bien diferenciado, esta enfermedad tiene un buen pronóstico. Sin embargo, cuando el diagnóstico encuentra una enfermedad pobremente diferenciada, la esperanza de vida decrece significativamente. El cáncer de tiroides anaplásico (ATC, del inglés *Anaplastic Thyroid Cancer*) es el tumor de tiroides más agresivo y de peor evolución, representa una de las neoplasias malignas más agresivas en humanos con un pobre pronóstico, una tasa de mortalidad mayor al 90% y una media de supervivencia de 6 meses luego del diagnóstico. Los tratamientos actuales para el cáncer de tiroides en estadios avanzados son poco eficaces debido principalmente a la generación de resistencia y la reincidencia, además de ser altamente nocivos para el paciente. Por este motivo, es imperativo generar avances en el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas para esta enfermedad.

En este trabajo hemos evaluado la participación de la proteína quinasa $C\alpha$ (PKC α , del inglés *Protein Kinase C\alpha*) en la proliferación inducida por la hormona estimulante de la tiroides (TSH, del inglés *Thyroid Stimulating Hormone*) y las hormonas tiroideas (HTs) en varias líneas celulares de cáncer de tiroides. Nuestro objetivo fue dilucidar si esta proteína confiere una ventaja sobre el crecimiento tumoral. Para esto, estudiamos la respuesta de las células tratadas con TSH o HTs en concentraciones fisiológicas al tratamiento con inhibidores pan-PKC y al silenciamiento con ARN de interferencia (siRNA, del inglés *short interfering Ribonucleic Acid*) contra PKC α . Observamos que al inhibir a PKC con fármacos específicos, la proliferación de las líneas celulares utilizadas inducida por las hormonas mencionadas disminuye. Esta disminución es aún más pronunciada cuando se silencia a PKC α con siRNA específicos, indicando la importancia de esta isoenzima en particular. Luego, evaluamos la expresión de diversas proteínas participantes en vías de señalización involucradas en proliferación y apoptosis, observando un aumento en la activación de timoma de la sepa murina AKR (AKT, del inglés *AKR mouse strain Thymoma*) y la quinasa regulada por señal extracelular 1/2 (ERK1/2, del inglés *Extracellular signal Regulated Kinase*), y un aumento de la expresión del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA, del inglés *Proliferating*

Cell Nuclear Antigen) y la disminución de los niveles de caspasa 3 clivada. Esto nos permite plantearnos la posibilidad de que PKC α actúe como marcador de mal pronóstico, así como blanco terapéutico para esta patología.

En primer lugar, encontramos que de un panel de 6 isoformas de la familia PKC (α , β 2, γ , δ , ϵ y ζ), 3 (α , ϵ y ζ) están sobreexpresadas en las líneas de cáncer de tiroides al comparar con células inmortalizadas no tumorales (Fig. 11). La sobreexpresión de PKC α fue descrita en cáncer de pulmón y glioma de alto grado, cáncer de mama y melanoma, entre otros (Mahapatra *et al.*, 2019; Clark *et al.*, 2003; Lahn *et al.*, 2004; Mandil *et al.*, 2001) y se asocia generalmente a la resistencia a terapias y a la proliferación exacerbada de las células tumorales (Abera y Kazanietz, 2015; Gupta *et al.*, 1996). La inhibición de PKC α en estos tipos de cáncer tiene un efecto antitumoral (Kang, 2014; Michie & Nakagawa, 2005). En base a esta información y a que PKC α se encuentra sobreexpresada en la mayoría de las líneas de cáncer de tiroides utilizadas, decidimos continuar con el estudio de esta isoforma. En el pasado se han realizado algunos trabajos para estudiar la actividad de PKC en cáncer de tiroides, tanto en general como isoforma específicos (KOBAYASHI *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2014; Koike *et al.*, 2006), sin embargo, la relación entre PKC α y el cáncer de tiroides no ha sido ampliamente explorada.

Además, en este trabajo corroboramos la expresión de los receptores de TSH y HTs a través de diferentes metodologías. Observamos que todas las líneas utilizadas expresan en mayor o menor medida tanto el TSHR (Fig. 12) como los receptores nucleares (TRs, del inglés *Thyroid hormone Receptor*) y de membrana de las HTs (mTR) (Fig. 13). La expresión de estas proteínas es esencial para el estudio de la señalización iniciada por la TSH y las HTs. Tanto los receptores nucleares de hormonas tiroideas TRs como el mTR se encuentran ampliamente descritos en la literatura con diferentes roles en distintos tipos de cáncer, sin embargo, con una clara tendencia a la proliferación, migración y evasión de la apoptosis (Krashin *et al.*, 2019), siendo esto concordante con los estudios previamente desarrollados en nuestro laboratorio con respecto al mTR en linfoma de células T (Cayrol *et al.*, 2015; Díaz Flaqué *et al.*, 2019). Nuestros resultados coinciden con la bibliografía en cuanto a la expresión de la integrina $\alpha\beta$ 3 (Hoffmann *et al.*, 2005), y la expresión o sobreexpresión de TRs, que se encuentra reportada en la amplia mayoría de tumores tiroideos (Hernandez *et al.*, 2021).

Por otra parte, La expresión del TSHR ha sido descrita en otros tipos de cáncer, como melanoma (Ellerhorst *et al.*, 2006), cáncer de ovario y carcinoma hepatocelular, y fue postulado como biomarcador de mal pronóstico debido a la actividad de TSH como factor de crecimiento en estas patologías (Chu y Yeh, 2020). La expresión del TSHR se encuentra descrita especialmente en cánceres de tiroides diferenciados, donde es altamente funcional, mientras que en ATC, hay reportes de una menor expresión, aunque con algunas discrepancias en la bibliografía (Chen *et al.*, 2000; Friedman *et al.*, 2009; Sheils & Sweeney, 1999). En un estudio reciente, su sobreexpresión se encontró en más del 50% de los cánceres de tiroides, tanto en general como relativo al tejido no tumoral del mismo paciente (Hernandez *et al.*, 2021). El TSHR es requerido para la respuesta a TSH, que es necesaria para la expresión de varios marcadores de diferenciación, como tiroperoxidasa (TPO), tiroglobulina (Tg), transportador de sodio yoduro (NIS, del inglés *Na⁺-I Symporter*), entre otros. Sin embargo, la expresión de esta proteína especialmente en ATC no se correlaciona con la expresión de marcadores de diferenciación (García-Jiménez y Santisteban, 2007). Se ha descrito también la participación de este receptor en la expresión y secreción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) en células de cáncer de tiroides mediante la actividad de PKC, como respuesta a TSH a concentraciones fisiológicas (Hoffmann *et al.*, 2004). Si bien otros grupos han reportado la ausencia del TSHR en algunas de las líneas utilizadas (van Staveren *et al.*, 2007; Rowe *et al.*, 2017), observamos no sólo su expresión en estas líneas, sino que además en los resultados posteriores se evidenció la respuesta a TSH.

Una vez que describimos la presencia de los receptores de las hormonas en las líneas de tiroides, estudiamos la proliferación inducida por las HTs en las líneas TPC-1, WRO y 8505C (Fig. 14). Vimos que el tratamiento con HTs lleva a un aumento significativo de la proliferación en las tres líneas celulares evaluadas, especialmente al tratar con la combinación de ambas hormonas en las concentraciones fisiológicas tal como se encuentran en circulación. En particular en la línea 8505C, observamos que estos efectos son inhibidos de forma dependiente de la concentración al tratar con Cilengitide (Fig. 15), llevando a una disminución significativa de la proliferación mediada por las HTs. Este agente posee actividad antagonista sub-nanomolar para la integrina $\alpha v \beta 3$, y ha demostrado buenos resultados en el tratamiento de

cáncer tanto en ensayos clínicos por otros grupos (Tabatabai *et al.*, 2010), como a nivel pre-clínico en nuestro laboratorio (Cayrol *et al.*, 2015). Si bien hay una parte de los efectos que no se explican por esta vía, las células de cáncer de tiroides parecerían proliferar principalmente mediante la unión de las HTs a su mTR, y posiblemente en menor medida debido a mecanismos genómicos de las HTs. Este razonamiento coincide con trabajos previos de nuestro grupo, donde los mecanismos no genómicos iniciados en el mTR son complementados por una activación de los mecanismos genómicos, resultando en la modificación de la expresión génica y un aumento de la proliferación (Barreiro Arcos *et al.*, 2011).

La integrina $\alpha\beta3$ está especialmente relacionada con los efectos pro-tumorales de las HTs, como la angiogénesis y la proliferación (Davis *et al.*, 2011). En este trabajo, evidenciamos que el tratamiento con Cilengitide disminuye la proliferación tumoral inducida por las HTs, coincidiendo esto con los hallazgos de Lin *et al.*, donde se describe que la inhibición farmacológica de esta proteína en células de cáncer de tiroides disminuye la proliferación mediada por la vía de las quinasas activadas por mitógeno (MAPK, del inglés *Mitogen Activated Protein Kinase*) y sensibiliza a la apoptosis (Lin *et al.*, 2007).

Una vez observada la expresión de PKC α y los efectos de las HTs en las células de tiroides, analizamos la participación de PKC en la proliferación por TSH y HTs. Al inhibir a PKC mediante dos drogas distintas, Staurosporina (St) y GF109203X (GF) (Fig. 16 y 17), vimos una disminución de la proliferación causada tanto por TSH como por las HTs. A diferencia de la St, el GF es capaz de inhibir selectivamente a las subfamilias de PKC en función de la concentración utilizada. En base a esto, decidimos utilizar la concentración reportada en la bibliografía para inhibir selectivamente a las cPKC (Lønne *et al.*, 2010; Detjen *et al.*, 2000; Abera y Kazanietz, 2015; Cooke *et al.*, 2018; 2019; Llorens *et al.*, 2019). Esto sugiere que los efectos proliferativos de estas hormonas se encuentran mediados por isoformas de la familia PKC, y en base a lo observado con GF, habría una mayor participación de isoformas clásicas por sobre el resto. A su vez, PKC α parece ser la isoforma clásica con mayor expresión en nuestras células, por lo que los efectos inhibitorios sobre las cPKC estarían representando principalmente la inhibición de esta proteína. Previamente, nuestro grupo demostró que la inhibición de PKC ζ lleva a una disminución de la proliferación inducida por HTs en linfoma de células T (Barreiro Arcos *et al.*, 2011). En forma coincidente con nuestros

resultados, la activación de PKC por TSH a través de su receptor se encuentra ya reportada por varios autores, sin embargo, pocos estudios se enfocan en la repercusión de esta vía de señalización en cáncer de tiroides. Si bien en el tejido sano parecen requerirse concentraciones de TSH superiores a las fisiológicas para activar a la fosfolipasa C (PLC, del *PhosphoLipase C*) (Rivas y Santisteban, 2003), los resultados podrían deberse a una diferencia en la preferencia de vías de señalización en células tumorales. En el tejido tiroideo sano, las células responden a TSH activando principalmente la vía de la proteína quinasa A (PKA, del inglés *Protein Kinase A*), resultando en la proliferación y diferenciación (Laurent *et al.*, 1987; Rivas y Santisteban, 2003). La vía de señalización PLC/PKC está asociada a la proliferación y desdiferenciación del tejido tiroideo, por lo que las células tumorales que responden a TSH podrían activar esta vía de forma preferencial. Este razonamiento fue previamente reportado para células de cáncer de tiroides folicular (FTC, del inglés Follicular Thyroid Cancer) (Hoelting *et al.*, 1993). Por otra parte, la participación de PKC en las vías desencadenadas por las HTs en la membrana plasmática ha sido previamente descrita en distintos tejidos, tanto por nuestro grupo (Barreiro Arcos *et al.*, 2011; Cayrol *et al.*, 2015; Díaz Flaqué *et al.*, 2019), como por otros (Gnoni *et al.*, 2012; Davis *et al.*, 2006). Sin embargo, esto no había sido demostrado previamente en células de cáncer de tiroides, por lo que nuestros resultados resaltan por primera vez la importancia de esta vía intracelular en la patología del cáncer tiroideo.

Es importante entender que al estudiar a las PKC en conjunto observamos la sumatoria de los efectos individuales de cada una, por lo que es necesario un enfoque más específico para determinar el rol de las isoformas implicadas. Si bien este trabajo se enfoca en la participación de PKC α , hace falta determinar si otras isoformas podrían ser responsables de la diferencia observada al tratar con St, siendo éste un enfoque más inespecífico, donde posiblemente algunas PKC, también sean inhibidas. En este sentido, la participación de PKC ζ en la proliferación de células de tiroides ha sido reportada previamente (Fernandez *et al.*, 2000). Más aún, un estudio de la expresión de las 10 isoformas de PKC proporcionaría una imagen más completa de la posible contribución de cada una, siendo que en este trabajo no se midieron los niveles de PKC β 1, θ , η ni ι .

Una vez observada la participación de PKC en estos efectos, optamos por una estrategia de bloqueo isoforma-específico para ver la contribución particular de PKC α a estos resultados. Al silenciar a PKC α con siRNA específicos, la proliferación inducida tanto por TSH como por HTs disminuyó significativamente, llegando a niveles similares a los de las células transfectadas con siRNA con una secuencia control (Fig. 18). Esto denota una gran influencia de PKC α en la proliferación inducida por ambas hormonas. En base a este resultado podemos interpretar que la contribución individual de esta isoenzima parece ser responsable en gran medida de los efectos proliferativos inhibidos con los enfoques anteriores. La participación de esta isoforma en la proliferación mediada por TSH o HTs no había sido previamente estudiada. Además, la inhibición de PKC α en células de cáncer de tiroides ha sido descrita en una sola ocasión, mostrando una disminución de la proliferación que ha sido observada en el marco de la vía desencadenada por VEGF (Bergelin *et al.*, 2010).

Previamente, se mencionó que no se han realizado antes ensayos clínicos con fármacos contra PKC α en cáncer de tiroides. En este contexto, los resultados reportados respaldan la factibilidad de abordajes terapéuticos contra esta proteína. Como se mencionó en los antecedentes, el uso de los inhibidores de PKC α en ensayos clínicos tiene como desventaja la necesidad de usar concentraciones elevadas para observar un beneficio terapéutico, a costa de una alta toxicidad. Para superar esta dificultad común en fármacos dirigidos a intermediarios de vías de señalización en cáncer, la combinación con otras drogas permitiría el uso de dosis más bajas, beneficiándose así de la sinergia entre ambas drogas y evitando los percances de la alta toxicidad (Bhatia *et al.*, 2020; Al-Lazikani *et al.*, 2012).

A fin de entender mejor los mecanismos moleculares involucrados, estudiamos la activación de las vías de ERK1/2 y AKT (Fig. 19), así como caspasa 3 y PCNA (Fig. 20). La inhibición de PKC α llevó a una mayor apoptosis independientemente de la presencia de TSH o HTs, evidenciado por el aumento en los niveles de expresión de caspasa 3 clivada. A su vez, vimos que el tratamiento con TSH o HTs lleva a un aumento pronunciado de los niveles de PCNA, asociados a una mayor proliferación, siendo esto concordante con nuestros resultados anteriores. Al silenciar PKC α , vimos un descenso en la proliferación inducida por dichas hormonas, siendo una respuesta parcial en las células tratadas con TSH, y volviendo a los niveles del control en aquellas tratadas con HTs. La expresión de estas proteínas fue medida a

tiempos largos, por lo que estos resultados pueden ser interpretados como los efectos biológicos de las hormonas en presencia y ausencia de PKC α . A fin de entender las vías de señalización que desencadenan estos efectos, estudiamos la activación de ERK1/2 y AKT en respuesta a los estímulos con TSH y HTs. Ambos estímulos resultaron en la activación de las dos vías de señalización, si bien la activación de AKT fue más pronunciada que la de ERK1/2. En las células a las que se inhibió a PKC α , se observó, al igual que con PCNA, una disminución de los niveles de AKT y ERK1/2 fosforilados, respondiendo parcialmente en presencia de TSH y volviendo a los niveles del control en presencia de HTs. AKT y ERK1/2 fueron medidas a tiempos cortos, permitiendo entonces asociar los cambios observados a la transducción de señales en respuesta a las hormonas a través de PKC α . Las diferencias observadas en el tratamiento con TSH podrían deberse a la participación de otras proteínas activadas río debajo de TSHR y río arriba de las proteínas estudiadas además de PKC α . Estas podrían ser otras isoformas de PKC, o bien intermediarias de otras vías de señalización. La TSH activa a través del TSHR además de la vía de PKC, la vía de PKA y la vía de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K, del inglés *Phosphatidyl Inositol 3-Kinase*) (Chu y Yeh, 2020), por lo que estas vías podrían participar en la proliferación no explicada exclusivamente por PKC α . Si bien en este estudio nos enfocamos en PKC α , como se mencionó previamente, algunos de los efectos proliferativos observados podrían deberse a la participación de otras isoformas no estudiadas en esta ocasión. Hacen falta esfuerzos en dilucidar el rol de otras isoformas, como es el caso de PKC ζ . La expresión de esta isoforma también se encontró aumentada en el presente trabajo y se ha reportado su actividad proliferativa *in vitro* en células de tiroides (Fernandez *et al.*, 2000). Los presentes hallazgos indican que PKC α tiene una participación preponderante en la tumorigénesis tiroidea, por lo que constituye un blanco terapéutico prometedor. Sería necesario un estudio más completo de estas vías de señalización, haciendo hincapié en las mutaciones características del cáncer de tiroides, como lo son homólogo B de fibrosarcoma rápidamente acelerado^{V600E} (BRAF^{V600E}, del inglés *B-homolog of Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*), los rearrreglos del gen rearrreglado durante transfección (RET, del inglés *REarranged during Transfection*)/PTC y las miembros de la familia sarcoma de rata (RAS, del inglés *RAt Sarcoma*) (Prete *et al.*, 2020). En particular, BRAF^{V600E} es la segunda mutación más prevalente observada en cáncer de tiroides en las últimas décadas

(Cabanillas *et al.*, 2019; Xing, 2005; Oakley *et al.*, 2014), y ha sido asociada a la invasión extratiroidea, estadio tumoral avanzado, metástasis a distancia y recurrencia (Xing, 2005; Lazzara *et al.*, 2019). Sin embargo, los intentos de tratar a BRAF^{V600E} en cáncer de tiroides no han sido exitosos (Crispo *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020). Por otra parte, PKC α se ha visto implicada en las vías de transducción de resistencia a BRAF^{V600E} en melanoma (Parker *et al.*, 2015). Por lo tanto, la inhibición de PKC α podría ser una estrategia eficaz para superar la generación de resistencia a inhibidores de BRAF^{V600E} en cáncer de tiroides.

7 Conclusiones

En este trabajo, estudiamos la participación de la proteína quinasa C alfa (PKC α , del inglés *Protein Kinase C α*) en los efectos inducidos por la hormona estimulante de la tiroides (TSH, del inglés *Thyroid Stimulating Hormone*) y las hormonas tiroideas (HTs) en células de cáncer de tiroides, así como los mecanismos implicados en la transducción de señales que lleva a estos efectos. Los principales hallazgos del trabajo nos permiten concluir que:

7.1 PKC α se encuentra sobreexpresada en cáncer de tiroides

De un panel de distintas isoformas de PKC en líneas celulares de tiroides, observamos una diferencia significativa entre los niveles de expresión de PKC α y las demás PKC estudiadas, y entre los niveles de PKC α en células de cáncer de tiroides de distintos estadios en comparación con células inmortalizadas no tumorales.

7.2 PKC α participa en la proliferación inducida por TSH en células de PTC

Una vez identificada la expresión del receptor de TSH (TSHR, del inglés *TSH Receptor*) en las líneas celulares utilizadas, observamos que el tratamiento con TSH induce la proliferación de células de cáncer de tiroides papilar. Estos efectos fueron inhibidos significativamente por el tratamiento con ácido ribonucleico de interferencia (siRNA, del inglés *small interference RiboNucleic Acid*) contra PKC α , implicándose a esta proteína como partícipe en los efectos observados.

7.3 PKC α participa en la proliferación inducida por hormonas tiroideas a través de su receptor de membrana en la integrina $\alpha\beta3$ en células de ATC

Luego de identificar la expresión de los receptores nucleares de HTs (TRs, del inglés *Thyroid hormone Receptor*) y el receptor de membrana (mTR) en las líneas celulares estudiadas, vimos que el tratamiento con el inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$, el Cilengitide, modula negativamente la proliferación inducida por HTs. Esto nos permite estimar la importante participación de las vías de señalización desencadenadas a partir de este receptor en la proliferación mediada por las HTs. A su vez, el tratamiento con siRNA contra PKC α también fue capaz de inhibir en gran medida los efectos proliferativos de las HTs. Si bien el

tratamiento con inhibidores pan-PKC también tuvo un efecto inhibitorio de la proliferación por HTs, este fue menor. Estos resultados apoyan la idea de que es necesario un enfoque isoforma específico.

7.4 La proliferación mediada por PKC α en respuesta a TSH y HTs ocurre a través de las vías de ERK y AKT, resultando en el aumento de la expresión de PCNA y aumento de la apoptosis.

El tratamiento con TSH y HTs por tiempos cortos en células a las que se les ha inhibido PKC α resulta en una disminución de los niveles de la quinasa regulada por señal extracelular 1/2 (ERK1/2, del inglés *Extracellular signal Regulated Kinase1/2*) y timoma de la cepa murina AKR (AKT, del inglés *AKR mouse strain Thymoma*) fosforilados. A tiempos largos, el silenciamiento de PKC α también resultó en una disminución de los niveles del marcador de proliferación antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA, del inglés *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) en células de PTC tratadas con ambas hormonas. Por otra parte, si bien de manera independiente de los estímulos hormonales, el silenciamiento de PKC α también resultó en el aumento de caspasa 3 clivada, indicando un aumento de la apoptosis y demostrando así su participación en la evasión a la apoptosis.

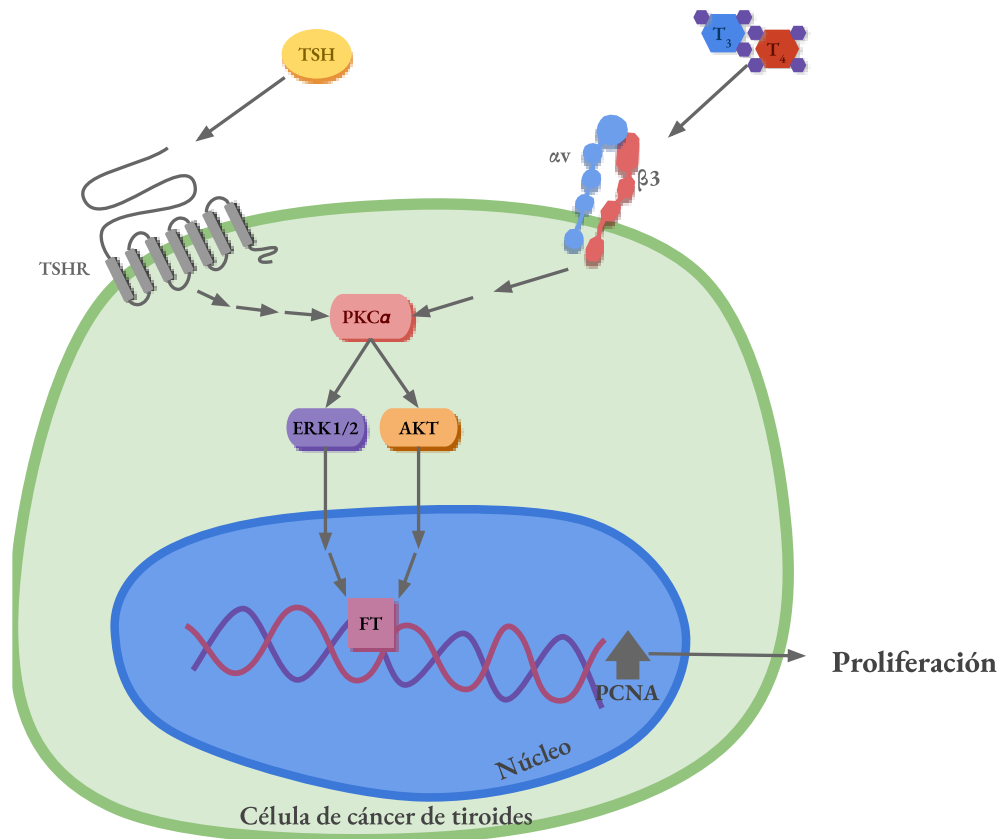


Figura 21: Mecanismos propuestos para los efectos de la TSH y las HTs mediados por PKCα en células de cáncer de tiroides (FT: factor de transcripción).

Por lo tanto, podemos inferir que la proliferación inducida por TSH y por HTs a través de PKCα, activa las vías de ERK1/2 y AKT resultando en un aumento de los niveles de expresión de PCNA (Fig.21).

Finalmente, podemos concluir que la sobreexpresión de PKCα confiere una ventaja sobre el crecimiento tumoral en cáncer de tiroides. Por lo tanto, esta proteína podría actuar como un potencial biomarcador o blanco terapéutico en esta neoplasia.

8 Bibliografía

- ABERA, M.B. y KAZANIETZ, M.G., 2015. Protein kinase C α mediates erlotinib resistance in lung cancer cells. *Molecular Pharmacology*, vol. 87, no. 5, pp. 832-841. ISSN 15210111. DOI 10.1124/mol.115.097725.
- ADVANI, R., LUM, B.L., FISHER, G.A., HALSEY, J., GEARY, R.S., HOLMLUND, J.T., KWOH, T.J., DORR, F.A. y SIKIC, B.I., 2005. A phase I trial of aprinocarsen (ISIS 3521/LY900003), an antisense inhibitor of protein kinase C- α administered as a 24-hour weekly infusion schedule in patients with advanced cancer. *Investigational New Drugs*, vol. 23, no. 5, pp. 467-477. ISSN 01676997. DOI 10.1007/s10637-005-2906-0.
- ADVANI, R., PEETHAMBARAM, P., LUM, B.L., FISHER, G.A., HARTMANN, L., LONG, H.J., HALSEY, J., HOLMLUND, J.T., DORR, A. y SIKIC, B.I., 2004. A Phase II trial of aprinocarsen, an antisense oligonucleotide inhibitor of protein kinase C alpha, administered as a 21-day infusion to patients with advanced ovarian carcinoma. *Cancer* [en línea], vol. 100, no. 2, pp. 321-326. ISSN 0008-543X. DOI 10.1002/cncr.11909. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.11909>.
- AFRASIABI, E., AHLGREN, J., BERGELIN, N. y TÖRNQUIST, K., 2008. Phorbol 12-myristate 13-acetate inhibits FRO anaplastic human thyroid cancer cell proliferation by inducing cell cycle arrest in G1/S phase: Evidence for an effect mediated by PKC δ . *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 292, no. 1-2, pp. 26-35. ISSN 03037207. DOI 10.1016/j.mce.2008.04.018.
- AL-LAZIKANI, B., BANERJI, U. y WORKMAN, P., 2012. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature Biotechnology* [en línea], vol. 30, no. 7, pp. 679-692. ISSN 10870156. DOI 10.1038/nbt.2284. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2284>.
- ALDINGER, K.A., SAMAN, N.A., IBANEZ, M. y HILL, C.S., 1978. Anaplastic carcinoma of the thyroid. A review of 84 cases of spindle and giant cell carcinoma of the thyroid. *Cancer* [en línea], vol. 41, no. 6, pp. 2267-2275. [Consulta: 11 abril 2021]. ISSN 0008-543X. DOI 10.1002/1097-0142(197806)41:6<2267::AID-CNCR2820410627>3.0.CO;2-7. Disponible en: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(197806\)41:6%3C2267::AID-CNCR2820410627%3E3.0.CO;2-7](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(197806)41:6%3C2267::AID-CNCR2820410627%3E3.0.CO;2-7).

American Cancer Society. [en línea], 2020. Disponible en:

<http://www.cancer.org/cancer/thyroidcancer/detailedguide/thyroid-cancer-risk-factors>.

- ASA, S.L., 2019. The Current Histologic Classification of Thyroid Cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 48, no. 1, pp. 1-22. ISSN 15584410. DOI 10.1016/j.ecl.2018.10.001.
- ASSENDER, J.W., GEE, J.M.W., LEWIS, I., ELLIS, I.O., ROBERTSON, J.F.R. y NICHOLSON, R.I., 2007. Protein kinase C isoform expression as a predictor of disease outcome on endocrine therapy in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, vol. 60, no. 11, pp. 1216-1221. ISSN 00219746. DOI 10.1136/jcp.2006.041616.
- BARREIRO ARCOS, M.L., GORELIK, G., KLECHA, A.J., GENARO, A.M. y CREMASCHI, G.A., 2006. Thyroid hormones increase inducible nitric oxide synthase gene expression downstream from PKC- ζ in murine tumor T lymphocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 291, no. 2, pp. 327-336. ISSN 03636143. DOI 10.1152/ajpcell.00316.2005.
- BARREIRO ARCOS, M.L., STERLE, H.A., PAULAZO, M.A., VALLI, E., KLECHA, A.J., ISSE, B., PELLIZAS, C.G., FARIAS, R.N. y CREMASCHI, G.A., 2011. Cooperative nongenomic and genomic actions on thyroid hormone mediated-modulation of T cell proliferation involve up-regulation of thyroid hormone receptor and inducible nitric oxide synthase expression. *Journal of Cellular Physiology*, vol. 226, no. 12, pp. 3208-3218. ISSN 00219541. DOI 10.1002/jcp.22681.
- BECK-PECCOZ, P., RODARI, G., GIAVOLI, C. y LANIA, A., 2017. Central hypothyroidism - a neglected thyroid disorder. *Nature Reviews Endocrinology* [en línea], vol. 13, no. 10, pp. 588-598. ISSN 17595037. DOI 10.1038/nrendo.2017.47. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2017.47>.
- BERGELIN, N., LÖF, C., BALTHASAR, S., KALHORI, V. y TÖRNQUIST, K., 2010. S1P 1 and VEGFR-2 Form a Signaling Complex with Extracellularly Regulated Kinase 1/2 and Protein Kinase C- α Regulating ML-1 Thyroid Carcinoma Cell Migration . *Endocrinology*, vol. 151, no. 7, pp. 2994-3005. ISSN 0013-7227. DOI 10.1210/en.2009-1387.
- BERGH, J.J., LIN, H.Y., LANSING, L., MOHAMED, S.N., DAVIS, F.B., MOUSA, S. y DAVIS, P.J., 2005. Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of

- angiogenesis. *Endocrinology*, vol. 146, no. 7, pp. 2864-2871. ISSN 00137227. DOI 10.1210/en.2005-0102.
- BHATIA, K., BHUMIKA y DAS, A., 2020. Combinatorial drug therapy in cancer - New insights. *Life Sciences* [en línea], vol. 258, no. July, pp. 118134. ISSN 00243205. DOI 10.1016/j.lfs.2020.118134. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118134>.
- BOEHM, E.M., GILDENBERG, M.S. y WASHINGTON, M.T., 2017. The many roles of PCNA in eukaryotic DNA replication. *Physiology & behavior*, vol. 39, pp. 231-254. DOI 10.1016/bs.enz.2016.03.003.
- BOICE, A. y BOUCHIER-HAYES, L., 2020. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* [en línea], vol. 1867, no. 6, pp. 118688. ISSN 18792596. DOI 10.1016/j.bbamcr.2020.118688. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118688>.
- BOURSI, B., HAYNES, K., MAMTANI, R. y YANG, Y.X., 2015. Thyroid dysfunction, thyroid hormone replacement and colorectal cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 107, no. 6, pp. 1-7. ISSN 14602105. DOI 10.1093/jnci/djv084.
- BRAUN, D. y SCHWEIZER, U., 2018. *Thyroid Hormone Transport and Transporters* [en línea]. 1. S.l.: Elsevier Inc. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.vh.2017.04.005>.
- BRENT, G.A., 2012. Mechanisms of thyroid hormone action. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, no. 9, pp. 3035-3043. DOI 10.1172/JCI60047.three.
- BROSE, M.S., NUTTING, C.M., JARZAB, B., ELISEI, R., SIENA, S., BASTHOLT, L., DE LA FOUCHARDIERE, C., PACINI, F., PASCHKE, R., SHONG, Y.K., SHERMAN, S.I., SMIT, J.W.A., CHUNG, J., KAPPELER, C., PEÑA, C., MOLNÁR, I. y SCHLUMBERGER, M.J., 2014. Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: A randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet*, vol. 384, no. 9940, pp. 319-328. ISSN 1474547X. DOI 10.1016/S0140-6736(14)60421-9.
- CABANILLAS, M.E., RYDER, M. y JIMENEZ, C., 2019. Targeted Therapy for Advanced Thyroid Cancer: Kinase Inhibitors and beyond. *Endocrine Reviews*, vol. 40, no. 6, pp. 1573-1604. ISSN 19457189. DOI 10.1210/er.2019-00007.
- CAO, J., ZHANG, M., ZHANG, L., LOU, J., ZHOU, F. y FANG, M., 2021. Non-coding RNA in

- thyroid cancer - Functions and mechanisms. *Cancer Letters*, vol. 496, pp. 117-126. ISSN 18727980. DOI 10.1016/j.canlet.2020.08.021. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.08.021>.
- CARVALHO, D.P. y DUPUY, C., 2013. Role of the NADPH Oxidases DUOX and NOX4 in Thyroid Oxidative Stress. *European Thyroid Journal*, vol. 2, no. 3, pp. 160-167. ISSN 2235-0640. DOI 10.1159/000354745.
- CARVALHO, D.P. y DUPUY, C., 2017. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Molecular and Cellular Endocrinology*, ISSN 18728057. DOI 10.1016/j.mce.2017.01.038.
- CAYROL, F., DIAZ FLAQUÉ, M.C., FERNANDO, T., YANG, S.N., STERLE, H.A., BOLONTRADE, M., AMORÓS, M., ISSE, B., FARÍAS, R.N., AHN, H., TIAN, Y.F., TABBÒ, F., SINGH, A., INGHIRAMI, G., CERCHIETTI, L. y CREMASCHI, G.A., 2015. Integrin $\alpha\beta 3$ acting as membrane receptor for thyroid hormones mediates angiogenesis in malignant T cells. *Blood*, vol. 125, no. 5, pp. 841-851. ISSN 15280020. DOI 10.1182/blood-2014-07-587337.
- CHEN, J.L., STEELE, T.W.J. y STUCKEY, D.C., 2018. Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 115, no. 2, pp. 351-358. ISSN 10970290. DOI 10.1002/bit.26475.
- CHEN, S., SHIEH, H., LIN, J., CHANG, K. y LIN, K., 2000. Overexpression of thyroid hormone receptor beta1 is associated with thyrotropin receptor gene expression and proliferation in a human thyroid carcinoma cell line. *Journal of Endocrinology* [en línea], vol. 165, no. 2, pp. 379-389. ISSN 0022-0795. DOI 10.1677/joe.0.1650379. Disponible en: <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/165/2/379.xml>.
- CHEN, X., WU, Q., TAN, L., PORTER, D., JAGER, M.J., EMERY, C. y BASTIAN, B.C., 2014. Combined PKC and MEK inhibition in uveal melanoma with GNAQ and GNA11 mutations. *Oncogene*, vol. 33, no. 39, pp. 4724-4734. ISSN 14765594. DOI 10.1038/onc.2013.418.
- CHENG, S.Y., LEONARD, J.L. y DAVIS, P.J., 2010. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine Reviews*, vol. 31, no. 2, pp. 139-170. ISSN 0163769X. DOI 10.1210/er.2009-0007.
- CHU, Y.-D. y YEH, C.-T., 2020. The Molecular Function and Clinical Role of Thyroid

- Stimulating Hormone Receptor in Cancer Cells. *Cells* [en línea], vol. 9, no. 7, pp. 1730. [Consulta: 4 marzo 2021]. ISSN 2073-4409. DOI 10.3390/cells9071730. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32698392/>.
- CITTERIO, C.E., TARGOVNIK, H.M. y ARVAN, P., 2019. The role of thyroglobulin in thyroid hormonogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 15, no. 6, pp. 323-338. ISSN 17595037. DOI 10.1038/s41574-019-0184-8.
- CLARK, A.S., WEST, K.A., BLUMBERG, P.M. y DENNIS, P.A., 2003. Altered protein kinase C (PKC) isoforms in non-small cell lung cancer cells: PKC δ promotes cellular survival and chemotherapeutic resistance. *Cancer Research*, vol. 63, no. 4, pp. 780-786. ISSN 00085472.
- CODY, V., DAVIS, P.J. y DAVIS, F.B., 2007. Molecular modeling of the thyroid hormone interactions with $\alpha\beta 3$ integrin. *Steroids*, vol. 72, no. 2, pp. 165-170. ISSN 0039128X. DOI 10.1016/j.steroids.2006.11.008.
- COOKE, M., CASADO-MEDRANO, V., ANN, J., LEE, J., BLUMBERG, P.M., ABBA, M.C. y KAZANIETZ, M.G., 2019. Differential Regulation of Gene Expression in Lung Cancer Cells by Diacylglycerol-Lactones and a Phorbol Ester Via Selective Activation of Protein Kinase C Isozymes. *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, pp. 1-15. ISSN 20452322. DOI 10.1038/s41598-019-42581-4.
- COOKE, M., MAGIMAIDAS, A., CASADO-MEDRANO, V. y KAZANIETZ, M.G., 2017. Protein kinase C in cancer: The top five unanswered questions. *Molecular Carcinogenesis*, vol. 56, no. 6, pp. 1531-1542. ISSN 10982744. DOI 10.1002/mc.22617.
- COOKE, M., ZHOU, X., CASADO-MEDRANO, V., LOPEZ-HABER, C., BAKER, M.J., GARG, R., ANN, J., LEE, J., BLUMBERG, P.M. y KAZANIETZ, M.G., 2018. Characterization of AJH-836, a diacylglycerol-lactone with selectivity for novel PKC isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 293, no. 22, pp. 8330-8834. ISSN 1083351X. DOI 10.1074/jbc.RA117.000235.
- COOPER, D.S. y BIONDI, B., 2012. Subclinical thyroid disease. *The Lancet* [en línea], vol. 379, no. 9821, pp. 1142-1154. ISSN 01406736. DOI 10.1016/S0140-6736(11)60276-6. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60276-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60276-6).
- CRISPO, F., NOTARANGELO, T., PIETRAFESA, M., LETTINI, G., STORTO, G., SGAMBATO, A., MADDALENA, F. y LANDRISCINA, M., 2019. BRAF Inhibitors in

- Thyroid Cancer: Clinical Impact, Mechanisms of Resistance and Future Perspectives. *Cancers* [en línea], vol. 11, no. 9, pp. 1388. ISSN 2072-6694. DOI 10.3390/cancers11091388. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/9/1388>.
- DAVIS, F.B., TANG, H.Y., SHIH, A., KEATING, T., LANSING, L., HERCBERGS, A., FENSTERMAKER, R.A., MOUSA, A., MOUSA, S.A., DAVIS, P.J. y LIN, H.Y., 2006. Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. *Cancer Research*, vol. 66, no. 14, pp. 7270-7275. ISSN 00085472. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-05-4365.
- DAVIS, P.J., ASHUR-FABIAN, O., INCERPI, S. y MOUSA, S.A., 2019. Editorial: Non Genomic Actions of Thyroid Hormones in Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, vol. 10, no. 847, pp. 1-2. DOI 10.3389/fendo.2019.00847.
- DAVIS, P.J., DAVIS, F.B., MOUSA, S.A., LUIDENS, M.K. y LIN, H.Y., 2011. Membrane receptor for thyroid hormone: Physiologic and pharmacologic implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 51, pp. 99-115. ISSN 03621642. DOI 10.1146/annurev-pharmtox-010510-100512.
- DAVIS, P.J., GOGLIA, F. y LEONARD, J.L., 2016. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nature Reviews Endocrinology* [en línea], vol. 12, no. 2, pp. 111-121. ISSN 17595037. DOI 10.1038/nrendo.2015.205. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2015.205>.
- DE CREVOISIER, R., BAUDIN, E., BACHELOT, A., LEBoulLEUX, S., TRAVAGLI, J.-P., CAILLOU, B. y SCHLUMBERGER, M., 2004. Combined treatment of anaplastic thyroid carcinoma with surgery, chemotherapy, and hyperfractionated accelerated external radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, vol. 60, no. 4, pp. 1137-1143. ISSN 0360-3016 (Print). DOI 10.1016/j.ijrobp.2004.05.032.
- DETJEN, K.M., BREMBECK, F.H., WELZEL, M., KAISER, A., HALLER, H., WIEDENMANN, B. y ROSEWICZ, S., 2000. Activation of protein kinase C α inhibits growth of pancreatic cancer cells via p21(cip)-mediated G1 arrest. *Journal of Cell Science*, vol. 113, no. 17, pp. 3025-3035. ISSN 00219533.
- DÍAZ FLAQUÉ, M.C., CAYROL, M.F., STERLE, H.A., DEL ROSARIO ASCHERO, M., DÍAZ ALBUJA, J.A., ISSE, B., FARÍAS, R.N., CERCHIETTI, L., ROSEMBLIT, C. y CREMASCHI, G.A., 2019. Thyroid hormones induce doxorubicin chemosensitivity through

- enzymes involved in chemotherapy metabolism in lymphoma T cells. *Oncotarget*, vol. 10, no. 32, pp. 3051-3065. ISSN 19492553. DOI 10.18632/oncotarget.26890.
- DUMONT, J.E., LAMY, F., ROGER, P. y MAENHAUT, C., 1992. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiological Reviews*, vol. 72, no. 3, pp. 667-697. ISSN 00319333. DOI 10.1152/physrev.1992.72.3.667.
- DURANTE, C., PUXEDDU, E., FERRETTI, E., MORISI, R., MORETTI, S., BRUNO, R., BARBI, F., AVENIA, N., SCIPIONI, A., VERRIENTI, A., TOSI, E., CAVALIERE, A., GULINO, A., FILETTI, S. y RUSSO, D., 2007. Brief report: BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 92, no. 7, pp. 2840-2843. ISSN 0021972X. DOI 10.1210/jc.2006-2707.
- ELLERHORST, J.A., SENDI-NADERI, A., JOHNSON, M.K., COOKE, C.P., DANG, S.M. y DIWAN, A.H., 2006. Human melanoma cells express functional receptors for thyroid-stimulating hormone. *Endocrine-Related Cancer*, vol. 13, no. 4, pp. 1269-1277. ISSN 13510088. DOI 10.1677/erc.1.01239.
- FERNANDEZ, N., CALOCA, M.J., PRENDERGAST, G. V., MEINKOTH, J.L. y KAZANIETZ, M.G., 2000. Atypical Protein Kinase C- ζ Stimulates Thyrotropin-Independent Proliferation in Rat Thyroid Cells 1. *Endocrinology* [en línea], vol. 141, no. 1, pp. 146-152. ISSN 0013-7227. DOI 10.1210/endo.141.1.7278. Disponible en: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo.141.1.7278>.
- FLAMANT, F. y SAMARUT, J., 2003. Thyroid hormone receptors: Lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 14, no. 2, pp. 85-90. ISSN 10432760. DOI 10.1016/S1043-2760(02)00043-7.
- FRIEDMAN, S., LU, M., SCHULTZ, A., THOMAS, D. y LIN, R., 2009. CD133+ Anaplastic Thyroid Cancer Cells Initiate Tumors in Immunodeficient Mice and Are Regulated by Thyrotropin. En: B. BREANT (ed.), *PLoS ONE* [en línea], vol. 4, no. 4, pp. e5395. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0005395. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0005395>.
- GARCÍA-JIMÉNEZ, C. y SANTISTEBAN, P., 2007. TSH Signalling And Cancer. *Archivos*

Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, vol. 51, no. 5, pp. 654-671. DOI <https://doi.org/10.1590/s0004-27302007000500003>.

GARG, R., BENEDETTI, L.G., ABERA, M.B., WANG, H., ABBA, M. y KAZANIETZ, M.G., 2014. Protein kinase C and cancer: What we know and what we do not. *Oncogene*, vol. 33, no. 45, pp. 5225-5237. ISSN 14765594. DOI 10.1038/onc.2013.524.

GARNER, D. y SHOBACK, D., 2015. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology Textbook*. 9th. S.l.: McGraw-Hill. ISBN 978-0071622431.

GÉRARD, A.C., DAUMERIE, C., MESTDAGH, C., GOHY, S., DE BURBURE, C., COSTAGLIOLA, S., MIOT, F., NOLLEVAUX, M.C., DENEFF, J.F., RAHIER, J., FRANC, B., DE VIJLDER, J.J.M., COLIN, I.M. y MANY, M.C., 2003. Correlation between the Loss of Thyroglobulin Iodination and the Expression of Thyroid-Specific Proteins Involved in Iodine Metabolism in Thyroid Carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 88, no. 10, pp. 4977-4983. ISSN 0021972X. DOI 10.1210/jc.2003-030586.

GIAMMANCO, M., DI LIEGRO, C.M., SCHIERA, G. y DI LIEGRO, I., 2020. Genomic and non-genomic mechanisms of action of thyroid hormones and their catabolite 3,5-diiodo-L-thyronine in Mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 11, pp. 1-40. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms21114140.

GLINSKII, A.B., GLINSKY, G. V., LIN, H.Y., TANG, H.Y., SUN, M., DAVIS, F.B., LUIDENS, M.K., MOUSA, S.A., HERCBERGS, A.H. y DAVIS, P.J., 2009. Modification of survival pathway gene expression in human breast cancer cells by tetraiodothyroacetic acid (tetrac). *Cell Cycle*, vol. 8, no. 21, pp. 3562-3570. ISSN 15514005. DOI 10.4161/cc.8.21.9963.

Global Cancer Observatory. [en línea], 2020. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/>.

GNONI, G. V., ROCHIRA, A., LEONE, A., DAMIANO, F., MARSIGLIANTE, S. y SICULELLA, L., 2012. 3,5,3'triiodo-L-thyronine induces SREBP-1 expression by non-genomic actions in human HEP G2 cells. *Journal of Cellular Physiology*, vol. 227, no. 6, pp. 2388-2397. ISSN 00219541. DOI 10.1002/jcp.22974.

GÖKMEN-POLAR, Y., MURRAY, N.R., VELASCO, M.A., GATALICA, Z. y FIELDS, A.P., 2001. Elevated protein kinase C β II is an early promotive event in colon carcinogenesis. *Cancer Research*, vol. 61, no. 4, pp. 1375-1381. ISSN 00085472.

- GOLDMAN, J.M., GOREN, E.N., COHEN, M.H., WEBBER, B.L., BRENNAN, M.F. y ROBBINS, J., 1980. Anaplastic thyroid carcinoma: Long-term survival after radical surgery. *Journal of Surgical Oncology*, vol. 14, no. 4, pp. 389-394. ISSN 10969098. DOI 10.1002/jso.2930140413.
- GORIN, M.A. y PAN, Q., 2009. Protein kinase C ϵ : An oncogene and emerging tumor biomarker. *Molecular Cancer*, vol. 8, pp. 1-8. ISSN 14764598. DOI 10.1186/1476-4598-8-9.
- GRINER, E.M. y KAZANIETZ, M.G., 2007. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Reviews Cancer*, vol. 7, no. 4, pp. 281-294. ISSN 1474175X. DOI 10.1038/nrc2110.
- GROSSMAN, S.A., ALAVI, J.B., SUPKO, J.G., CARSON, K.A., PRIET, R., DORR, F.A., GRUNDY, J.S. y HOLMLUND, J.T., 2005. Efficacy and toxicity of the antisense oligonucleotide aprinocarsen directed against protein kinase C- α delivered as a 21-day continuous intravenous infusion in patients with recurrent high-grade astrocytomas. *Neuro-Oncology*, vol. 7, no. 1, pp. 32-40. ISSN 15228517. DOI 10.1215/S1152851703000353.
- GUPTA, A.K., GALOFORO, S.S., BERNS, C.M., MARTINEZ, A.A., CORRY, P.M., GUAN, K.L. y LEE, Y.J., 1996. Elevated levels of ERK2 in human breast carcinoma MCF-7 cells transfected with protein kinase C α . *Cell Proliferation*, vol. 29, no. 12, pp. 655-663. ISSN 09607722. DOI 10.1111/j.1365-2184.1996.tb00979.x.
- GUYTON, A.C., 2011. *Textbook of Medical Physiology*. 12th. Philadelphia, PA: Elsevier.
- HADDAD, T., QIN, R., LUPU, R., SATELE, D., EADENS, M., GOETZ, M.P., ERLICHMAN, C. y MOLINA, J., 2017. A phase I study of cilengitide and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 79, no. 6, pp. 1221-1227. ISSN 14320843. DOI 10.1007/s00280-017-3322-9.
- HAIGH, P.I., ITUARTE, P.H., WU, H.S., TRESELER, P.A., POSNER, M.D., QUIVEY, J.M., DUH, Q.Y. y CLARK, O.H., 2001. Completely resected anaplastic thyroid carcinoma combined with adjuvant chemotherapy and irradiation is associated with prolonged survival. *Cancer*, vol. 91, no. 12, pp. 2335-2342. ISSN 0008-543X (Print).
- HAN, J.M., KIM, T.Y., JEON, M.J., YIM, J.H., KIM, W.G., SONG, D.E., HONG, S.J., BAE, S.J., KIM, H.K., SHIN, M.H., SHONG, Y.K. y KIM, W.B., 2013. Obesity is a risk factor for thyroid cancer in a large, ultrasonographically screened population. *European Journal of*

Endocrinology, vol. 168, no. 6, pp. 879-886. ISSN 08044643. DOI 10.1530/EJE-13-0065.

- HANAHAN, D. y WEINBERG, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* [en línea], vol. 100, no. 1, pp. 57-70. ISSN 00928674. DOI 10.1016/S0092-8674(00)81683-9. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400816839>.
- HAUGEN, B.R., ALEXANDER, E.K., BIBLE, K.C., DOHERTY, G.M., MANDEL, S.J., NIKIFOROV, Y.E., PACINI, F., RANDOLPH, G.W., SAWKA, A.M., SCHLUMBERGER, M., SCHUFF, K.G., SHERMAN, S.I., SOSA, J.A., STEWARD, D.L., TUTTLE, R.M. y WARTOFSKY, L., 2016. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*, vol. 26, no. 1, pp. 1-133. ISSN 15579077. DOI 10.1089/thy.2015.0020.
- HERNANDEZ, B.Y., RAHMAN, M., LOO, L.W.M., CHAN, O.T.M., HORIO, D., MORITA, S. y BRYANT-GREENWOOD, G., 2021. BRAFV600E, hypothyroidism, and human relaxin in thyroid carcinogenesis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* [en línea], vol. 147, no. 1, pp. 183-194. ISSN 0171-5216. DOI 10.1007/s00432-020-03401-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03401-9>.
- HIZLI, A.A., BLACK, A.R., PYSZ, M.A. y BLACK, J.D., 2006. Protein kinase C α signaling inhibits cyclin D1 translation in intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 21, pp. 14596-14603. ISSN 00219258. DOI 10.1074/jbc.M601959200.
- HOELTING, T., TEZELMAN, S., SIPERSTEIN, A.E., DUH, Q.-Y. y CLARK, O.H., 1993. Thyrotropin Stimulates Invasion and Growth of follicular cancer cells via PKC- Rather than PKA Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 195, no. 3, pp. 1230-1236. DOI 10.1006/bbrc.1993.2176.
- HOFFMANN, S., HOFBAUER, L.C., SCHARRENBACH, V., WUNDERLICH, A., HASSAN, I., LINGELBACH, S. y ZIELKE, A., 2004. Thyrotropin (TSH)-induced production of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cells in vitro: Evaluation of TSH signal transduction and of angiogenesis-stimulating growth factors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 89, no. 12, pp. 6139-6145. ISSN 0021972X. DOI 10.1210/jc.2004-1260.
-

- HOFFMANN, S., MASCHUW, K., HASSAN, I., RECKZEH, B., WUNDERLICH, A., LINGELBACH, S. y ZIELKE, A., 2005. Differential pattern of integrin receptor expression in differentiated and anaplastic thyroid cancer cell lines. *Thyroid*, vol. 15, no. 9, pp. 1011-1020. ISSN 10507256. DOI 10.1089/thy.2005.15.1011.
- HOUSE, C. y KEMP, B.E., 1987. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science*, vol. 238, no. 4834, pp. 1726-1728. ISSN 00368075. DOI 10.1126/science.3686012.
- HSU, Y.H., YAO, J., CHAN, L.C., WU, T.J., HSU, J.L., FANG, Y.F., WEI, Y., WU, Y., HUANG, W.C., LIU, C.L., CHANG, Y.C., WANG, M.Y., LI, C.W., SHEN, J., CHEN, M.K., SAHIN, A.A., SOOD, A., MILLS, G.B., YU, D., HORTOBAGYI, G.N. y HUNG, M.C., 2014. Definition of PKC- α , CDK6, and MET as therapeutic targets in triple-negative breast cancer. *Cancer Research*, vol. 74, no. 17, pp. 4822-4835. ISSN 15387445. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-14-0584.
- HUBERMAN, E. y CALLAHAM, M.F., 1979. Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor promoting agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 76, no. 3, pp. 1293-1297. ISSN 00278424. DOI 10.1073/pnas.76.3.1293.
- Hypothyroidism (Underactive Thyroid). [en línea], 2012. Disponible en: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/endocrine-diseases/hypothyroidism>.
- ISAKOV, N., 2018. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Seminars in Cancer Biology* [en línea], vol. 48, pp. 36-52. ISSN 10963650. DOI 10.1016/j.semcancer.2017.04.012. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.012>.
- JAKEN, S., 1996. Protein kinase C isozymes and substrates. *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 8, no. 2, pp. 168-173. ISSN 09550674. DOI 10.1016/S0955-0674(96)80062-7.
- KANG, J.-H., 2014. Protein Kinase C (PKC) Isozymes and Cancer. *New Journal of Science*, vol. 2014, pp. 1-36. ISSN 2356-7740. DOI 10.1155/2014/231418.
- KANG, J.H., ASAI, D., TOITA, R., KITAZAKI, H. y KATAYAMA, Y., 2009. Plasma protein kinase C (PKC) α as a biomarker for the diagnosis of cancers. *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 11, pp. 1927-1931. ISSN 01433334. DOI 10.1093/carcin/bgp210.

- KANG, J.H., MORI, T., KITAZAKI, H., NIIDOME, T., TAKAYAMA, K., NAKANISHI, Y. y KATAYAMA, Y., 2013. Serum protein kinase C α as a diagnostic biomarker of cancers. *Cancer Biomarkers*, vol. 13, no. 2, pp. 99-103. ISSN 15740153. DOI 10.3233/CBM-130340.
- KIM, K.M., KANG, D.W., MOON, W.S., PARK, J.B., PARK, C.K., SOHN, J.H., JEONG, J.S., CHO, M.Y., JIN, S.Y., CHOI, J.S. y KANG, D.Y., 2006. PKC θ expression in gastrointestinal stromal tumor. *Modern Pathology*, vol. 19, no. 11, pp. 1480-1486. ISSN 08933952. DOI 10.1038/modpathol.3800673.
- KOBAYASHI, K., SHAVER, J.K., LIANG, W., SIPERSTEIN, A.E., DUH, Q.-Y. y CLARK, O.H., 1993. Increased Phospholipase C Activity in Neoplastic Thyroid Membrane. *Thyroid* [en línea], vol. 3, no. 1, pp. 25-29. ISSN 1050-7256. DOI 10.1089/thy.1993.3.25. Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/thy.1993.3.25>.
- KOIKE, K., FUJII, T., NAKAMURA, A.M., YOKOYAMA, G., YAMANA, H., KUWANO, M. y SHIROUZU, K., 2006. Activation of protein kinase C δ induces growth arrest in NPA thyroid cancer cells through extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *Thyroid*, vol. 16, no. 4, pp. 333-341. ISSN 10507256. DOI 10.1089/thy.2006.16.333.
- KRASHIN, E., PIEKIELKO-WITKOWSKA, A., ELLIS, M. y ASHUR-FABIAN, O., 2019. Thyroid hormones and cancer: A comprehensive review of preclinical and clinical studies. *Frontiers in Endocrinology*, vol. 10, no. FEB, pp. 1-23. ISSN 16642392. DOI 10.3389/fendo.2019.00059.
- LAHN, M., KÖHLER, G., SUNDELL, K., SU, C., LI, S., PATERSON, B.M. y BUMOL, T.F., 2004. Protein kinase C alpha expression in breast and ovarian cancer. *Oncology*, vol. 67, no. 1, pp. 1-10. ISSN 00302414. DOI 10.1159/000080279.
- LANDA, I., IBRAHIMPASIC, T., BOUCAI, L., SINHA, R., KNAUF, J.A., SHAH, R.H., DOGAN, S., RICARTE-FILHO, J.C., KRISHNAMOORTHY, G.P., XU, B., SCHULTZ, N., BERGER, M.F., SANDER, C., TAYLOR, B.S., GHOSSEIN, R., GANLY, I. y FAGIN, J.A., 2016. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *Journal of Clinical Investigation* [en línea], vol. 126, no. 3, pp. 1052-1066. ISSN 0021-9738. DOI 10.1172/JCI85271. Disponible en: <https://www.jci.org/articles/view/85271>.

- LAURENT, E., MOCKEL, J., VAN SANDE, J., GRAFF, I. y DUMONT, J.E., 1987. Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid. *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 52, no. 3, pp. 273-278. ISSN 03037207. DOI 10.1016/0303-7207(87)90055-4.
- LAZAR, M.A., 2003. Thyroid hormone action: A binding contract. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, no. 4, pp. 497-499. ISSN 00219738. DOI 10.1172/JCI19479.
- LAZAR, V., BIDART, J.M., CAILLOU, B., MAHÉ, C., LACROIX, L., FILETTI, S. y SCHLUMBERGER, M., 1999. Expression of the Na⁺/I⁻ symporter gene in human thyroid tumors: A comparison study with other thyroid-specific genes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 84, no. 9, pp. 3228-3234. ISSN 0021972X. DOI 10.1210/jc.84.9.3228.
- LAZZARA, D.R., ZARKHIN, S.G., RUBENSTEIN, S.N. y GLICK, B.P., 2019. Melanoma and Thyroid Carcinoma: Our Current Understanding. *Brief Review*, vol. 12, no. 9, pp. 39-41.
- LIN, H.Y., TANG, H.Y., SHIH, A., KEATING, T., CAO, G., DAVIS, P.J. y DAVIS, F.B., 2007. Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic. *Steroids*, vol. 72, no. 2, pp. 180-187. ISSN 0039128X. DOI 10.1016/j.steroids.2006.11.014.
- LITTLE, A.G., 2018. *Local Regulation of Thyroid Hormone Signaling* [en línea]. 1. S.l.: Elsevier Inc. ISBN 9780128141168. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.vh.2017.06.004>.
- LIU, X., ZHENG, N., SHI, Y.N., YUAN, J. y LI, L., 2014. Thyroid hormone induced angiogenesis through the integrin $\alpha\beta 3$ /protein kinase D/histone deacetylase 5 signaling pathway. *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 52, no. 3, pp. 245-254. ISSN 14796813. DOI 10.1530/JME-13-0252.
- LIU, Y.C., YEH, C.T. y LIN, K.H., 2019. Molecular functions of thyroid hormone signaling in regulation of cancer progression and anti-apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 4986, pp. 1-27. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms21103554.
- LIVAK, K.J. y SCHMITTGEN, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402-408. ISSN 10462023. DOI 10.1006/meth.2001.1262.
- LLORENS, M.C., ROSSI, F.A., GARCÍA, I.A., COOKE, M., ABBA, M.C., LOPEZ-HABER,

- C., BARRIO-REAL, L., VAGLIENTI, M.V., ROSSI, M., BOCCO, J.L., KAZANIETZ, M.G. y SORIA, G., 2019. PKC α Modulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Invasiveness of Breast Cancer Cells Through ZEB1. *Frontiers in Oncology*, vol. 9, no. November, pp. 1-15. ISSN 2234943X. DOI 10.3389/fonc.2019.01323.
- LØNNE, G.K., CORNMAR, L., ZAHIROVIC, I.O., LANDBERG, G., JIRSTRÖM, K. y LARSSON, C., 2010. PKC α expression is a marker for breast cancer aggressiveness. *Molecular Cancer*, vol. 9, pp. 1-14. ISSN 14764598. DOI 10.1186/1476-4598-9-76.
- LUSTER, M., FELBINGER, R., DIETLEIN, M. y REINERS, C., 2005. Thyroid hormone withdrawal in patients with differentiated thyroid carcinoma: A one hundred thirty-patient pilot survey on consequences of hypothyroidism and a pharmaco-economic comparison to recombinant thyrotropin administration. *Thyroid*, vol. 15, no. 10, pp. 1147-1155. ISSN 10507256. DOI 10.1089/thy.2005.15.1147.
- MACKAY, H.J. y TWELVES, C.J., 2007. Targeting the protein kinase C family: Are we there yet? *Nature Reviews Cancer*, vol. 7, no. 7, pp. 554-562. ISSN 1474175X. DOI 10.1038/nrc2168.
- MAENHAUT, C., CHRISTOPHE, D., VASSART, G., DUMONT, J., ROGER, P. y OPITZ, R., 2000. Ontogeny, Anatomy, Metabolism and Physiology of the Thyroid. *Endotext* [en línea], no. 7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905409>.
- MAGNIFICO, A., ALBANO, L., CAMPANER, S., CAMPIGLIO, M., PILOTTI, S., MÉNARD, S. y TAGLIABUE, E., 2007. Protein kinase CA determines HER2 fate in breast carcinoma cells with HER2 protein overexpression without gene amplification. *Cancer Research*, vol. 67, no. 11, pp. 5308-5317. ISSN 00085472. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-06-3936.
- MAHAPATRA, L., ANDRUSKA, N., MAO, C., GRUBER, S.B., JOHNSON, T.M., FULLEN, D.R., RASKIN, L. y SHAPIRO, D.J., 2019. Protein kinase C- α is upregulated by IMP1 in melanoma and is linked to poor survival. *Melanoma Res.*, vol. 29, no. 5, pp. 539-543. DOI 10.1097/CMR.0000000000000558.Protein.
- MANDIL, R., ASHKENAZI, E., BLASS, M., KRONFELD, I., KAZIMIRSKY, G., ROSENTHAL, G., UMANSKY, F., LORENZO, P.S., BLUMBERG, P.M. y BRODIE, C., 2001. Protein kinase C α and protein kinase C δ play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells. *Cancer Research*, vol. 61, no. 11, pp. 4612-4619. ISSN 00085472.

- MAS-MORUNO, C., RECHENMACHER, F. y KESSLER, H., 2010. Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation. *Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. S.l.:
- MCDERMOTT, M.T. y RIDGWAY, E.C., 1998. Central hyperthyroidism. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 27, no. 1, pp. 187-203. ISSN 08898529. DOI 10.1016/S0889-8529(05)70306-6.
- MEDAS, F., ERDAS, E., CANU, G.L., LONGHEU, A., PISANO, G., TUVERI, M. y CALÒ, P.G., 2018. Does hyperthyroidism worsen prognosis of thyroid carcinoma? A retrospective analysis on 2820 consecutive thyroidectomies. *Journal of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, vol. 47, no. 1, pp. 2-7. ISSN 19160216. DOI 10.1186/s40463-018-0254-2.
- MEDICI, M., EDWARD VISSER, W., VISSER, T.J. y PEETERS, R.P., 2015. Genetic determination of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis: Where do we stand? *Endocrine Reviews*, vol. 36, no. 2, pp. 214-244. ISSN 0163769X. DOI 10.1210/er.2014-1081.
- MELMED, S., POLONSKY, K.S., LARSEN, P.R. y KRONENBERG, H.M., 2011. *Williams Textbook of Endocrinology* [en línea]. 12th. S.l.: Elsevier. ISBN 9781437703245. Disponible en: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.308.6942.1512c>.
- MICHIE, A.M. y NAKAGAWA, R., 2005. The link between PKC α regulation and cellular transformation. *Immunology Letters*, vol. 96, no. 2, pp. 155-162. ISSN 01652478. DOI 10.1016/j.imlet.2004.08.013.
- MOCHLY-ROSEN, D., DAS, K. y GRIMES, K. V., 2012. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nature Reviews Drug Discovery* [en línea], vol. 11, no. 12, pp. 937-957. ISSN 1474-1776. DOI 10.1038/nrd3871. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.
- MOCHLY-ROSEN, D. y GORDON, A.S., 1998. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 12, no. 1, pp. 35-42. ISSN 0892-6638 (Print).
- MOMESSO, D.P. y TUTTLE, R.M., 2014. Update on differentiated thyroid cancer staging. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* [en línea], vol. 43, no. 2, pp. 401-421. ISSN 15584410. DOI 10.1016/j.ecl.2014.02.010. Disponible en:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2014.02.010>.

- MOSCAT, J., DIAZ-MECO, M.T., ALBERT, A. y CAMPUZANO, S., 2006. Cell Signaling and Function Organized by PB1 Domain Interactions. *Molecular Cell*, vol. 23, no. 5, pp. 631-640. ISSN 10972765. DOI 10.1016/j.molcel.2006.08.002.
- MOUROUZIS, I., LAVECCHIA, A.M. y XINARIS, C., 2020. Thyroid Hormone Signalling: From the Dawn of Life to the Bedside. *Journal of Molecular Evolution* [en línea], vol. 88, no. 1, pp. 88-103. ISSN 14321432. DOI 10.1007/s00239-019-09908-1. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09908-1>.
- MULLUR, R., LIU, Y.Y. y BRENT, G.A., 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological Reviews*, vol. 94, no. 2, pp. 355-382. ISSN 15221210. DOI 10.1152/physrev.00030.2013.
- NEWTON, A.C., 1995. Protein kinase C: Structure, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 48, pp. 28495-28498. ISSN 00219258. DOI 10.1074/jbc.270.48.28495.
- NEWTON, A.C., 1997. Regulation of protein kinase C. *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 9, no. 2, pp. 161-167. ISSN 09550674. DOI 10.1016/S0955-0674(97)80058-0.
- NEWTON, A.C., 2001. Protein kinase C: Structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chemical Reviews*, vol. 101, no. 8, pp. 2353-2364. ISSN 00092665. DOI 10.1021/cr0002801.
- NEWTON, A.C., 2003. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: Protein kinase C as a paradigm. *Biochemical Journal*, vol. 370, no. 2, pp. 361-371. ISSN 02646021. DOI 10.1042/BJ20021626.
- OAKLEY, G.M., CURTIN, K., LAYFIELD, L., JARBOE, E., BUCHMANN, L.O. y HUNT, J.P., 2014. Increased Melanoma Risk in Individuals With Papillary Thyroid Carcinoma. *JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery* [en línea], vol. 140, no. 5, pp. 423. ISSN 2168-6181. DOI 10.1001/jamaoto.2014.78. Disponible en: <http://archotol.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoto.2014.78>.
- OHTA, K., ENDO, T. y ONAYA, T., 1991. The mRNA levels of thyrotropin receptor, thyroglobulin and thyroid peroxidase in neoplastic human thyroid tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 174, no. 3, pp. 1148-1153. DOI 10.1016/0006-

291X(91)91540-S.

- ŌMURA, S., ASAMI, Y. y CRUMP, A., 2018. Staurosporine: new lease of life for parent compound of today's novel and highly successful anti-cancer drugs. *Journal of Antibiotics*, vol. 71, no. 8, pp. 688-701. ISSN 18811469. DOI 10.1038/s41429-018-0029-z.
- ORTIGA-CARVALHO, T.M., CHIAMOLERA, M.I., PAZOS-MOURA, C.C. y WONDISFORD, F.E., 2016. Hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Comprehensive Physiology*, vol. 6, no. 3, pp. 1387-1428. ISSN 20404603. DOI 10.1002/cphy.c150027.
- PARKER, R., VELLA, L.J., XAVIER, D., AMIRKHANI, A., PARKER, J., CEBON, J. y MOLLOY, M.P., 2015. Phosphoproteomic analysis of cell-based resistance to BRAF inhibitor therapy in melanoma. *Frontiers in Oncology*, vol. 5, no. MAY, pp. 1-13. ISSN 2234943X. DOI 10.3389/fonc.2015.00095.
- PELLEGRITI, G., FRASCA, F., REGALBUTO, C., SQUATRITO, S. y VIGNERI, R., 2013. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: Update on epidemiology and risk factors. *Journal of Cancer Epidemiology*, vol. 2013. ISSN 16878558. DOI 10.1155/2013/965212.
- PILLI, T., PRASAD, K. V., JAYARAMA, S., PACINI, F. y PRABHAKAR, B.S., 2009. Potential utility and limitations of thyroid cancer cell lines as models for studying thyroid cancer. *Thyroid*, vol. 19, no. 12, pp. 1333-1342. ISSN 10507256. DOI 10.1089/thy.2009.0195.
- PINTO-VALDIVIA, M., ORTIZ-TORRES, M., VILLENA-CHÁVEZ, J. y CHIAN-GARCÍA, C., 2012. Cáncer anaplásico de tiroides. Reporte de caso. *Revista Medica Herediana*, vol. 23, no. 2, pp. 116-119. ISSN 1018-130X. DOI 10.20453/rmh.v23i2.1040.
- POZDEYEV, N., GAY, L.M., SOKOL, E.S., HARTMAIER, R., DEEVER, K.E., DAVIS, S., FRENCH, J.D., BORRE, P. Vanden, LABARBERA, D. V., TAN, A.-C., SCHWEPPE, R.E., FISHBEIN, L., ROSS, J.S., HAUGEN, B.R. y BOWLES, D.W., 2018. Genetic Analysis of 779 Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancers. *Clinical Cancer Research* [en línea], vol. 24, no. 13, pp. 3059-3068. ISSN 1078-0432. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-18-0373. Disponible en: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-18-0373>.
- PRETE, A., BORGES DE SOUZA, P., CENSI, S., MUZZA, M., NUCCI, N. y SPONZIELLO, M., 2020. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Frontiers in*

Endocrinology, vol. 11, no. March, pp. 1-10. ISSN 16642392. DOI 10.3389/fendo.2020.00102.

- REARDON, D.A., NABORS, L.B., STUPP, R. y MIKKELSEN, T., 2008. Cilengitide: an integrin-targeting arginine–glycine–aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme. *Expert Opinion on Investigational Drugs* [en línea], vol. 17, no. 8, pp. 1225-1235. ISSN 1354-3784. DOI 10.1517/13543784.17.8.1225. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543784.17.8.1225>.
- REBBAA, A., CHU, F., DAVIS, F.B., DAVIS, P.J. y MOUSA, S.A., 2008. Novel function of the thyroid hormone analog tetraiodothyroacetic acid: A cancer chemosensitizing and anti-cancer agent. *Angiogenesis*, vol. 11, no. 3, pp. 269-276. ISSN 09696970. DOI 10.1007/s10456-008-9110-8.
- RIVAS, M. y SANTISTEBAN, P., 2003. TSH-activated signaling pathways in thyroid tumorigenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 213, no. 1, pp. 31-45. ISSN 03037207. DOI 10.1016/j.mce.2003.10.029.
- ROSS y WILSON, 2013. *Ross and Wilson: Anatomy and Physiology in Health and Illness*. 12th. S.l.: Churchill Livingstone. ISBN 9780702053252.
- ROWE, C.W., PAUL, J.W., GEDYE, C., TOLOSA, J.M., BENDINELLI, C., MCGRATH, S. y SMITH, R., 2017. Targeting the TSH receptor in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*, vol. 24, no. 6, pp. R191-R202. ISSN 14796821. DOI 10.1530/ERC-17-0010.
- SANTOS, G.M., FAIRALL, L. y SCHWABE, J.W.R., 2011. Negative regulation by nuclear receptors: A plethora of mechanisms. *Trends in Endocrinology and Metabolism* [en línea], vol. 22, no. 3, pp. 87-93. ISSN 10432760. DOI 10.1016/j.tem.2010.11.004. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2010.11.004>.
- SASAKI, S., MATSUSHITA, A., KURODA, G., NAKAMURA, H.M., OKI, Y. y SUDA, T., 2018. *The Mechanism of Negative Transcriptional Regulation by Thyroid Hormone: Lessons From the Thyrotropin β Subunit Gene* [en línea]. 1. S.l.: Elsevier Inc. ISBN 9780128141168. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.vh.2017.06.006>.
- SCHMIDINGER, M., VOGL, U.M., BOJIC, M., LAMM, W., HEINZL, H., HAITEL, A., CLODI, M., KRAMER, G. y ZIELINSKI, C.C., 2011. Hypothyroidism in patients with renal cell carcinoma. *Cancer*, vol. 117, no. 3, pp. 534-544. ISSN 0008543X. DOI

10.1002/cncr.25422.

- SEGUIN, L., DESGROSELLIER, J.S., WEIS, S.M. y CHERESH, D.A., 2015. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends in Cell Biology* [en línea], vol. 25, no. 4, pp. 234-240. ISSN 09628924. DOI 10.1016/j.tcb.2014.12.006. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416312148>.
- SEIB, C.D. y SOSA, J.A., 2019. Evolving Understanding of the Epidemiology of Thyroid Cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* [en línea], vol. 48, no. 1, pp. 23-35. ISSN 15584410. DOI 10.1016/j.ecl.2018.10.002. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2018.10.002>.
- SHEILS, O.M. y SWEENEY, E.C., 1999. TSH receptor status of thyroid neoplasms? TaqMan RT-PCR analysis of archival material. *The Journal of Pathology* [en línea], vol. 188, no. 1, pp. 87-92. ISSN 0022-3417. DOI 10.1002/(SICI)1096-9896(199905)188:1<87::AID-PATH322>3.0.CO;2-5. Disponible en: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199905\)188:1%3C87::AID-PATH322%3E3.0.CO;2-5](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-9896(199905)188:1%3C87::AID-PATH322%3E3.0.CO;2-5).
- SINGH, R.K., KUMAR, S., GAUTAM, P.K., TOMAR, M.S., VERMA, P.K., SINGH, S.P., KUMAR, S. y ACHARYA, A., 2017. Protein kinase C- α and the regulation of diverse cell responses. *Biomolecular Concepts*, vol. 8, no. 3-4, pp. 143-153. ISSN 1868503X. DOI 10.1515/bmc-2017-0005.
- SIRAKOV, M. y PLATEROTI, M., 2011. The thyroid hormones and their nuclear receptors in the gut: From developmental biology to cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* [en línea], vol. 1812, no. 8, pp. 938-946. ISSN 09254439. DOI 10.1016/j.bbadis.2010.12.020. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.12.020>.
- SLEDGE, G.W. y GÖKMEN-POLAR, Y., 2006. Protein Kinase C- β as a Therapeutic Target in Breast Cancer. *Seminars in Oncology*, vol. 33, no. SUPPL. 9, pp. 15-18. ISSN 00937754. DOI 10.1053/j.seminoncol.2006.03.019.
- SØGAARD, M., FARKAS, D.K., EHRENSTEIN, V., JØRGENSEN, J.O.L., DEKKERS, O.M. y SØRENSEN, H.T., 2016. Hypothyroidism and hyperthyroidism and breast cancer risk: A

- nationwide cohort study. *European Journal of Endocrinology*, vol. 174, no. 4, pp. 409-414. ISSN 1479683X. DOI 10.1530/EJE-15-0989.
- STERLE, H.A., VALLI, E., CAYROL, F., PAULAZO, M.A., MARTINEL LAMAS, D.J., DIAZ FLAQUÉ, M.C., KLECHA, A.J., COLOMBO, L., MEDINA, V.A., CREMASCHI, G.A. y BARREIRO ARCOS, M.L., 2014. Thyroid status modulates T lymphoma growth via cell cycle regulatory proteins and angiogenesis. *Journal of Endocrinology*, vol. 222, no. 2, pp. 243-255. ISSN 14796805. DOI 10.1530/JOE-14-0159.
- SUBBIAH, V., CABANILLAS, M.E., KREITMAN, R.J., WAINBERG, Z.A., CHO, J.Y., KEAM, B., SCHELLENS, J.H.M., SORIA, J.C., WEN, P.Y., ZIELINSKI, C., URBANOWITZ, G., MOOKERJEE, B., WANG, D. y RANGWALA, F., 2018. Dabrafenib and trametinib treatment in patients with locally advanced or metastatic BRAF V600-mutant anaplastic thyroid cancer. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 36, no. 1, pp. 7-13. ISSN 15277755. DOI 10.1200/JCO.2017.73.6785.
- SUDHA, T., BHARALI, D.J., SELL, S., DARWISH, N.H.E., DAVIS, P.J. y MOUSA, S.A., 2017. Nanoparticulate Tetrac Inhibits Growth and Vascularity of Glioblastoma Xenografts. *Hormones and Cancer* [en línea], vol. 8, no. 3, pp. 157-165. ISSN 1868-8497. DOI 10.1007/s12672-017-0293-6. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s12672-017-0293-6>.
- TABATABAI, G., WELLER, M., NABORS, B., PICARD, M., REARDON, D., MIKKELSEN, T., RUEGG, C. y STUPP, R., 2010. Targeting integrins in malignant glioma. *Targeted Oncology*, vol. 5, no. 3, pp. 175-181. ISSN 17762596. DOI 10.1007/s11523-010-0156-3.
- TAN, M., LI, P., SUN, M., YIN, G. y YU, D., 2006. Upregulation and activation of PKC α by ErbB2 through Src promotes breast cancer cell invasion that can be blocked by combined treatment with PKC α and Src inhibitors. *Oncogene*, vol. 25, no. 23, pp. 3286-3295. ISSN 09509232. DOI 10.1038/sj.onc.1209361.
- TANAKA, K., OTSUKI, T., SONOO, H., YAMAMOTO, Y., UDAGAWA, K., KUNISUE, H., ARIME, I., YAMAMOTO, S., KUREBAYASHI, J. y SHIMOZUMA, K., 2000. Semi-quantitative comparison of the differentiation markers and sodium iodide symporter messenger ribonucleic acids in papillary thyroid carcinomas using RT-PCR. *European Journal of Endocrinology*, vol. 142, no. 4, pp. 340-346. ISSN 08044643. DOI

10.1530/eje.0.1420340.

- TEICHER, B.A., 2006. Protein kinase C as a therapeutic target. *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no. 18, pp. 5336-5345. ISSN 10780432. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-06-0945.
- TEICHER, B.A., MENON, K., ALVAREZ, E., SHIH, C. y FAUL, M.M., 2002. Antiangiogenic and antitumor effects of a protein kinase C β inhibitor in human breast cancer and ovarian cancer xenografts. *Investigational New Drugs*, vol. 20, no. 3, pp. 241-251. ISSN 01676997. DOI 10.1023/A:1016297611825.
- TONETTI, D.A., MORROW, M., KIDWAI, N., GUPTA, A. y BADVE, S., 2003. Elevated protein kinase C alpha expression may be predictive of tamoxifen treatment failure. *British Journal of Cancer*, vol. 88, no. 9, pp. 1400-1402. ISSN 00070920. DOI 10.1038/sj.bjc.6600923.
- TOTOŃ, E., IGNATOWICZ, E., SKRZECZKOWSKA, K. y RYBCZYŃSKA, M., 2011. Protein kinase C ϵ as a cancer marker and target for anticancer therapy. *Pharmacological Reports*, vol. 63, no. 1, pp. 19-29. ISSN 17341140. DOI 10.1016/S1734-1140(11)70395-4.
- TOULLEC, D., PIANETTI, P., COSTE, H., BELLEVERGUE, P., GRAND-PERRET, T., AJAKANE, M., BAUDET, V., BOISSIN, P., BOURSIER, E., LORIOLE, F., DUHAMEL, L., CHARON, D. y KIRILOVSKY, J., 1991. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 24, pp. 15771-15781. ISSN 00219258. DOI 10.1016/S0021-9258(18)98476-0.
- TRUMAN, J.P., ROTENBERG, S.A., KANG, J.H., LERMAN, G., FUKS, Z., KOLESNICK, R., MARQUEZ, V.E. y HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A., 2009. PKC α activation downregulates ATM and radio-sensitizes androgen-sensitive human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biology and Therapy*, vol. 8, no. 1, pp. 54-63. ISSN 15558576. DOI 10.4161/cbt.8.1.7119.
- VAN STAVEREN, W.C.G., SOLÍS, D.W., DELYS, L., DUPREZ, L., ANDRY, G., FRANC, B., THOMAS, G., LIBERT, F., DUMONT, J.E., DETOURS, V. y MAENHAUT, C., 2007. Human Thyroid Tumor Cell Lines Derived from Different Tumor Types Present a Common Dedifferentiated Phenotype. *Cancer Research* [en línea], vol. 67, no. 17, pp. 8113-8120. ISSN 0008-5472. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-06-4026. Disponible en:

<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-06-4026>.

- VILLALONA-CALERO, M.A., RITCH, P., FIGUEROA, J.A., OTTERSON, G.A., BELT, R., DOW, E., GEORGE, S., LEONARDO, J., MCCACHREN, S., MILLER, G.L., MODIANO, M., VALDIVIESO, M., GEARY, R., OLIVER, J.W. y HOLMLUND, J., 2004. A phase I/II study of LY900003, an antisense inhibitor of protein kinase C- α , in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, vol. 10, no. 18 I, pp. 6086-6093. ISSN 10780432. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-04-0779.
- WANG, S.C., 2014. PCNA: A silent housekeeper or a potential therapeutic target? *Trends in Pharmacological Sciences* [en línea], vol. 35, no. 4, pp. 178-186. ISSN 18733735. DOI 10.1016/j.tips.2014.02.004. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2014.02.004>.
- WANG, Y., HU, Z., MA, W., NIU, Y., SU, J., ZHANG, L. y ZHAO, P., 2020. Signal transducer and activator of transcription 3 inhibition alleviates resistance to BRAF inhibition in anaplastic thyroid cancer. *Investigational New Drugs* [en línea], ISSN 0167-6997. DOI 10.1007/s10637-020-01024-y. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10637-020-01024-y>.
- WATANABE, T., ONO, Y., TANIYAMA, Y., HAZAMA, K., IGARASHI, K., OGITA, K., KIKKAWA, U. y NISHIZUKA, Y., 1992. Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C- δ subspecies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 21, pp. 10159-10163. ISSN 00278424. DOI 10.1073/pnas.89.21.10159.
- WU-ZHANG, A.X. y NEWTON, A.C., 2013. Protein Kinase C Pharmacology: Refining the Toolbox. *Biochem J* [en línea], vol. 452, no. 2, pp. 195-209. ISSN 6176321972. DOI 10.1042/BJ20130220. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.
- XING, M., 2005. *BRAF mutation in thyroid cancer* [en línea]. junio 2005. S.I.: Endocr Relat Cancer. [Consulta: 12 octubre 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15947100/>.
- YALCIN, M., BHARALI, D.J., DYSKIN, E., DIER, E., LANSING, L., MOUSA, S.S., DAVIS, F.B., DAVIS, P.J. y MOUSA, S.A., 2010. Tetraiodothyroacetic acid and

tetraiodothyroacetic acid nanoparticle effectively inhibit the growth of human follicular thyroid cell carcinoma. *Thyroid*, vol. 20, no. 3, pp. 281-286. ISSN 10507256. DOI 10.1089/thy.2009.0249.

YANG, D., YAO, X., ZHOU, J., ZHOU, H., LU, G. y WANG, Y., 2019. Correlations of PCNA expression with thyroid cancer ultrasound and histopathologic features. *International journal of clinical and experimental pathology*, vol. 12, no. 4, pp. 1378-1384. ISSN 1936-2625.

YEN, P.M., 2001. Physiological and molecular basis of Thyroid hormone action. *Physiological Reviews*, vol. 81, no. 3, pp. 1097-1142. ISSN 00319333. DOI 10.1152/physrev.2001.81.3.1097.

ZHANG, X., LI, D., LI, M., YE, M., DING, L., CAI, H., FU, D. y LV, Z., 2014. MicroRNA-146a targets PRKCE to modulate papillary thyroid tumor development. *International Journal of Cancer*, vol. 134, no. 2, pp. 257-267. ISSN 00207136. DOI 10.1002/ijc.28141.