



Universitat de Lleida

## Dissecció molecular de la funció de Sprouty1 in vivo

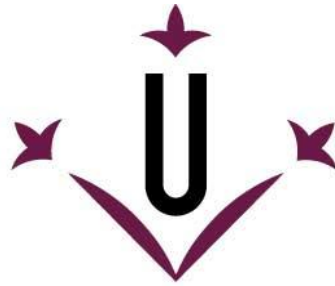
Marta Vaquero Susagna

<http://hdl.handle.net/10803/457619>

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

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

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



**Universitat de Lleida**

**TESI DOCTORAL**

**Dissecció molecular de la funció de  
Sprouty1 *in vivo***

Marta Vaquero Susagna

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la  
Universitat de Lleida

Programa de Doctorat en Salut

Director/a  
Mario Encinas Martín

Maig 2017



*A la més valenta,  
A tu, mare.*



# ***Agraiments***

---



Doncs sí, després de tot ha arribat el dia que em toca escriure els agraïments de la tesi... la veritat és que no sé per on començar perquè durant aquests cinc anys o més perquè sempre trèiem anys de tesi com si fos la nostra edat i no ens volguéssim fer grans... En certa manera és així perquè aquests anys per mi han estat espectaculars i en el fons no vols que s'acabin, doncs això que deia que durant aquest temps i vist en perspectiva he set molt feliç i afortunada. Tant a nivell personal com professional m'emporto moltíssimes coses bones. I és que tant els que us dediqueu a aquest món com els que no, ja sabeu com és aquesta feina, una feina que o t'apassiona o se't menja, que a dies et fa plorar de la ràbia i altres dies de l'emoció i tot això jo ho he compartint amb un grup de recerca que no canviaria per cap altre. Gràcies a totes i cada una de les persones que heu passat pel Grup de Senyalització Oncogènica i del Desenvolupament, nens i nenes de pràctiques, tècnics de laboratori... i sí al Adrián també. Primer de tot agrair al Mario haver-me donat l'oportunitat de poder fer la tesi al seu grup i sobretot per ensenyar-me i captivar-me amb la seva manera de fer i sentir la ciència. Crec que cada cop queden menys persones així i s'agraeix tenir-ne a prop. Gràcies per ensenyar-me que amb esforç, dedicació i ganes després de tot aquest temps, dels entrebancs que ens hem anat trobant finalment les coses surten, i és que entre tots crec que hem fet una molt bona feina. Òbviament, a la següent persona que li vull donar les gràcies és a l'Anna, la que m'ha fet de germana gran al laboratori ha estat amb mi des del minut zero ensenyant-me i estant amb mi quan les coses sortien i quan no sortien també! I és que durant tots els anys que hem estat juntes hem format un gran tàndem! Gràcies per transmetre'm tant a nivell professional i més a nivell personal, preocupant-te i estant sempre disposada a ajudar i a fer-me una abraçada. Pues sí, es pensar en ti y ponerme a escribir en castellano. Así que ahora no me digas que ésto no es ser bilingüe, eh Carlos Anerillas? La verdad es que me pongo a pensar y desde que llegaste al laboratorio siendo el niño de Huesca que nos mandaba audios cantando Amaral y el Canto del Loco han pasado unos días... pero sigues haciéndome reir como el primer día. Quiero darte las gracias por las miles de horas compartidas, los abrazos infinitos y las eternas divagaciones sobre Sprouty y la vida, sé que estás cada día un poquito más cerca de descubrir el *controversial mechanism* y así poder *shed a little light* en este *complex scenario* igual que lo has hecho en mi vida. Te quiero mucho. Bé, els que em coneixeu sabeu que fins aquí ja porto gastat mig paquet de mocadors, i és que com deia el Vicente (onomatopeia de so mastegant xiclet): Martita siempre llora. A part de l'Anna i el Carlos, durant aquests anys també he compartit laboratori amb la Myriam i amb la Sara, gràcies a les dues però en especial a la Sara que tot i no haver pogut coincidir tot el temps que ens hagués agradat m'ha encantat poder compartir aquests mesos amb tu. I finalment i amb especial carinyo vull donar-li les gràcies al Joan Ribera, no només per seriar-me els embrionets i quasi aconseguir que em senti més d'Almenar que d'Almacelles sinó que



també per ajudar-me en tot el que has pogut. Moltes gràcies! Ara que la tesi està acabada ja pots pensar un lloc per anar a fer un dinar!

Fora del meu laboratori però, he conegut gent impressionant! Només creuant el passadís de la segona planta m'he trobat amb un grup de recerca ple de persones genials. Allí he conegut a la Cris i la M<sup>a</sup>Alba, les meves xipis, i és que no sabeu quan poden arribar a unir uns xipirons suuuuper bons! La Cris o més ben dit, el Sol i jo a part de tenir un iman pels desastres i situacions paranormals, ser la seva padrineta, testimoni de la seva boda i amiga pel que convingui, va aconseguir que em despertés a les 6 del matí per anar a spinning, tots sabem que això va ser transitori, però el que és important és que hem creat un equip que per mi és indestructible. A tu Malbi donar-te les gràcies per ser simplement com ets, per ser-hi sempre, quan t'he necessitat i quan no, pels mil cafès, sopars, viatges i escapades. Que sàpiguis que tenim pendent la nostra tapa d'aquest any al Blanco y Negro! I és que després de tants dies i hores no només tens companys de feina sinó que aquella gent passen a ser els teus amics i crees com una espècie de família. I continuant amb els Patonc donar les gràcies també al Xavi i a l'Andree, a la Núria per encomanar l'alegria dia rere dia als esmorzars i dinars, no deixar mai de tenir ganes d'integrar a la gent i donar un cop de mà sempre que fa falta. A l'Isidre per proporcionar-nos informació i ensenyar-nos l'important que és contrastar-la, a la Mónica per ensenyar-me que no existeix problema o mal de ojo que el maestro Soriba, Zuru o Kumbia (o en su defecto unas cañas) pugui solucionar. Y finalmente y no por ello menos importante, donar-li les gràcies al Raúl, el meu compi de gimnàs o esos cuádriceps con cabeza que hacen CRISPR.

La veritat és que l'IRB s'ha anat fent gran i amb l'excusa del #totssomirb he conegut a molta gent des del grup de la Laura Bergadà, la Gemma Arjó, la Berta i la Maria que ja no hi són però que vam passar molts bons moments junts, passant per la Mariona i l'Èlia, sempre somrients i disposades a fer un beuret i arribant al grup de les mallorquines més maques que conec: la Marta Crespi, la Carla i la Nat. Gràcies per deixar-me gaudir de la vostra terra amb una companyia immillorable, portar-nos a llocs que estaven *full of energy* i de pokemons (de fons la Malbi cantant *Hazte con todos...*) i ensenyar-li a una *guiiri* a dir "a saco". Sou genials! A l'Òscar per fer-nos riure amb les seves historietes i introduir-nos en tota la ciència que hi ha darrere del món del culturisme. I a la tercera planta de l'IRB també he trobat a la meua companya de pis, la Rebe. La Rebeca és un amor de nena amb un cor enorme amb qui durant aquest any he compartit molts bons moments i que m'ha recolzat en els no tan bons, no saps la sort que tinc de tenir-te!

També vull agrair tota l'ajuda dels patòlegs i tècnics del personal d'Anatomia Patològica de l'Hospital Arnau de Vilanova, especialment, al Dr. Matias-Guiu per la seva ajuda en el diagnòstic tumoral, a la Maria Santacana, la Maria Carrelé i la Lúdia Parra. Donar les gràcies

al personal d'altres serveis com el de l'estabulari de rosegadors, en especial a la Jèssica i la Leti i a l'Anaïs del servei de citometria de flux. També vull donar-li les gràcies a la Loli per venir cada tarda a veure'ns amb un somriure dibuixat. Espero no deixar-me ningú, però si és així vull donar les gràcies a tothom que simplement ha contribuït a la seva manera en aquesta etapa.

Fora del laboratori durant aquests anys hi hagut dos grups d'amigues que han estat i són molt importants per mi. El primer és el grup d'Almacelles i és que això del poble es porta molt a dins, gràcies a la Romi, la Monik, la Sara, la Tiz i l'Auro. Tot i que potser no ens veiem tant com ens agradaria sempre trobem una excusa per fer un soparet o un dinaret i posar-nos al dia! L'altre grup és el que es va crear a la uni ja fa 10 anys, i això es diu ràpid, però sóc molt feliç de poder comptar amb la Cris, la Pili, la Sara, la Mire, l'Ester i la Xènia. A tu Xènia et deixo pel final perquè a part de companya de la uni, et conec des de que érem uns mocs i fins fa un any també compartíem pis, així que pràcticament ets una companya de vida. Gràcies per ser-hi. Aquests últims mesos no han estat dels més fàcils i tot i que no m'agrada queixar-me tot plegat ha resultat una mica dur. Curiosament però, la vida de vegades et fa coincidir amb persones que simplement necessiten vint minuts per capgirar-te-la i inconscientment ajudar-te quan més ho necessites. Així que sí, gràcies Marc.

I ja per acabar només donar les gràcies al més important de la meva vida, i és que sense elles res d'això hagués estat possible. A tu mare, a la Lara i l'Anna. I és que ja sabeu que sou la meva *alma*, que us necessito i que com diuen les nostres petites us estimo fins al cel. Anna i Lara, les meves dos germanes i pilars indispensables. No us podeu imaginar el feliç que em fa tenir-vos. A tu mama, no tinc paraules per dir-te tot el que penso i admiro de tu. M'has ensenyat que la vida tot i no ser fàcil és meravellosa, m'has ensenyat el que és lluitar i tirar endavant, m'has ensenyat a estimar i perdonar, en definitiva m'has ensenyat a sé qui sóc i ningú en aquest món podria haver-ho fet millor. Ets la meva campiona. T'estimo. Durant els últims 6 anys han aparegut tres personetes a les nostres vides que són l'alegria de casa nostra, la Jana, l'Aina i el Dídac. Aquesta aparició no ha estat espontània i aquí li vull donar les gràcies al Joan Manel, el meu cunyat, que encara no sé com sobreviu al nostre matriarcat. Algun dia et portarem un altre mascle a la família, t'ho prometem ;) També vull donar les gràcies al meu pare, sé que estàs orgullós de mi. A la padrina Pepita i al padrí Josep, però també a la padrina Ramoneta i al padrí Ricardo, sé que ni que no hi sigueu us faria molta il·lusió, així que us envio un petó ben gran.

I és que com em va dir un taxista l'altre dia, després de tot la vida només són moments i els hem de gaudir tot el que puguem, perquè al final això és l'únic que ens queda. Així que gràcies a tots i cadascú de vosaltres per haver format part del meu moment, perquè al final això és amb el que jo em quedo.



***Resums***





Les proteïnes de la família de Sprouty (Spry1-4) són reguladores de la senyalització mediada per receptors tirosina cinasa. La seva funció és important durant el desenvolupament embrionari i també en l'edat adulta per mantenir l'homeòstasi cel·lular. La deleció de Spry1 en ratolí provoca l'aparició de defectes durant el desenvolupament del sistema genitourinari degut a una hiperactivació de la senyalització de Ret. D'altra banda, la deleció de Spry2 causa defectes craniofacials i en la innervació del sistema nerviós entèric a causa d'un excés de la senyalització de FGFR i Ret, respectivament. Tot i les seves funcions diferents en l'organogènesi murina, dades recents indiquen que els diferents gens de Spry cooperen i tenen papers solapants durant el desenvolupament. Pel que fa al manteniment de l'homeòstasi tissular també s'ha descrit la funció dels gens de la família Spry com a supressors tumorals en diverses patologies canceroses.

A nivell molecular, durant els darrers anys s'ha generat una gran controvèrsia en quant al mecanisme d'acció de Sprouty implicat en la regulació d'aquests processos. A dia d'avui no es coneix un mecanisme d'acció universal sinó que depèn del context i del tipus cel·lular, així com del membre de Spry implicat. Estudis *in vitro* han descrit la importància de la tirosina N-terminal conservada en les diferents isoformes de Spry tant per la funció com per la regulació de la proteïna. En aquest context, per disposar d'una eina *in vivo* que permeti elucidar els mecanismes moleculars de Sprouty hem generat la línia de ratolí *knockin* Spry1 Y53A.

En la primera part d'aquest treball hem descrit la funció de Spry1 com a gen supressor tumoral en el carcinoma fol·licular de tiroide i en el feocromocitoma. Les tiroides dels ratolins *knockout* per Spry1 presenten un increment de la seva mida provocat per un augment de la proliferació de les cèl·lules fol·liculars. Aquestes cèl·lules mostren una disminució dels marcadors de senescència cel·lular incloent una reducció de citocines com la IL-6 i KC relacionades amb el fenotip secretor associat a la senescència (SASP). També presenten una reducció de l'activitat NFκB que correlaciona amb la inhibició del SASP en la tiroide. La funció de la senescència cel·lular com a mecanisme anti-tumoral ens ha conduït a analitzar si la manca de Spry1 és capaç d'accelerar la tumorigènesi en un context susceptible al desenvolupament tumoral (haploinsuficiència per Pten). Els ratolins Spry1<sup>+/-</sup>; Pten<sup>+/-</sup> presenten una major incidència de tumors en la glàndula tiroide i adrenal, essent en aquesta última més malignes i invasius. A més, en el cas de la tiroide hem demostrat la reducció i la correlació entre els nivells de Spry1 i IL-6 en mostres humanes de tumors fol·liculars.

En la segona part del treball la generació del ratolí *knockin* Spry1 Y53A ens condueix a la confirmació de la rellevància de la tirosina 53 durant la formació i la ramificació de la gemma uretèrica en el procés de morfogènesi del ronyó. L'anàlisi del ratolí Spry1 Y53A ens revela un nou fenotip i per tant una nova funció de Sprouty durant el desenvolupament dels genitals interns, a més d'una funció de dominant negatiu d'aquesta mutació *in vivo*. Els ratolins Spry1<sup>Y53A/+</sup> presenten vagines imperforades i hidrometrocolpos en el cas de les femelles, i els mascles mostren duplicació de la vesícula seminal. Els ratolins doble heterozigots de

Spry1;Spry2 exhibeixen els mateixos defectes indicant la cooperació entre Spry1 i Spry2 en aquest procés i suggerint que l'efecte de dominant negatiu de la forma mutant Spry1 Y53A pot actuar interferint la funció de Spry2 en aquest sistema. Les anomalies genitals observades són consistents amb defectes en el desenvolupament de la part caudal del conducte de Wolff (WD). Pel que fa al mecanisme, tant la senyalització de Ret, com la de FGF i la de Wnt/ $\beta$ -catenina s'ha descrit que tenen alguna funció durant el desenvolupament del WD. Hem demostrat que tot i la interacció genètica entre Spry1 i Ret en la formació del ronyó, el mecanisme implicat en la formació dels genitals interns és independent de Ret. Ara bé, l'existència d'interaccions entre la via de FGF i/o la de Wnt/ $\beta$ -catenina i Spry1 en aquest procés requereix ser investigat més exhaustivament.

Curiosament, s'ha descrit la presència d'un programa de senescència cel·lular durant la regressió dels WD en les femelles. El fet que els ratolins mutants de Spry mostrin un increment en la proliferació de la part caudal del WD juntament amb la funció coneguda de Sprouty en la inducció de la senescència cel·lular, fa molt interessant l'estudi amb profunditat de la idea que la manca de Sprouty pugui provocar defectes en la senescència programada durant el desenvolupament del WD i sigui responsable de les anomalies dels genitals interns.

Las proteínas de la familia de Sprouty (Spry1-4) son reguladoras de la señalización mediada por receptores tirosina quinasa. Su función es importante durante el desarrollo embrionario y también para el mantenimiento de la homeostasis celular en la edad adulta. La delección de Spry1 en ratón provoca la aparición de defectos durante el desarrollo del sistema genitourinario debido a una hiperactivación de la señalización por Ret. Por otro lado, la delección de Spry2 causa defectos cráneo-faciales y en la inervación del sistema nervioso entérico a causa de un exceso de la señalización por FGFR y Ret, respectivamente. A pesar de sus distintas funciones en la organogénesis murina, datos recientes indican que los diferentes genes de la familia de Spry cooperan y tienen papeles solapantes durante el desarrollo. En cuanto al mantenimiento de la homeostasis tisular también se ha descrito la función de los genes de la familia de Spry como supresores tumorales en diversas patologías cancerosas.

A nivel molecular, durante los últimos años se ha generado una gran controversia en cuanto al mecanismo de acción de Sprouty implicado en la regulación de estos procesos. Hoy en día todavía no se conoce un mecanismo de acción universal sino que depende del contexto y del tipo celular, así como del miembro de Spry implicado. Estudios *in vitro* han descrito la importancia de la tirosina N-terminal conservada en las distintas isoformas de Spry tanto para la función como para la regulación de la proteína. En este contexto, para disponer de una herramienta *in vivo* que nos permita elucidar los mecanismos moleculares de Sprouty hemos generado la línea de ratón *knockin* Spry1 Y53A.

En la primera parte de este trabajo hemos descrito la función de Spry1 como un gen supresor tumoral en el carcinoma folicular de tiroides y en el feocromocitoma. Las tiroides de los ratones *knockout* para Spry1 presentan un incremento de su tamaño provocado por un aumento de la proliferación de las células foliculares. Estas células muestran una disminución de los marcadores de senescencia incluyendo una reducción de citoquinas como la IL-6 y KC relacionadas con el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). También presentan una reducción de la actividad NFκB que se correlaciona con la inhibición del SASP en la tiroides. La función de la senescencia celular como mecanismo anti-tumoral nos ha conducido a analizar si la falta de Spry1 es capaz de acelerar la tumorigénesis en un contexto susceptible al desarrollo tumoral (haploinsuficiencia de Pten). Los ratones Spry1<sup>+/-</sup>; Pten<sup>+/-</sup> presentan una mayor incidencia de tumores en la glándula tiroides y adrenal, siendo en esta última más malignos e invasivos. Además, en el caso de la tiroides hemos demostrado la reducción y la correlación entre los niveles de Spry1 e IL-6 en muestras humanas de tumores foliculares.

En la segunda parte del trabajo la generación del ratón *knockin* Spry1 Y53A nos conduce a la confirmación de la relevancia de la tirosina 53 durante la formación y la ramificación de la yema uretérica en el proceso de morfogénesis del riñón. El análisis del ratón Spry1 Y53A nos revela un nuevo fenotipo y por tanto una nueva función de Sprouty durante el desarrollo de los genitales internos, además de una función de dominante negativo de esta mutación *in vivo*. Los ratones Spry1<sup>Y53A/+</sup> presentan vaginas imperforadas e hidrometrocolpos en el caso de las



hembras, y los machos muestran una duplicación de la vesícula seminal. Los ratones doble heterocigotos de *Spry1*; *Spry2* exhiben los mismos defectos indicando la cooperación entre *Spry1* y *Spry2* en este proceso y sugiriendo que el efecto de dominante negativo de la forma mutante *Spry1* Y53A puede actuar interfiriendo la función de *Spry2* en este sistema. Las anomalías genitales observadas son consistentes con defectos en el desarrollo de la parte caudal del conducto de Wolff (WD). En cuanto al mecanismo, tanto la señalización de Ret como la de FGF y la de Wnt/ $\beta$ -catenina se ha descrito que tiene alguna función durante el desarrollo del WD. Hemos demostrado que aunque existe una interacción genética entre *Spry1* y Ret durante la formación del riñón, el mecanismo implicado en la formación de los genitales internos es independiente de Ret. No obstante, la existencia de interacciones entre la vía de FGF y/o la de Wnt/ $\beta$ -catenina y *Spry1* en este proceso requiere ser investigado más exhaustivamente.

Curiosamente, se ha descrito la presencia de un programa de senescencia celular durante la regresión de los WD en las hembras. El hecho que los ratones mutantes de *Spry* muestren un incremento en la proliferación de la parte caudal del WD junto con la conocida función de *Spry1* en la inducción de la senescencia celular, genera interés para estudiar con más profundidad la idea que la falta de Sprouty pueda provocar defectos en la senescencia programada durante el desarrollo del WD y sea responsable de las anomalías en los genitales internos.

Sprouty proteins (Spry1-4) are feedback inhibitors of receptor tyrosine kinase (RTK) signaling pathway. Sprouty genes have been implicated in various physiological and developmental processes in a cell-specific and context-dependent manner. As such, they restrain proliferation of many cell types and have been proposed as tumor suppressor genes in certain types of cancer where physiological homeostasis is altered. Deletion of Spry1 in mice leads to defects in the development of the genitourinary system due to hyperactivation of Ret signaling. On the other hand, targeted deletion of Spry2 causes craniofacial and enteric innervation defects owing to excessive FGFR and Ret signaling, respectively. Besides these distinct roles in mouse organogenesis, recent data indicate that the different Sprouty genes play overlapping roles during development.

However, the molecular mechanism underlying these functions has not been defined and the mechanisms of action of Sprouty proteins are poorly understood. One of the most conserved motifs across species and family members is a N-terminal tyrosine. In vitro studies show an important role of such tyrosine (Tyr53) in modulating Spry1 function showing that the lack of this tyrosine promote a dominant negative effect, but these observations have not been confirmed in vivo. In this context, we have generated knockin mice carrying a Tyrosine to Alanine mutation in residue 53 of Spry1 (Spry1Y53A) to shed light on this complex scenario.

In the first chapter of this work, we have proposed a role of Spry1 as a tumor suppressor gene in follicular thyroid carcinoma and pheochromocytoma. We have described a novel mechanism by which Spry1 restricts proliferation independently of the ERK pathway. In vivo analysis of thyroid glands from Spry1 knockout mice reveals that Spry1 induces a senescence-associated secretory phenotype (SASP) via activation of the NF $\kappa$ B pathway. Consistently, thyroids from Spry1 knockout mice are bigger and exhibit decreased markers of senescence. Although such escape from senescence is not sufficient to promote thyroid tumorigenesis in adult mice up to five months, the onset of Pten-induced tumor formation in thyroid and adrenal glands is accelerated when Spry1 is concomitantly eliminated. Accordingly, we have observed a reduction of Spry1 and IL-6 levels in human thyroid malignancies.

In the second part of this work the generation of Spry1 Y53A knockin mice allows us to confirm the relevance of this tyrosine for Spry1 function in the ureteric bud formation and epithelial branching during kidney development. Analysis of Spry1 Y53A mice reveals an unseen phenotype which places Sprouty as a crucial regulatory element for the proper development of internal genitalia. Through its dominant negative behavior, Y53A mutation uncovers phenotypes that were hidden behind the redundancy between different Spry members. Female mice that own this mutation exhibit imperforate vagina and hydrometrocolpos, while males show seminal vesicle duplication. Interestingly, double heterozygous mice for Spry1 and Spry2 phenocopy these defects, pointing out that both members of Spry family cooperate to execute their function in this developmental process. Furthermore, this fact reinforces the dominant negative role of Y53A mutation, indicating that in this context Spry1 Y53A allele

interferes with the function of Spry2. Genital abnormalities displayed suggest defective development of the caudal portion of Wolffian Duct (WD). Ret, FGF or Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways have been described as relevant for the correct development of WD. We have demonstrated how, despite the genetic interaction between Spry1 and Ret during kidney morphogenesis, the mechanism underlying Spry influence over development of internal genitalia is Ret-independent. However, possible interactions among FGF, Wnt/ $\beta$ -catenin and Spry pathways must be further investigated.

Interestingly, it has recently been described the presence of a cellular senescence program during WD regression. The reported role of Spry1 in senescence induction together with the increased proliferation of caudal WD of Spry mutants prompt us to further analyze if the lack of Sprouty could be triggering developmentally programmed senescence defects during WD development.

# *Índex*





<b>Resums.....</b>	<b>xi</b>
<b>Abreviatures.....</b>	<b>3</b>
<b>Introducció.....</b>	<b>7</b>
<b>1. ELS GENS DE LA FAMÍLIA DE SPROUTY .....</b>	<b>9</b>
1.1 Estructura i regulació de les proteïnes de Sprouty .....	9
1.2 Funció de Sprouty durant el desenvolupament embrionari.....	12
1.3 Funció de Sprouty en la tumorigènesi .....	18
1.4 Mecanismes d'acció de les proteïnes Sprouty .....	21
<b>2. DESENVOLUPAMENT DEL SISTEMA GENITOURINARI .....</b>	<b>26</b>
2.1 Desenvolupament del tracte urinari .....	26
2.1.1 Desenvolupament i estructura del ronyó .....	26
2.2 Desenvolupament del sistema reproductor .....	29
2.2.1 Desenvolupament i diferenciació del sistema genital intern.....	29
2.2.1.1 Desenvolupament de la gònada.....	29
2.2.1.2 Desenvolupament i diferenciació del sistema ductal .....	31
2.2.1.3 Desenvolupament de la vagina .....	33
2.2.1.4 Desenvolupament de la vesícula seminal .....	35
2.3 Gens i vies de senyalització implicades en el desenvolupament i la patologia del sistema genitourinari.....	35
2.3.1 Mecanismes moleculars de la formació de la gemma uretèrica .....	36
2.3.1.1 Senyalització per Ret/Gdnf.....	36
2.3.1.2 Senyalització per Wnt/ $\beta$ -catenina.....	42
2.3.2 Mecanismes moleculars implicats en el desenvolupament del Müllerian i Wolffian duct.....	46
<b>3. CÀNCERS ENDOCRINS .....</b>	<b>49</b>
3.1 CARCINOMA DE TIROIDE.....	49
3.1.1 Anatomia, histologia i fisiologia de la glàndula tiroide .....	49
3.1.2 Aspectes generals del càncer de tiroide .....	50
3.1.3 Carcinomes de tiroide derivats de les cèl·lules fol·liculars .....	51
3.1.3.1 Carcinoma papil·lar de tiroide ( <i>Papillary Thyroid Carcinoma, PTC</i> ).....	51

3.1.3.2 Carcinoma fol·licular de tiroide ( <i>Follicular Thyroid Carcinoma, FTC</i> ).....	52
3.1.4 Carcinomes de tiroide derivats de les cèl·lules parafol·liculars .....	52
3.1.5 Alteracions moleculars del càncer de tiroide.....	53
3.1.5.1 Alteracions moleculars dels PTC .....	53
3.1.5.2 Alteracions moleculars dels FTC.....	54
3.1.5.3 Alteracions moleculars dels MTC.....	54
3.2 CÀNCER DE LA GLÀNDULA ADRENAL .....	56
3.2.1 Anatomia, histologia i fisiologia de la glàndula adrenal.....	56
3.2.2 Aspectes generals del càncer de la glàndula adrenal .....	57
3.2.3 Alteracions moleculars del feocromocitoma i paraganglioma .....	58
<b>4. LA SENESCÈNCIA CEL·LULAR .....</b>	<b>60</b>
4.1 Tipus i mecanismes de senescència .....	60
4.1.1 Senescència induïda per dany.....	61
4.1.1.1 Senescència replicativa .....	61
4.1.1.2 Senescència induïda per dany al DNA.....	61
4.1.1.3 Senescència induïda per estrès oxidatiu .....	61
4.1.1.4 Senescència induïda per oncògens (OIS) .....	62
4.1.2 Senescència en condicions fisiològiques.....	63
4.1.2.1 Senescència programada durant el desenvolupament embrionari.....	63
4.1.2.2 Senescència fisiològica en cèl·lules adultes .....	64
4.2 Morfologia i biomarcadors de les cèl·lules senescentes.....	66
4.3 Processos biològics associats a la senescència cel·lular.....	68
4.3.1 El paper de la senescència en la supressió tumoral.....	68
4.3.2 El paper de la senescència en la progressió tumoral .....	69
4.3.3 El paper de la senescència en l'envelliment .....	71
4.3.4 El paper de la senescència en la regeneració tissular .....	73
<b>Objectius .....</b>	<b>75</b>
<b>Materials i Mètodes .....</b>	<b>79</b>
<b>1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ .....</b>	<b>81</b>
1.1 Consideracions prèvies.....	81

1.2 Soques de ratolins emprades .....	81
1.2.1 Ratolins <i>knockout</i> per Sprouty1 .....	81
1.2.2 Ratolins <i>knockout</i> per Pten .....	81
1.2.3 Ratolins <i>knockout</i> per Sprouty2 .....	82
1.2.4 Ratolins <i>knockin</i> Ret <sup>EGFP</sup> .....	82
1.2.5 Ratolins <i>knockin</i> Axin2 <sup>LacZ</sup> .....	82
1.2.8 Ratolins Flpe .....	83
1.2.9 Generació dels ratolins Spry1 <sup>Y53A</sup> .....	83
1.2.9.1 Construcció del Spry1Y53A <i>targeting vector</i> .....	83
1.2.9.2 Anàlisi de la recombinació homòloga .....	84
Screening per PCR.....	84
Southern Blot.....	85
1.3 Genotipatge de ratolins.....	86
1.4 Estimulació amb Lipopolisacàrid (LPS) .....	88
<b>2. TÈCNiques DE CULTIUS CEL·LULARS.....</b>	<b>88</b>
2.1 Cultiu de la línia cel·lular HEK 293T .....	88
2.2 Cultiu de la línia cel·lular IMR90.....	88
2.3 Cultiu primari de tiroide de ratolí.....	88
2.4 Cultiu primari de fibroblasts dèrmics de ratolí .....	89
<b>3. PRODUCCIÓ DE LENTIVIRUS .....</b>	<b>90</b>
3.1 Construccions plasmídiques: generació de vectors lentivirals de sobreexpressió de proteïnes .....	90
3.2 Transducció lentiviral .....	91
3.2.1 Transfecció i producció de lentivirus a la línia cel·lular HEK293T .....	91
3.2.2 Transducció de la línia cel·lular IMR90 i dels cultius primaris de tiroide .....	92
<b>4. ASSAIGS DE PROLIFERACIÓ .....</b>	<b>93</b>
In vitro .....	93
4.1 Recompte cel·lular mitjançant els sistema 3T3.....	93
4.2 Assaig d'incorporació de Bromodeoxyuridina .....	93
4.3 Assaig clonogènic. Cristall violeta .....	93
In vivo .....	94
4.4 Assaig d'incorporació de 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) en embrions .....	94



4.5 Anàlisi del nombre de mitosis .....	94
<b>5. PCR EN TEMPS REAL: RT-PCR.....</b>	<b>94</b>
5.1 Extracció de RNA .....	94
5.2 Síntesi de cDNA .....	95
5.3 RT-PCR .....	95
<b>6. IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES.....</b>	<b>96</b>
EN LLISATS DE PROTEÏNA .....	96
6.1 Western Blot i Immunoprecipitació .....	96
6.1.1 Extracció de proteïna .....	96
6.1.2 Immunoprecipitació .....	96
6.1.3 Western Blot .....	96
6.2 Histologia i tècniques d'immunodetecció.....	98
6.2.1 Tècniques d'histologia bàsica.....	98
6.2.2 Immunohistoquímica .....	98
6.2.3 Immunofluorescència.....	99
<b>7. ELISA I ARRAY D'ANTICOSSOS .....</b>	<b>100</b>
<b>8. ASSAIG LUCIFERASA.....</b>	<b>101</b>
<b>9. ACTIVITAT <math>\beta</math>-GALACTOSIDASA.....</b>	<b>101</b>
9.1 Activitat $\beta$ -galactosidasa associada a la senescència (SA- $\beta$ -gal) .....	101
9.2 Tinció X-gal .....	101
<b>Resultats.....</b>	<b>103</b>
<b>CAPÍTOL I .....</b>	<b>105</b>
<b>PAPER DE SPROUTY1 COM A SUPRESSOR TUMORAL EN NEOPLÀSIES ENDOCRINES</b>	<b>105</b>
<b>1. PAPER DE SPRY1 EN EL DESENVOLUPAMENT DEL CARCINOMA FOL·LICULAR DE TIROIDE.....</b>	<b>106</b>
1.1 Els ratolins <i>knockout</i> per Spry1 presenten un augment en la mida de la glàndula tiroide .....	106
1.2 La pèrdua de Spry1 resulta en un increment de la proliferació de les cèl·lules fol·liculars de la tiroide sense afectar la fosforilació de les ERK.....	107
1.3 Les cèl·lules fol·liculars de la tiroide dels ratolins <i>knockout</i> per Spry1 mostren una disminució dels marcadors de senescència cel·lular.....	108

1.4 L'activació de la via NFκB es troba afectada en les cèl·lules fol·liculars <i>Spry1 knockout</i>	111
1.5 La deleció genètica de <i>Spry1</i> accelera la tumorigènesi de la tiroide induïda per <i>Pten</i>	114
1.6 Els nivells de <i>Spry1</i> i IL-6 es troben reduïts en mostres humanes de carcinoma i adenoma fol·licular de tiroide	116
<b>2. PAPER DE <i>SPRY1</i> EN EL DESENVOLUPAMENT DEL FEOCROMOCITOMA</b>	<b>117</b>
2.1 L'haploinsuficiència de <i>Sprouty1</i> accelera el desenvolupament del feocromocitoma en ratolins <i>Pten<sup>+/-</sup></i>	117
2.2 La pèrdua d'heterozigositat de <i>Spry1</i> no és responsable de l'acceleració en la tumorigènesi de la mèdulla adrenal induïda per <i>Pten</i>	120
2.3 Els feocromocitomes dels ratolins <i>Spry1<sup>+/-</sup></i> ; <i>Pten<sup>+/-</sup></i> presenten signes de major agressivitat	122
<b>CAPÍTOL II</b>	<b>125</b>
<b>PAPER DE LA TIROSINA 53 DE <i>SPRY1</i> EN EL DESENVOLUPAMENT DEL SISTEMA GENITOURINARI</b>	<b>125</b>
1.1 Generació del ratolí <i>knockin Spry1<sup>Y53ANeo</sup></i>	126
1.2 La mutació de la tirosina 53 de <i>Spry1</i> no afecta els seus nivells d'expressió <i>in vivo</i>	128
1.3 La tirosina 53 és un lloc de fosforilació principal de <i>Spry1</i>	129
1.4 La deleció de la tirosina 53 de <i>Spry1</i> fenocopia alguns dels defectes del ratolí <i>knockout</i> per <i>Spry1</i> però també promou l'aparició de nous fenotips	130
1.5 L'eliminació de la <i>cassette</i> Neo revela un paper de dominant negatiu de la mutació <i>Spry1 Y53A in vivo</i>	137
1.6 <i>Spry1</i> i <i>Spry2</i> col·laboren durant el desenvolupament dels genitals interns	143
1.7 La formació incorrecta dels genitals interns dels ratolins <i>Spry1<sup>+/-</sup></i> ; <i>Spry2<sup>+/-</sup></i> pot ser conseqüència dels defectes en la morfogènesi de la part caudal del conducte de Wolff	144
1.8 Els defectes en el conducte de Wolff caudal no són deguts a una hiperactivació de la senyalització de Ret	147
1.9 <i>Spry1</i> i <i>Spry2</i> afecten al patró d'expressió de β-catenina durant el desenvolupament dels genitals interns	152
<b>Discussió</b>	<b>157</b>
<b>Conclusions</b>	<b>179</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>183</b>
<b>Annex</b>	<b>227</b>



# ***Abreviatures***

---



<b>ATC</b>	<i>Anaplastic Thyroid Carcinoma</i>
<b>ARTN</b>	<i>Artemin</i>
<b>CAKUT</b>	<i>Congenital Anomalies of the Kidney and the Urinary Tract</i>
<b>C/EBP<math>\beta</math></b>	<i>CCAAT/enhancer-binding protein beta</i>
<b>CBD</b>	<i>c-Cbl Binding Domain</i>
<b>CRD</b>	<i>Cysteine Rich Domain</i>
<b>CREB</b>	<i>cAMP response element binding protein</i>
<b>DDR</b>	<i>DNA-Damage Response</i>
<b>DKO</b>	<i>Double KnockOut</i>
<b>DTC</b>	<i>Differentiated Thyroid Carcinoma</i>
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
<b>ENS</b>	<i>Enteric Nervous System</i>
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
<b>FGFR</b>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
<b>FMTC</b>	<i>Familial Medullary Thyroid Carcinoma</i>
<b>FTC</b>	<i>Follicular Thyroid Carcinoma</i>
<b>GDNF</b>	<i>Glial cell-Derived Neurotrophic Factor</i>
<b>GFL</b>	<i>GDNF Family of Ligands</i>
<b>GFR<math>\alpha</math></b>	<i>GDNF Family Receptor alpha</i>
<b>GRB2</b>	<i>Growth factor Receptor-Bound protein 2</i>
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	<i>Glycogen Synthase kinase 3 beta</i>
<b>HSCR</b>	<i>Hirschsprung disease</i>
<b>IGFBP</b>	<i>Insulin-like Growth Factor-Binding Protein</i>
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha</i>
<b>IKK</b>	<i>I<math>\kappa</math>B Kinase</i>
<b>IL</b>	<i>Interleukin</i>
<b>IL-R</b>	<i>Interleukin Receptor</i>

<b>KO</b>	<i>Knockout</i>
<b>KI</b>	<i>Knockin</i>
<b>LOH</b>	<i>Loss Of Heterozygosity</i>
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharide</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
<b>MD</b>	<i>Müllerian Duct</i>
<b>MEN2</b>	<i>Multiple Endocrine Neoplasia type 2</i>
<b>MIS</b>	<i>Müllerian Inhibiting Substance</i>
<b>MTC</b>	<i>Medullary Thyroid Carcinoma</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NGF</b>	<i>Nerve Growth Factor</i>
<b>NRTN</b>	<i>Neurturin</i>
<b>OIS</b>	<i>Oncogene-Induced Senescence</i>
<b>PH</b>	<i>Pleckstrin Homology</i>
<b>PDK</b>	<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase</i>
<b>PDTC</b>	<i>Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma</i>
<b>PGC</b>	<i>Primordial Germ Cell</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol-3-kinases</i>
<b>PIP2</b>	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
<b>PIP3</b>	<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate</i>
<b>PKC</b>	<i>Protein Kinase C</i>
<b>PLC-<math>\gamma</math></b>	<i>Phospholipase C gamma</i>
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</i>
<b>PTC</b>	<i>Papillary Thyroid Carcinoma</i>
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
<b>PSPN</b>	<i>Persephin</i>
<b>Rb</b>	<i>Retinoblastoma</i>

<b>RBD</b>	<i>Raf Binding Domain</i>
<b>RET</b>	<i>REarranged during Transfection</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>RTK</b>	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
<b>SA-<math>\beta</math>-Gal</b>	<i>Senescence-associated beta-galactosidase</i>
<b>SAHF</b>	<i>Senescence-Associated Heterochromatin Foci</i>
<b>SASP</b>	<i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>
<b>SMS</b>	<i>Senescence-Messaging Secretome</i>
<b>SOS</b>	<i>Son of Sevenless</i>
<b>SP1</b>	<i>Specificity Protein 1</i>
<b>SPRY</b>	<i>Sprouty family proteins</i>
<b>SPRED</b>	<i>SProuty-Related proteins with an EVH1 Domain</i>
<b>SRD</b>	<i>Serine Rich Domain</i>
<b>TGF<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>TSH</b>	<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
<b>TRH</b>	<i>Thyroid Releasing Hormone</i>
<b>UB</b>	<i>Ureteric Bud</i>
<b>UGS</b>	<i>UroGenital Sinus</i>
<b>VEGFR</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>
<b>WD</b>	<i>Wolffian Duct</i>
<b>WDTC</b>	<i>Well-Differentiated Thyroid Carcinoma</i>
<b>WT</b>	<i>Wild-type</i>
<b>WT1</b>	<i>Wilms' tumor 1</i>





# ***Introducció***

---



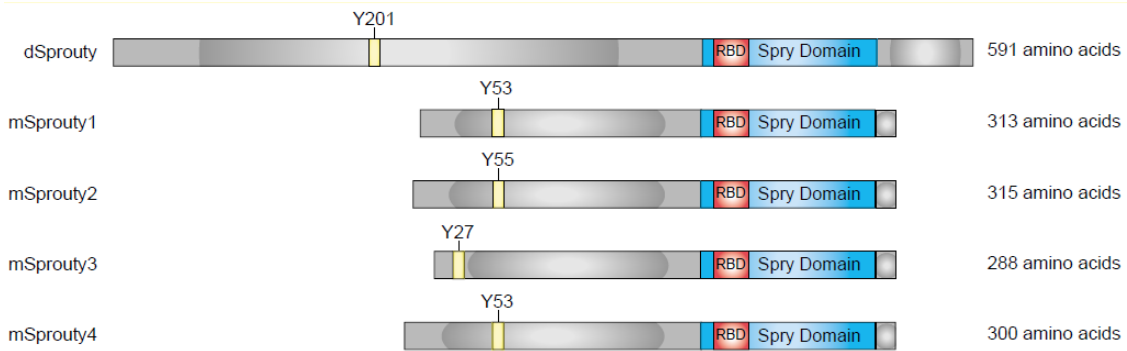
## 1. ELS GENS DE LA FAMÍLIA DE SPROUTY

La senyalització per receptors tirosina cinasa (RTK) es troba espacial i temporalment regulada per una sèrie de mecanismes reguladors positius i negatius. Aquests mecanismes controlen la magnitud i la durada de les senyals iniciades a la superfície cel·lular per promoure un efecte biològic normal o aberrant en la fisiologia i la patologia, respectivament. En aquest context s'han identificat els gens de la família de Sprouty com a moduladors de la senyalització per RTK.

El primer membre de la família de proteïnes Sprouty va ser descrit el 1998 per Hacohen i els seus col·laboradors com un inhibidor de la senyalització per FGF durant el desenvolupament de les vies aèries en *Drosophila melanogaster* (dSpry). A més a més, les mosques *knockout* per Spry o que contenen una mutació de pèrdua de funció del gen presenten fenotips en l'ull i les ales que encaixen amb un excés de senyalització a través del receptor de l'EGF (Minowada *et al.*, 1999). Aquests estudis demostren que el gen dSpry és un inhibidor de la senyalització dels RTK, en concret de la via de senyalització Ras/ERK. Experiments *in vitro* amb cèl·lules de *Drosophila melanogaster* demostren que Sprouty és una proteïna intracel·lular que interacciona directament amb membres de la via Ras/MAPK com Gap1 i Drk (homòleg de Grb2) i actua com antagonista de la senyalització mediada per FGFR i EGFR, ja que la seva pèrdua o sobreexpressió resulta en l'aparició de fenotips que reflecteixen la desregulació d'aquestes vies de senyalització (Casici *et al.*, 1999; Kramer *et al.*, 1999). Basant-se en les seqüències d'homologia de dSpry, s'han identificat gens ortòlegs en ratolí, humà, pollastre, peix zebra i granota (Mason *et al.*, 2006) i aleshores es va començar a explorar la funció dels seus ortòlegs en vertebrats.

### 1.1 Estructura i regulació de les proteïnes de Sprouty

El gen Sprouty de *Drosophila melanogaster* codifica per una proteïna de 63kDa que conté un únic domini de 124 residus d'aminoàcids ric en cisteïnes (CRD, Cistein-Rich Domain). En mamífers, la família de Sprouty està formada per quatre membres diferents que comprèn de Spry1 a Spry4 i que codifiquen per proteïnes d'una mida considerablement menor, 32-35kDa, respecte dSpry (Mason *et al.*, 2006). Les similituds entre els homòlegs de dSpry en diferents espècies es troben pràcticament restringides al CRD (també conegut com domini Spry) de l'extrem C-terminal. Aquest domini conté una regió altament conservada necessària per la unió de Raf1 (RBD, *Raf1 binding domain*) i necessària per desencadenar la homo i heterodimerització entre els membres de la mateixa família (Ozaki *et al.*, 2005a). En canvi, és en l'extrem N-terminal on la seva seqüència presenta més divergències, exceptuant un motiu altament conservat que conté un residu de tirosina (CBD, *c-Cbl binding domain*) i un domini ric en serines (SRD, *Serine rich domain*) poc conservat en dSpry.



**Figura 1. Estructura de la proteïna de dSprouty i dels seus homòlegs de ratolí.** Les proteïnes de la família de Sprouty presenten una regió en l'extrem C-terminal molt conservada amb un domini ric en residus de serina (Spry Domain) que conté un lloc d'unió a Raf1 (RBD). L'extrem N-terminal tot i ser la regió més divergent, conté un residu de tirosina (Y) conservat (Mason *et al.*, 2006).

Aquest residu de tirosina (Y55 de Spry2 i Y53 en el cas de Spry1 i Spry4) pot ser fosforilat en resposta a factors tròfics i seguidament reconegut per dominis tipus SH2 i PTB presents en diverses proteïnes adaptadores de senyalització intracel·lular (Mason *et al.*, 2006; Guy *et al.*, 2009). La variabilitat de la seqüència de la regió N-terminal en els quatre homòlegs de mamífer podria indicar diferents funcions per cada membre mitjançant la formació d'interaccions diferents. La regió rica en serines (SRD) adjacent al CRD també es troba altament conservada entre els diferents membres de la família Sprouty (Lao *et al.*, 2007c; Aranda *et al.*, 2008).

La fosforilació d'aquests residus de tirosina i de serina s'ha descrit mitjançant diferents tipus d'aproximacions experimentals. Així doncs, múltiples estudis de proteòmica han identificat mitjançant espectrometria de masses la fosforilació de la tirosina conservada dels diferents membres de Sprouty. Aquesta informació es troba recollida en el lloc web *PhosphoSitePlus*, on trobem que per exemple la fosforilació de la Tyr53 de Spry1 s'ha descrit 247 vegades, la de la Tyr55 de Spry2 89 i en el cas de la Tyr53 de Spry4 s'ha produït en 150 ocasions. A part d'en aquests residus concrets també s'han descrit fosforilacions i altres modificacions en altres tirosines i en residus de serina. A més a més, també s'han identificat utilitzant mètodes de marcatge metabòlic i a través de l'anàlisi dels *shifts* migratoris de les proteïnes de Sprouty. S'ha descrit que les diferents proteïnes de Sprouty migren formant múltiples bandes en gels de SDS-poliacrilamida i que les bandes de migració lenta desapareixen quan es tracta el llisat cel·lular amb fosfatases indicant així la presència de formes fosforilades de Sprouty. És important destacar que el mutant Spry2 Y55F també migra formant múltiples bandes, i que per tant la fosforilació de la Tyr55 no és la responsable de la isoforma de migració lenta de Spry2 sinó que aquesta és deguda a fosforilacions en Ser/Thr (Impagnatiello *et al.*, 2001). En aquest context, en un treball sobre l'estabilitat i degradació proteosomal de Spry2 es mostra com les Ser112 i Ser121 són fosforilades per la cinasa Mnk1 i que són responsables de les bandes de migració lenta de Spry2, ja que quan les muten desapareixen (Dasilva *et al.*, 2006).

Un altre estudi descriu també la contribució d'una zona rica en Ser/Thr de Spry2 (entre els aminoàcids 108-132) a la formació de formes de migració lenta. Concretament, descriuen que la Ser112 i la Ser115 estan fosforilades en cèl·lules no estimulades i que són defosforilades per la fosfatasa PP2A després de l'estímul amb FGF (Lao *et al.*, 2007b). Cal destacar que tot i que aquests treballs coincideixen en que la banda de migració lenta de Spry es correspon amb la forma fosforilada en residus de Ser/Thr, observen efectes oposats pel que fa als canvis en la proporció de les diferents bandes sota l'estímul de factors de creixement. És a dir, DaSilva i els seus col·laboradors descriuen un increment de la forma fosforilada (banda de migració lenta) de Spry2 a través d'EGF i FGF, mentre que en el treball de Lao *et al.*, l'estimulació de les cèl·lules amb FGF promou l'acumulació de la forma defosforilada (banda de migració ràpida). La funcionalitat i els mecanismes d'aquestes fosforilacions i defosforilacions a dia d'avui encara no estan clars, tot i que com veurem a continuació són importants per regular els nivells de Sprouty i posteriorment, en l'apartat on parlem dels mecanismes d'acció de Spry també parlarem del seu paper en l'activació de la proteïna.

Per altra banda, s'ha identificat un altre grup de molècules relacionades que contenen un CRD molt similar al de les proteïnes Sprouty, es tracta d'una família de reguladors negatius de la senyalització per Ras i s'anomenen SPRED (SPROUTY-Related proteins with an EVH1 Domain) (Bundschu *et al.*, 2007).

El contingut cel·lular de les proteïnes Sprouty es troba altament regulat, ja que com a modulador de la senyalització per RTK s'ha de mantenir un balanç entre la seva síntesi i degradació per mantenir l'homeòstasi cel·lular. La regulació dels nivells de Sprouty té lloc tant a nivell transcripcional com post-traduccional. Cal dir que la localització cel·lular també pot tenir un paper en la seva regulació.

Pel que fa a la regulació transcripcional de Sprouty es sap que l'activació de la via ERK a través de factors de creixement provoca generalment un increment dels nivells de Sprouty (Ozaki *et al.*, 2001). No obstant, la inducció de les diferents isoformes de Sprouty varia en funció del factor de creixement, del tipus i context cel·lular. Per aquest motiu s'han descrit altres vies i mecanismes que modulen l'activitat transcripcional dels gens Spry, com per exemple a través de PLC $\gamma$  i senyals dependents de calci (Abe and Naski, 2004), de la senyalització per TGF $\beta$ 1 MAPK-independent (Ding *et al.*, 2007) o a través de TNF- $\alpha$  i p38 (Ding and Warburton, 2008). A més, la presència de regions riques en CG en els promotors de Spry1 (Gross *et al.*, 2003), Spry2 (Ding *et al.*, 2003) i Spry4 (Ding *et al.*, 2004) suggereix l'existència d'una regulació espaciotemporal de l'expressió de Spry mitjançant factors de transcripció específics, com per exemple WT1 (Wilms tumor suppressor 1) (Gross *et al.*, 2003), SP1 (Specificity protein 1) (Gross *et al.*, 2007), CREB (cAMP response element-binding protein) i PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (Tennis *et al.*, 2010).

Els mecanismes post-traduccionals que regulen els nivells proteics de Sprouty inclouen processos de poliubiquitinilació i degradació proteosomal. Aquests processos estan regulats

per l'estat de fosforilació de diversos residus de serina i tirosina que segons el seu estat promouen una determinada interacció molecular. Entre aquestes interaccions trobem les fosfatases PP2A i SHP2 i les lligases d'ubiquïtina E3 c-Cbl i Siah2. També s'han descrit interaccions d'altres dominis de Sprouty amb diverses cinases com Ras, Raf1 i Dyrk1a, i proteïnes adaptadores com CIN85 i Grb2 (Guy *et al.*, 2009). La degradació de la forma activa de Sprouty a través del proteosoma és un procés que depèn de la fosforilació de la tirosina N-terminal conservada i està mediada per c-Cbl. Així doncs, Mason *et al.*, van descriure que la interacció de Spry2 i c-Cbl depèn de la fosforilació de la Tyr55, però que tot i que la formació del complex Spry2/c-Cbl és dispensable per la inhibició de les ERK regula la degradació de Spry2 (Mason *et al.*, 2004; Mason *et al.*, 2006). La fosforilació en serines també té una funció important i s'ha descrit que la fosforilació de les Ser112 i Ser121 a través de Mnk1 (MAPK interacting kinase 1) promou l'estabilització de Spry2 regulant la fosforilació de la Tyr55, ja que la mutació d'aquestes serines incrementa la fosforilació de la Tyr55 potenciant la unió de c-Cbl i per tant la degradació de la proteïna (Dasilva *et al.*, 2006). També s'ha descrit la funció d'altres lligases d'ubiquïtina E3 com Siah2 i Nedd4. Siah2 s'uneix al domini N-terminal de Spry i promou la seva degradació a través d'un mecanisme independent de la fosforilació en tirosines (Nadeau *et al.*, 2007), mentre que Nedd4 requereix la fosforilació de les Ser112/121 a través de Mnk2 per interaccionar amb Spry (Edwin *et al.*, 2010).

Finalment pel que fa a la localització cel·lular, Spry1 i Spry2 de vegades estan associades a la membrana plasmàtica i a la Caveolina-1 a través del CRD (Impagnatiello *et al.*, 2001; Cabrita and Christofori, 2008). La importància de la localització de les proteïnes de Spry a la membrana pot reflectir el fet que proteïnes d'unió a Spry com Grb2 (Hanafusa *et al.*, 2002) i Raf1 (Sasaki *et al.*, 2003) es troben a la membrana plasmàtica. Per tant, el moviment de Spry cap a la membrana plasmàtica també pot estar controlant la seva activitat inhibidora.

## 1.2 Funció de Sprouty durant el desenvolupament embrionari

Durant el desenvolupament embrionari es requereix una regulació a nivell espacial i temporal de les vies de transducció de senyals implicades en el creixement i la diferenciació cel·lular. El control negatiu de la resposta induïda per factors de creixement s'aconsegueix mitjançant la inhibició de la pròpia senyal i la inducció de mecanismes reguladors que afecten la propagació de la senyal. Un exemple en seria la regulació de la senyalització a través de RTK pels gens de la família Sprouty. Els gens Sprouty de mamífer segueixen patrons d'expressió altament específics durant el desenvolupament embrionari i en molts teixits adults (De Maximy *et al.*, 1999; Minowada *et al.*, 1999; Chambers and Mason, 2000). A més a més, aquest patró específic d'expressió coincideix en espai i temps amb l'expressió dels gens FGF i Ret en diverses estructures embrionàries on Sprouty actua com un antagonista de la senyalització per FGFR i Ret.

La generació de models murins *knockout* per Sprouty ens ha proporcionat informació sobre les funcions de Sprouty, així com també ens ha servit per confirmar la funció inhibidora d'aquests gens en la regulació de la morfogènesis de diferents estructures i en la senyalització per factors de creixement. A diferència dels estudis *in vitro* on la funció de Sprouty no està clara i depèn de diversos factors, tots els estudis *in vivo* amb ratolins *knockout* d'algun o alguns membres de la família de Sprouty demostren que Sprouty actua com un inhibidor. A continuació descrivim amb més detall els models i alguns fenotips dels diferents membres de la família (per més informació sobre la implicació de Sprouty en processos fisiològics i del desenvolupament vegeu Taula 1 (Masoumi-Moghaddam *et al.*, 2014).

Investigators	Sprouty isoform	Developmental/Adult physiological event
Hacohen et al. [1]	dSpry	Tracheal development
Kramer et al. [2]	dSpry	Eye development
Minowada et al. [10]	mSpry2 and 4	Limb development
Tefft et al. [12]	mSpry2	Lung development
Furthauer et al. [17]	zSpry4	Midbrain development
Zhang et al. [18]	mSpry1, 2 and 4	Craniofacial and trunk development
Gross et al. [19]	mSpry1	Kidney development
Chi et al. [20]	hSpry2	Ureteric branching
Lo et al. [21]	mSpry1 and 2	Breast development in puberty and pregnancy
Anteby et al. [22]	hSpry1, 2, and 3	Placental villi sprouting
Haimov-Kochman et al. [23]	hSpry2	Follicle maturation and corpus luteum formation
Lin et al. [24]	mSpry2	Patterning of midbrain and anterior hindbrain
Shim et al. [25]	mSpry2	Inner ear development
Basson et al. [26]	mSpry1	Ureteric branching
Boros et al. [27]	mSpry1 and 2	Ocular lens development
Chi et al. [28]	mSpry2	Male sex organogenesis
Natanson-Yaron et al. [29]	hSpry2	Placental villi sprouting
Price et al. [30]	hSpry4	Kidney development
Gross et al. [8]	mSpry2	Neuronal differentiation
Shaw et al. [31]	mSpry2	Lung development
Laziz et al. [32]	hSpry1, 2 and 4	Muscle regeneration
Hamel et al. [33]	hSpry2	Oocyte developmental competence
Klein et al. [34]	mSpry4 (+ mSpry1 or 2)	Growth and development of rodent incisors
Jaggi et al. [35]	mSpry4	Pancreas development
Wang et al. [36]	xSpry1	Gastrulation
Pan et al. [37]	mSpry2	Lens and lacrimal gland development
Purcell et al. [38]	mSpry1 and 2	Temporomandibular Joint development
Sieglitz et al. [39]	dSpry	Neuronal and glial differentiation
Kuracha et al. [40]	mSpry1 and 2	Eyelid closure
Velasco et al. [41]	hSpry2	Endometrial gland developing and branching
Sigurdsson et al. [42]	hSpry2	Breast morphogenesis
Ching et al. [43]	mSpry1 and 2	External genitalia development

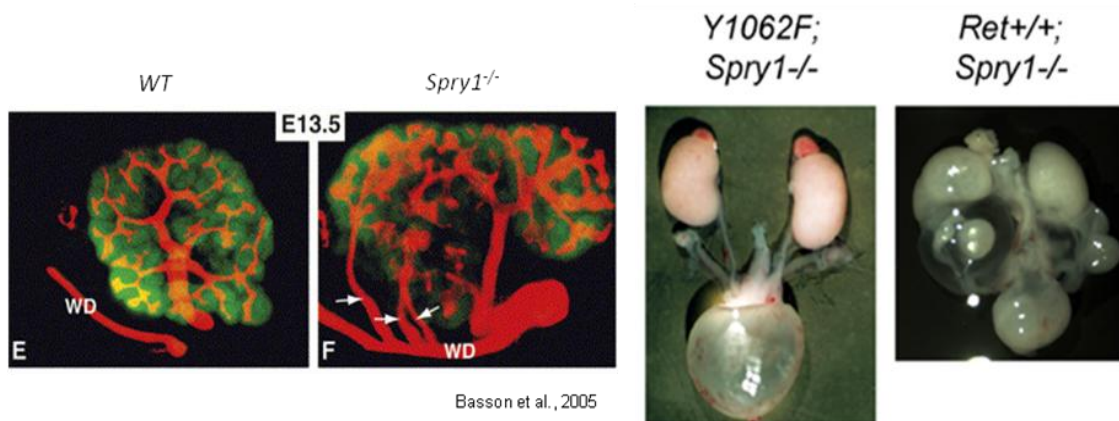
**Taula 1.** Implicacions dels gens de la família de Sprouty en processos fisiològics i del desenvolupament.



La manca de **Spry1** provoca defectes en el desenvolupament del ronyó i en la ramificació de la gemma uretèrica (UB). La gemma uretèrica és una estructura embrionària que dóna lloc al sistema col·lector del ronyó i l'absència de la qual provoca agènesi renal. Els defectes renals causats per la falta de Spry1 es deuen a un excés de senyalització per GDNF a través del seu receptor Ret (Basson *et al.*, 2005; Basson *et al.*, 2006). Tal i com s'explica amb més detall en la secció de desenvolupament del sistema genitourinari el procés de formació i de ramificació de la gemma uretèrica està regulat pels gens de Ret, Gdnf i Spry1 entre altres. Breument, Ret (*REarranged during Transfection*) és un receptor tirosina cinasa transmembrana que en el ronyó s'activa a través de la interacció amb el lligand GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*) i el co-receptor GFR $\alpha$ 1 (*Gdnf Family Receptor $\alpha$ 1*). El GDNF és una glicoproteïna secretada relacionada amb la família de TGF $\beta$  que s'expressa en el mesènquima metanèfric mentre que Ret només s'expressa en l'epiteli de la gemma uretèrica (Sariola and Saarma, 2003). Curiosament, el co-receptor GFR $\alpha$ 1 s'expressa tant en el mesènquima com en l'epiteli (Towers *et al.*, 1998; Golden *et al.*, 1999; Enomoto *et al.*, 2004; Keefe Davis *et al.*, 2013). L'expressió de Ret defineix una població de cèl·lules de l'extrem de la gemma uretèrica que proliferen sota l'efecte de l'estimulació del GDNF secretat pel mesènquima metanèfric provocant l'evaginació i ramificació de la gemma uretèrica a partir del conducte de Wolff (WD, estructura precursora del ronyó que es forma a partir del mesoderm intermedi i que també rep el nom de conducte nèfric) cap al mesènquima metanèfric (Schuchardt *et al.*, 1994; Schuchardt *et al.*, 1996). Estudis amb ratolins *knockout* per Ret han demostrat com la inactivació d'aquest gen resulta en agènesi renal o hipodisplàsia severa ja que en absència de Ret les cèl·lules dels extrems de la UB canvien el seu destí cel·lular i contribueixen només a la formació del tronc de la gemma uretèrica (Shakya *et al.*, 2005). Treballs de diferents laboratoris han demostrat que els ratolins nuls per GDNF i GFR $\alpha$ 1 també moren al néixer a causa d'una agènesi o aplàsia renal bilateral (Pichel *et al.*, 1996; Cacalano *et al.*, 1998; Enomoto *et al.*, 1998).

Així doncs, la funció de Spry1 durant el desenvolupament de la gemma uretèrica es va analitzar el 2005 quan el Dr. MA Basson i els seus col·laboradors van descriure el fenotip renal del ratolí *knockout* per Spry1. Aquests ratolins tal i com es pot veure en la Figura 2 neixen amb malformacions renals que recorden a les observades en el síndrome humà CAKUT (Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract). L'anàlisi histològic dels ronyons mutants mostra una clara desorganització amb zones nefrogèniques més enllà del còrtex i la presència de cists epitelials derivats del sistema col·lector. A dia E11.5 que és quan té lloc la formació de la gemma uretèrica, l'embrió *knockout* per Spry1 presenta una dilatació de la base i dels extrems de la UB i a més s'observen gemmes ectòpiques al llarg del conducte de Wolff. A E14.5 el ronyó nul per Spry1 està més ramificat i presenta defectes en la maduració de l'urèter. Spry1 s'expressa en l'epiteli del conducte de Wolff en el moment de la formació de la gemma uretèrica i també després per regular la seva ramificació. L'expressió de Spry1 en la gemma uretèrica depèn de Ret, ja que el *knockout* de Ret específic del conducte de Wolff presenta una

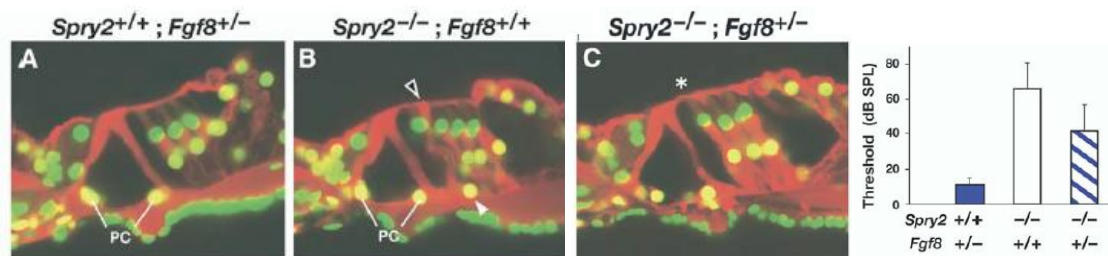
disminució dels nivells de *Spry1*. El mecanisme mitjançant el qual *Spry1* regula ambdós processos involucra l'activitat *Ret/Gdnf*. *Spry1* regula la senyalització downstream de *Ret* ja que l'anàlisi de l'expressió de *Wnt11* (gen que es troba per sota de *Ret*) en la gemma uretèrica del ratolí *Spry1KO* mostra un increment de la seva expressió en zones més anteriors del conducte de Wolff i en llocs ectòpics on es formaran les gemmes supernumeràries. En el moment de la formació de la gemma uretèrica la manca de *Spry1* no promou el manteniment de l'expressió de *Gdnf* simplement les cèl·lules es tornen hipersensibles a aquest factor, però sí que l'augmenta durant el procés de ramificació. Durant la formació de la gemma uretèrica a part de *Wnt11* hi ha altres gens que regulen i són necessaris per l'expressió de *Gdnf* com *Foxc1*, *Slit2* i *Robo2*. Pel que fa al procés de ramificació aquest està regulat també per *Fgf7* i *Fgf10*. Tant en la formació com en la ramificació de la gemma uretèrica es senyala com possible mecanisme d'acció de *Spry1* la inhibició del via MAPK/ERK. Resulta interessant destacar que el fenotip del mutant de *Spry1* es rescata quan es creua amb un ratolí heterozigot per *GDNF*, o bé amb mutants hipomorfs (*Y1062F*) o nuls de *Ret* (Figura 2) (Basson *et al.*, 2006; Rozen *et al.*, 2009; Michos *et al.*, 2010). Aquests resultats confirmen que *Spry1* actua com a inhibidor de la senyalització de *Ret in vivo* i que a més *Spry1* pot estar regulant altres vies no només la de *Ret/Gdnf*, tot i que aquesta és crucial pel desenvolupament del ronyó.



**Figura 2. Defectes renals del ratolí *knockout* per *Spry1*.** A l'esquerra immunofluorescència de *Pax2* (vermell) i citoqueratina (verd) d'explants de ronyons a E13.5 i s'observa la presència de gemmes ectòpiques i ronyons duplicats, i a la dreta imatges macroscòpiques del sistema geniturinari dels genotips indicats. Adaptat de (Basson *et al.*, 2005; Rozen *et al.*, 2009).

Pel que fa a ***Spry2***, s'han generat dos models *knockout* en dos laboratoris independents. En un model els ratolins nuls per *Spry2* són viables, neixen en proporcions mendelianes però en el moment del deslletament mor la meitat dels ratolins *knockout* per *Spry2* i els que sobreviuen són més petits (Shim *et al.*, 2005). Com a possible causa de la mort s'assenyala la presència de defectes en la funció del tracte gastrointestinal. En aquest treball descriuen com la pèrdua de *Spry2* resulta en defectes en la citoarquitectura de l'òrgan de Corti, concretament presenten un excès en el nombre de OHC (Outer Hair Cell) de la oïda interna i un defecte en la diferenciació de les cèl·lules Deiter que desencadenen en una pèrdua d'audició. La manca de

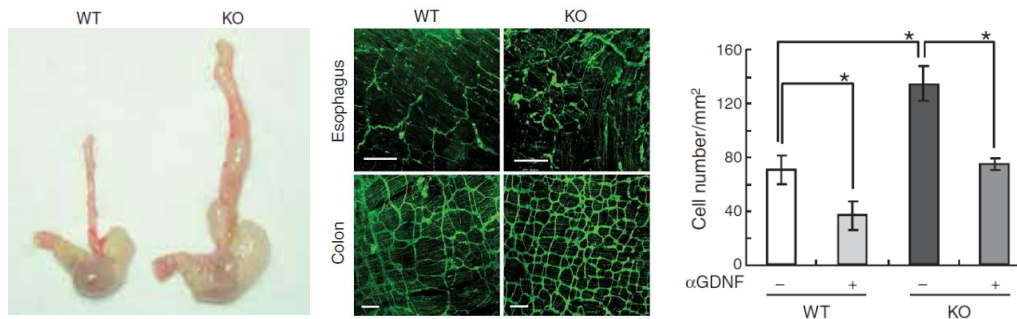
Spry2 altera el destí cel·lular d'una de les cèl·lules de Deiter i aquesta es transforma en una cèl·lula pilar ectòpica que formarà un segon túnel de Corti. Els estudis en *Drosophila melanogaster* han descrit la funció de Spry com a regulador negatiu de la senyalització per FGF (Hacohen *et al.*, 1998). A més, Fgf8 i el seu putatiu receptor Fgfr3 s'expressen en algunes cèl·lules d'aquesta estructura i la seva pèrdua impedeix el desenvolupament de les cèl·lules pilars (Colvin *et al.*, 1996). També s'ha descrit que Fgf8 és necessari per induir l'expressió de Spry2 en l'embrió (Minowada *et al.*, 1999). Tant els defectes en la diferenciació cel·lular com la pèrdua d'audició del ratolí *knockout* per Spry2 es poden rescatar parcialment reduint el dosatge genètic de Fgf8 però no reduint els nivells de Fgfr3, segurament degut a la redundància funcional amb altres receptors. Així doncs, la funció de Spry2 com antagonista de la senyalització per FGF és essencial per la formació correcta de l'òrgan de Corti i per l'audició.



**Figura 3. Defectes en la oïda interna causats per la pèrdua de Spry2.** Secció transversal de l'òrgan de Corti a P21 tenyit amb S100 (vermell) on s'observa que el ratolí mutant per Spry2 presenta una cèl·lula pilar ectòpica i que aquests defectes, així com la pèrdua d'audició es rescaten reduint la dosi de Fgf8 (panell esquerre). Adaptat de (Shim *et al.*, 2005).

En el cas de l'altra línia generada de ratolí *knockout* per Spry2 els ratolins també neixen amb freqüències mendelianes, presenten una esperança de vida reduïda ja que la meitat moren abans de les sis setmanes i els que sobreviuen són més petits. De la mateixa manera que en l'altra línia, la manca de Spry2 provoca la pèrdua de l'audició però a més a més, descriuen un fenotip gastrointestinal sever caracteritzat per una hiperplàsia del sistema nerviós entèric deguda a una hiperactivitat per GDNF (Taketomi *et al.*, 2005). Els ratolins *knockout* per Spry2 presenten acalàsia de l'esòfag i una pseudo-obstrucció intestinal, característiques que recorden a la malaltia de Hirschprung en humans o al megacolon agangliònic dels ratolins deficients per GDNF (Barlow *et al.*, 2003). Així doncs, tal i com es pot veure en la Figura 4 els ratolins Spry2 KO presenten una hiperplàsia de les neurones entèriques del colon i de l'esòfag, hiperganglionosi i un increment del M2AChR (Muscarinic2-acetilcholine receptor) en les unions neuromusculars de l'esòfag. El lligand GDNF i el seu receptor Ret regulen la migració i la colonització de les cèl·lules de la cresta neural i són necessaris per la supervivència de les neurones del sistema nerviós entèric (ENS). L'anàlisi de la via de senyalització de Ret-GDNF en el sistema nerviós entèric dels ratolins deficients per Spry2 va revelar un increment dels nivells de pERK i pAkt, així com la hipersensibilitat de les ENS a GDNF. A més a més, per confirmar el paper del GDNF en la hiperganglionosi, experiments amb anticossos bloquejants contra GDNF

corregeixen la hiperplàsia del sistema nerviós entèric i la dilatació de l'esòfag dels ratolins *knockout* per *Spry2*. Per tant, *Spry2* és un regulador negatiu de la senyalització de Ret-Gdnf durant el desenvolupament de les neurones entèriques. Aquest model proporciona una evidència *in vivo* més de la funció inhibidòria dels gens *Sprouty* en la senyalització per Ret.



**Figura 4. Defectes en el sistema nerviós entèric dels ratolins knockout per *Spry2*.** De dreta a esquerra, esòfags dels genotips indicats amb acumulació de saburra en el cas del KO (acalàsia de l'esòfag). Immunofluorescència contra PGP9.5 on es mostra la hiperplàsia del ENS dels ratolins *Spry2* KO. Rescat de la hiperplàsia del ENS mitjançant la injecció d'anticossos bloquejants de GDNF. Adaptat de (Taketomi *et al.*, 2005).

S'han descrit dos línies de ratolí *knockout* per *Spry4*. En el primer model generat per Klein *et al* els ratolins deficients per *Spry4* són viables i fèrtils. En aquest treball demostren que *Spry2* i *Spry4* controlen el desenvolupament de la dentadura antagonitzant la senyalització per FGF (Klein *et al.*, 2006). Tot i que *Spry2* i *Spry4* s'expressen en diferents compartiments durant el desenvolupament de les dents (epiteli i mesènquima, respectivament), la pèrdua de funció d'un o altre gen resulta en el mateix fenotip: la formació d'una dent en el diastema, regió que normalment no en conté cap. Està descrit que la senyalització per FGF juga un paper en la formació de la dentadura, i una vegada més mitjançant estudis d'interacció genètica es demostra com els defectes en la odontogènesi dels ratolins *knockout* per *Spry2* o *Spry4* es rescaten disminuint el dosatge genètic d'una sèrie de gens de la família de FGF. Per tant, aquests models a part d'indicar-nos una vegada més que *Sprouty* inhibeix la senyalització per FGF també ens aporten evidències de la cooperació entre els diferents gens de *Sprouty* mitjançant processos de comunicació creuada entre epiteli i mesènquima.

En el segon model els ratolins *knockout* per *Spry4* presenten defectes en la mandíbula que es tradueixen en una disminució de la viabilitat, mentre que els ratolins que sobreviuen són viables i fèrtils però mostren un retard en el creixement i polisindactília (Taniguchi *et al.*, 2007). Alguns ratolins tot i que amb una freqüència baixa presenten un increment de la mida dels incisius i/o maloclusió i tancament de la parpella de l'ull. S'ha descrit que *Spry2* i *Spry4* s'expressen durant el desenvolupament del pulmó i que *Spry4* inhibeix la ramificació d'aquest òrgan *in vitro*, però l'anàlisi dels pulmons del ratolí *knockout* per *Spry4* no va revelar un increment en la ramificació d'aquests. Aquestes dades suggereixen que la manca de *Spry4* en el pulmó pot estar compensada per un altre gen de la família de *Sprouty*.

Per determinar si existeix alguna funció solapant entre els gens de Sprouty2 i Sprouty4 durant el desenvolupament es van generar els ratolins doble *knockout* (DKO) per Spry2 i Spry4. Aquests ratolins són letals embrionaris i la majoria dels embrions moren a E12.5 degut a la presència de defectes craniofacials i de la morfogènesi del pulmó i les extremitats. Entre aquests defectes s'inclouen ciclopia, cervell alobar i ramificació anormal de l'epiteli pulmonar amb una reducció significativa de les vies aèries. El fet que defectes a nivell pulmonar siguin més severos en el DKO suggereix que Spry2 i Spry4 tenen activitats redundants durant el desenvolupament embrionari. Finalment, tot i que no ho demostren mitjançant experiments *in vivo* discuteixen que tots aquests defectes també es deuen a una hipersenyalització a través de FGF.

A part de l'existència de funcions solapants entre Spry2 i Spry4, existeixen tota una sèrie de treballs on s'ha estudiat i demostrat la cooperació entre els gens de Spry1 i Spry2 durant el desenvolupament de diferents estructures embrionàries. Kuracha i els seus col·laboradors descriuen papers redundants de Spry1 i Spry2 durant el tancament de la parpella i en la inhibició de la proliferació de les cèl·lules epitelials de la còrnea (Kuracha *et al.*, 2011; Kuracha *et al.*, 2013). Aquest mateix efecte el trobem en una població concreta de papil·les gustatives (Petersen *et al.*, 2011), en una estructura de la oïda interna (otic placode) (Mahoney Rogers *et al.*, 2011), en el desenvolupament del telencèfal i del cerebel (Faedo *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011), en la formació de l'articulació temporomandibular (Purcell *et al.*, 2012) i en el desenvolupament dels genitals externs (Ching *et al.*, 2014). En tots aquests treballs la delecció única de Spry1 o Spry2 no provoca l'aparició de cap fenotip anormal en l'estructura d'interès, però en canvi quan s'eliminen els dos gens és quan apareixen defectes en el desenvolupament embrionari o fenotips aberrants de l'estructura en qüestió. Això s'explica per la redundància genètica entre els membres de la família de Sprouty, on la manca d'un gen es veu compensada per la funció de l'altre, però és quan desapareixen ambdós que aleshores la seva funció queda totalment anul·lada. A més a més, cal remarcar que en tots aquests models una vegada més Sprouty actua com inhibidor de la senyalització per FGF *in vivo*.

**Spry3** és el membre de la família de Sprouty més desconegut. La seva expressió es troba restringida al cervell i als testicles i no s'ha generat cap model de ratolí per facilitar el seu estudi.

### 1.3 Funció de Sprouty en la tumorigènesi

Atès el paper crític de les proteïnes Sprouty com moduladors i mediadors de les interaccions entre la via de les MAPK/ERK i altres vies de senyalització per mantenir l'homeòstasi cel·lular, és d'esperar que estiguin desregulades en condicions de malignitat. Així diversos estudis s'han centrat en l'estudi de la desregulació de Sprouty en diferents tipus de càncer i el seu paper com a biomarcador (Frolov *et al.*, 2003; Lo *et al.*, 2004; Barbáchano *et al.*, 2010; Feng *et al.*,

2010; Faratian *et al.*, 2011; Sirivatanauksorn *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2013), supressor de tumors o inclús com a oncogen.

Des de fa més d'una dècada la llista de patologies canceroses en les quals els membres de la família de Sprouty hi tenen un paper ha anat incrementant. I és que a dia d'avui s'ha descrit alguna funció de Sprouty en més de 10 tipus de càncer diferents. Entre aquests trobem càncer de mama, càncer de pròstata, hepatocarcinoma, carcinoma pulmonar, melanoma, sarcoma, limfoma de cèl·lules B, càncer d'endometri, càncer testicular de cèl·lules germinals, càncer d'ovari, carcinoma de cèl·lules renals clares, tumors de la glàndula pituïtària i càncer de tiroide.

Els membres de la família de Sprouty que es troben principalment desregulats són Spry1 i Spry2, tot i que en alguns casos també està afectada l'expressió de Spry4. Així doncs, s'ha descrit el paper de Spry2 com a supressor tumoral en càncer d'endometri (Velasco *et al.*, 2011), càncer de pulmó (Sutterlüty *et al.*, 2007), hepatocarcinoma (Lee *et al.*, 2008), càncer de pròstata (Mckie *et al.*, 2005; Schutzman and Martin, 2012), càncer de colon (Feng *et al.*, 2011) i tumor hipofisari (Dorman *et al.*, 2012). En el cas de Spry1 s'ha descrit en càncer de tiroide pel nostre grup i en càncer de pròstata (Macià *et al.*, 2012; Schutzman and Martin, 2012). Finalment, pel que fa a Spry4 s'ha postulat com a supressor tumoral en càncer de pulmó (Winn *et al.*, 2005). No obstant, aquests mateixos gens també s'han descrit com a possibles oncògens. En el cas de Spry2 hi ha diversos treballs que donen suport al seu paper com oncogen en el desenvolupament de càncer de colon i sarcoma (Lito *et al.*, 2008; Lito *et al.*, 2009; Barbáchano *et al.*, 2010; Holgren *et al.*, 2010). En canvi en el cas de Spry1 i Spry4 només s'ha descrit en sarcoma i càncer testicular, respectivament (Kanetsky *et al.*, 2009; Schaaf *et al.*, 2010). L'existència de funcions oposades dels membres de la família de Sprouty també té lloc a nivell de la regulació de la via MAPK/ERK, ja que s'ha descrit que tant Spry1 com Spry2 inhibeixen la senyalització per FGF mentre que potencien l'activació de la mateixa via a través d'EGF (Edwin *et al.*, 2009).

Bàsicament en la majoria d'aquests estudis analitzen l'expressió dels gens de Sprouty en mostres de pacients dels diferents tipus de càncer esmentats. Per exemple, en el cas del càncer de mama el 90% de les mostres de pacient analitzades presenten una supressió de l'expressió de Spry1 i Spry2 (Lo *et al.*, 2004), en casos de càncer de pròstata Spry1 i Spry2 estan inactivats en un 15 i 18% de tumors primaris i un 42 i 74% de tumors metastàtics, respectivament i en mostres de carcinoma d'endometri el 20% de 136 casos havien perdut l'expressió de Spry2 (Velasco *et al.*, 2011). Aquestes dades es solen trobar complementades per estudis *in vitro* utilitzant línies cel·lulars canceroses per corroborar l'efecte de Spry en la proliferació, migració i diferenciació cel·lular. Tot i que la majoria de resultats són *in vitro*, a dia d'avui l'increment en l'ús de models de ratolí *in vivo* aporta resultats funcionals del paper de Sprouty en el desenvolupament i la progressió de diferents patologies tumorals. La major part de les evidències *in vivo* s'havien basat en l'anàlisi del creixement de xenògrafs en càncer de mama, càncer de colon, càncer de tiroide i melanoma; així com també en estudis de

sobreexpressió en ratolí mitjançant sistemes de transfecció hidrodinàmica i la tecnologia Cre-loxP en el cas de l'hepatocarcinoma i el carcinoma pulmonar, respectivament. Al 2007 Shaw i col·laboradors utilitzant un model de ratolí nul per Spry2 descriuen com la manca de Spry2 en un context mutant per KRAS provoca un increment del nombre de tumors pulmonars (Shaw *et al.*, 2007). Posteriorment, també es descriu el paper dels gens Spry1 i Spry2 com a supressor de tumors en la pròstata de ratolins heterozigots per Pten (Schutzman and Martin, 2012).

Els mecanismes implicats en la disminució dels nivells d'expressió de Spry poden variar en funció del tipus de càncer, però principalment s'observen processos d'hipermetilació del promotor, de pèrdua d'heterozigositat (LOH) o de manca d'algun factor de transcripció que controla l'expressió de Spry. Així doncs, el promotor de Spry1 i Spry2 es troba hipermetilat en un elevat percentatge dels tumors de pròstata (Mckie *et al.*, 2005; Kwabi-Addo *et al.*, 2009), el promotor de Spry2 també presenta metilació del DNA en casos de carcinoma d'endometri, de limfoma de cèl·lules B i de càncer de pulmó (Sutterlüty *et al.*, 2007; Frank *et al.*, 2009; Velasco *et al.*, 2011) mentre que el de Spry1 es troba hipermetilat en el càncer de tiroide (Macià *et al.*, 2012). Pel que fa a la pèrdua d'heterozigositat de Spry2 s'observa en un 30% dels casos de càncer de pròstata (Mckie *et al.*, 2005) i en alguns casos d'hepatocarcinoma (Lo *et al.*, 2004). D'altra banda, el silenciament de Spry2 en el càncer de mama i en alguns casos de carcinoma hepatocel·lular i el de Spry4 en el càncer de pulmó es deu a defectes en l'expressió d'algun factor de transcripció, com per exemple PPAR $\gamma$  en el cas del promotor de Spry4 (Lo *et al.*, 2004; Bren-Mattison *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010).

Com els gens de la família de Spry es descriuen com reguladors de la via MAPK/ERK, aquesta es troba desregulada en molts dels càncers que hem anat mencionant. Per exemple, Spry2 actua inhibint la fosforilació de les ERK en el carcinoma hepatocel·lular, el càncer de pulmó, el càncer de colon i el limfoma de cèl·lules B (Masoumi-Moghaddam *et al.*, 2014). En el cas del càncer de pròstata les vies MAPK/ERK i PI3K/AKT són dos de les vies més freqüentment alterades amb un 40% en el cas dels tumors primaris i entre un 90-100% dels càncers metastàtics. S'ha descrit la interacció genètica entre Sprouty i PTEN un altre regulador d'aquestes vies, ja que la inactivació de Spry1 i Spry2 en un context d'haploinsuficiència de Pten accelera la tumorigènesi de la pròstata. Posteriorment Patel i els seus col·laboradors van demostrar que la deficiència de Spry2 és suficient per activar tant la via de les ERK com la PI3K/AKT però insuficient per promoure el desenvolupament tumoral. Mecanísticament, l'arrest proliferatiu induït per Spry2 involucra Pten, PP2A, GSK3 $\beta$ , p53 i les ROS. A part d'aquestes dues vies també s'ha descrit que Spry2 i Spry4 cooperen amb la via Wnt/ $\beta$ -catenina durant el desenvolupament de l'hepatocarcinoma i el càncer de pulmó, respectivament (Lee *et al.*, 2008; Tennis *et al.*, 2010). A més a més, els gens de Spry1 i Spry2 s'han descrit com dianes del microRNA miR-21 (Sayed *et al.*, 2008; Thum *et al.*, 2008), concretament Spry1 i Spry2 estan regulats negativament per miR-21 en càncer d'ovari i de colon (Feng *et al.*, 2011; Polytaichou *et al.*, 2011). El mecanisme d'acció de Sprouty pot variar en funció del context, així doncs per

exemple en el cas de les mutacions de RAS Sprouty pot actuar tant com un inhibidor o com un activador del desenvolupament i/o progressió tumoral.

La gran quantitat de treballs i estudis realitzats durant els darrers anys sobre la funció de Sprouty en càncer ha impulsat l'estudi de la seva utilitat com a biomarcador i la rellevància clínica. Spry2 és el gen de la família de Sprouty més proposat com a biomarcador, ja que s'ha postulat com a tal en càncer de mama (Lo *et al.*, 2004; Faratian *et al.*, 2011), de pròstata (Patel *et al.*, 2013), de colon (Frolov *et al.*, 2003; Barbáchano *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2010) i en hepatocarcinoma (Song *et al.*, 2012). Per exemple en el cas del càncer de mama s'ha vist que els baixos nivells de Spry2 s'associen amb alts nivells de HER2 i que actua sinèrgicament amb el Trastuzumab (anticòs monoclonal anti-HER2) reduint la viabilitat cel·lular i en el cas del càncer de colon l'expressió de Spry2 correlaciona amb la sensibilitat de les cèl·lules tumorals a l'inhibidor de EGFR (Gefitinib).

En línia amb l'exposat en aquest apartat, en resultats previs del nostre grup hem descrit que Spry1 s'expressa en les cèl·lules C de la tiroide de ratolí i que la deleció d'aquest gen causa una hiperplàsia de les cèl·lules C, lesió pre-cancerosa que precedeix l'aparició del carcinoma medul·lar de tiroide (MTC) en ratolins adults. A més a més, l'expressió ectòpica de Spry1 en una línia cel·lular derivada d'un MTC redueix la proliferació *in vitro* i inhibeix el creixement de xenògrafs *in vivo*. També vam demostrar que en mostres de MTC humanes el promotor de Spry1 es troba freqüentment metilat coincidint amb una disminució dels seus nivells. En la primera part d'aquesta tesi es mostren els resultats que confirmen el rol de Spry1 com a supressor tumoral en la glàndula tiroide així com en la glàndula adrenal *in vivo*.

#### 1.4 Mecanismes d'acció de les proteïnes Sprouty

Les proteïnes de la família Sprouty poden actuar com inhibidors de la senyalització Ras/MAPK/ERK activada per RTK en resposta a diversos factors de creixement, entre els quals es troben: FGF (Gross *et al.*, 2001; Impagnatiello *et al.*, 2001), PDGF (Gross *et al.*, 2001), VEGF (Impagnatiello *et al.*, 2001), NGF (Wong *et al.*, 2002), BDNF (Gross *et al.*, 2007) i GDNF (Ishida *et al.*, 2007). A nivell cel·lular, Sprouty modula processos de proliferació, diferenciació, motilitat i supervivència a través de la regulació de la via de les ERK i d'altres vies paral·leles i de la interacció amb diversos reguladors i efectors.

Els RTK regulen diverses vies de senyalització, una de les quals és la via Ras/MAPK/ERK. Quan un lligand s'uneix al seu receptor l'autofosforilació dels residus de tirosina del domini intracel·lular permet la unió de molècules adaptadores com Grb2 a través d'un domini SH2. Grb2 està associat constitutivament a SOS (*Son of sevenless*) i aquest complex promou l'intercanvi d'una molècula de GDP per una de GTP iniciant així la transducció de la senyal mitjançant l'activació de Ras, una proteïna G que es troba ancorada a la membrana plasmàtica. Aleshores Ras fosforila les serina/treonina cinases de la família Raf i les activa, aquestes a través de la fosforilació de serines i treonines activen la família de cinases MAP2K o MEK1/2 i



aquestes fosforilen i activen les MAPK (ERK1/2). Les cinases ERK1/2 un cop fosforilades es transloquen al nucli i modulen l'activitat de diversos factors de transcripció i l'expressió d'aquells gens diana requerits per les diferents funcions biològiques (Worby *et al.*, 1996). Entre aquests gens diana es troben els de la família de Sprouty que un cop sintetitzada la proteïna, s'activa a través de la fosforilació de la tirosina N-terminal conservada i bloquegen l'activació de Ras o Raf inhibint la senyalització intracel·lular a través d'un bucle de retroalimentació negativa (Mason *et al.*, 2006).

D'altra banda, el complex adaptador Grb2-SOS pot reclutar a Gab1/2 i activar la via de senyalització PI3K-Akt. Gab1/2 interacciona amb l'enzim PI3K i el segresta a la membrana plasmàtica. Aleshores PI3K catalitza la transformació de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP2) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3) (Hawkins *et al.*, 1992). La molècula de PIP3 és reconeguda pels dominis PH (*Pleckstrin Homology*) de diverses molècules adaptadores i efectores (Rameh *et al.*, 1997), com les serina-treonina cinases Akt o PDK1 (Downward, 2004). L'Akt és reclutada i fosforilada per PDK1 en la Thr308 i pel complex mTORC2 a la Ser473 (Sarbasov *et al.*, 2005; Alessi *et al.*, 2009) i al seu torn Akt fosforila residus serina i treonina de múltiples proteïnes.

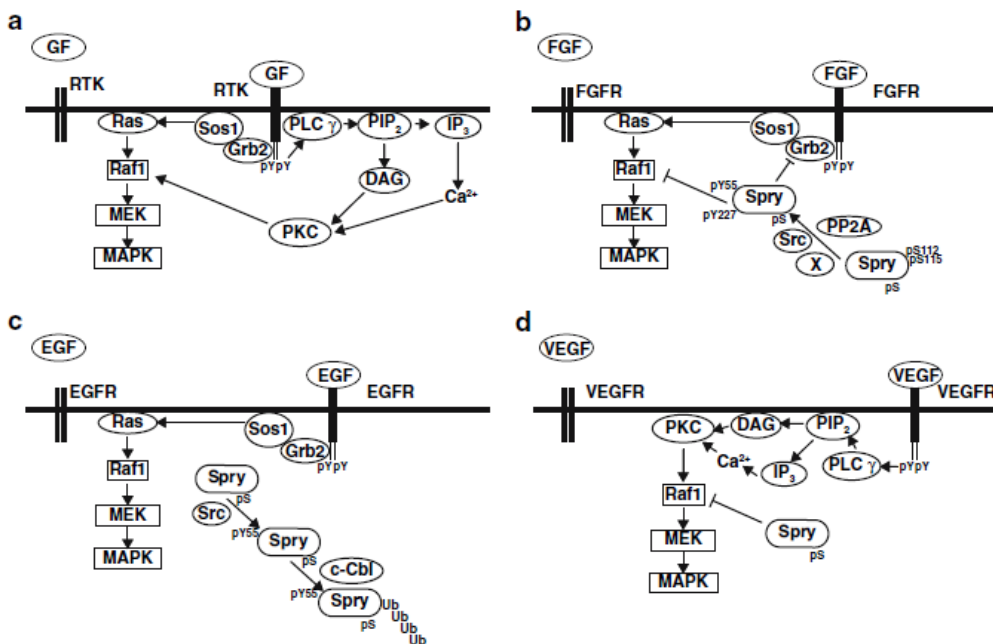
Tot i la gran quantitat de literatura publicada sobre la regulació de les vies de senyalització a través de Sprouty, avui dia no es coneix un mecanisme d'acció universal. S'ha generat certa controvèrsia pel que fa al punt de la via sobre el qual Sprouty bloqueja l'activació de la cascada MAPK/ERK, ja que les evidències experimentals suggereixen l'existència de diversos mecanismes que depenen del context cel·lular, del tipus de RTK i factor de creixement i del membre de Sprouty involucrat. La majoria de dades provenen d'estudis de sobreexpressió gènica realitzats *in vitro* i suggereixen l'existència de múltiples mecanismes d'acció implicant la interacció de Sprouty amb diversos components de les vies de transducció mediatades per RTK, però sense deixar clar de quina manera aquestes interaccions modulen la senyalització (Figura 5, Taula 2 (Edwin *et al.*, 2009)).

	EGF	FGF	PDGF	VEGF
Sprouty1	↑↔ Egan et al., 2002; Ozaki et al., 2005	↓↔ Hanafusa et al., 2002; Yusoff et al., 2002; Ozaki et al., 2005	?	↓ Impagnatiello et al., 2001; Huebert et al., 2004
Sprouty2	↑↔ Fürthauer et al., 2001; Egan et al., 2002; Wong et al., 2002; Ozaki et al., 2005	↓ Fürthauer et al., 2001; Impagnatiello et al., 2001; Yusoff et al., 2002; Ozaki et al., 2005	↓ Kajita et al., 2007	↓ Impagnatiello et al., 2001
Sprouty3	?	?	?	?
Sprouty4	↔ Fürthauer et al., 2001; Sasaki et al., 2003; Ozaki et al., 2005	↓↔ Fürthauer et al., 2001; Lee et al., 2001; Yusoff et al., 2002; Ozaki et al., 2005	?	↓ Lee et al., 2001; Sasaki et al., 2003

PDGF, platelet-derived growth factor; ↑, overexpression of sprouty-activated ERK activation; ↓, overexpression of sprouty-inhibited ERK activation; ↔, overexpression of sprouty did not affect ERK activation; ?, no current reports.

**Taula 2. Efecte de la sobreexpressió de les diferents isoformes de Sprouty en l'activació de la via MAPK/ERK induïda per diferents factors de creixement.**

Els estudis en *D. Melanogaster* descriuen com dSpry inhibeix la senyalització induïda per FGFR durant el desenvolupament de les vies aèries (Hacohen *et al.*, 1998). En canvi, durant el desenvolupament de l'ull dSpry inhibeix la senyalització induïda per EGFR per sobre de l'activació de Ras (Casci *et al.*, 1999), mentre que en el desenvolupament de les ales i ovaris, la funció de dSpry es troba per sota de Ras (Reich *et al.*, 1999). En fibroblasts de ratolí, Sprouty2 actua després de l'activació de FGFR, per sobre de Ras (Gross *et al.*, 2001); mentre que en cèl·lules 293T, bloqueja tant la senyalització de FGFR com del receptor  $\beta 2$  adrenèrgic a nivell de Raf (Yusoff *et al.*, 2002). També s'ha descrit que mSpry4 interfereix amb l'activació de Raf independentment de Ras, a través de l'activació de VEGFR (Sasaki *et al.*, 2003). No obstant, un altre grup ha determinat que hSpry4 reprimeix la senyalització per receptors d'insulina i d'EGF a nivell de Ras o anterior (Leeksa *et al.*, 2002). Altres estudis sobre xSpry1 i mSpry2, suggereixen que Sprouty antagonitza l'activació de la via ERK/MAPK induïda per FGF en base a la seva capacitat per competir amb Shp2 i FRS2 per la unió amb el complex Grb2-SOS (Hanafusa *et al.*, 2002). Segons aquest model, la interacció Spry-Grb2 estaria mediada per la unió del domini SH2 de Grb2, al residu fosfo-Tyr55 de Spry2. No obstant altres grups van observar que la unió de Spry2 al complex Grb2-SOS era constitutiva i que no era inhibida per la unió de FRS2 (Gross *et al.*, 2001; Rubin *et al.*, 2003; Rubin *et al.*, 2005).



**Figura 5. Mecanismes d'acció de Sprouty.** (a) Transducció de la senyal canònica en absència de Spry. Després de la unió del lligand, els RTKs poden activar les MAPK de forma Ras-dependenta a través de l'activació de Ras, Raf1, MEK i finalment de les MAPK mitjançant la proteïna adaptadora Grb2 i Sos1. Una altra via RTK que pot ser activada és la mediada per PLC $\gamma$  mitjançant la conversió de PIP $_2$  en IP $_3$  i DAG que portaran a la mobilització de Ca $^{2+}$ . Tant el DAG com el calci activen la PKC, que fosforilarà Raf1 activant les MAPK. (b) Inhibició de la senyalització per FGF a través de Spry. En estat basal Spry està fosforilat en múltiples serines i després de l'estimulació amb FGF es defosforilen les Ser112 i 115 per PP2A. A més, la fosforilació de la Tyr55 per una cinasa tipus Src i de la Tyr227 per una cinasa desconeguda (X) són requerides per Spry per inhibir l'activació de les MAPK per FGF. Sota determinades

condicions, la unió de Spry a Grb2 és suficient per inhibir l'activació de les MAPK per FGF, d'altres vegades l'associació a Grb2 no és necessària. L'associació entre Spry i Sos1 i Spry i Raf1 també inhibeix l'activació de les MAPK per FGF. (c) Activació de la senyalització per EGF a través de Spry. Després de la unió d'EGF, Spry és fosforilat en residus de tirosina i competeix amb EGFR per la unió de c-Cbl. A través de la interacció amb c-Cbl, Spry és ubiquitinilat i degradat, permetent així una senyalització sostinguda a través d'EGFR. (d) Inhibició de la senyalització per VEGF a través de Spry. Un cop ha tingut lloc l'activació per VEGF, Spry interacciona amb Raf1 a través del seu RBD i inhibeix l'activació de les MAPK. La fosforilació de la tirosina de Spry no és necessària per aquesta activitat. pY i pS representen residus fosforilats de tirosina i serina, respectivament. Aquest esquema utilitza Spry2 com a isoforma representativa de Spry, pY55 i pY227 representen les fosfotirosines N- i C-terminal (Cabrita and Christofori, 2008).

D'altra banda el paper de Sprouty en la regulació de l'activitat d'EGFR en mamífers encara no està clar. En aquest context diversos grups suggereixen que Sprouty no té un efecte inhibitori sobre l'activitat de la cascada Ras-ERK/MAPK induïda per aquest receptor, sinó que fins i tot pot tenir l'efecte contrari augmentant i prolongant els seus efectes. Aquest fenomen està regulat per la capacitat que presenten els membres de la família de Sprouty d'interaccionar amb c-Cbl (Impagnatiello *et al.*, 2001; Egan *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2003; Rubin *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2003). Aquest enzim intervé en la ubiquitinació del receptor activat EGFR, la seva internalització i posterior degradació proteosomal. Així el segrest de c-Cbl per Spry inhibeix la degradació del receptor i en prolonga la seva activitat (Cabrita and Christofori, 2008).

Com ja hem introduït anteriorment, a part de tenir un paper en la regulació dels nivells de Sprouty, l'estat de fosforilació del residu de tirosina conservat del domini N-terminal, és crucial pel desenvolupament de les funcions fisiològiques de Spry, concretament per la seva activitat inhibidòria (Hanafusa *et al.*, 2002; Guy *et al.*, 2009). La fosforilació d'aquesta tirosina conservada és un pre-requisit indispensable per la funció reguladora de Spry1 i Spry2 (Hanafusa *et al.*, 2002; Fong *et al.*, 2003) però no de Spry4 (Sasaki *et al.*, 2003; Mason *et al.*, 2004; Alsina *et al.*, 2012). Aquesta fosforilació varia en funció del factor de creixement i presenta diferents cinètiques segons el membre de Sprouty que analitzem. La fosforilació d'aquesta tirosina actua com un bucle de retroalimentació dual, ja que d'una banda activa la funció inhibidòria de Sprouty i d'altra banda promou la degradació a través de c-Cbl provocant la finalització de la senyal inhibidòria. També s'ha estudiat el significat funcional de la fosforilació d'altres residus de Sprouty, així doncs Rubin *et al.*, descriuen la fosforilació de la Tyr227 de Spry2 en resposta a FGF i Aranda i els seus col·laboradors identifiquen a Dyrk1a com un regulador negatiu de Sprouty a través de la fosforilació de la Thr75 (Rubin *et al.*, 2005; Aranda *et al.*, 2008). Tot i això, el paper d'aquestes dos tirosines no s'ha comprovat per altres laboratoris independents.

La defosforilació de Sprouty a través de les fosfatases PP2A (*Protein phosphatase 2A*) i SHP2 (*Src homology-2 containing phosphotyrosine phosphatase*) també regula l'activitat de la proteïna. En cèl·lules no estimulades, Sprouty es troba fosforilat principalment en residus de

serina del domini SRD de la regió N-terminal (Impagnatiello *et al.*, 2001). Per activar les proteïnes Sprouty es requereix la fosforilació de la tirosina conservada i la defosforilació dels residus de serina. Per dur-ho a terme PP2A s'uneix a Spry2 i defosforila les Ser112 i Ser115 (Lao *et al.*, 2007a; Guy *et al.*, 2009), aquesta defosforilació en serines provoca un canvi en la conformació terciària de la proteïna que exposa el lloc d'unió de Grb2 o altres proteïnes adaptadores permetent així la inhibició de les ERK a través de Spry2. A més, es sap que PP2A i c-Cbl competeixen per la unió amb Spry2 per regular la seva activitat (Cabrita and Christofori, 2008; Guy *et al.*, 2009). SHP2 s'ha implicat en la regulació de Sprouty a través de la defosforilació de les tirosines i la conseqüent dissociació de Grb2 que regula positivament l'activació de les ERK induïda per factors de creixement (Hanafusa *et al.*, 2004; Jarvis *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2012). A més, Sprouty regula les seves accions mitjançant l'increment de fosfatases com PTP1B (*protein tyrosine phosphatase 1B*) (Popleton *et al.*, 2004) i PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) (Edwin *et al.*, 2006).

A banda de ser necessàries per l'activació de Sprouty, s'ha descrit que mutacions en les tirosines de la regió N-terminal Tyr53 (en Spry1 i Spry4) i Tyr55 (en Spry2) generen mutants dominants negatius. Aquests mutants (Spry1Y53A, Spry2Y55F i Spry4Y53A) no només són incapaçs d'inhibir la senyalització de les ERK sinó que també inhibeixen la funció de la proteïna *wild-type* de Sprouty provocant un increment i/o prolongació de l'activació de les ERK, un augment de la transcripció de gens diana de la pròpia via o potenciant processos de diferenciació cel·lular regulats per Sprouty com és la formació de neurites (Sasaki *et al.*, 2001; Hanafusa *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2003; Mason *et al.*, 2004; Alsina *et al.*, 2012). Tots aquests treballs s'han realitzat *in vitro* i els resultats varien en funció del membre de Spry, de la línia cel·lular i del factor de creixement. Així doncs, les tirosines de cada Sprouty són fosforilades selectivament per un grup concret de factors de creixement i presenten cinètiques diferents, aquestes diferències suggereixen funcions no redundants de les proteïnes de Sprouty. D'altra banda, el mecanisme molecular no està clar i fins a dia d'avui no existien evidències *in vivo* que demostrassin el paper crític d'aquesta tirosina per la funció de Sprouty i encara menys el seu rol com a dominant negatiu. En aquest context la generació del ratolí *knockin* Spry1Y53A ens facilitarà i ens permetrà l'estudi del paper d'aquesta tirosina, a més de proporcionar-nos una eina molt útil a l'hora d'intentar elucidar el mecanisme molecular de Sprouty.

## 2. DESENVOLUPAMENT DEL SISTEMA GENITOURINARI

Donats els papers rellevants de Sprouty i Ret en el sistema genitourinari i per poder contextualitzar els resultats d'una part d'aquest treball, a continuació revisarem els processos del desenvolupament embrionari d'alguns òrgans d'aquest sistema.

El concepte de desenvolupament urogenital implica un nexa entre els processos del desenvolupament dels sistemes urinari i genital. Aquesta relació es troba filogenèticament ben conservada en l'evolució, i és que en l'embrió aquests sistemes es desenvolupen a partir de precursors comuns. Els dos sistemes en gran part deriven del mesoderm intermedi i hi ha elements del ronyó primitiu com el mesonefros que formen part del sistema genital. A més a més, els conductes excretors d'òrgans d'ambdós sistemes freqüentment es troben juxtaposats o són comuns.

El desenvolupament del sistema genitourinari dels vertebrats, el qual inclou els ronyons, les gònades i els tractes urinari i reproductiu, comença poc després de la gastrulació a través de la diferenciació del mesoderm intermedi. Aquest teixit embrionari prolifera i en algunes cèl·lules s'indueix la transició mesènquima-epiteli per generar els túbuls que formen els tractes reproductors masculins i femenins, així com també els ronyons.

### 2.1 Desenvolupament del tracte urinari

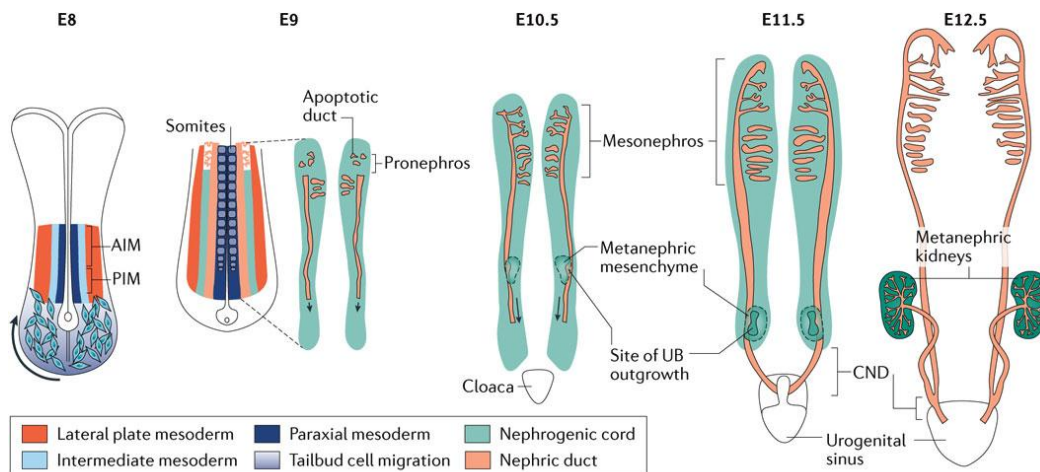
El sistema urinari està constituït per un conjunt d'òrgans que s'encarreguen de produir orina per eliminar els residus nitrogenats del metabolisme i de l'osmoregulació. Està format pels ronyons, els urèters, la bufeta i la uretra. En aquest treball principalment ens centrarem en el desenvolupament del ronyó.

#### 2.1.1 Desenvolupament i estructura del ronyó

Els ronyons són òrgans bilaterals que regulen la composició i el volum dels fluids corporals i eliminen els residus metabòlics. La unitat de filtració del ronyó és la nefrona, a l'extrem proximal de la qual es troben els glomèruls que són els responsables de filtrar la sang i conduir el filtrat (orina) a l'epiteli tubular on serà modificat abans de ser alliberat al conducte col·lector.

El desenvolupament renal dels mamífers es diferencia del d'altres òrgans en que té lloc a través de tres fases successives, cadascuna de les quals està marcada per la formació d'un parell de ronyons cada cop més complexos. Aquests ronyons reben el nom de pronefros, mesonefros i metanefros i es desenvolupen en sentit cranial-caudal a partir de franges de cèl·lules del mesoderm intermedi. En amniotes el pronefros i el mesonefros són estructures embrionàries transitòries poc desenvolupades que degeneren. El pronefros no té cap funció coneguda mentre que al mesonefros se li atribueix la funció d'òrgan excretor. El metanefros dóna lloc al ronyó definitiu adult i es caracteritza per un extens sistema col·lector ramificat i un

gran nombre de nefrones (~11.000 en ratolí i entre 300.000 i 1 milió en humà; (Nyengaard and Bendtsen, 1992; Yuan *et al.*, 2002). Estructuralment, el metanefros de mamífer comprèn una regió medul·lar interna que conté els conductes col·lectors i les nanses llargues de Henle (part de la nefrona involucrat en la concentració de l'orina), una regió medul·lar externa amb conductes col·lectors i nanses de Henle curtes, i una regió cortical que conté altres dominis de la nefrona. Aquesta estructura és important per la funcionalitat del ronyó metanèrfic ja que s'estableix un gradient osmòtic entre l'escorça i la mèdulla que promou l'extracció d'aigua de l'orina (Fenton and Knepper, 2007).



**Figura 6. Visió general del desenvolupament embrionari del ronyó (Short and Smyth, 2016).** El ronyó de mamífer s'origina a partir del mesoderm intermedi situat entre la placa lateral i el mesoderm paraxial a dia E8.0 en ratolí. Al voltant de E9.0, una població de cèl·lules del mesoderm intermedi anterior (AIM) dona lloc al conducte pronèrfic i s'allarga caudalment per formar el conducte nèrfic (ND). A E10.5 el ND ha migrat prop de la cloaca i els túbuls mesonèrfics rostrals i caudals es formen a partir del AIM posterior i del mesoderm intermedi posterior (PIM), respectivament. En aquest estadi, el pronefros ha degenerat, el ND dona lloc a la gemma uretèrica (UB) i el mesènquima metanèrfic sorgeix de les cèl·lules del PIM presents en la corda nefrogènica. A E11.5, la UB que després formarà tot el sistema col·lector, es comença a dividir formant una bifurcació en forma de T. En aquest moment s'inicia la remodelació del conducte nèrfic comú (CND) que acabarà resultant en la connexió dels urèters amb els sinus unrogenital (UGS)/bufeta. Al voltant de E12.5, el ronyó metanèrfic progressa ràpidament, els túbuls mesonèrfics (MT) estan connectats al ND, i tots els components connecten amb els UGS a través de l'urèter (UR) i del CND.

El mesoderm intermedi pot ser reconegut en l'embrió de ratolí a partir del dia E9. Degut a la seva proliferació al voltant del dia E9.5 forma dos arcs longitudinals bilaterals a la paret posterior del cos anomenats arcs urogenitals. Dins de l'arc urogenital es formen les tres unitats del ronyó, el desenvolupament de les quals descriurem amb més detall a continuació.

El procés de desenvolupament del ronyó comença amb la formació del conducte pronèrfic a partir del pronefros. El **pronefros** s'origina a partir del mesoderm intermedi a dia E8.0 (Vetter and Gibley, 1966; Bouchard *et al.*, 2000). En la regió cranial del mesoderm intermedi els precursors del conducte pronèrfic es separen i formen una línia longitudinal curta de cèl·lules que creixen caudalment des de l'arc urogenital per fusionar-se amb el sinus urogenital (porció ventral de la cloaca) a E11.0 (Hoar, 1976). Aquestes cèl·lules es sotmeten a una transició

mesenquimal-epitelial i formen el tub epitelial del conducte pronefric (també anomenat conducte nèfric o de Wolff). Al mateix temps, tenen lloc tres condensacions de cèl·lules mesenquimals des de la corda nefrogènica. Aquests grups de cèl·lules però, no es diferencien i s'avorta el desenvolupament del pronefros (Vetter and Gibley, 1966). Durant la seva migració el conducte nèfric indueix la formació de les nefrones mesonefriques a partir del mesoderm intermedi adjacent (també anomenat corda nefrogènica o mesènquima nefrogènic). El conducte nèfric comença a degenerar just després de la seva formació però persisteix en les seves posicions més caudals ja que és necessari per la formació dels ronyons mesonefrics i metanèfrics (Pole *et al.*, 2002; Pietilä and Vainio, 2005).

El **mesonefros** murí consisteix en 18 parells de túbuls que s'estenen des del nivell de la somita 10 a la 17 i es troben dividits en diferents conjunts cranials i caudals (Vetter and Gibley, 1966; Sainio, 2003). Les nefrones de la part cranial desenvolupen glomèruls rudimentaris i s'uneixen amb el conducte nèfric en 4-6 llocs contribuint només a la formació segments de connexió curts (Croisille *et al.*, 1976; Brenner-Anantharam *et al.*, 2007; Mugford *et al.*, 2008). En canvi, els parells caudals que formen la major part del mesonefros estan formats per túbuls no ramificats primitius que no connecten al conducte nèfric i deriven de la corda nefrogènica. Aquests túbuls apareixen com condensacions de cèl·lules de la corda nefrogènica a dia E9.0 (Vetter and Gibley, 1966). Aquestes cèl·lules pateixen una transició mesenquimal-epitelial i formen una vesícula renal que s'elonga donant lloc a un cos amb forma de S (*S-shaped body*) (Smith and Mackay, 1991). La degeneració del mesonefros comença al voltant del dia E14.5 i en 24 hores pràcticament tots els túbuls han desaparegut en direcció caudal-cranial (Smith and Mackay, 1991; Sainio *et al.*, 1997). En les femelles desapareixen tots els túbuls, mentre que en els mascles alguns túbuls cranials es mantenen intactes i contribueixen a la formació dels conductes epididimals dels testicles (Vetter and Gibley, 1966).

El desenvolupament del **metanefros** s'inicia a dia E10.5 en l'extrem caudal del conducte nèfric a l'alçada de les extremitats posteriors. La secreció de GDNF per les cèl·lules del mesènquima metanèfric regula la formació de la gemma uretèrica (UB) induint l'extensió del conducte nèfric cap al mesènquima metanèfric. A dia E11.5 la gemma uretèrica forma una bifurcació en forma de T (*T-shaped*) i es sotmet a ~11 cicles de ramificació i elongació per generar el sistema de conductes col·lectors metanèfrics (Cebrián *et al.*, 2004). Durant aquest procés cada extrem de la gemma uretèrica s'envolta d'un caputxó de mesènquima metanèfric i dona lloc als progenitors de les nefrones que proliferen i es diferencien en cèl·lules glomerulars i epitelials tubulars que es fusionen amb el conducte col·lector. S'ha demostrat que les senyals d'inducció recíproques entre la gemma uretèrica i el mesènquima metanèfric són essencials per l'inici i el manteniment dels cicles de ramificació de la gemma i per la inducció de les nefrones en la formació del metanefros (Grobstein, 1956a; b).

Aquests processos de desenvolupament acabaran desembocant en la formació d'un ronyó funcional que començarà a produir orina al voltant de les 10 setmanes de gestació en humans i a partir d'E16,5 en ratolí.

## 2.2 Desenvolupament del sistema reproductor

Pel que fa al desenvolupament del sistema reproductor diferenciem entre el desenvolupament del sistema genital intern i extern. En aquest treball però, ens centrem en l'estudi dels genitals interns tant masculins com femenins.

Durant el desenvolupament embrionari del sistema reproductor de mamífers, rèptils i aus es formen dos parells de sistemes ductals, els conductes de Wolff (WD) i de Müller (MD) (Massé *et al.*, 2009). En els mamífers mascles, el WD es diferencia en el conducte deferent, l'epidídim i la vesícula seminal. En el cas de les femelles, el MD es diferencia en l'oviducte, l'úter, el cèrvix i la part superior de la vagina. Pel que fa als testicles i als ovaris es diferencien a partir de la gònada, mentre que la pròstata en el cas dels mascles es forma a partir del sinus urogenital.

### 2.2.1 Desenvolupament i diferenciació del sistema genital intern

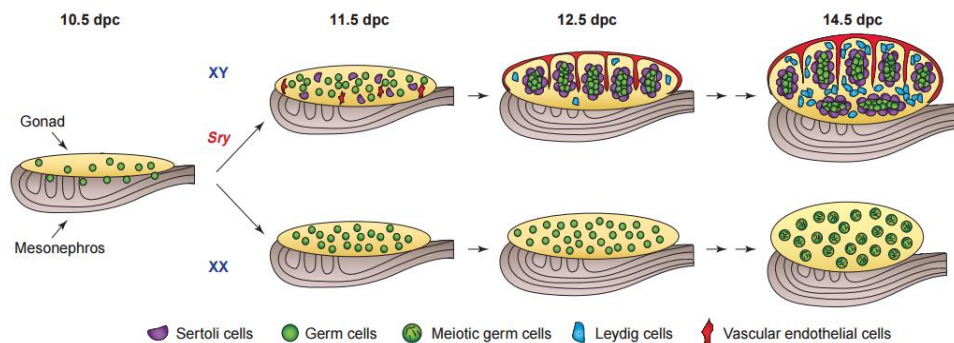
#### 2.2.1.1 Desenvolupament de la gònada

Coincidint amb la diferenciació del mesonefros, les gònades es diferencien com uns arcs gonadals longitudinals bilaterals a la cara mitja dels arcs urogenitals en la zona lumbar superior. Els arcs gonadals es poden reconèixer en el ratolí histològicament a partir del dia E9.5 i macroscòpicament es poden identificar a dia E12. A dia E13 ja es poden diferenciar les gònades masculines de les femenines. En els mascles s'observen les cordes testiculars que esdevindran els túbuls seminífers, mentre que en el cas de les femelles l'ovari té menys estructures internes degut a la manca d'aquestes cordes epitelials.

En mamífers les cèl·lules germinals primordials (PGCs) apareixen fora de l'arc urogenital abans de la formació de les gònades. Aquestes cèl·lules s'especifiquen en l'epiblast i es detecten per primer cop a dia E7.25 en una regió posterior de la línia primitiva (Mclaren, 2003). Les PGC proliferen i migren a través del mesenteri intestinal cap a l'arc urogenital i poblen les gònades entre els dies E10.0 i E11.0. Els estadis inicials del desenvolupament de les gònades són idèntics en mascles i femelles, es generen uns rudiments urogenitals en l'anomenat estadi indiferent o ambisexual de la diferenciació sexual. En aquest estadi el sexe de les gònades no pot ser determinat mitjançant criteris morfològics. La diferenciació sexual de la gònada s'inicia amb l'expressió del gen Sry (sex-determining region of chromosome Y) en les cèl·lules somàtiques de la gònada XY entre el dia E10.5 i E12.0 (Gubbay *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1990). El gen Sry codifica per un factor de transcripció essencial pel desenvolupament del mascle i per la formació dels testicles (Lovell-Badge and Robertson, 1990; Koopman *et al.*, 1991). Un cop s'inicia l'expressió de Sry es produeix un increment en la proliferació de les cèl·lules epitelials cel·lòmiques en les gònades XY (Schmahl *et al.*, 2000). Entre els dies E11.2 i



12.5 les cèl·lules de Sertoli es diferencien en la gònada XY i envolten les cèl·lules germinals per formar les cordes testiculars. Simultàniament, les cèl·lules endotelials vasculars migren del mesonefros cap a la gònada XY i s'organitzen en la vasculatura específica testicular (Brennan *et al.*, 2002). Les cèl·lules fetals de Leydig entre els dies E12.5 i 13.5 es diferencien en l'espai intersticial entre les cordes. En canvi, pocs canvis morfològics tenen lloc en l'ovari durant aquest període de temps. La primera característica evident del desenvolupament de l'ovari té lloc entre els dies E13.5 i 14.5 i és l'entrada de les cèl·lules germinals en la profase de la meiosi (Menke *et al.*, 2003). Altres aspectes de la diferenciació de l'ovari, incloent la diferenciació de les cèl·lules de la granulosa i la formació dels fol·licles primordials, tenen lloc en moments pròxims al naixement.



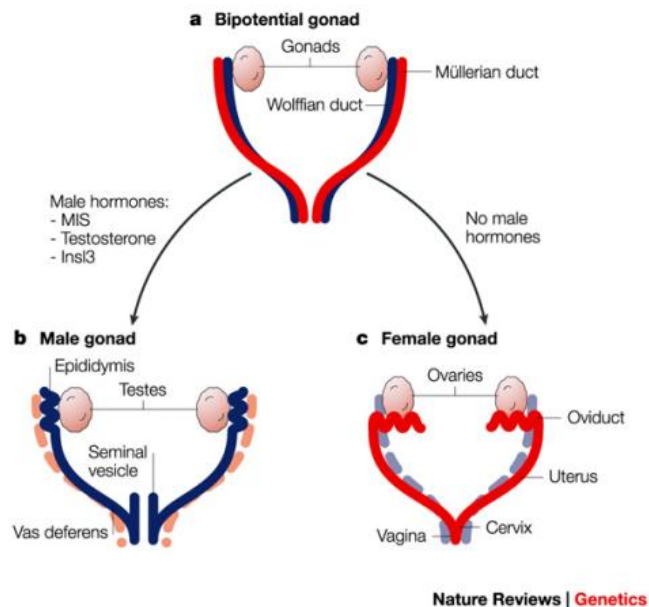
**Figura 7. Representació dels estadis primerencs de diferenciació de la gònada de ratolí.** La gònada bipotencial (groc) es forma inicialment com un engruiximent de l'epiteli coelòmic del mesonefros (gris). Entre els dies E9.5 i E11.5 les cèl·lules germinals primordials (verd) migren cap al sinus urogenital i poblen les gònades. Entre els dies E10.5 i E12.0 el gen *Sry* s'expressa específicament en les gònades XY, on desencadena el procés de diferenciació dels testicles. Les primeres característiques del desenvolupament testicular inclouen la diferenciació de les cèl·lules de Sertoli (morat), les quals condueixen a la formació de la vasculatura masculina específica (vermell). Al voltant del dia E12.5 també es produeix la diferenciació de les cèl·lules de Leydig (blau). En canvi, en les gònades XX no s'observen canvis morfològics fins als dies E13.5-14.5 quan les cèl·lules germinals entren en la profase de la meiosi. (Ross and Capel, 2005)

Les gònades també tenen un paper en el desenvolupament del sistema ductal masculí i femení. Com hem comentat anteriorment, al voltant del dia E13.0-14.0 les cèl·lules de Leydig es diferencien en els testicles i aquestes comencen a sintetitzar i secretar testosterona (Pointis *et al.*, 1980). La testosterona i els seus metabòlits prevenen la mort cel·lular dels WD i dels túbuls mesonèfrics i subseqüentment estimulen el seu desenvolupament. Entre els dies E14.0-15.0, les cèl·lules de Sertoli dels testicles comencen a produir la substància Müllleriana inhibidora (MIS), la qual promourà la destrucció del conductes de Mülller en mascles (Kuroda *et al.*, 1990; Münsterberg and Lovell-Badge, 1991). L'ovari fetal és relativament inactiu en sentit endocrí i no és necessari pel desenvolupament del tracte urogenital femení (Jost, 1972). En canvi, l'activitat endocrina (producció de testosterona i MIS) dels testicles embrionaris és essencial pel desenvolupament masculí.

### 2.2.1.2 Desenvolupament i diferenciació del sistema ductal

Tant en mascles com en femelles es formen dos sistemes ductals: el primer és el **conducte mesonèfric o Wolffian duct (WD)** que deriva del conducte pronèfric, i el segon és el **conducte paramesonèfric o Müllerian duct (MD)** el qual es desenvolupa lateralment al WD (Kobayashi and Behringer, 2003). El desenvolupament del tracte reproductor és un procés trifàsic d'iniciació, elongació i diferenciació.

En ratolí la iniciació del WD té lloc a partir del mesoderm intermedi el dia E9.0 i s'elonga craniocaudalment (Hannema and Hughes, 2007), mentre que el MD s'inicia a partir d'una invaginació de l'epiteli de la superfície del mesonefros al voltant del dia E11.5 i s'elonga paral·lelament al WD fins que arriben al sinus urogenital el dia E13.5 (Kobayashi and Behringer, 2003; Orvis and Behringer, 2007; Ma, 2009). Posteriorment, en l'embrió femella el WD degenera i el MD es diferencia en l'oviducte, l'úter, el cervix i la part superior de la vagina, que s'estendrà durant el desenvolupament post-natal per formar la vagina inferior (Kobayashi and Behringer, 2003; Ma, 2009; Kurita, 2011); mentre que en l'embrió mascle el MD degenera i el WD es diferencia en l'epidídim, el conducte deferent, la vesícula seminal i el conducte eferent (Kobayashi and Behringer, 2003) (Figura 8).



**Figura 8. Esquema de la diferenciació del sistema ductal de mamífer.** Abans de la diferenciació sexual, tant mascles com femelles tenen gònades bipotencials (a), ja que presenten els conductes de Wolff i de Müller. En els mascles (b) la testosterona promou la diferenciació del WD i la MIS provoca la degeneració dels MD (línia discontinua rosa). En les femelles (c) l'absència d'hormones masculines provoca l'eliminació del WD (línia blava discontinua), mentre que els MD persisteixen i es diferencien en el tracte reproductor femení (Kobayashi and Behringer, 2003).

Durant la diferenciació sexual, els rudiments urogenitals de l'estadi ambisexual experimenten processos de desenvolupament per generar patrons masculins o femenins. Cal dir que la finestra temporal del desenvolupament de les diferents estructures varia. Per exemple, com

hem comentat a l'apartat anterior la diferenciació sexual de les gònades té lloc a E13.0, quan els testicles i els ovaris esdevenen morfològicament diferents en l'embrió. L'estadi ambisexual pels WDs i MDs acaba a E16.0 quan es determina el seu destí de desenvolupament. En canvi, en el cas del sinus urogenital l'estadi ambisexual acaba a E17.0 quan apareixen les gemmes prostàtiques en els mascles.

Fins a dia E14.5 tant els WD com els MD estan presents en mascles i femelles, és aleshores quan té lloc l'inici de la diferenciació sexual del sistema ductal. En la femella l'absència d'andrògens testiculars fetals (testosterona) promou la regressió dels WD i túbuls mesonèfrics en direcció cranial-caudal. Així doncs, el sistema ductal femení no requereix estimulació hormonal per la seva diferenciació. En els mascles, la degeneració dels MD s'inicia també al voltant del dia E15.0 degut a la producció de la substància inhibidora Müllleriana (MIS). La persistència del futur sistema ductal masculí derivat dels WD i dels túbuls mesonèfrics requereix l'acció dels andrògens secretats per les cèl·lules de Leydig dels testicles fetals a partir d'E14.0. La testosterona estableix i evita la tendència natural de regressar dels WD i dels túbuls mesonèfrics. Alguns túbuls mesonèfrics s'uneixen amb els conductes dels testicles i de l'epidídim formant els conductes eferents. A més a més, sota la influència de la testosterona la part superior del WD s'elonga cap a la regió del testicle, plegant-se sobre sí mateix, i diferenciant-se en l'epidídim aproximadament a E18.0. La porció mitjana del WD en mascles es manté com un tub simple per formar el conducte deferent mentre que la part més caudal del WD en els embrions masculins mostra una dilatació diferent a E15.0. A E16.0-17.0 la dilatació inicial de la vesícula seminal del WD s'elonga cranialment per formar un diverticle (Lipschutz *et al.*, 1999).

A dia E16.0 tant la regressió dels WD com dels MD està pràcticament completada. La regressió d'aquests conductes té lloc en direcció cranial-caudal, i per tant a dia E15.0 (inici de la regressió) les porcions cranials poden ser més petites o absents mentre que a les regions caudals de l'arc urogenital s'observen ambdós conductes en aquest estadi. Els embrions de ratolí mascle a E16.0 presenten els WD però no els MD, mentre que en les femelles es mantenen els MD i els WD es troben gairebé completament regressats (Price e Ortiz, 1965). No obstant, s'ha demostrat que l'existència del WD en les femelles té un paper en el desenvolupament del seu sistema reproductor. Per exemple, diversos estudis han demostrat que perquè tingui lloc l'elongació del MD es requereix la presència del WD (Kobayashi *et al.*, 2005; Orvis and Behringer, 2007) i que també és necessari per la correcta formació de la vagina (Drews, 2007).

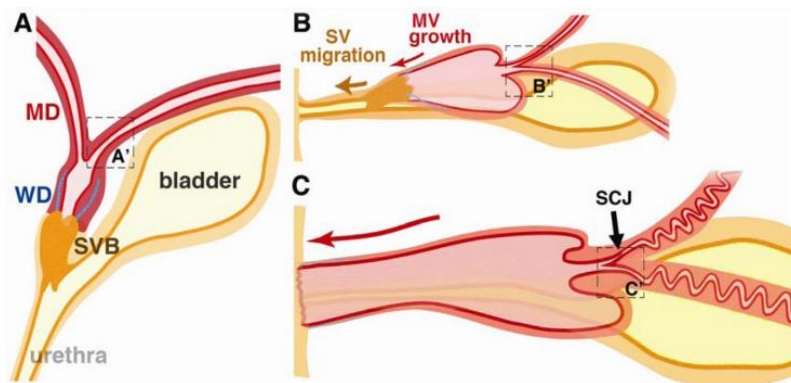
A continuació analitzarem amb més detall el desenvolupament de dos dels òrgans o estructures que s'originen a partir del WD i/o del MD, aquests són la vagina i les vesícules seminals.

### 2.2.1.3 Desenvolupament de la vagina

La major part del tracte reproductor femení es desenvolupa a partir del conducte paramesonèric o de Müller (MD) (Witschi, 1959; Kobayashi and Behringer, 2003; Yin and Ma, 2005). La fusió dels MD, els WD i el UGS forma el bulb sinovaginal, projeccions de cordes epitelials sòlides en la paret dorsal del UGS (Bloomfield, 1927; Koff, 1933). Al mateix temps, les parets internes dels MD degeneren i formen un canal únic i la major part del WD regresa deixant fragments d'epiteli (WDE) en la zona d'unió amb el UGS. En els embrions femella d'humà i de ratolí la unió dels MD fusionats amb el UGS forma una corda epitelial plana que en humans rep el nom de placa vaginal (Koff, 1933). En la majoria de llibres i treballs s'indica que la part inferior de la vagina es forma a través del creixement i canalització simultani de la placa vaginal (Kurita, 2010); Russell, 1989; Moore and Persaud, 2002; Sadler, 2004; Gilbert, 2003; Carlson, 1999; Forsberg, 1978).

Tal i com es pot veure en la Figura 9 en l'organogènesi de la vagina estan presents els MD, els WD i el UGS, però el grau de contribució de cadascuna d'aquestes estructures en la formació del bulb i la placa vaginal, així com de l'epiteli de la vagina adulta s'ha debatut durant dècades. Arrel d'aquesta controvèrsia s'han postulat quatre teories sobre l'origen de l'epiteli vaginal. La primera i més àmpliament acceptada defensa un origen a partir del UGS + MD, en la qual els dos terços superiors de la vagina (vagina Mülleriana) deriven de la part caudal dels MD i el terç inferior de la vagina (vagina sinus) es desenvolupa a partir del UGS (Koff, 1933; Del Vecchio, 1982; Shapiro *et al.*, 2000; Kobayashi and Behringer, 2003; Yin and Ma, 2005; Sajjad, 2010)(Moore and Persaud, 2002; Sadler, 2004; Forsberg, 1963; Gilbert, 2003. Segons aquesta teoria el bulb/placa vaginal consisteix únicament en epiteli d'origen UGS i per això s'anomena "bulb sinovaginal" (SVB). D'acord amb això, la vagina inferior es desenvolupa a través del creixement i canalització simultani de l'epiteli del UGS (UGE) (Koff, 1933) Forsberg, 1963). La segona teoria descriu que el bulb/placa vaginal deriva únicament del MD (Bloomfield, 1927; Cai, 2009). La tercera teoria parla d'un origen MD + WD (Hart, 1901; Bloomfield, 1927; Mauch *et al.*, 1985; Sánchez-Ferrer *et al.*, 2006). Finalment, la quarta teoria suggereix que tot l'epiteli deriva del UGS (Bulmer, 1957; 1959; Ulfelder and Robboy, 1976; Ferris, 2004).

Totes aquestes teories es basen en observacions anatòmiques i histològiques, però fins el 2010 cap havia set provada o refutada de forma definitiva. Finalment s'ha determinat l'origen de l'epiteli vaginal mitjançant una sèrie d'experiments de rastreig de llinatge cel·lular (Kurita, 2010). El resultat d'aquest treball va descartar les quatre teories descrites anteriorment, tot i que l'estudi coincideix amb la primera teoria (MD + UGS) en l'origen del bulb vaginal (format només per UGE).



**Figura 9. Esquema de la formació de la vagina i del cervix de ratolí.** A. Al voltant del dia E16.0 es troben presents el MD, WD i UGS tot i que la part cranial del WD ja ha regressat. B. En l'estadi perinatal la SV es desplaça caudalment a mesura que la MV s'elonga caudalment. En aquest moment, la major part del WD (línia blava) ha regressat. C. En la pubertat la corda epitelial sòlida de la SV forma una canalització i es forma l'orifici vaginal. La vagina està formada completament per cèl·lules epitelials derivades del MDE. MD; Müllerian duct, WD; Wolffian duct, UGS; urogenital sinus, SVB; sinovaginal bulb. SV; sinus vagina, MV; Müllerian vagina, SCJ; squamocolumnar junction, VgM; vaginal mesenchyme, UtM; uterine mesenchyme (Kurita, 2011).

Així doncs, les vagines embrionàries i de nounats estan formades per una "vagina Mülleriana" que deriva de la fusió dels MD i una "vagina sinus" que s'origina a partir del UGS. No obstant, les vagines Mülleriana i sinus mai s'unifiquen tal i com s'havia estat descrivint en la majoria de llibres i treballs. En ratolí l'epiteli de la "vagina sinus" es manté sòlid durant el desenvolupament i mai forma part de la verdadera vagina com a tal. A més a més, l'epiteli sòlid de la "vagina sinus" mai s'elonga. En lloc d'això, la "vagina sinus" connecta la "vagina Mülleriana" amb la uretra i migra cap a l'extrem posterior del cos dirigint el creixement caudal de la "vagina Mülleriana" (Figura 9 B i C). A dia P7 la "vagina Mülleriana" s'estén caudalment cap a l'extrem del cos mentre que la porció "vagina sinus" es troba significativament reduïda i es manté en la zona d'unió entre la vagina i la pell perineal. La corda epitelial sòlida de la "vagina sinus" només es canalitza durant la formació de l'obertura vaginal a la pubertat (4-5 setmanes), i aleshores el UGE de la "vagina sinus" passa a formar part de l'epiteli vulvar. Per tant, l'epiteli vaginal del ratolí adult deriva completament de l'epiteli del conducte de Müller.

A més a més, cal esmentar que des d'estadis embrionaris fins a l'edat adulta es troben residus d'epiteli del Wolffian duct (WDE) a la paret estromal dorsolateral de la vagina, però no en el propi epiteli vaginal o epiteli vulvar. El paper del WD residual en la formació de la vagina és controvertit, tot i que anàlisis histològics tridimensionals de diferents estadis del desenvolupament de la vagina suggereixen una funció assistencial del WD residual caudal (Drews, 2007). A més a més, altres treballs mostren com defectes en el WD provoquen defectes en la formació de la vagina, donant suport a la idea que el WD pot actuar com a guia durant l'elongació de la vagina (Murata *et al.*, 2014).

#### 2.2.1.4 Desenvolupament de la vesícula seminal

Les vesícules seminals i la pròstata són les glàndules sexuals accessòries masculines encarregades de produir la major part de fluid seminal. Tot i que les vesícules seminals deriven del WD i la pròstata deriva del sinus urogenital, els processos de morfogènesi als que es sotmeten ambdues glàndules són similars. Nosaltres però, ens centrem només en el desenvolupament de la vesícula seminal. Així doncs, inicia el seu desenvolupament com una estructura amb capes juxtaposades de cèl·lules mesenquimals i epitelials. La morfogènesi i especificació glandular de la vesícula seminal comença amb la projecció de gemmes des de les capes de cèl·lules epitelials cap al mesènquima que l'envolta i depèn dels andrògens produïts pels testicles fetals (Shukri *et al.*, 1988). Aquest procés té lloc durant els estadis finals de la gestació i és durant les dos primeres setmanes de vida quan les vesícules seminals creixen i pateixen processos morfogènics que provoquen un increment de la seva complexitat (Lung and Cunha, 1981; Sugimura *et al.*, 1986). El lumen de les vesícules seminals està present durant tot el seu procés de desenvolupament, ja des d'estadis primerencs quan té lloc la gemmació epitelial en el mesènquima de la vesícula. A mesura que va incrementant la complexitat de l'epiteli de la vesícula, les gemmes ductals creixen i ramifiquen cap a l'interior del mesènquima. Al mateix temps, plecs d'epiteli es projecten en el lumen ductal. Durant la pubertat (al voltant de les 5 setmanes en ratolí) es produeix un augment dels nivells d'andrògens i això provoca el creixement de les vesícules seminals fins a adquirir la seva mida adulta. Aquest increment dels nivells d'andrògens en la pubertat també provoca la citodiferenciació funcional de l'epiteli secretor de la vesícula seminal (Cunha *et al.*, 1987). Una sèrie d'estudis embrionaris han demostrat que els andrògens i tota una sèrie de senyals paracrines epiteli-mesenquima proporcionen informació que coordina la morfogènesi tant de les cèl·lules epitelials com mesenquimals. En els darrers anys s'han identificat diversos gens que tenen un paper en el desenvolupament de la vesícula seminal. Entre aquests gens trobem el receptor d'andrògens *AR* (Brown *et al.*, 1988; He *et al.*, 1991), *Fgf7* (Thomson *et al.*, 1997), *Fgf10* (Thomson and Cunha, 1999), *Gdf7* (Settle *et al.*, 2001), *Hoxa10* (Podlasek, Seo, *et al.*, 1999), *Hoxa13* (Warot *et al.*, 1997; Podlasek, Clemens, *et al.*, 1999), *Hoxd13* (Podlasek *et al.*, 1997; Warot *et al.*, 1997), i *Srd5a2* (Andersson *et al.*, 1991; Mahendroo *et al.*, 2001).

### 2.3 Gens i vies de senyalització implicades en el desenvolupament i la patologia del sistema genitourinari

Tot i que només s'han descobert uns quants gens associats a defectes en el tracte urinari en humans, els resultats dels darrers 30 anys en recerca bàsica ens han proporcionat coneixements biològics a nivell molecular sobre el desenvolupament del sistema genitourinari. Concretament, s'han identificat molts gens implicats en la formació de la gemma uretèrica, en el desenvolupament de l'urèter i en la formació del sistema reproductor. A més a més, s'ha demostrat que vies de senyalització importants en altres sistemes tenen un paper rellevant en el desenvolupament del sistema genitourinari. Entre elles trobem les vies de senyalització

mediades per receptors tirosina cinasa (RTK) amb gens clau com *Gdnf* i *Ret* (Costantini, 2010), la via Wnt on trobem gens com *Ctnnb1*, *Wnt7b*, *Wnt9b* i *Fzd1* (Trowe et al., 2012), la via de Hedhehog amb gens coneguts com *Shh*, *Gli3*, *Smo* i *Tshz3* (Yu et al., 2002; Caubit et al., 2008; Cain et al., 2011), la senyalització per TGF- $\beta$  amb gens com *Bmp4* o *Smad4* (Miyazaki et al., 2000; Brenner-Anantharam et al., 2007; Tripathi et al., 2012), la via de senyalització del receptor de l'àcid retinoïc on trobem els gens *Rara* i *Rarb* implicats (Batourina et al., 2005; Mendelsohn, 2009; Kam et al., 2012), i el sistema renina-angiotensina amb els gens *Agt*, *Ren*, *Agtr1* i *Agtr2* (Tsuchida et al., 1998; Nishimura et al., 1999; Gribouval et al., 2005; Yosypiv, 2011). A més a més, l'expressió dels gens d'aquestes vies de senyalització a part de ser necessaris pel desenvolupament del sistema genitourinari també es troben implicats en malalties i patologies d'aquest sistema.

En la part de desenvolupament d'aquest treball parlem sobretot de la funció de Sprouty en la formació del ronyó i descrivim un nou fenotip provocat per la manca de Sprouty durant el desenvolupament dels genitals interns. Com ja hem comentat en l'apartat de Sprouty, aquest gen és important per regular la formació de la gemma uretèrica i en la part dels resultats veurem com també és important per controlar el creixement i/o la regressió del Wolffian duct durant el desenvolupament de la vagina i de les vesícules seminals. Seguidament descriurem les vies i gens implicats en la regulació d'aquests dos processos. Així doncs, primer parlarem dels gens i vies implicats en la formació de la gemma uretèrica i després dels gens requerits per la formació del tracte reproductor masculí i femení. Principalment ens centrarem en l'anàlisi de la senyalització per Ret/Gdnf i de la via Wnt/ $\beta$ -catenina.

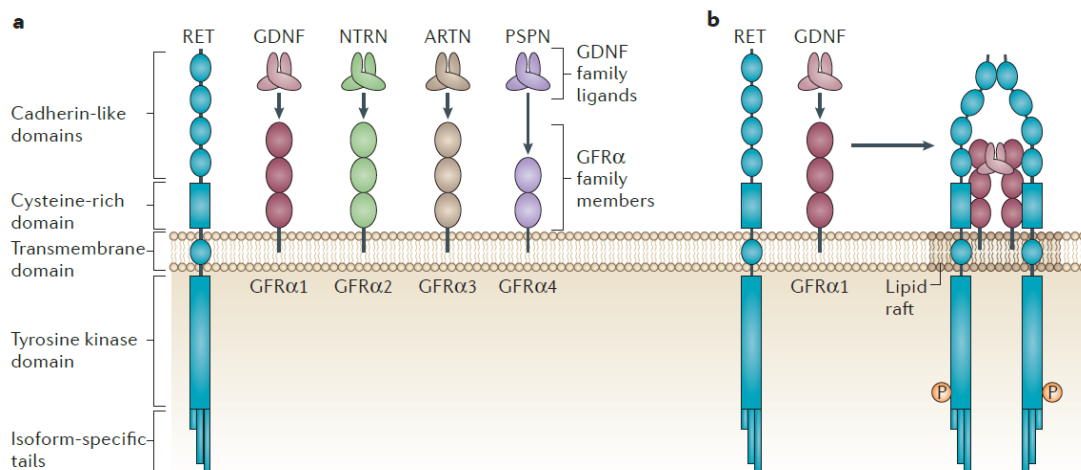
### 2.3.1 Mecanismes moleculars de la formació de la gemma uretèrica

#### 2.3.1.1 Senyalització per Ret/Gdnf

RET (REarranged during Transfection) és un receptor tirosina cinasa transmembrana que pot actuar com un receptor de factors de creixement o com un oncogen. Normalment s'activa a través d'un complex format per algun membre de la família dels lligands de GDNF (GFL) i un co-receptor anomenat receptor  $\alpha$  de la família de GDNF (GFR $\alpha$ ). Existeixen quatre GFLs diferents: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurturin (NRTN), artemin (ARTN) i persephin (PSPN). Cada lligand pot activar específicament el receptor RET a través de la unió selectiva a un dels quatre co-receptors GFR $\alpha$ 1-4, tot i que també es coneixen casos de reactivitat creuada. El fet que RET actuï com a transductor de la senyal de quatre complexes diferents de lligand/co-receptor justifica les seves múltiples funcions en diferents teixits (Airaksinen and Saarma, 2002). Així doncs, RET té un paper crucial en el desenvolupament del ronyó, en l'espermatogènesi i en la funció de la glàndula tiroide (Runeberg-Roos and Saarma, 2007). RET també és necessari pel desenvolupament del sistema nerviós entèric i regula el desenvolupament de les neurones simpàtiques, parasimpàtiques, motores i sensorials.

La identificació i el descobriment de l'oncogen RET va tenir lloc l'any 1985 quan Masahide Takahashi i Geoffrey Cooper van transfectar DNA total d'un limfoma humà en cèl·lules NIH3T3 de ratolí (Takahashi *et al.*, 1985). Així doncs, al realitzar aquest experiment van obtenir un clon que presentava una eficiència de transformació molt superior i es va descriure un nou reordenament del gen que va resultar ser una recombinació entre dos seqüències de DNA no relacionades entre sí. És per aquest motiu que aquest nou gen es va anomenar RET (REarranged during Transfection) (Arighi *et al.*, 2005). Posteriorment es va localitzar la posició en el genoma del proto-oncogen RET mitjançant FISH en la regió pericentromèrica del cromosoma 10q11.2 (Ishizaka *et al.*, 1989).

Pel que fa a l'estructura de RET segueix l'esquema típic dels receptors tirosina cinasa i tal i com s'observa en la Figura 10 presenta un gran domini extracel·lular, una regió transmembrana i un domini cinasa intracel·lular (Takahashi, 1988). Les seqüències extracel·lulars inclouen quatre repeticions cadherin-like que són importants per l'estabilització dels dímers de RET i a més a més també trobem una regió rica en cisteïnes proximal a la membrana que és crucial per la conformació de la proteïna i la unió al lligand (Anders *et al.*, 2001; Amoresano *et al.*, 2005; Kjaer *et al.*, 2010; Wang, 2013). Durant el processament de RET en el reticle endoplasmàtic es forma una glicoproteïna immadura de 155 kDa que a continuació serà processada en el trans-Golgi i en la via secretora donant com a resultat una proteïna madura de la membrana plasmàtica d'aproximadament 175 kDa (Van Weering *et al.*, 1998; Runeberg-Roos and Saarma, 2007; Hirata *et al.*, 2010; Richardson *et al.*, 2012).



**Figura 10. El receptor tirosina cinasa RET.** A. El receptor RET té un gran domini extracel·lular que conté una regió rica en cisteïnes i una sèrie de dominis de cadherina, un domini transmembrana i un domini tirosina cinasa intracel·lular. B. Els GFL no interaccionen directament amb RET, sinó que s'uneixen als co-receptors GFRα per formar un complex heterodimèric per reclutar RET als "lipid rafts". Aleshores es produeixen una sèrie de canvis conformationals que faciliten la dimerització i autofosforilació del receptor (Mulligan, 2014).



El gen de RET es sotmet a splicing alternatiu dels ens de la regió 3' del gen per generar tres isoformes proteiques diferents: RET9, RET43 i RET51. La diferència entre elles es troba en el nombre d'aminoàcids en l'extrem C-terminal, que és de 9, 43 i 51 aminoàcids, respectivament (Tahira *et al.*, 1990; Myers *et al.*, 1995). Les isoformes de RET9 i RET51 es troben altament conservades en tots els vertebrats, fet que suggereix que cadascuna té un paper funcional important; mentre que RET43 només s'expressa en primats i en baixos nivells (Carter *et al.*, 2001).

Durant el desenvolupament de la gemma uretèrica la senyalització a través de Ret s'activa mitjançant la formació del complex Gdnf-GFR $\alpha$ 1-Ret. A continuació descriurem amb més detall els gens implicats en la regulació d'aquesta via.

El lligand **Gdnf** és l'inductor més important del creixement i extensió de la gemma uretèrica a través de la senyalització pel receptor tirosina cinasa Ret (Costantini, 2010; Costantini and Kopan, 2010). El gen de Gdnf codifica per una proteïna que és secretada pel mesènquima metanèfric i indueix el creixement de les gemmes uretèriques durant els estadis inicials del desenvolupament del ronyó i de l'urèter (Costantini, 2010; Costantini and Kopan, 2010). Els ratolins *knockout* per Gdnf presenten agènesi renal degut a l'absència de formació de les gemmes uretèriques (Sánchez *et al.*, 1996).

El gen de **Ret** tal i com hem dit anteriorment codifica per un receptor tirosina cinasa que en el cas del ronyó es troba en l'epiteli de la gemma uretèrica i interacciona amb el Gdnf secretat per el mesènquima metanèfric. S'han identificat mutacions en Ret en pacients amb VUR (VesicoUreteral Reflux), obstrucció ureteral, megaurèter, ronyons dúplex, anormalitats renals així com en la malaltia de Hirschprung i en càncer (Takahashi, 2001; Jain, 2009; Pini Prato *et al.*, 2009). Els fenotips dels ratolins mutants de Ret són similars als defectes observats en humans. En el cas del sistema genitourinari els ratolins *knockout* per Ret o *knockin* per les tirosines claus de la seva senyalització presenten defectes renals entre els quals trobem agènesi renal i megaurèter. Per tant, mutacions en gens associats amb la via de Gdnf i Ret causen fenotips anormals en la formació de la UB en ratolí. Entre aquests gens trobem Spry1, Gata3, Bmp4, Slit/Robo2, Foxc1/2, Pax2, Eya1/Six1 i Sall1 (Xu *et al.*, 1999; Kume *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 2000; Nishinakamura *et al.*, 2001; Grieshammer *et al.*, 2004; Basson *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2007; Grote *et al.*, 2008; Kiefer *et al.*, 2010; Nie *et al.*, 2011).

Tal i com es veu en la Figura 11 podem dividir aquests gens en funció de si es troben per sobre (*upstream*) o per sota (*downstream*) de Ret.

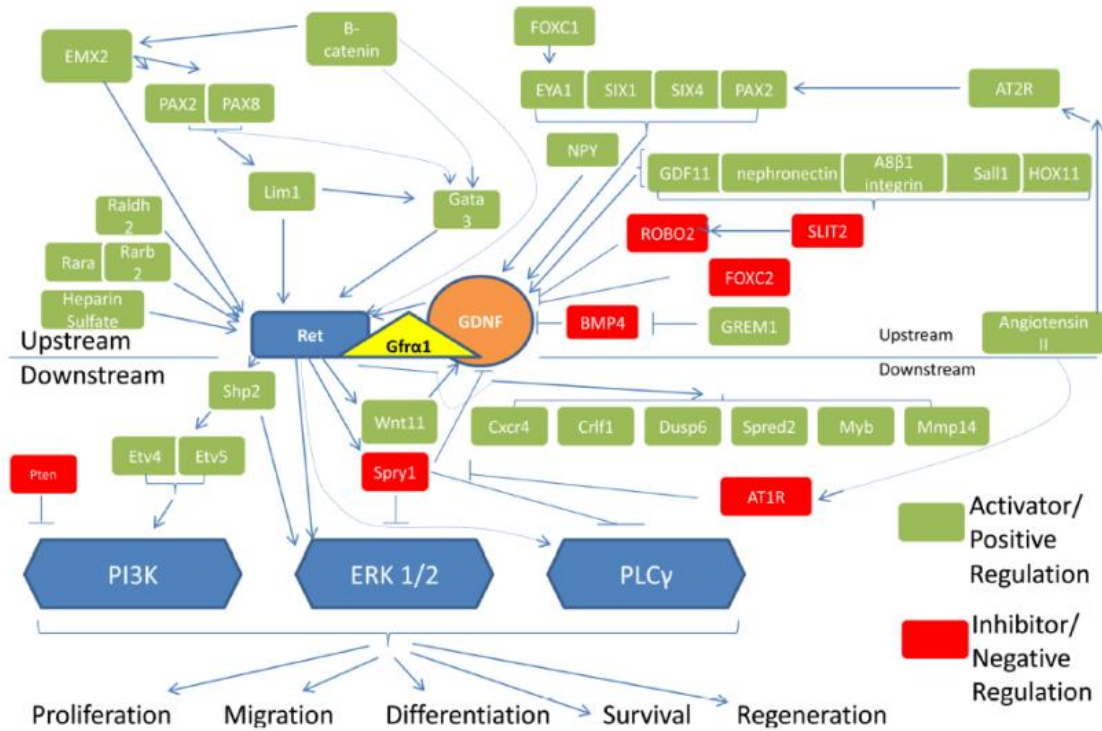


Figura 11. Esquema dels gens i vies implicades en la senyalització de Ret-Gdnf durant el desenvolupament de la gemma uretèrica. En verd trobem els activadors o reguladors positius de la senyalització, mentre que en vermell es mostren els inhibidors o reguladors negatius. Aquestes activacions poden ser directes o indirectes, i tenir lloc a nivell transcripcional o post-traducciona (Davis et al., 2014).

**Gens reguladors *upstream* de la senyalització per Ret-Gdnf**

**Gata3** és un factor de transcripció de la família GATA que s’expressa en la gemma uretèrica (Labastie et al., 1995). En ratolí l’absència de Gata3 provoca la formació de gemmes uretèriques ectòpiques, ronyons dúplex, hidroureter, hiperplàsia del conducte deferent i agènesi uterina (Grote et al., 2008). En humà s’han identificat mutacions en el gen de GATA3 com la causa de la sordesa sensorineural, l’hipoparatiroidisme (HDR: OMIM 146255) i la malaltia renal (Van Esch et al., 2000; Benetti et al., 2009). L’expressió de Gata3 està regulada pels gens **Pax2** i **Pax8**. Els ratolins nuls per Pax2 mostren una reducció en el desenvolupament del mesonefros i en l’expressió de Gdnf (Brophy et al., 2001). Gata3 també és un regulador clau de la morfogènesi del Wolffian duct (Grote et al., 2006). Els anàlisis moleculars han situat a Gata3 per sobre de Ret però per sota de **β-catenina**, evitant l’aparició de gemmes uretèriques ectòpiques i la diferenciació prematura del Wolffian duct (Grote et al., 2008).

En ratolí, la pèrdua dels **receptors d’àcid retinoïc** alpha (Rara) i beta (Rarb) provoca l’aparició de megaurèter i hidronefrosi degut a un defecte en l’apoptosi en el lloc d’inserció de l’urèter i

la bufeta (Batourina *et al.*, 2002; Batourina *et al.*, 2005). La deleció de *Ret* provoca agènesi renal degut a la downregulació de *Ret* (Rosselot *et al.*, 2010).

Un altre estudi mostra com la xarxa molecular formada per *Gata3-Raldh2-Ret* té un paper crucial en la inserció correcta del conducte nèfric en la bufeta. L'absència de *Ret*, *Gata3* o **Raldh2** causa defectes en la inserció de l'urèter similars donant lloc a fenotips d'obstrucció urinària i hidronefrosi en ratolí (Chia *et al.*, 2011).

**Foxc1**, **Foxf1** i **Foxc2** són factors de transcripció de la família FOX (Forkhead box). El gen *Foxc1* es troba expressat en el mesènquima metanèfric. A més a més, mutacions en *FOXC1* són la causa del síndrome Axenfeld-Rieger (OMIM 602482). Curiosament, mutacions en *Foxc1* i *Foxc2* en ratolí resulten en l'expansió del domini d'expressió de *Gdnf* en el mesènquima metanèfric provocant l'aparició de gemmes uretèriques ectòpiques, urèters duplicats i hidroureters (Kume *et al.*, 2000). *FOXF1* es troba en el mateix locus que *FOXC2* i forma part de les vies de senyalització de TGF- $\beta$  i de Sonic Hedgehog. Mutacions en el factor de transcripció *FOXF1* causa Displàsia Alveolar Capil·lar amb Desalineació de les Venes Pulmonars (ACDMPV: OMIM 265380), malaltia associada també amb defectes en tracte urinari (Weisschuh *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010).

Les proteïnes morfogenètiques òssies (BMPs) són un grup de proteïnes implicades i molt estudiades en el desenvolupament del sistema genitourinari. Concretament, el gen **Bmp-4** s'encarrega d'assegurar la formació correcta de la gemma uretèrica a prop del MM (Davies and Fisher, 2002). El ratolí *knockout* per *Bmp-4* mostra un increment de l'expressió de *Gdnf* i l'aparició de gemmes uretèriques ectòpiques indicant així que és un regulador negatiu de la senyalització per *Ret-Gdnf* (Raatikainen-Ahokas *et al.*, 2000).

Tot i l'origen ontogènic comú del ronyó i l'urèter hi ha alguns factors de transcripció del mesènquima metanèfric que permeten l'extensió de la gemma uretèrica i indueixen la formació de l'urèter però no del ronyó. Per exemple, mutacions en *SALL1*, un factor de transcripció expressat en el MM que activa la via canònica de Wnt, són responsables del síndrome Townes-Brocks (TBS: OMIM 107480) (Kohlhase *et al.*, 1998). La deleció dels dos al·lels de **Sall1** en ratolí provoca l'apoptosi del mesènquima i agènesi renal però urèters normals. Aquest fenotip es pot rescatar disminuint els nivells de  $\beta$ -catenina en el mutant de *Sall1* (Kiefer *et al.*, 2010). En la mateixa línia, mutacions en *SIX1* causen el síndrome Branchiootíc 3 (BOS3: OMIM 608389) i els ratolins homozigots per mutacions en **Six1** desenvolupen urèters però no ronyons (Bush *et al.*, 2006). Curiosament, la manca del gen **Eya1** (activador transcripcional que interacciona amb *Six1* al MM) provoca l'agènesi dels urèters i dels ronyons (Xu *et al.*, 1999). A més a més, mutacions en *EYA1* causa el síndrome Branchio-oto-renal (BOR: OMIM 113650) (Pierides *et al.*, 2002).

Finalment, la manca de **Slit2** i **Robo2** provoca l'expansió del domini d'expressió de Gdnf suggerint que aquestes proteïnes regulen negativament l'expressió de Gdnf i inhibeixen la senyalització per Ret (Grieshammer *et al.*, 2004).

### **Gens regulats *downstream* de la senyalització per Ret-Gdnf**

Ret regula l'expressió de **Wnt11**, **Etv4** i **Etv5** (Pepicelli *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2009). Tant el ratolí *knockout* de Wnt11 com el doble *knockout* de Etv4 i Etv5 presenten agènesi o hipoplàsia renal com els mutants de Ret.

També s'ha descrit que la fosfatasa de tirosines **Shp2** és un modulador de la senyalització de Ret, ja que els ratolins nuls per Shp2 presenten ronyons hipoplàstics i una *downregulació* de Wnt11, Etv4 i Etv5 (Willecke *et al.*, 2011).

Els ratolins doble *knockout* pels gens **Ptprf** i **Ptprs** (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type F and S) presenten un retard en la regressió del conducte nèfric comú i un augment en l'activació de les tirosines de Ret resultant en un defecte en la connexió de l'urèter i la bufeta causant obstrucció urinària, hidrourèter i hidronefrosi (Uetani *et al.*, 2009). Indicant així l'existència d'una interacció entre les vies de senyalització Lar (Leukocyte antigen related) i Ret.

**Spry1** és un regulador de la senyalització per RTK i actua per equilibrar la senyalització de Gdnf-Ret en la gemma uretèrica. Un dels mecanismes clàssics descrits per inhibir aquesta senyalització és mitjançant la inhibició de l'activitat Ras-MAPK (Hanafusa *et al.*, 2002). Així doncs, l'ablació de Spry1 resulta en una hiperactivació de la via Ras-MAPK en el ronyó (Basson *et al.*, 2005). A més, com ja hem vist en la secció de Sprouty i desenvolupament, mutacions en Spry1 provoquen la formació de múltiples gemmes uretèriques i hidrourèters. Aquest fenotip és totalment oposat al d'agènesi renal observat en els ratolins nuls per Ret o RetY1062F en els quals la inducció de la formació de la gemma uretèrica es troba inhibida per la reducció de la senyalització de la via Ras-MAPK. A més a més, en el nostre laboratori hem descrit com la manca de Spry1 és capaç de rescatar els fenotips renals dels ratolins homozigots per la mutació hipomòrfica de Ret (RetY1062F) demostrant així la interacció genètica d'aquests gens *in vivo* (Rozen *et al.*, 2009). El mecanisme implicat en el rescat renal podria estar provocant un increment de la senyalització de Ras-MAPK a través d'una via diferent de Ret. Una possible via és la de la senyalització a través de FGFR, ja que Fgf7 és capaç d'induir la formació de la gemma uretèrica en absència de la senyalització per Ret (Maeshima *et al.*, 2007). D'altra banda, els ratolins doble *knockout* per Spry1 i Gdnf o Ret tampoc presenten defectes renals, donant novament suport a la idea de l'existència d'una activitat tirosina cinasa alternativa en aquest sistema. Així doncs, l'eliminació de Fgf10 en els ratolins doble *knockout* de Ret i Spry1 resulta en l'absència de formació de la gemma uretèrica, suggerint que Fgf10 és el factor que activa la senyalització per RTK alternativa a través de Fgfr2 i indueix la formació de la gemma uretèrica (Michos *et al.*, 2010). Curiosament, les ampul·les dels ronyons dels ratolins doble

mutants Ret-Spry1 o Gdnf-Spry estan dilatades fet que suggereix el requeriment de Ret en la regulació d'altres aspectes de la ramificació del ronyó. A més, el fet que la mida dels ronyons dels ratolins Spry1<sup>-/-</sup>; Ret<sup>Y1062F/Y1062F</sup> sigui normal en comparació als Spry1<sup>-/-</sup>; Ret<sup>-/-</sup> i Spry1<sup>-/-</sup>; Gdnf<sup>-/-</sup> suggereix que les senyals de Ret que no senyalitzen a través de la tirosina 1062 també poden tenir un paper en la ramificació de la gemma uretèrica (Davis *et al.*, 2014). No obstant, no s'han identificat mutacions de Spry1 en pacients amb VUR (VesicoUreteral Reflux) o CAKUT (Van Eerde *et al.*, 2007).

### 2.3.1.2 Senyalització per Wnt/ $\beta$ -catenina

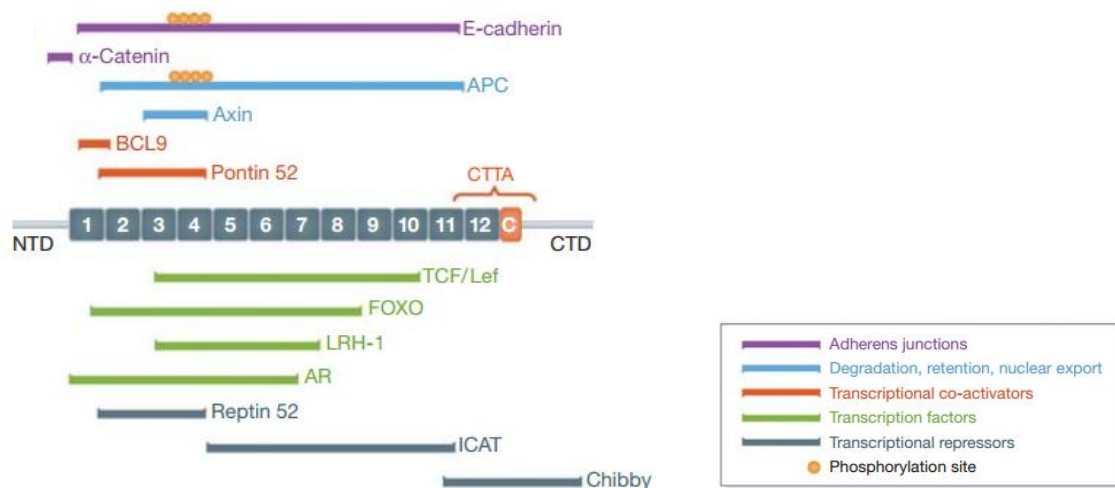
La senyalització a través de les glicoproteïnes de la família Wnt és un dels mecanismes fonamentals que controla els processos de proliferació, polaritat i diferenciació cel·lular durant el desenvolupament embrionari i l'homeostàsi dels teixits (Logan and Nusse, 2004). Així doncs, mutacions en la via de Wnt es troben freqüentment relacionades amb defectes en el naixement, càncer i altres malalties (Clevers, 2006).

La família dels gens Wnt està formada per 19 gens evolutivament conservats que codifiquen per proteïnes riques en cisteïnes que s'uneixen a diversos receptors i activen diferents vies de senyalització (Kikuchi *et al.*, 2011). Aquestes vies es classifiquen com a canòniques i no canòniques, en funció de si depenen de  $\beta$ -catenina o no, respectivament.

La proteïna de  $\beta$ -catenina (Armadillo en *Drosophila*) és una molècula amb múltiples funcions i que també està conservada evolutivament. Concretament,  $\beta$ -catenina és un dels components estructurals integrals de les unions adherents i també és un efector nuclear clau de la senyalització canònica de Wnt. Un desequilibri en les propietats estructurals i de senyalització de  $\beta$ -catenina sovint resulta en patologies i defectes en el creixement relacionats amb el càncer i la metàstasi.

La regulació dels processos de desenvolupament a través de  $\beta$ -catenina es duu a terme mitjançant la suma de la seva funció estructural i la seva funció senyalitzadora. La capacitat de  $\beta$ -catenina de poder mediar la seva activitat d'adhesió i senyalització es basa en la composició estructural d'aquesta proteïna. La molècula de  $\beta$ -catenina (781 aminoàcids en humà) consisteix en una regió central (residus 141-664) formada per 12 repeticions Armadillo (R1-12) que es troben flanquejades per uns dominis N-terminal i C-terminal diferents (NTD i CTD, respectivament). Els NTD i CTD són estructuralment flexibles mentre que la regió central és relativament rígida. Aquesta zona serveix com a plataforma d'interacció a moltes proteïnes que interaccionen amb  $\beta$ -catenina ja sigui a la membrana, al citosol o al nucli (Huber *et al.*, 1997). Anàlisis bioquímics i estructurals han revelat que molts interactors de  $\beta$ -catenina comparteixen llocs d'unió solapants de la regió central de la proteïna de  $\beta$ -catenina i per tant, aquestes proteïnes interactores no es poden unir a  $\beta$ -catenina simultàniament. Aquesta exclusivitat mútua la trobem tal i com es pot veure en la Figura 12 en el cas dels seus interactors claus: E-cadherina (partner principal de les unions adherents), APC (partner

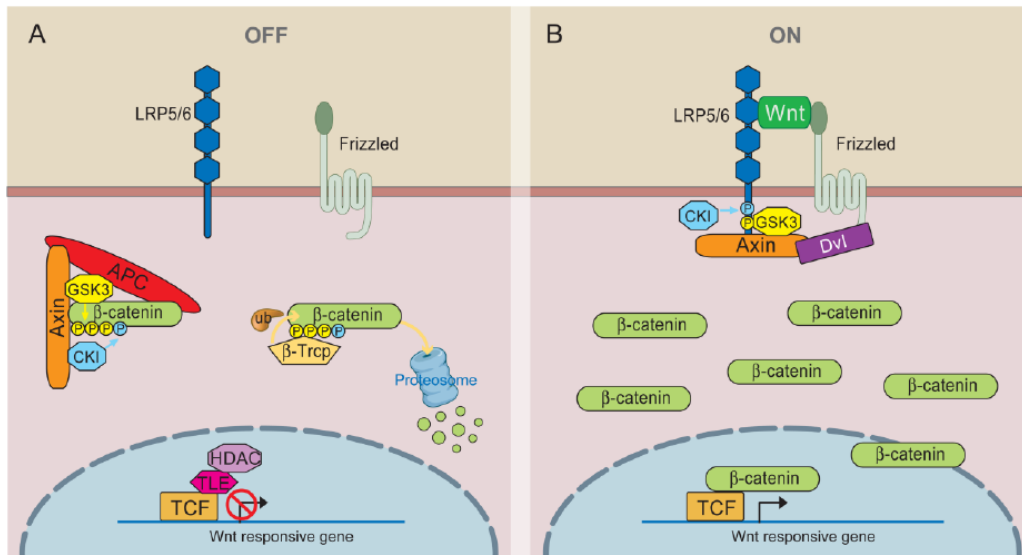
principal del complex de destrucció) i TCF/LEF (partner principal al nucli). Totes aquestes proteïnes s'uneixen al lloc d'unió localitzat en les repeticions ARM R3-R9 (Graham *et al.*, 2000; Eklof Spink *et al.*, 2001; Huber and Weis, 2001; Poy *et al.*, 2001). La segregació espacial dels diferents interactors de  $\beta$ -catenina dins de la cèl·lula és important per permetre'n la seva funció, però la competició entre elles per unir-se a  $\beta$ -catenina també es important a l'hora de regular la senyalització canònica de Wnt.



**Figura 12. Esquema de l'estructura de  $\beta$ -catenina i dels dominis implicats en la unió als seus diferents interactors.** La proteïna  $\beta$ -catenina consisteix en una regió central de 12 repeticions Armadillo (quadres enumerats), flanquejats per un domini N-terminal (NTD) i un domini C-terminal (CTD). Entre l'última repetició Armadillo i la part flexible del CTD es troba una hèlix-C conservada (C). Les barres de colors mostren llocs d'unió validats d'interactors de  $\beta$ -catenina. El domini d'unió dels activadors transcripcionals C-terminal (CTTA) està marcat amb corxets. Els cercles petits indiquen llocs de fosforilació d'E-cadherina o APC implicats en la interacció. APC, Adenoma Polyposis Coli; TCF/Lef, T-cell factor/Lymphoid enhancer factor; AR, Androgen Receptor; LRH-1, Liver Receptor Homologue-1; ICAT, Inhibitor of  $\beta$ -catenin and TCF; BCL9, B-cell lymphoma-9 (Valenta *et al.*, 2012).

La via dependent de  $\beta$ -catenina o via canònica és la que està més ben caracteritzada i es desencadena per la interacció de Wnt amb Frizzled i LRP5 o LRP6. En absència de Wnt, la proteïna citoplasmàtica  $\beta$ -catenina és degradada constantment a través del complex Axin, el qual està format per la proteïna adaptadora Axin, el supressor tumoral APC (adenomatous polyposis coli), CK1 (Casein kinase 1) i GSK3 (Glycogen synthase kinase 3. CK1 i GSK3 fosforilen seqüencialment la regió amino terminal de  $\beta$ -catenina i aleshores la forma fosforilada de  $\beta$ -catenina és reconeguda per la E3 ubiquitin lligasa  $\beta$ -Trcp que marca la  $\beta$ -catenina perquè sigui degradada pel proteosoma (He *et al.*, 2004). Aquesta eliminació continua de  $\beta$ -catenina impedeix que aquesta proteïna s'acumuli i entri al nucli, de manera que els gens diana de Wnt estan reprimits per la unió al DNA dels factors TCF (T cell factor) i LEF (Lymphoid enhancer factor). La via Wnt/ $\beta$ -catenina s'activa quan un lligand Wnt s'uneix a un receptor transmembrana Frizzled (Fz) i el seu co-receptor LRP5 o LRP6 (low-density lipoprotein receptor related protein 5-6). La formació del complex Wnt-Fz-LRP5/6 juntament amb el reclutament de

la proteïna adaptadora Dvl (Dishevelled) resulta en la fosforilació de LRP5/6 i l'activació i reclutament del complex Axin cap al receptor. Tots aquests esdeveniments porten a la inhibició de la fosforilació de  $\beta$ -catenina a través del complex Axin i per tant a l'estabilització de  $\beta$ -catenina, la qual s'acumula i entra al nucli on forma complexos amb TCF/LEF i activa l'expressió dels gens diana de Wnt. Aquesta via es troba predominantment implicada en la regulació de la diferenciació i proliferació cel·lular.



**Figura 13. Esquema de la senyalització de Wnt/ $\beta$ -catenina.** A. En absència de Wnt, la  $\beta$ -catenina citoplasmàtica forma un complex amb l'Axin, APC, GSK3 i CK1, i és fosforilada per CK1 (blau) i després per GSK3 (groc). La forma fosforilada de  $\beta$ -catenina és reconeguda per  $\beta$ -Trcp (una E3 ubiquitin ligase), que la marca per la seva degradació proteosomal. Els gens diana de Wnt es troben reprimits per TCF-TLE i histones deacetilases (HDAC). B. En presència de Wnt, el receptor forma un complex amb Fz i LRP5/6. El segrest de Dvl a través de Fz promou la fosforilació de LRP5/6 i el segrest de l'Axin. Aquest procés interromp la fosforilació/degradació de  $\beta$ -catenina mediada per l'Axin i la  $\beta$ -catenina s'acumula al nucli on actuarà com a co-activador de TCF per activar gens diana de Wnt (Macdonald et al., 2009).

La senyalització de Wnt independent de  $\beta$ -catenina o via no canònica comprèn aquelles vies que no utilitzen el complex  $\beta$ -catenina/TCF-LEF per induir la transcripció de gens diana. A dia d'avui existeixen múltiples vies de Wnt no canòniques que es classifiquen en funció del receptor i co-receptor de Wnt implicat i segons els efectors als quals estan acoblats. La via no canònica més ben caracteritzada és la via PCP (Planar Cell Polarity). En aquest tipus de senyalització els receptors Fz activen una cascada que involucra les GTPases petites RAC1 i RHOA i la cinasa JNK (JUN-N-terminal kinase). L'activació d'aquesta via provoca canvis en el citoesquelet i en la polaritat cel·lular a través de l'activació de factors de transcripció dependents de JNK (com per exemple ATF2, activating transcription factor 2) que activaran els seus gens diana. La via PCP està implicada en la regulació de la polaritat cel·lular durant processos morfogènics. Una altra via independent de  $\beta$ -catenina és la via Wnt- $\text{Ca}^{2+}$ , en aquest cas Wnt activa proteïnes G heterotrimeriques a través de Fz. S'activa la PLC (phospholipasa C) que estimula la producció de diacilglicerol i  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (inositol-1,4,5-triphosphate).  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  provoca l'alliberament de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular i l'activació d'efectors

com la CAMKII (Ca<sup>2+</sup>-calmodulin dependent kinase II), la calcineurina i la PKC (Protein kinase C), les quals activen el regulador transcripcional NFAT (Nuclear Factor Associated with T cells). Aquesta via es troba implicada en càncer, inflamació i neurodegeneració (De, 2011).

Per informació més detallada i actualitzada sobre la senyalització de Wnt/ $\beta$ -catenina podeu consultar la pàgina web Wnt homepage ([www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html](http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html)) on trobem dades sobre els diferents components de la via, els models *in vivo* que existeixen i ens permeten el seu estudi i les patologies relacionades amb aquesta via entre altres qüestions.

### **Paper de la via de la senyalització Wnt/ $\beta$ -catenina en la formació i ramificació de la gemma uretèrica**

La senyalització de Wnt a través de la via canònica de  $\beta$ -catenina està implicada en la ramificació de la UB (Maretto *et al.*, 2003; Moriyama *et al.*, 2007; Bridgewater *et al.*, 2008). Els estudis amb soques de ratolins reporters han demostrat que els gens induïts per  $\beta$ -catenina estan actius durant el procés de ramificació de la UB (Maretto *et al.*, 2003; Moriyama *et al.*, 2007). La inactivació específica de  **$\beta$ -catenina** a la gemma uretèrica provoca la inhibició de la ramificació a E12.5 resultant en una aplàsia o displàsia renal (Bridgewater *et al.*, 2008). A més a més, aquest fenotip està associat amb una reducció de l'expressió de Gdnf i Ret en el mesènquima i en l'extrem de la UB, respectivament. Curiosament, diversos Wnt's que senyalitzen a través de la via canònica de  $\beta$ -catenina s'expressen durant el desenvolupament del metanefros, entre aquests trobem **Wnt6**, **Wnt7b** i **Wnt9b** en els sistema col·lector i **Wnt4** en els precursors inicials de la nefrona (Merkel *et al.*, 2007). D'entre aquests, la manca de Wnt4 o Wnt9b provoca la disrupció de la ramificació de la UB després de l'estadi "T-shape", essent el fenotip del mutant de Wnt9b més sever que el del mutant de Wnt4 (Stark *et al.*, 1994; Carroll *et al.*, 2005). La observació de que el defecte en la ramificació es produeix després de la pèrdua de Wnt4, el qual es troba expressat en la vesícula renal per sota de l'extrem de la UB, suggereix l'existència d'un mecanisme de retroalimentació en el qual les nefrones induïdes en resposta a la ramificació utilitzen Wnt4 per promoure els següents esdeveniments de ramificació de la UB. En el cas dels embrions mutants de Wnt9b l'expressió de Wnt11 i Gdnf es troba disminuïda abans que apareguin els defectes en la ramificació (Carroll *et al.*, 2005). No obstant, donada la reciprocitat entre les interaccions del mesènquima amb la UB i l'existència del bucle auto-regulador de la senyalització de Gdnf-Ret, es desconeix si la diana cel·lular de Wnt9b es troba en el mesènquima o en la UB.

La identitat dels gens regulats per la senyalització per Wnt en la UB avui dia encara no estan clars. Un estudi on analitzen els ronyons deficients en  $\beta$ -catenina en la UB ha identificat Emx2 com un possible gen diana de Wnt (Bridgewater *et al.*, 2008). Els mutants de Emx2 exhibeixen una disminució de l'expressió de Lhx1 i Ret en la UB (Miyamoto *et al.*, 1997). La deleció específica de Lhx1 en la UB causa una reducció de l'expressió de Ret i de la ramificació de la UB suggerint la implicació de la via  $\beta$ -catenina-Emx2-Lhx1-Ret en el manteniment de l'expressió de Ret durant la ramificació de la UB (Kobayashi *et al.*, 2005; Bridgewater *et al.*, 2008).



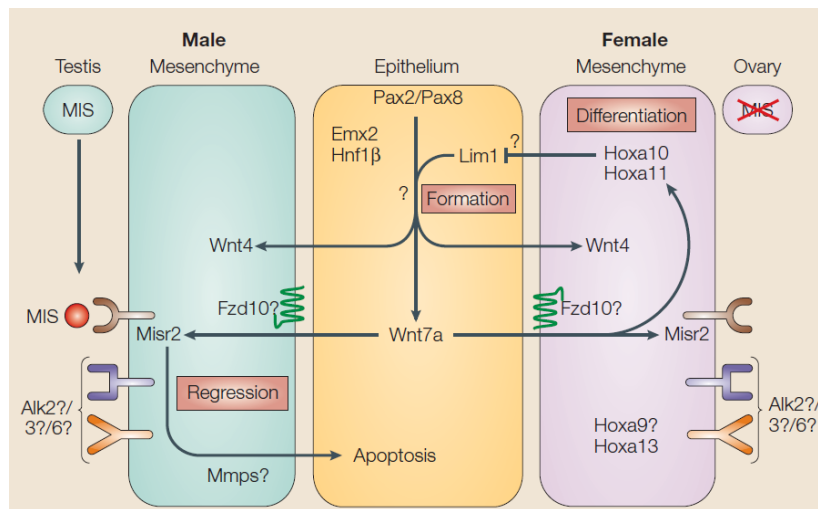
### 2.3.2 Mecanismes moleculars implicats en el desenvolupament del Müllerian i Wolffian duct

A dia d'avui s'han identificat molts gens implicats en el desenvolupament del sistema reproductor. El desenvolupament del MD i del WD està íntimament relacionat, per aquest motiu comparteixen els mecanismes moleculars implicats en la seva formació. No obstant, presenten diferències pel que fa als mecanismes moleculars de regressió i diferenciació.

Durant la **formació del MD**, abans que tingui lloc la diferenciació sexual, els gens **Lim1**, **Pax2**, **Pax8**, **Emx2**, **Hnf1 $\beta$** , i **Wnt7a** s'expressen en l'epiteli mentre que **Wnt4** s'expressa en el mesènquima (Torres *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1997; Parr and McMahon, 1998; Vainio *et al.*, 1999; Reber and Cereghini, 2001; Bouchard *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2004). Tots aquests gens, excepte Pax8, són essencials per la formació del MD. Les interaccions genètiques entre aquests gens són bastant desconegudes però els anàlisis d'expressió, l'anàlisi dels fenotips de mutants i estudis epistàtics en ratolí apunten al model genètic de la Figura 14. Les cèl·lules precursors del MD estan presents en els ratolins nuls per Wnt4, aquestes cèl·lules expressen Lim1, però no són capaces de formar el túbul d'invaginació. Aquest fet indica que Lim1 és necessari per convertir les cèl·lules precursors en teixit epitelial del MD (Tsang *et al.*, 2000). És possible que Lim1 i Pax2/8 cooperin per regular l'expressió de diversos factors, entre ells Wnt4 i Wnt7a durant la formació del MD. S'ha descrit que Wnt7a és un factor secretat per les cèl·lules de l'epiteli i que senyalitzant a través de **Fzd10** indueix l'expressió de **Misr2** en el mesènquima dels MD dels dos sexes (Kawakami *et al.*, 2000). A més, la regulació de l'expressió de Misr2 a través de Wnt7a requereix la presència funcional de  **$\beta$ -catenina** i **TCF4** (Hossain and Saunders, 2003). L'expressió de Misr2 fa que tant els MD dels mascles com els de les femelles siguin susceptibles a la regressió induïda per MIS.

Pel que fa al procés de **regressió del MD**, durant la diferenciació sexual els testicles dels mascles expressen i secreten la MIS. Al mesènquima del MD la MIS s'uneix al receptor **Misr2** (Mishina *et al.*, 1996) i possiblement a altres receptors codificats per Alk (**Alk2/Alk3/Alk6**) (Jamin *et al.*, 2002) induint l'eliminació de l'epiteli mitjançant la transformació en cèl·lules mesenquimals o per apoptosi (Roberts *et al.*, 1999; Allard *et al.*, 2000). Aquesta senyal indueix l'expressió de **Mmp2** en el mesènquima del MD i possiblement d'altres metal·loproteïnases de la matriu provocant l'apoptosi de l'epiteli del MD (Roberts *et al.*, 2002). En el cas de les femelles com no es sintetitza la MIS els MD persisteixen i es diferencien.

La **diferenciació del MD** està regulada pels gens de la família Hoxa. Trobem expressió dels gens **Hoxa9**, **Hoxa10**, **Hoxa11** i **Hoxa13** al llarg del MD i determinen la identitat dels teixits com l'oviducte, l'úter, el cervix i la vagina (Taylor *et al.*, 1997). Una altra possible funció de Hoxa10 és la repressió de l'expressió de Lim1 en l'epiteli de l'oviducte. A més, l'expressió de **Wnt7a** es requereix per mantenir l'expressió post-natal de Hoxa10 i Hoxa11 (Miller and Sassoon, 1998). El gen **Wnt5a** també té un paper en la diferenciació del MD i es troba en la mateixa via genètica que Wnt7a i els gens Hoxa (Mericskay *et al.*, 2004).



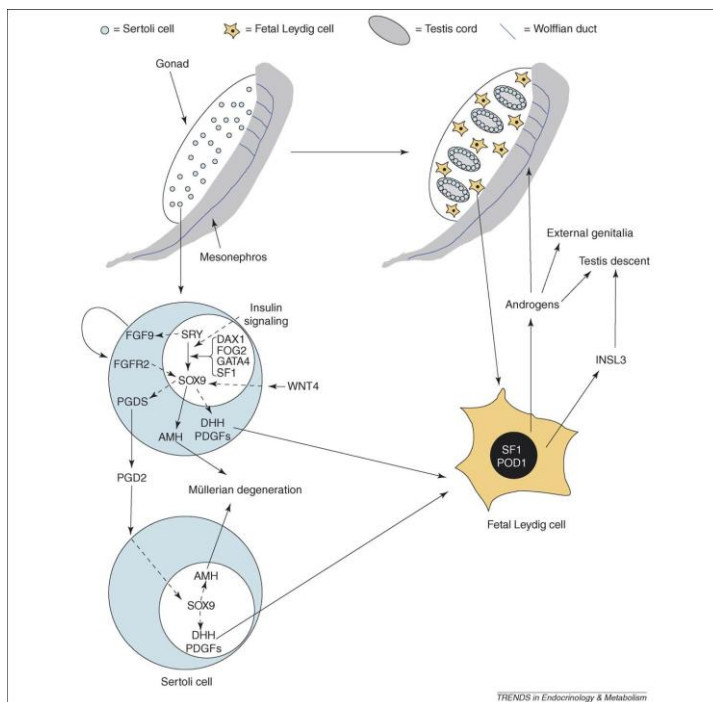
**Figura 14. Model genètic del desenvolupament del conducte de Müller.** El conducte de Müller (MD) està format per un tub epitelial i el mesènquima adjacent. Durant la formació del MD s'expressen a l'epiteli els gens *Emx2*, *Hnf1β*, *Lim1*, *Pax2*, *Pax8* i *Wnt7a* mentre que *Wnt4* ho fa al mesènquima. Les interaccions entre aquests gens tot i que són en gran part desconegudes estan indicades amb fletxes. El *Wnt7a* secretat per l'epiteli induïx l'expressió de *Misr2* en el mesènquima de mascles i femelles fent-los competents per la regressió induïda per MIS. En els mascles la MIS és expressada i secretada pels testicles i s'uneix al receptor del mesènquima del MD induïnt l'eliminació de l'epiteli del MD. En les femelles com no hi ha producció de MIS els MD persisteixen i es diferencien. Els gens *Hoxa* tenen una funció en la diferenciació (Kobayashi and Behringer, 2003).

La **formació inicial del WD** és independent del sexe i de les hormones secretades per les gònades, sinó que està controlada per la mateixa xarxa de factors de transcripció i molècules senyalitzadores implicada en la formació del MD. Per tant, són necessaris els gens **Lim1**, **Pax2/8** i **Emx2** ja que s'expressen en l'epiteli del WD i la seva mutació tot i que afecta a diferents aspectes de la diferenciació epitelial, acaba en la degeneració del WD (Torres *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1997; Bouchard *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2004). Les interaccions moleculars entre aquests factors són encara desconegudes o poc clares. Una vegada l'estructura del WD està estabilitzada, aleshores sí que la seva diferenciació en les diferents estructures del tracte reproductor masculí dependran dels andrògens produïts per les cèl·lules de Leydig (Drews, 2000).

Quan a la **regressió del WD** és el procés més desconegut molecularment, ja que la seva degeneració s'associa a l'absència d'hormones masculines (andrògens).

En el procés de **diferenciació del WD** es requereix la interacció coordinada de la via genètica Sry-Sox9 i la via hormonal dels andrògens (Figura 15). En el moment de la determinació sexual les gònades masculines expressen el gen **Sry** del cromosoma Y. Aquest gen s'expressa en les cèl·lules de Sertoli precursors i és el responsable d'activar una cascada d'esdeveniments moleculars i cel·lulars que conduiran a la diferenciació del tracte reproductor masculí (Koopman *et al.*, 1990; Albrecht *et al.*, 2000). El gen Sry juntament amb altres reguladors de la

transcripció com **Dax1**, **Fog2**, **Gata4**, **Sf1** i **Wt1** incrementen l'expressió de **Sox9**, i aquest controla la producció de **MIS**, **DHH**, **PDGFs** i **PGDS**. Els factors DHH i PDGF actuen de forma paracrina induint la diferenciació de les cèl·lules de Leydig i aquestes produeixen **andrògens** i **INSL3**. Els andrògens faciliten la supervivència i la diferenciació del WD i dels genitals externs, mentre que INSL3 juntament amb els andrògens provoca el descens dels testicles (Barsoum and Yao, 2006). Concretament en el WD, els andrògens s'uneixen al seu receptor, **AR** (Androgen Receptor) i regulen la transcripció de gens específics. La manca de AR en ratolins Tfm (Testis feminization) i en ratolins *knockout* per AR provoca la degeneració del WD (Ohno, 1977; He *et al.*, 1991; Yeh *et al.*, 2002). A més a més, les femelles que es sotmeten a una exposició prolongada a andrògens presenten els WD (Jost, 1953; Bentvelsen *et al.*, 1995; Gupta and Singh, 1996). Així doncs, el paper essencial dels andrògens en la diferenciació masculina és evident però a dia d'avui encara no està clar el mecanisme d'acció d'aquests. Els gens de la família Hox són uns possibles candidats ja que s'han descrit fenòmens de transformació homeòtica en els mascles mutants de **Hoxa10**, **Hoxa11** i en el doble mutant **Hoxa11; Hoxd11** (Davis *et al.*, 1995; Hsieh-Li *et al.*, 1995; Benson *et al.*, 1996). També s'han dut a terme nombrosos experiments *in vitro* per estudiar la participació de diversos factors de creixement en el desenvolupament del WD, però es desconeix el paper funcional d'aquests factors en relació als andrògens. Durant els darrers 15 anys hi hagut un gran progrés en quan als mecanismes moleculars implicats en el desenvolupament de les cèl·lules de Sertoli i Leydig i del WD (Figura 15). No obstant, la relació exacta i funcional entre aquests components reguladors no està clara.



**Figura 15. Vies cel·lulars i gens implicats en la connexió entre les cèl·lules de Sertoli, les de Leydig i el desenvolupament del conducte de Wolff segons dades de models genètics de ratolí.** Les línies contínues representen les vies confirmades amb evidències genètiques o bioquímiques. Les línies discontinúes representen vies putatives responsables d'aquests esdeveniments. En el moment de la determinació sexual (E10.5-11.5), Sry s'expressa en les cèl·lules de pre-Sertoli (blau clar). Sry juntament amb altres reguladors de la transcripció (DAX1, FOG2, GATA4 i SF1 entre altres) incrementen l'expressió de Sox9 que

controla la producció de AMH, DHH, PDGFs i PGDS. Aquesta última promou la producció de PGD2 que induïx l'expressió de Sox9. El DHH i PDGFs derivate de les cèl·lules de Sertoli actuen com factors paracrins que induïxen l'especificació i diferenciació de les cèl·lules de Leydig fetals (groc). Les cèl·lules de Leydig produeixen andrògens i INSL3. (Drews, 2000; Barsoum and Yao, 2006).

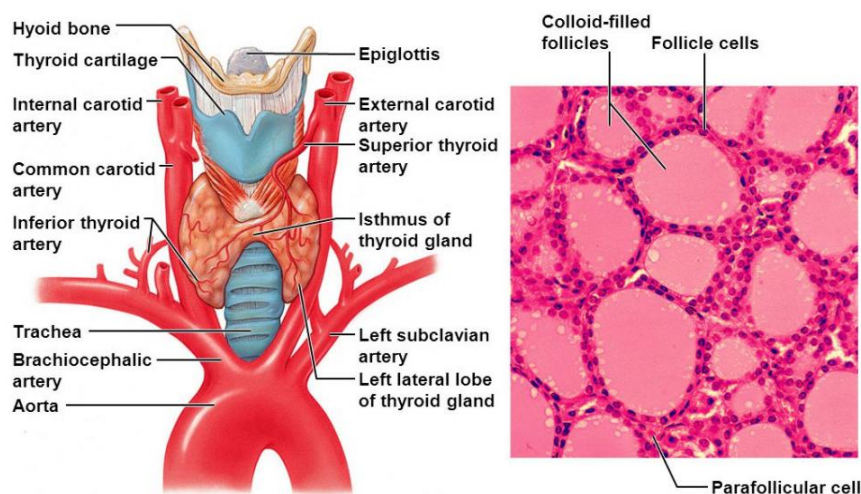
### 3. CÀNCERS ENDOCRINS

El sistema endocrí és un conjunt d'òrgans i teixits que alliberen hormones al torrent sanguini per regular diverses funcions de l'organisme. Entre les glàndules que formen aquest sistema es troben la glàndula tiroide i la glàndula adrenal.

#### 3.1 CARCINOMA DE TIROIDE

##### 3.1.1 Anatomia, histologia i fisiologia de la glàndula tiroide

La tiroide és la glàndula endocrina més gran de l'organisme situada a la part anterior del coll. Es troba a l'alçada del cartílag cricoides, entre les vèrtebres C5 i T1, envoltant la tràquea fins arribar a l'esòfag per la part posterior. Anàtomicament, es distingeixen dos lòbuls units per un istme, característica responsable de la forma de papallona d'aquest òrgan (Figura 16; Dieguez and Yturriaga, 2007). Presenta una gran vascularització i una xarxa abundant de vasos limfàtics que afavoreixen la distribució de les hormones tiroïdals a tot l'organisme. En adults, la tiroide pesa entre 20 i 30 grams, dada que varia en funció de l'edat, sexe i estatus hormonal de la glàndula. Normalment, és més gran en dones ja que augmenta de mida durant l'embaràs (González and Matarranz, 2007).



**Figura 16. Anatomia macroscòpica i microscòpica de la glàndula tiroide** (*Human Anatomy and Physiology, Elaine Marieb and Katja Hoehn*).

A nivell histològic, la glàndula tiroide està recoberta per una càpsula gruixuda de teixit conjuntiu per sota de la qual, s'observa una segona capa més fina adherida al teixit glandular. Aquesta segona capa de teixit connectiu s'introdueix al teixit glandular i forma septes que divideixen la glàndula en lòbuls irregulars incomplets (Young *et al.*, 2006). Cadascun d'aquests lòbuls està format per fol·licles de mida variable entre 15-1000µm amb una cavitat central que conté el col·loide. El col·loide és un material viscos compost principalment de tiroglobulina (Tg), la proteïna precursora de les hormones tiroïdals. La tiroide està formada per dos tipus cel·lulars: les cel·lules fol·liculars o tiròcits i les cel·lules parafol·liculars o cel·lules C. Les

cèl·lules fol·liculars constitueixen més del 95% de la glàndula i es disposen en els fol·licles formant una monocapa epitelial polaritzada (Figura 16). Es caracteritzen per la seva funció en la regulació, producció i secreció de les hormones tiroïdals tiroxina (T4) i triiodotironina (T3). D'altra banda, les cèl·lules parafol·liculars suposen menys del 5% de la tiroide. Són cèl·lules epitelials no polaritzades que es troben disseminades entre els fol·licles i la seva funció principal és la producció de calcitonina (Kumar *et al.*, 2012).

Les hormones tiroïdals estan implicades en el creixement, en el desenvolupament del sistema nerviós central, en el metabolisme de la glucosa i del teixit adipós i en el desenvolupament ossi. La glàndula tiroide actua sota el control de la via de senyalització hipòfisi-hipotàlem. Inicialment, l'hipotàlem produeix l'hormona alliberadora de tirotropina (thyrotropin-releasing hormone, TRH), la qual actua sobre la hipòfisi. En resposta a aquest estímul, la hipòfisi allibera la tirotropina (thyroid stimulating hormone, TSH) i aquesta s'allibera al torrent sanguini i activa la glàndula tiroide. El primer pas és la unió de la Tg al iode del col·loide provocant l'endocitosi del col·loide per les cèl·lules fol·liculars. A continuació s'activa un procés de digestió enzimàtica lisosomal als tiròcits que promou la síntesi i l'alliberament de les hormones T3 i T4 al torrent sanguini. Quan els nivells d'hormones tiroïdals en sang augmenten, s'activa un circuit de retroalimentació negativa que inhibeix l'acció de la TSH. D'altra banda la secreció de TSH per la hipòfisi està regulada per l'hipotàlem a través de la TRH i també acaba inhibint l'acció de la TSH mitjançant un mecanisme de retroalimentació negativa desencadenat per les pròpies hormones T3 i T4 (Eng *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 2006). Paral·lelament, les cèl·lules C s'encarreguen de la síntesi i producció de l'hormona calcitonina que participa en l'homeòstasi del metabolisme del calci-fòsfor juntament amb l'hormona paratiroïdal (Maronpot *et al.*, 1999).

### 3.1.2 Aspectes generals del càncer de tiroide

El càncer de tiroide és el tipus de tumor endocrí amb més prevalença i mortalitat. L'edat mitjana d'aparició del càncer de tiroide varia en funció del subtipus de carcinoma, però es troba entre els 45 i 60 anys essent de 2 a 4 vegades més freqüent en dones que en homes (Papini *et al.*, 2002; Delellis, 2006). Representa l'1% de totes les neoplàsies amb una incidència variable entre 0.5 i 10 casos per cada 100.000 habitants, tot i que aquest número augmenta de forma constant mostrant un increment anual del 6.6% en els darrers deu anys. Un dels factors crítics d'aquestes xifres és la taxa de recurrència de la malaltia, que es situa entre el 20-30% i és responsable en part de la mortalitat dels pacients (Liu *et al.*, 2001; Tuttle *et al.*, 2010).

La gran variabilitat en la incidència de la malaltia s'associa al fet que el càncer de tiroide està molt influenciat per factors ambientals que es tradueixen en alteracions moleculars que causen la malaltia. Entre aquests factors destaquen: l'exposició a radiacions, els processos inflamatoris de la glàndula, el consum reduït de iode, els antecedents familiars i la regulació hormonal (Wartofsky, 2010); Williams *et al.*, 1995). En conjunt, el càncer de tiroide presenta una gran variabilitat fenotípica, tant pel que fa a la seva manifestació clínica com a la resposta

al tractament, fet que suposa un obstacle important per l'estudi de la malaltia des del punt de vista patològic, quirúrgic i oncològic.

En funció del tipus cel·lular que els origina, els tumors de la glàndula tiroide es classifiquen en dos grans grups. Quan les cèl·lules parafol·liculars són les responsables de la formació del tumor, rep el nom de carcinoma medul·lar de tiroide (*Medullary Thyroid Carcinoma, MTC*) i comprenen menys del 5% dels casos diagnosticats. La majoria de neoplàsies de la tiroide, al voltant del 95% dels casos, deriven de les cèl·lules fol·liculars i poden originar tumors tan benignes com malignes (Nikiforov and Nikiforova, 2011).

### 3.1.3 Carcinomes de tiroide derivats de les cèl·lules fol·liculars

Els carcinomes fol·liculars de tiroide es classifiquen en tumors diferenciats (*Well Differentiated Thyroid Carcinoma, WDTC*), poc diferenciats (*Poorly Differentiated Thyroid carcinoma, PDTC*) i indiferenciats o anaplàstics (*Anaplastic Thyroid Carcinoma, ATC*). Dins del grup de carcinomes diferenciats, podem distingir el carcinoma papil·lar de tiroide (*Papillary Thyroid Carcinoma, PTC*) i el carcinoma fol·licular de tiroide (*Follicular Thyroid Carcinoma, FTC*), que representen més del 90% dels càncer de tiroide diagnosticats. La major part dels carcinomes de tiroide són esporàdics, només entre el 3-5% d'aquests són hereditaris. La majoria de pacients evolucionen favorablement després de la tiroïdectomia i el tractament amb iode radioactiu, però una part mostren resistència al tractament i desenvolupen metàstasi en altres òrgans o recidives de la malaltia.

En el cas del PDTC i ATC, es tracta de tumors no encapsulats i molt agressius, que perden els marcadors de diferenciació i no poden ser tractats amb iode radioactiu. L'observació de que aquest tipus de tumors presenten àrees diferenciades amb fenotip de WDTC suggereix que els PDTC i ATC deriven de carcinomes diferenciats preexistents (Xing, 2013). Seguidament descriurem amb més detall les característiques del dos tipus de WDTC.

#### 3.1.3.1 Carcinoma papil·lar de tiroide (*Papillary Thyroid Carcinoma, PTC*)

És el carcinoma de tiroide més freqüent (75-80% dels casos) amb un índex de supervivència del 90% i una edat mitjana d'aparició al voltant dels 45 anys (Mazzaferrri and Kloos, 2001). Es caracteritza per ser un carcinoma epitelial maligne amb evidències de diferenciació cel·lular però que manté les característiques pròpies de les cèl·lules fol·liculars, com la polaritat i la producció de tiroglobulina (DeLellis et al 2004). Al voltant del 3-7% dels PTCs són familiars (Corvi et al., 2001) i presenten una forma més agressiva que les formes esporàdiques (Alsanea, 2000). El carcinoma papil·lar sol ser de creixement lent i metastatitza preferentment a la via limfàtica, degut a l'abundant xarxa de vasos limfàtics que irriguen els lòbuls de la tiroide. Des del punt de vista histològic, el tret més característic és la presència de papil·les, formades per un eix conjuntiu recobert de cèl·lules epitelials cúbiques amb nuclis allargats i contorn irregular. Altres característiques comuns són els solcs i inclusions nuclears, la detecció de calcificacions i les cèl·lules gegants multinucleades (DeLellis et al., 2004).

### 3.1.3.2 Carcinoma fol·licular de tiroide (*Follicular Thyroid Carcinoma, FTC*)

Els carcinomes fol·liculars comprenen entre el 10 i el 15% dels càncers de tiroide diagnosticats. Aquest tipus de tumor sol aparèixer al voltant dels 55 anys i presenta un pitjor pronòstic que el carcinoma papil·lar. Com l'anterior, és un carcinoma epitelial maligne amb evidències de diferenciació cel·lular però que no presenta les característiques nuclears dels PTC (De Lellis *et al.*, 2004). Aquests tumors presenten una gran tendència a metastatitzar a pulmó i al teixit ossi. Des del punt de vista histològic, el FTC és un tumor invasiu, normalment encapsulat, amb característiques morfològiques variables que comprenen des de la formació d'estructures fol·liculars amb col·loide fins a patrons de creixement sòlid o trabecular. El tret citològic distintiu dels FTC és la carència de l'atípia nuclear pròpia del PTC (DeLellis, 2006; Schmid and Farid, 2006; Vasko *et al.*, 2007).

Els tumors fol·liculars benignes reben el nom d'adenomes de tiroide i es poden dividir en dos subgrups: els adenomes tòxics, que són aquells que provoquen un excés d'hormones tiroïdals i que rarament es tornen malignes, i els adenomes fol·liculars (*Follicular Adenoma, FA*) que són tumors diferenciats i encapsulats que representen la neoplàsia més freqüent i evolucionen cap a un fenotip maligne de forma esporàdica i poc freqüent, essent considerat una lesió precursora del FTC. Les dues patologies presenten les mateixes característiques citològiques, però la invasió capsular, la infiltració del parènquima tiroïdal adjacent i la invasió vascular, són els criteris de malignitat utilitzats pel diagnòstic diferencial (Mazzanti *et al.*, 2004).

### 3.1.4 Carcinomes de tiroide derivats de les cèl·lules parafol·liculars

L'únic tumor maligne d'origen parafol·licular és el carcinoma medul·lar de tiroide (*Medullary Thyroid Carcinoma, MTC*). És un tipus de tumor poc comú (5-7% dels casos diagnosticats) que presenta un creixement tumoral lent però que pot metastatitzar a fetge i ganglis limfàtics durant les etapes inicials del creixement tumoral, així doncs presenta un pitjor pronòstic que els WDTC (Pinchot *et al.*, 2009). El 75% dels MTC són esporàdics mentre que el 25% restant són hereditaris i estan associats a tres síndromes autosòmics dominants: la neoplàsia endocrina múltiple de tipus 2A (MEN2A), de tipus 2B (MEN2B) i el carcinoma medul·lar familiar (FMTC) (Negri *et al.*, 2002; Nix *et al.*, 2006; Wells and Santoro, 2009). El pic d'incidència dels MTC esporàdics i dels FMTC es dona al voltant dels 50 anys. En canvi, els tumors associats al síndrome MEN2A apareixen al final de l'adolescència o a l'inici de la infància, mentre que els MEN2B es desenvolupen principalment en el període d'infantesa (DeLellis *et al.*, 2004). El fenotip dels malalts amb MEN2A varia en funció de l'agressivitat del MTC i de l'afectació d'altres òrgans com la paratiroide o la glàndula adrenal. El 50% dels pacients amb MEN2A presenten MTC i feocromocitoma i entre el 20-30% pateixen hiperplàsia o adenoma de la paratiroide. La variant MEN2B és la més agressiva ja que apareix durant els primers anys de vida i a part de desenvolupar MTC i feocromocitoma, els malalts presenten anomalies durant el desenvolupament. Finalment, el FMTC és la variant menys agressiva i es caracteritza per la presència de MTC en quatre membres o més de la mateixa família (Eng *et al.*, 1996).

Histològicament, les cèl·lules C dels MTC són poligonals, esfèriques o fusiformes i solen presentar un patró de creixement difús o en forma de niu. A més a més, són positives per calcitonina, marcatge que s'utilitza com a biomarcador (Ball, 2007). Els tumors esporàdics o familiars no es poden diferenciar histològicament, tot i que les formes hereditàries estan associades a una hiperplàsia de les cèl·lules C en etapes inicials (Delellis, 2006).

### 3.1.5 Alteracions moleculars del càncer de tiroide

La progressió del càncer de tiroide és un procés d'acumulació d'alteracions genètiques i epigenètiques que desencadenen en la desregulació de vies de senyalització i promouen l'aparició d'un fenotip tumoral concret. En una primera etapa, les mutacions iniciadores són les que provoquen l'aparició de la malaltia en forma de carcinoma diferenciat. Progressivament, l'aparició de mutacions secundàries promouen la pèrdua de diferenciació i el desenvolupament de carcinomes poc diferenciats o indiferenciats (Riesco-Eizaguirre and Santisteban, 2007).

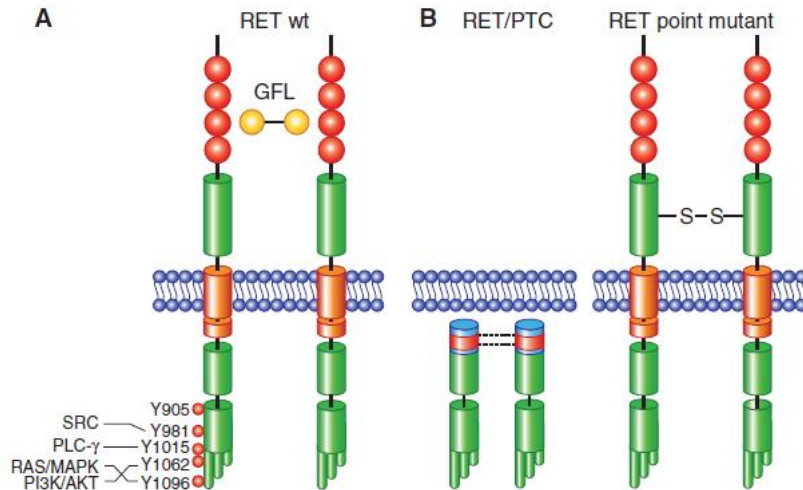
#### 3.1.5.1 Alteracions moleculars dels PTC

L'alteració molecular més freqüent en el carcinoma papil·lar de tiroide és l'activació de la via ERK-MAPK. S'han descrit quatre alteracions genètiques que causen aquest fenotip: reordenaments cromosòmics dels receptors tirosina cinasa Ret i NTRK1 i mutacions puntuals activadores dels oncògens Braf i Ras.

Els reordenaments cromosòmics RET/PTC són l'alteració més comú. S'han descrit més de 10 reordenaments diferents (Santoro and Carlomagno, 2013). Els oncògens quimèrics RET/PTC sorgeixen de la fusió del gen de Ret amb diversos gens activadors (com CCDC6 i NCOA4), concretament el domini tirosina cinasa de Ret es situa sota el control transcripcional de la regió promotora del gen activador. A diferència de Ret, aquests gens s'expressen de forma ubiqua i per tant condueixen a l'expressió de Ret en les cèl·lules fol·liculars. A més a més, provoquen la dimerització constitutiva i independent de lligand de Ret (Figura 17) (Bongarzone *et al.*, 1993; Monaco *et al.*, 2001). La prevalença dels reordenaments RET/PTC és d'un 25% de mitjana (Nikiforov and Nikiforova, 2011), però varia segons l'estudi i la sèrie de pacients, podent arribar a un 70% en casos d'àrees contaminades amb isòtops radioactius (Zhu *et al.*, 2006). Pel que fa als reordenaments de NTRK1 són poc comuns i s'observen amb una prevalença d'entre el 5% i el 13%. Es formen per la fusió de l'extrem 3' del gen NTRK1 amb l'extrem 5' de diversos gens (TPM3, TPR, TGF entre altres) (Pierotti *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 2003; Frattini *et al.*, 2004).



Respecte a les mutacions puntuals de gens que provoquen l'activació constitutiva de la via ERK-MAPK, s'han descrit mutacions de Braf en un 50% dels casos de PTC. La mutació de Braf més freqüent és la V600E que es troba en un 30-65% dels PTC i també en un 10-35% dels ATC (Knauf *et al.*, 2005; Nikiforov and Nikiforova, 2011). Quan a les mutacions de Ras s'observen en una petita fracció dels FVPTC (*Follicular Variant Papillary Thyroid Carcinoma*).



**Figura 17.** Esquema dels mecanismes d'activació de la forma wild-type i oncogènica de RET. (A) L'activació de la forma RET wild-type està mediada per la dimerització induïda per GFL. S'indiquen els principals llocs d'autofosforilació de RET i les vies de senyalització activades. Els dominis extracel·lulars de RET cadherin-like estan representats en vermell. (B) L'activació de RET/PTC està mediada per dimerització induïda per hèlix superenrotllada (esquerra); l'activació dels mutants de cisteïnes de RET associats amb les síndromes MEN2A o FMTC està mediada per la dimerització a través de ponts disulfur (dreta) (Santoro and Carlomagno, 2013).

### 3.1.5.2 Alteracions moleculars dels FTC

En el cas dels FTC les mutacions més freqüents són les que provoquen l'activació constitutiva de Ras (codons 12, 13, 62 de K-RAS, H-RAS i N-RAS, respectivament) i estan presents en un 45% d'aquests carcinomes. Encara que amb una freqüència menor, les mutacions de Ras també es troben en casos de PDTC i ATC.

La via PI3K/Akt també té un paper important. Aquesta via es pot activar a través de mutacions de Ras, però també s'han descrit mutacions activadores de PI3KCA que afecten al 12-34% dels FTC. A més a més, també s'observen mutacions i delecions del supressor tumoral Pten, un inhibidor de la via PI3K/Akt (Sansal and Sellers, 2004).

### 3.1.5.3 Alteracions moleculars dels MTC

Més del 95% dels pacients amb MEN2A, MEN2B i FMTC (MTC hereditari) presenten mutacions puntuals de guany de funció a la línia germinal en el receptor Ret. Pel que fa als MTC d'origen esporàdic s'han descrit mutacions de Ret en un 50% dels casos.

Podem agrupar les mutacions de Ret en dos grups, segons si es troben en el domini extracel·lular o en el domini intracel·lular. En el cas dels pacients amb MEN2A es substitueixen cisteïnes del domini extracel·lular situades en l'exó 10 i 11 de Ret. En canvi, els pacients amb MEN2B presenten mutacions en el domini tirosina cinasa intracel·lular, un 95% presenten la mutació M918T i el 5% restant la mutació A883F. Pel que fa als casos de FMTC s'han descrit mutacions tant en el domini extracel·lular (exó 10) com en l'intracel·lular (exó 13, 14 i 15).

El mecanisme d'activació de Ret acaba convergint en la dimerització i activació constitutiva del receptor independent de lligand. En el cas dels mutants en cisteïnes, l'eliminació d'aquests residus impedeix la formació de ponts disulfur intramoleculars i permet la formació de d'enllaços intermoleculars a través dels residus de cisteïna lliures provocant la formació de dímers covalents de Ret constitutivament actius. A part de totes aquestes alteracions moleculars en el càncer de tiroide cal dir que també s'han observat alteracions en les vies Wnt/ $\beta$ -catenina, NF $\kappa$ B o vies relacionades amb p53 (Kondo *et al.*, 2006; Xing, 2013).

Mutations	Types of thyroid tumours	Approximate prevalence (%)*	Primary signalling pathways affected	Functional impact on the protein and tumour
BRAF <sup>V600E</sup>	CPTC	45	MAPK	Activating; promoting tumorigenesis, invasion, metastasis, recurrence and mortality
	FVPTC	15		
	TCPTC	80-100		
	ATC	25		
BRAF <sup>G469E</sup>	FVPTC	5	MAPK	Activating; probably similar to BRAF <sup>V600E</sup>
HRAS, KRAS, NRAS	FTA	20-25	MAPK and PI3K-AKT	Activating; promoting tumorigenesis, invasion and metastasis of PDTC and FTC
	FTC	30-45		
	FVPTC	30-45		
	PDTC	20-40		
	ATC	20-30		
PTEN (mutation)	FTA	0	PI3K-AKT	Inactivating the gene but activating the PI3K pathway; promoting tumorigenesis and invasiveness
	FTC	10-15		
	ATC	10-20		
	PTC	1-2		
PTEN (deletion)	FTC	30	PI3K-AKT	Inactivating the gene but activating the PI3K pathway; promoting tumorigenesis and invasiveness
PIK3CA	FTA	0-5	PI3K-AKT	Activating; promoting tumorigenesis and invasiveness
	FTC	5-15		
	ATC	15-25		
	PTC	1-2		
AKT1	Metastatic cancer	15	PI3K-AKT	Unclear; seems to favour metastasis
CTNNB1	PDTC	25	WNT- $\beta$ -catenin	Activating; promoting tumour progression
	ATC	60-65		
TP53	PDTC	25	p53-coupled pathways	Inactivating; promoting tumour progression
	ATC	70-80		
IDH1	FTC	5-25	IDH1-associated metabolic pathways	Inactivating; impact on tumours is unclear
	FVPTC	20		
	CPTC	10		
	ATC	10-30		
ALK	ATC	10	MAPK and PI3K-AKT	Activating; probably promoting tumour progression
EGFR	CPTC	5	MAPK and PI3K-AKT	Activating; impact on tumours is unclear
NDUFA13 (also known as GRIM19)	HCTC	15	Component of complex I of the mitochondrial respiratory chain	Presumably inactivating; affecting mitochondrial metabolism and cell death

**Taula 3. Mutacions dels tumors de tiroide.** ALK, anaplastic lymphoma kinase; ATC, anaplastic thyroid cancer; CPTC, conventional PTC; CTNNB1,  $\beta$ -catenin; EGFR, epidermal growth factor receptor; FTA, follicular thyroid adenoma; FTC, follicular thyroid cancer; FVPTC, follicular-variant PTC; HCTC, Hürthle cell thyroid cancer; IDH1, isocitrate dehydrogenase 1; NDUFA13, NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 $\alpha$  subcomplex 13; PDTC, poorly differentiated thyroid cancer; PTC, papillary thyroid cancer; TCPTC, tall-cell PTC. \*Els valors representen la prevalença estimada de les mutacions indicades (Xing, 2013).

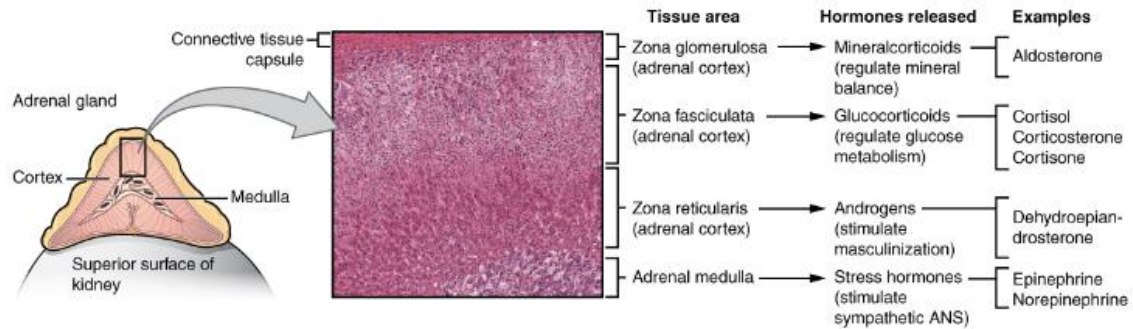
## 3.2 CÀNCER DE LA GLÀNDULA ADRENAL

### 3.2.1 Anatomia, histologia i fisiologia de la glàndula adrenal

La glàndula adrenal és un òrgan endocrí petit que es troba a la part superior de cada ronyó. Són glàndules ovalades molt irrigades ja que reben un alt subministrament de sang a través de les artèries aorta, renal i frènica inferior. Aquestes glàndules s'encarreguen de regular múltiples processos fisiològics, com el metabolisme, la resposta a l'estrès i funcions del sistema immune i del sistema cardiovascular (Bielohuby *et al.*, 2007). L'adrenal està formada per dos capes independents: el còrtex adrenal i la mèdulla adrenal (Nagel 1836). Durant el desenvolupament embrionari la glàndula adrenal es desenvolupa a partir de dos capes germinals diferents, el còrtex deriva del mesoderm mentre que la mèdulla s'origina a partir de la cresta neural de l'ectoderm (Rüsse and Sinowatz, 1998).

Histològicament, el còrtex està envoltat d'una càpsula fibrosa fina i es pot dividir en tres zones morfològicament i funcionalment diferents: la capa més externa s'anomena zona glomerulosa, a continuació es troba la zona fasciculata i en la part més interna es troba la zona reticularis. Aquestes zones tenen papers diferents en la producció d'hormones (Keegan and Hammer, 2002) (Figura 18). La zona glomerulosa està formada per cèl·lules petites que formen arcs i tenen nuclis relativament grans i citoplasmes lleugerament basòfils. La zona fasciculata s'estén cap a la mèdulla i està formada per columnes de cèl·lules amb nuclis vesiculars localitzats al centre del citoplasma que en aquest cas és eosinòfil. La zona reticularis consisteix en una xarxa de cèl·lules més petites que les de la zona fasciculata. La mèdulla adrenal està formada per cèl·lules polièdriques homogènies agrupades en petits nius separats per sinusoides amb nuclis grans i centrals. El citoplasma és lleugerament granular i més basòfil que el de les cèl·lules del còrtex. Normalment està envoltada completament per còrtex però de vegades es pot estendre cap a la superfície capsular a través de l'hilus.

El còrtex adrenal s'encarrega de la secreció de tres tipus d'hormones totes elles derivades del colesterol. Els mineralocorticoides són secretats per la zona glomerulosa i el més important és l'aldosterona; els glucocorticoides són les hormones secretades per la zona fasciculata i el predominant és el cortisol, i el tercer tipus comprèn els andrògens adrenals (principalment DHEA) que són secretats per la zona reticularis. La mèdulla adrenal secreta catecolamines, bàsicament epinefrina i norepinefrina. Aquestes hormones són responsables de les característiques fisiològiques de la resposta a l'estrès i de la modulació del sistema cardiovascular.



**Figura 18.** Imatge macroscòpica i microscòpica de les diferents parts de la glàndula adrenal i esquema de les hormones alliberades per cada zona.

A diferència d'altres mamífers, el ratolí i la rata no presenten la zona reticularis degut a la manca d'expressió de la  $17\alpha$ -hidroxilasa. Per tant, les adrenals dels ratolins i d'altres rossegadors no secreten andrògens adrenals (Keegan and Hammer, 2002). Una característica específica del còrtex adrenal de ratolí és la presència de la X-zone, un romanent de l'adrenal embrionària (Zubair *et al.*, 2006). A nivell funcional, estudis d'expressió han proporcionat evidències indirectes de la implicació de la X-zone en el metabolisme de la progesterona adrenal i del 11-DOC (11-Deoxycorticosterone) (Hershkovitz *et al.*, 2007).

El còrtex adrenal forma part de l'eix hipotàlem-hipòfisi-adrenal involucrat en el manteniment de l'homeòstasi. L'hipotàlem produeix CRH (corticotropin-releasing hormone) que estimula la producció de ACTH (adrenocorticotropin hormone) a la hipòfisi. I això, a la vegada genera una senyal perquè es produeixi aldosterona, cortisol i andrògens a les glàndules adrenals. Com a part d'un mecanisme de retroalimentació negativa, la producció en excés de qualsevol d'aquestes hormones corticals desencadena en una disminució de la producció de CRH i ACTH en l'hipotàlem i la hipòfisi. No obstant, s'ha descrit el paper d'altres factors reguladors que inclouen neurotransmissors, neuropèptids, citocines i factors de creixement (Bornstein *et al.*, 1999; Hammer *et al.*, 2005; Karpac *et al.*, 2005). Entre aquests tenen una funció important l'hormona de creixement (GH) i el IGF (insuline-like-growth factor) (Wolf *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 1999; Hoeflich *et al.*, 2002; Fottner *et al.*, 2004). Les alteracions de les xarxes reguladores per aquests factors freqüentment promou l'aparició de neoplàsies en la glàndula adrenal.

### 3.2.2 Aspectes generals del càncer de la glàndula adrenal

El càncer de la glàndula adrenal és un tipus de neoplàsia endocrina poc freqüent. Es pot classificar en funció del seu origen cel·lular, així doncs quan el tumor s'origina en el còrtex adrenal parlem d'adenoma adrenocortical i de carcinoma adrenocortical. Els adenomes són les lesions benignes més comuns (Boland *et al.*, 1998; Young, 2007). La majoria d'adenomes són tumors no-funcionals, és a dir, que no produeixen hormones; i només un 6% dels adenomes són tumors funcionals i que per tant secreten hormones en excés (Boland *et al.*, 1998). Normalment són tumors asimptomàtics i si són petits no requereixen tractament. El carcinoma adrenocortical (ACC) és un càncer poc freqüent que comprèn menys del 5% del total de tumors

de la glàndula adrenal diagnosticats i que té una incidència de menys de 1:1.000.000 (Bilimoria *et al.*, 2008). El 60% d'aquests tumors són funcionals, apareixen principalment en l'edat adulta però també pot afectar nens, tot i que l'edat mitjana de diagnòstic és als 46 anys (Dackiw *et al.*, 2001).

Pel que fa als tumors que s'originen en la mèdulla adrenal trobem els feocromocitomes i els paragangliomes. Els feocromocitomes (PCCs) i els paragangliomes (PGLs) són tumors que s'originen a les cèl·lules cromafíniques de la mèdulla adrenal i que sintetitzen, emmagatzemen, metabolitzen i normalment però no sempre secreten catecolamines (Manger & Gifford, 1996). Els dos tumors s'originen a partir de teixit de la cresta neural, la diferència és que el feocromocitoma es localitza en la mèdulla adrenal i el paraganglioma ho fa en altres localitzacions (paraganglis simpàtics i parasimpàtics). La majoria són benignes i s'eliminen quirúrgicament, però existeix un percentatge de feocromocitomes malignes i poden metastatitzar a fetge, pulmó, teixit ossi i nòduls limfàtics (Lehnert *et al.*, 2004). Tot i que la prevalença de malignitat normalment es situa al voltant del 10%, hi ha estudis que parlen de percentatges d'entre el 5-26% depenent dels criteris de malignitat utilitzats (Goldstein *et al.*, 1999; Edström Elder *et al.*, 2003; Gimenez-Roqueplo *et al.*, 2003). La incidència del feocromocitoma és de 2 a 8 per milió de persones per any (Beard *et al.*, 1983; Stenström and Svärdsudd, 1986), és igual en els dos sexes (Amar *et al.*, 2005) i l'edat mitjana de diagnòstic és de 25 anys pels casos hereditaris i de 44 anys pels casos esporàdics (Neumann *et al.*, 2002).

### 3.2.3 Alteracions moleculars del feocromocitoma i paraganglioma

Durant l'última dècada, hi hagut un gran avenç pel que fa al coneixement de la genètica del PCC i PGL. Fins al segle 21 es pensava que el 10% dels PCC/PGL estaven determinats genèticament, causats per mutacions específiques de la línia germinal en els gens de RET, NF1 o VHL. Posteriorment, es van identificar els gens SDHD, SDHC i SDHB com a gens de susceptibilitat, explicant així que un 25% dels casos eren hereditaris. Actualment, s'han descrit quatre gens nous (SDHA, SDHF2, TMEM127 i MAX) justificant així la causa de l'aparició de gairebé el 50% dels PCC i/o PGL diagnosticats. Aquests tumors fins ara es coneixien com els "tumors del 10%" basant-se en la freqüència de les formes hereditàries de la malaltia, avui dia però, també es coneixen com els "tumors dels 10 gens", d'acord amb el número de gens de susceptibilitat identificats. A més, a part de la majoria de casos hereditaris de feocromocitoma i/o paraganglioma també s'han identificat mutacions d'alguns d'aquests gens en un 10-20% dels casos esporàdics (Gimenez-Roqueplo *et al.*, 2003).

El gen RET és l'únic oncogen de tots els gens de susceptibilitat identificats. Mutacions en la línia germinal d'aquest gen són responsables de la susceptibilitat a desenvolupar la neoplàsia endocrina múltiple de tipus 2 (MEN2). Els feocromocitomes associats amb mutacions de Ret solen ser bilaterals, rarament malignes i amb PGLs extra-adrenals. A més, també s'han descrit mutacions somàtiques de Ret en un 14,3% dels casos esporàdics. Les vies de senyalització intracel·lular que es veuen afectades per aquestes mutacions són les PI3K/AKT i MAPK.

El síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL) està causat per mutacions en el gen supressor tumoral VHL. Aquest gen codifica per una E3 ubiquitin ligase que regula la degradació de HIF (Hypoxia Inducible Factor) a través del proteosoma, fet que explica el perfil pseudo-hipòxic d'aquests tumors. Els PCC o PGL amb mutacions en VHL solen ser bilaterals o multicèntrics, rarament malignes i diagnosticats en edats joves (40% dels pacients pediàtrics amb PCC).

El gen supressor tumoral NF1 codifica per una GAP (GTPase activating protein) que modula l'activitat de Ras. Aquesta GAP es troba mutada en malalts de Neurofibromatosis tipus 1 i només entre un 0,1-5,7% dels casos desenvolupen feocromocitoma. En aquests casos els tumors poden ser tant unilaterals com bilaterals, no solen presentar tumors extra-adrenals i la malignitat és més freqüent que en altres síndromes com MEN2 o VHL. A nivell de senyalització, les mutacions en NF1 provoquen un increment de l'activitat de Ras i de mTOR.

El gens SDHD, SDHC i SDHB codifiquen per tres subunitats de la succinat deshidrogenasa i tot i que els mecanismes moleculars pels quals la seva mutació afecta a la proliferació cel·lular no estan clars, s'ha vist que la inactivació de SDH i VHL provoca l'acumulació de succinat que inhibeix l'activitat enzimàtica propil hidroxilasa i en conseqüència HIF no pot ser degradat a través de VHL i la seva estabilització indueix processos d'angiogènesi.

Recentment, s'han descrit mutacions en casos de feocromocitoma en el gens SDHA, una altra subunitat de la SDH, i en SDHF2, una proteïna requerida per l'assemblatge de la SDH. També s'han descrit mutacions en el gen TMEM127 que codifica per una proteïna transmembrana implicada en el transport de proteïnes i la maquinària necessària per l'endocitosi i el reciclatge proteic i en el gen MAX (MYC associated factor X) membre de la xarxa MYC-MAX-MXD1 de factors de transcripció que regulen el creixement i la proliferació cel·lular i la biologia de les cèl·lules mare.

## 4. LA SENESCÈNCIA CEL·LULAR

El 1965 Leonard Hayflick i Paul Moorhead van descriure el fenomen de la senescència cel·lular quan van descobrir que els fibroblasts humans normals presentaven una capacitat proliferativa finita *in vitro* (Hayflick, 1965). La senescència cel·lular és una aturada proliferativa irreversible en la qual les cèl·lules romanen vives i metabòlicament actives. Avui dia, sabem que el fenomen observat en fibroblasts per Hayflick i col·laboradors reflecteix un tipus particular de senescència cel·lular produïda per l'escurçament dels telòmers, però actualment se'n coneixen diferents tipus que tot seguit descriurem.

La varietat i el nombre d'estímuls així com els contextos cel·lulars que indueixen senescència en diferents processos fisiològics i patològics incrementa constantment, i per tant l'estudi dels mecanismes involucrats en la senescència, les causes i les característiques del fenotip senescent són camps que des de les últimes dècades estan generant un gran interès.

### 4.1 Tipus i mecanismes de senescència

Els estímuls inductors de senescència senyalitzen a través de múltiples vies (Campisi and D'adda Di Fagagna, 2007; Kuilman *et al.*, 2010; Salama *et al.*, 2014), moltes de les quals activen p53 i convergeixen en l'activació de p16 (també anomenat INK4A, codificat per *CDKN2A*), p15 (també anomenat INK4B i codificat per *CDKN2B*), p21 (també conegut com WAF1 i codificat per *CDKN1A*) i p27 (codificat per *CDKN1B*), tots ells inhibidors de CDKs (cyclin-dependent kinase). La inhibició dels complexos CDK-ciclina resulta en una aturada proliferativa on el component responsable crucial per la implementació de la senescència és la forma hipofosforilada de Rb (Chicas *et al.*, 2010).

En aquest apartat parlarem dels mecanismes involucrats en els diferents tipus de senescència cel·lular. El paper de la senescència fins fa poc s'havia restringit a situacions de dany o estrès cel·lular, però recentment aquesta visió ha canviat ja que s'ha descrit que la senescència també té un rol durant el desenvolupament embrionari i en la fisiologia d'alguns tipus de cèl·lules adultes normals. Així doncs, podem fer una primera classificació de la senescència cel·lular en: **senescència induïda per dany** i **senescència en condicions fisiològiques**.

La senescència induïda per dany es pot dividir en diversos subtipus: la senescència replicativa, la senescència induïda per dany al DNA, la senescència induïda per estrès oxidatiu i la senescència induïda per oncògens. Tots aquests tipus de senescència es poden combinar i estan relacionats entre ells ja que convergeixen en els mecanismes moleculars involucrats en la seva inducció (Muñoz-Espín e Serrano, 2014).

En canvi, pel que fa a la senescència en condicions fisiològiques parlarem de la senescència programada durant el desenvolupament embrionari i de la senescència fisiològica en les cèl·lules adultes.

#### 4.1.1 Senescència induïda per dany

##### 4.1.1.1 Senescència replicativa

Aquest tipus de senescència està causada per l'erosió dels telòmers al llarg de les divisions cel·lulars. Quan la telomerasa no és capaç de mantenir la llargada dels telòmers i la longitud d'aquests esdevé crítica, les cèl·lules ho interpreten com un tipus de dany al DNA i per tant desencadenen una resposta de dany al DNA (DDR) (Harley *et al.*, 1990; Fumagalli *et al.*, 2012).

La senescència replicativa està relacionada amb el locus CDKN2A que codifica per p16 i ARF dos supressors tumorals crucials (Kim and Sharpless, 2006). Mentre que p16 és un inhibidor de CDK4 i CDK6, ARF regula l'estabilitat de p53 a través de la inactivació de MDM2 (una p53-degrading E3 ubiquitin protein ligase). El locus CDKN2A normalment es troba expressat en nivells molt baixos en teixits joves i és activat amb l'envelliment (Krishnamurthy *et al.*, 2004). Malgrat que els mecanismes de desrepressió són en part desconeguts, està àmpliament acceptat que depèn de la pèrdua dels complexos repressius Polycomb (Jacobs *et al.*, 1999; Bracken *et al.*, 2007).

##### 4.1.1.2 Senescència induïda per dany al DNA

La resposta de dany al DNA provocada per l'escurçament dels telòmers és similar a la produïda per agents externs de dany al DNA, com la radiació ionitzant o els quimioterapèutics. Els telòmers són particularment sensibles al dany al DNA extern ja que són difícilment accessibles per la maquinària de reparació del DNA.

Els principals mediadors del DDR són les cinases de dany al DNA ATM, ATR, CHK1 i CHK2, les quals fosforilen i activen diverses proteïnes de cycle cel·lular incloent p53. La forma fosforilada de p53 activa l'expressió de p21 que inhibeix alguns complexos CDK-ciclina, concretament els que involucren la CDK2 (Campisi and D'adda Di Fagagna, 2007).

##### 4.1.1.3 Senescència induïda per estrès oxidatiu

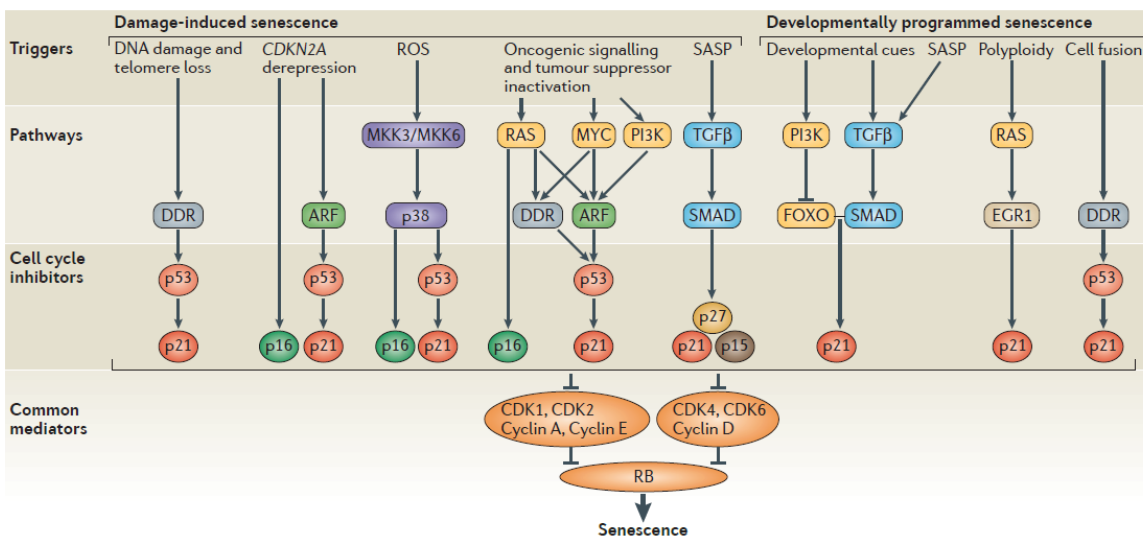
S'ha descrit que els nivells d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) augmenten després de l'exposició a molts tipus diferents d'estrès, entre els quals trobem la pèrdua de les funcions protectores dels telòmers, els agents quimioterapèutics, el dany al DNA i l'activació oncogènica (Passos *et al.*, 2009; Debacq-Chainiaux *et al.*, 2010). El paper rellevant de l'estrès oxidatiu en la senescència s'ha descrit en diversos treballs en els quals el tractament amb antioxidants retarda o evita la inducció de la senescència (Chen *et al.*, 1995; Macip *et al.*, 2002). Mecanísticament els alts nivells intracel·lulars de ROS induïts per la cascada RAS-RAF-MEK-ERK activen p38 MAPK que promourà un increment de l'activitat transcripcional de p53 i l'augment dels nivells de p21 (Sun *et al.*, 2007).



**4.1.1.4 Senescència induïda per oncògens (OIS)**

Les cèl·lules normals responen a l'activació de molts oncògens entrant en senescència cel·lular, aquest concepte es coneix com senescència induïda per oncògens. Va ser descrit originalment per Serrano i els seus col·laboradors quan van observar com l'expressió d'una forma oncogènica de Ras en fibroblasts humans provocava una aturada proliferativa (Serrano *et al.*, 1997). La llista d'oncògens capaços d'induir senescència ha anat incrementant des d'aleshores i se'n coneixen uns 50. De manera similar, la pèrdua de supressors de tumors com Pten, NF1 o VHL pot desencadenar la inducció de senescència (Courtois-Cox *et al.*, 2006; Alimonti *et al.*, 2010). A més a més, s'ha demostrat que la OIS funciona com una barrera durant els estadis inicials de la tumorigènesi *in vivo* (Collado and Serrano, 2010).

Una característica general pel que fa als mecanismes implicats en la senescència induïda per oncògens és l'activació del locus CDKN2A (Gil and Peters, 2006). A més a més, aquest tipus de senescència també pot provocar una resposta de dany al DNA causada per defectes en la replicació del DNA i per l'acumulació de ROS. És important remarcar que la importància dels mecanismes que s'il·lustren a la Figura 20 (p16, ARF o DDR induïda per p53) varia en funció del tipus i context cel·lular. Per exemple, en el cas de la pèrdua de Pten, el dany al DNA no sembla ser important per la inducció de senescència (Alimonti *et al.*, 2010). Un altre exemple d'aquesta varietat la trobem entre espècies, en ratolí la via ARF-p53 és un activador crucial de la OIS, mentre que en humans la via DDR-p53 sembla tenir un paper més important (Efeyan and Serrano, 2007; Halazonetis *et al.*, 2008). I el mateix succeeix amb el paper de p16 en la inducció de senescència, en ratolí té un rol més modest que en humà (Evan and D'adda Di Fagagna, 2009).



**Figura 20. Vies moleculars de senescència.** Múltiples agents estressants i de dany activen cascades de senyalització que convergeixen en l'activació d'inhibidors del cicle cel·lular i del supressor tumoral Rb. Els agents de dany al DNA i l'escurçament dels telòmers activen la resposta de dany al DNA (DDR) que activa

directament p53 i p21. Les ROS activen p16 i p53 a través de MKK3 i MKK6 i el seu efector p38. Els insults oncogènics o la pèrdua de supressors tumorals activen p16 i p53 amb la participació del DDR i ARF. TGF- $\beta$  és un factor del SASP que up-regula els inhibidors de cicle p21, p27 i p15 a través del complex SMAD. Els processos de desenvolupament indueixen senescència a través de p21 activant les vies PI3K i TGF $\beta$ . La poliploidia i la fusió cel·lular també indueixen l'expressió de p21 a través del DDR i p53, i també a través de l'activació d'EGR1.

#### 4.1.2 Senescència en condicions fisiològiques

##### 4.1.2.1 Senescència programada durant el desenvolupament embrionari

La senescència és una forma d'aturada del cicle cel·lular lligada a la supressió tumoral i a l'envelliment. I fins no fa gaire més de tres anys no s'havia documentat el seu paper en estats no patològics. És al 2013 quan els laboratoris del Dr. Manuel Serrano i Dr. William M. Keyes descriuen pràcticament de manera simultània l'existència d'un tipus senescència programada durant el desenvolupament embrionari (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013). Aquesta sorprenent troballa es basa majoritàriament en l'anàlisi d'embrions de ratolí. Cal assenyalar però, que la senescència durant en el desenvolupament també s'ha observat en embrions humans, de pollastre i de guatlla (Nacher *et al.*, 2006), suggerint així que és una característica conservada del desenvolupament embrionari dels vertebrats.

Entre les estructures senescentes es troben els túbuls mesonèfrics durant la regressió del mesonefros, el sac endolimfàtic de l'oïda interna, la cresta ectodèrmica apical (AER) de les extremitats, les membranes interdigitals i el tancament del tub neural. De fet, s'ha detectat la presència de cèl·lules senescentes en altres estructures embrionàries i per tant és fàcil que pròximament anàlisis més complets revelin encara més processos de desenvolupament relacionats amb el fenomen de la senescència.

La senescència i l'apoptosi són els mecanismes principals d'eliminació de cèl·lules danyades. La importància d'aquests mecanismes s'ha fet evident en càncer i envelliment, processos caracteritzats per l'acumulació severa de dany cel·lular. D'altra banda, la rellevància de l'apoptosi i la mort programada durant el desenvolupament embrionari està molt ben establerta (Fuchs and Steller, 2011). La inhibició del programa apoptòtic durant l'embriogènesi provoca l'aparició de defectes morfològics lleus com la persistència parcial de les membranes interdigitals i de la vagina imperforada (Lindsten *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2010) indicant la presència de mecanismes compensatoris durant la formació d'aquestes estructures. Curiosament, la formació de la vagina i dels dits són dos dels processos en els quals s'ha descrit recentment l'existència d'un tipus de senescència programada durant el seu desenvolupament embrionari. A més, s'ha descrit que la inhibició d'aquest tipus de senescència pot activar programes apoptòtics compensatoris suggerint així l'existència d'una interconnexió entre els processos de senescència i apoptosi que en permet la compensació mútua durant el desenvolupament.

Pel que fa als mecanismes moleculars implicats en aquest tipus de senescència en el cas del mesonefros, del sac endolimfàtic, del AER i del tub neural es relaciona amb un increment de l'expressió dels inhibidors de cicle cel·lular p15, p21 i p27. Anàlisis genètics de la senescència d'aquestes estructures han revelat un paper essencial de l'inhibidor de cicle p21, ja que els embrions knockout per CDKN1A mostren una manca de les característiques de la senescència (incloent SA-βGal, aturada proliferativa i focus d'heterocromatina associats a la senescència). Cal destacar que els marcadors de dany al DNA estan absents en aquestes estructures. A més a més, el mesonefros, el sac endolimfàtic, el AER i el tub neural d'embrions deficientes en altres inhibidors de cicle com CDKN2A o Trp53 no mostren aquesta absència de senescència. Així doncs, la senescència cel·lular programada durant el desenvolupament sembla ser comú en tot l'embrió, però té característiques distintives en comparació a la senescència induïda per dany.

D'altra banda, l'estudi de perfils d'expressió gènica de mesonefros i AER senescentos demostren l'existència de canvis en l'expressió de gens característics de diverses vies implicades en el desenvolupament, concretament de la via de TGFβ, Wnt i Hedgehog, i d'un fenotip secretor similar al SASP que inclou els factors de creixement FGF4 i FGF8. Estudis genètics i mecanístics del mesonefros i del sac endolimfàtic han revelat l'upregulació de p21 i que la inducció de senescència es troba controlada per les vies TGFβ-Smad i PI3K-FOXO. A més a més, en les cèl·lules mesenquimals proximals a la AER la secreció de factors de creixement, com FGF4 i FGF8, activen la via de les ERK que a la vegada té una funció en el manteniment de la senescència del AER. Cal assenyalar que aquestes vies també participen en la senescència induïda per dany en cèl·lules somàtiques adultes i que per tant tot i que com hem comentat anteriorment difereixen en algunes característiques també coincideixen en altres.

En conjunt, aquests estudis suggereixen que la senescència programada del desenvolupament es caracteritza per senyals de desenvolupament que convergeixen en p21.

#### 4.1.2.2 Senescència fisiològica en cèl·lules adultes

A part de durant el desenvolupament embrionari la senescència també té lloc de forma fisiològica programada en l'organisme adult. Concretament, s'ha descrit que els megacariòcits i els sincitiotrofo blasts de la placenta entren en senescència durant els seus programes de maduració (Besancenot *et al.*, 2010; Chuprin *et al.*, 2013). Curiosament, la senescència dels megacariòcits, de forma similar al que passa en la senescència programada del desenvolupament, és dependent de p21 però és independent de p16, p53 o p27. Els megacariòcits de desordres mieloproliferatius com la mielofibrosi primària no expressen p21 i no es tornen senescentos, fenomen que suggereix que la senescència és fisiològicament rellevant. En el cas de la placenta humana, aquesta mostra activitat SA-βGal en el sincitiotrofo blast i s'associa amb marcadors de dany al DNA, p16, p21 i p53. És important assenyalar que aquests dos tipus cel·lulars són dels pocs tipus de cèl·lules de mamífer que es sotmeten a endoreduplicació, fenomen que condueix a la poliploidia d'aquestes cèl·lules (Ullah *et al.*, 2009). El fet que la senescència programada fisiològica tingui lloc en dos casos de

poliploïdia natural suggereix que aquesta en podria ser la causa subjacent. D'acord amb això, durant la fusió de diversos tipus cel·lulars cancerosos no relacionats també s'indueix senescència, així com en processos infecciosos amb virus fusogènics com el virus del xarampió. A més a més, els osteoclasts madurs que són cèl·lules multinucleades que es formen per fusió cel·lular també presenten activitat SA- $\beta$ Gal (Kopp *et al.*, 2007), però es necessiten més estudis per poder concloure que els osteoclasts són un altre cas de senescència fisiològica. Finalment, les cèl·lules natural killer (NK) manifesten característiques típiques de la senescència, incloent activitat SA- $\beta$ Gal, marcadors de dany al DNA, HP1 $\gamma$ , p21 i SASP (Rajagopalan and Long, 2012).

Table 1 | **Developmental and physiological senescence**

Structures	Developmental stage*
<i>Embryonic structures</i>	
Branchial arches	Embryonic day 9.5 (E9.5) Chicken Hamburger–Hamilton stage 28 (HH28)
Eye	Chicken HH28
Gut endoderm	E9.5–E10.5
Apical ectodermal ridge (AER) of limbs	E9.5–E13.5
Tip of tail	E10.5–E17.5
Fusion of cranial plates	E10.5–E12.5
Pallium ventricular zone	E11.5
Cystic primordium (gall bladder)	E11.5
Neural tube	E11.5–E14.5 Chicken HH28
Endolymphatic sac of the inner ear	E12.5–E14.5 Human 9 weeks
Mesonephric tubules	E12.5–E14.5 Quail HH40 Human 9 weeks
Interdigital webs of limbs	E13.5–E14.5
Ventral and fusing sternum midline	E14.5
Vibrissae follicles	E14.5–E15.5
Vertebral osteoblasts (cervical region)	E17.5–E18.5
Vertebral chondroblasts (cervical region)	E17.5–E18.5
<i>Adult cells</i>	
Placental syncytiotrophoblasts	Adult
Megakaryocytes	Adult
Decidual natural killer cells	Adult

\*Unless otherwise specified, stage refers to mouse embryonic development.

**Taula 4. Estructures embrionàries i adultes on s'ha detectat la presència de cèl·lules senescents (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).**

## 4.2 Morfologia i biomarcadors de les cèl·lules senescentes

Una de les característiques que presenten les cèl·lules senescentes *in vitro* és el canvi en la seva **morfologia**; en general, les cèl·lules esdevenen més grans, aplanades, vacuolitzades i, ocasionalment, multinucleades (Campisi *et al.*, 2011). No obstant, les cèl·lules senescentes *in vivo* mantenen la seva morfologia respectant l'arquitectura tissular.

Actualment no hi ha un marcador únic per totes les cèl·lules senescentes, per aquest motiu s'utilitza la combinació d'una sèrie de marcadors que estan generalment acceptats per definir la senescència cel·lular tant *in vitro* com *in vivo*.

Entre aquests marcadors trobem l'activitat  $\beta$ -galactosidasa associada a la senescència, **SA- $\beta$ Gal** (Dimri *et al.*, 1995; Collado and Serrano, 2006). És l'assaig més àmpliament utilitzat per detectar senescència i es basa en la detecció histoquímica de l'activitat de l'enzim  $\beta$ -galactosidasa a pH 6.0 (Kurz *et al.*, 2000). Aquesta activitat es basa en l'increment del contingut lisosomal de les cèl·lules senescentes, fet que permet la detecció de la  $\beta$ -galactosidasa lisosomal a un pH subòptim i que probablement reflecteix l'increment de l'autofàgia i l'engrandiment del compartiment lisosomal de les cèl·lules senescentes. Una de les limitacions de l'assaig SA- $\beta$ Gal és la necessitat d'utilitzar mostres fresques o congelades. Recentment s'ha descrit que les cèl·lules senescentes també són positives per la tinció **Sudan Black B (SBB)** que detecta la lipofuscina, un agregat lisosomal complex (Georgakopoulou *et al.*, 2013). L'avantatge d'aquesta tècnica és que es pot utilitzar en mostres de teixit fixades amb formalina i parafinades.

La senescència cel·lular es basa en una aturada estable del cicle cel·lular, i per tant, l'**absència de marcadors de proliferació** com la proteïna Ki67 o la incorporació de nucleòtids sintètics anàlegs de la timidina com la BrdU o l'EdU és una condició necessària per documentar la presència de senescència.

D'altra banda els mediadors més comuns de la senescència també s'utilitzen com a marcadors d'aquesta, per tant, l'expressió dels **inhibidors de cicle cel·lular** p15, p16, ARF, p21 i p27 i dels **supressors tumorals** p53 i de la forma hipofosforilada de Rb també són utilitzats com a biomarcadors de la senescència cel·lular.

Una altra característica de les cèl·lules senescentes és la presència de focus d'heterocromatina deguts a modificacions en l'estructura de la cromatina per canvis en l'expressió gènica. Els **focus d'heterocromatina associats a la senescència (SAHF)** contenen nombroses proteïnes associades a l'heterocromatina com la H3K9me3 (Trimethyl-histone H3 Lys9), HP1 $\gamma$  (Heterocromatin protein 1 homologue- $\gamma$ ) i macroH2A. Aquestes proteïnes augmenten el grau de compactació de la cromatina i reprimeixen l'expressió de gens necessaris per la progressió del cicle cel·lular (Nielsen *et al.*, 2001; Funayama and Ishikawa, 2007; Zhang and Adams, 2007).

És important mencionar que els SAHF es formen preferentment durant la senescència induïda per oncògens però no durant la senescència replicativa o l'envelliment.

A més a més, la caracterització del **fenotip secretor associat a la senescència (SASP)** permet utilitzar la secreció de múltiples factors extracel·lulars per les cèl·lules senescentes com a marcadors. La senescència cel·lular tradicionalment es descrivia com una resposta intracel·lular a diversos tipus d'estímuls o estrès. Actualment però, es sap que les cèl·lules senescentes secreten una sèrie de **citocines** (IL-6, IL-8 i IL-1 $\alpha$  entre altres), **quemocines** (MCPs, proteïnes quimiotàctiques de monòcits i MIPs, proteïnes inflamatores de macròfags), **factors de creixement** (TGF $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$  i GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) i **proteases** que constitueixen una resposta pro-inflamatòria complexa que rep el nom de fenotip secretor associat a la senescència, SASP (Senescence-associated secretory phenotype, (Acosta *et al.*, 2008; Kuilman *et al.*, 2008; Acosta *et al.*, 2013)) o també és anomenat secretoma senyalitzador de la senescència, SMS (Senescence Messaging Secretome, (Kuilman and Peeper, 2009)). La secreció d'aquests factors està mediat pels factors de transcripció NF $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) i CEBP $\beta$  (CCAAT/enhancer-binding protein- $\beta$ ).

La secreció de les proteïnes citades anteriorment o d'altres de similars per les cèl·lules senescentes causen inflamació i en alguns casos poden ésser crucials per la fagocitosi i eliminació de les cèl·lules senescentes (Xue *et al.*, 2007; Hoenicke and Zender, 2012). A més a més, els components del SASP poden promoure la inducció de senescència en les cèl·lules veïnes de forma paracrina a través d'un mecanisme que genera ROS i dany al DNA (Hubackova *et al.*, 2012; Nelson *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2013). L'activitat autocrina i paracrina del SASP suggereix que la senescència crea un microambient inflamatori que promou l'eliminació de les cèl·lules senescentes. D'altra banda hi ha certa controvèrsia pel que fa a les funcions biològiques desencadenades pels factors SASP. Així doncs, s'ha descrit que la secreció de citocines pro-inflamatòries per les cèl·lules senescentes pot tenir un efecte beneficiós o perjudicial en la cèl·lula. Els mateixos factors que activen el SASP poden activar mecanismes oposats, i per tant actuar tant com supressors tumorals o oncògens en funció del tipus i context cel·lular (Campisi *et al.*, 2011).

Finalment, hi ha **altres marcadors** com DEC1 (Deleted Esophageal Cancer 1), DCR2 (Decoy Receptor 2) que també es poden trobar freqüentment expressants en les cèl·lules senescentes (Collado *et al.*, 2005). Mentre que una reducció dels nivells de LMNB1 (Laminin B1) pot associar-se a diversos tipus de senescència (Shimi *et al.*, 2011; Freund *et al.*, 2012).

És important remarcar que la majoria d'aquests marcadors de senescència s'han validat *in vivo*, tant associant-los amb lesions pre-malignes de tumors com amb processos fisiològics, patològics i del desenvolupament embrionari.

### 4.3 Processos biològics associats a la senescència cel·lular

La senescència cel·lular és un mecanisme important per impedir la proliferació de cèl·lules potencialment tumorals. A banda d'aquesta funció de supressió tumoral, sabem que la senescència cel·lular també té un paper en el desenvolupament embrionari i que pot promoure la regeneració tissular i la inflamació associada a l'envelliment i a la progressió tumoral. Així doncs, la senescència cel·lular participa en cinc processos biològics complexos: la supressió tumoral, l'envelliment, la reparació tissular, el desenvolupament embrionari i paradòxicament també pot tenir un paper en la progressió tumoral. Alguns d'aquests processos tenen efectes totalment oposats i per tant la senescència pot ésser beneficiosa o perjudicial en funció de l'activitat biològica que acabi desencadenant. Per tant, entendre el funcionament del fenomen de la senescència és un repte que ens permetrà poder aprofitar els seus beneficis i suprimir-ne els inconvenients.

A continuació, analitzarem amb més detall quatre d'aquests cinc processos, ja que en l'apartat anterior ja hem parlat del paper de la senescència programada en el desenvolupament.

#### 4.3.1 El paper de la senescència en la supressió tumoral

Avui dia està clarament reconegut el paper de la resposta senescent com un mecanisme anti-tumoral eficaç i cell-autònom. El dany o estrès, que provoca que les cèl·lules en proliferació estiguin en risc de patir una transformació neoplàsica, indueix l'entrada en senescència per evitar la iniciació de la tumorigènesi. A més a més, l'aturada proliferativa de la senescència depèn de les funcions de les vies de p53 i p16INK4a/pRB, les quals es poden considerar les dos vies de supressió tumoral més potents codificades pel genoma dels vertebrats (Itahana *et al.*, 2001; Ohtani *et al.*, 2004). Ambdues vies integren múltiples aspectes de la fisiologia cel·lular per determinar el destí cel·lular. En humans i en ratolí, la majoria de càncers presenten mutacions en una o en les dues vies anteriors. Aquestes inactivacions genètiques o epigenètiques incrementen la susceptibilitat de l'organisme a desenvolupar un càncer compromentent l'habilitat de les cèl·lules a induir senescència.

El fet que la senescència cel·lular és un mecanisme de supressió tumoral s'ha demostrat *in vivo*, tant en estudis amb mostres de teixits humans com amb models de ratolí "cancer-prone". Així doncs per exemple, mostres de pacients d'adenomes de colon i nevus premalignes contenen cèl·lules que expressen marcadors de senescència com la SA- $\beta$ gal i marcadors de resposta del dany al DNA. No obstant, els adenocarcinomes i els melanomes malignes que es desenvolupen a partir de les lesions anteriors mostren una disminució de les cèl·lules senescentes (Bartkova *et al.*, 2005; Michaloglou *et al.*, 2005). De la mateixa manera, en models de ratolí que expressen la forma oncogènica de Ras o la deleció de Pten, les cèl·lules senescentes són abundants en les lesions premalignes però escasses en els càncers que deriven d'aquestes (Braig *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Collado *et al.*, 2005). A més a més, la inactivació de p53 provoca l'acceleració del desenvolupament de tumors malignes degut a una

disrupció de la resposta senescent (Chen *et al.*, 2005). Algunes cèl·lules tumorals conserven l'habilitat d'entrar en senescència (Shay and Roninson, 2004) *in vivo* en resposta a la quimioteràpia (Schmitt *et al.*, 2002; Coppé *et al.*, 2010) o després de la reactivació de p53 (Ventura *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2007). En aquests casos la senescència s'associa amb una regressió del tumor. És important assenyalar que el tumor en regressió promou una resposta inflamatòria que estimula el sistema immune per eliminar les cèl·lules senescentes. No obstant, la generació d'inflamació local està relacionada amb altres activitats biològiques de la senescència que comentarem en els següents apartats.

Les citocines pro-inflamatòries (IL-6, IL-8, IGFBP7 i IL-1 $\alpha$  entre altres) secretades per les cèl·lules senescentes (SASP) s'ha descrit que tenen una funció autocrina en l'activació de mecanismes d'aturada proliferativa per mantenir la senescència cel·lular (Kortlever *et al.*, 2006; Acosta *et al.*, 2008; Kuilman *et al.*, 2008; Wajapeyee *et al.*, 2008). D'altra banda s'ha descrit que la senescència cel·lular pot inhibir la formació de tumors no només induint una aturada del creixement cel·lular de manera persistent sinó també limitant la generació de cèl·lules mare canceroses (Kuilman *et al.*, 2010). La inhibició de la via de p53 provoca un increment de la ratio de divisió cel·lular promovent la inducció de la generació de cèl·lules mare pluripotents (Hanna *et al.*, 2009). L'extrapolació d'aquest fet a un model *in vivo* suggereix que l'origen de les cèl·lules mare cancerígenes sorgeix d'un procés de reprogramació cel·lular semblant (Krizhanovsky and Lowe, 2009).

Els exemples anteriors entre una llista creixent d'estudis similars (Collado and Serrano, 2010), demostren que la senescència cel·lular frena el desenvolupament del càncer mitjançant mecanismes cell-autònoms que bloquegen la proliferació de cèl·lules estressades o danyades oncogènicament. D'altra banda tal i com parlarem a continuació la senescència també pot promoure la progressió tumoral, però la diferència és que els mecanismes no són autònoms de la pròpia cèl·lula.

#### 4.3.2 El paper de la senescència en la progressió tumoral

La idea que la senescència pugui promoure el desenvolupament i la progressió tumoral sembla paradòxica, ja que s'oposa al seu paper com a mecanisme anti-tumoral. No obstant, la teoria de l'antagonisme pleiotròpic estipula que un procés biològic pot resultar beneficiós o perjudicial en funció de l'edat de l'organisme (Rauser *et al.*, 2006; Williams 1957). L'explicació racional de l'antagonisme pleiotròpic es basa en el fet que la majoria d'organismes evolucionen en ambients replets de perills extrínsecs letals, condicions sota les quals els individus d'edats avançades i els processos biològics per fer front a l'envelliment solen desaparèixer. En canvi, avui dia ens trobem amb que els fenotips i les malalties associades a l'envelliment han escapat de la selecció natural i per tant, un procés biològic que en el seu moment va ser seleccionat evolutivament per promoure el benestar dels organismes joves pot ser perjudicial en organismes envellits. Així doncs, en el cas de la senescència aquest procés pot suprimir el desenvolupament de càncer en individus joves mentre que pot promoure'n la



seva progressió en individus d'edat avançada. Un altre exemple, de l'antagonisme pleiotròpic de la senescència també el trobem durant el procés de regeneració tissular com veurem amb més detall en un apartat posterior.

Les cèl·lules senescentes desenvolupen un fenotip secretor (SASP) que afecta al comportament de les cèl·lules veïnes. Sorprenentment, molts d'aquests factors estimulen fenotips associats amb l'agressivitat de les cèl·lules canceroses i diversos treballs *in vitro* n'han anat proporcionant nombroses evidències. Per exemple, s'ha descrit que els fibroblasts senescentes secreten el factor GRO (Growth-Related Oncogene) i que aquest estimula la proliferació de cèl·lules epitelials pre-malignes (Bavik *et al.*, 2006; Coppé *et al.*, 2010). Coppé i els seus col·laboradors mostren com les cèl·lules senescentes secreten nivells elevats de IL-6 i IL-8 que promouen la transició epiteli-mesènquima i la invasió de cèl·lules epitelials pre-malignes (Coppé *et al.*, 2008). A més, tant fibroblasts com cèl·lules mesotelials senescentes secreten VEGF que estimula la migració i la invasió de cèl·lules endotelials (Coppé *et al.*, 2006; Ksiazek *et al.*, 2008). També s'ha observat que fibroblasts i queratinòcits senescentes secreten metal·loproteïnases de la matriu (MMPs) que faciliten la invasió cel·lular (Millis *et al.*, 1992; Kang *et al.*, 2003; Coppé *et al.*, 2010).

Hi ha diverses evidències que mostren com les cèl·lules senescentes que sovint persisteixen *in vivo*, poden promoure la progressió tumoral a través del fenotip secretor associat a la senescència (SASP). Bàsicament, el SASP pot crear un microambient que afavoreixi la progressió tumoral a través de tres processos. El primer d'aquests processos es basa en la capacitat dels factors SASP per promoure la invasió cel·lular i la metàstasi mitjançant la disrupció i la remodelació de l'estructura dels teixits (Coppé *et al.*, 2008; Rodier and Campisi, 2011). Les cèl·lules senescentes secreten grans quantitats de proteases que degraden la matriu extracel·lular i deixen l'estructura del teixit més relaxada i per tant faciliten la invasió de les cèl·lules canceroses. A més a més, els factors SASP faciliten la invasió de les cèl·lules tumorals induint la transició d'epiteli a mesènquima de les cèl·lules veïnes (Laberge *et al.*, 2012). També s'ha descrit que interleucines específiques del SASP contribueixen a connectar la senescència amb un fenotip inflamatori i càncer (Kuilman *et al.*, 2008). S'ha descrit que els fibroblasts senescentes estimulen la formació de tumors malignes a partir de cèl·lules epitelials pre-malignes quan aquests dos tipus cel·lulars són co-injectats en ratolins immunodeprimits (Krtolica *et al.*, 2001). A més, la co-injecció de cèl·lules senescentes amb cèl·lules canceroses accelera la ratio de formació de tumors en ratolí (Krtolica *et al.*, 2001; Liu and Hornsby, 2007; Bhatia *et al.*, 2008; Bartholomew *et al.*, 2009; Coppé *et al.*, 2010). Per tant, en models de xenografts de ratolí s'ha demostrat que les cèl·lules senescentes promouen i/o acceleren la progressió maligna tant de cèl·lules premalignes com malignes *in vivo*. Molt recentment, Baker i els seus col·laboradors han demostrat que l'eliminació de les cèl·lules positives per p16INK4a endarrerix la tumorigènesi i atenua el deteriorament relacionat amb l'envelliment de diversos òrgans (Baker *et al.*, 2011; Demaria *et al.*, 2014). El segon procés en el que està implicat el SASP és la vascularització tumoral. Les cèl·lules senescentes poden promoure directament o

indirectament l'angiogènesi. Pel que fa al mecanisme directe, les cèl·lules senescentes secreten una varietat de factors angiogènics que promouen la proliferació i l'assemblatge de cèl·lules endotelials per la neo-angiogènesi (Davalos *et al.*, 2010). Les cèl·lules senescentes també poden promoure l'angiogènesi indirectament mitjançant el reclutament de macròfags i estimulants-los perquè adoptin un fenotip pro-angiogènic M2 (Kelly *et al.*, 2007). I finalment, el tercer mecanisme mitjançant el qual el SASP promou el creixement tumoral és l'establiment d'un microambient immunosupressor. Les cèl·lules senescentes secreten citocines que recluten cèl·lules supressores mieloides que inhibeixen els limfòcits T CD8<sup>+</sup> que ataquen i eliminen les cèl·lules tumorals. La inhibició de STAT3 provoca la disminució de la secreció d'una sèrie de citocines immunosupressores que comporta una forta resposta anti-tumoral desencadenada pels limfòcits T CD8<sup>+</sup> i promou la regressió del tumor (Toso *et al.*, 2014).

Tot i que les activitats paracrines d'alguns factors SASP puguin promoure fenotips associats amb la malignitat, el SASP és un fenomen complex i no tots els seus components promouen el desenvolupament de càncer. Per exemple, els queratinòcits senescentes secreten el factor anti-angiogènic maspin (Nickoloff *et al.*, 2004). A més, els melanòcits humans senescentes secreten IGFBP7 que induïx senescència en melanòcits no senescentes i apoptosi en algunes línies cel·lulars de melanoma (Wajapeyee *et al.*, 2008). A més a més, cada factor SASP pot tenir efectes diferents en funció del tipus i del context cel·lular. Per exemple, tal i com hem comentat en la secció anterior la IL-6, IL-8 i PAI-1 que són secretats per fibroblasts senescentes que promouen la supressió tumoral a través del reforç i manteniment de l'arrest proliferatiu induït per oncògens o per estrès oxidatiu (Kortlever *et al.*, 2006; Acosta *et al.*, 2008; Kuilman *et al.*, 2008), no obstant la IL-6 i la IL-8 també s'ha vist que promouen la tumorigènesi en cooperació amb l'activació de diversos oncògens (Sparmann and Bar-Sagi, 2004; Ancrile *et al.*, 2007).

Totes aquestes activitats del SASP descrites en la progressió tumoral fa que el SASP es converteixi en una diana atractiva per a noves teràpies adjuvants del càncer.

#### 4.3.3 El paper de la senescència en l'envelliment

Avui dia, sabem que la senescència observada per Hayflick està causada per l'escurçament dels telòmers (Bodnar *et al.*, 1998), però que hi ha altres estímuls associats a l'envelliment que promouen la senescència independentment de la mida dels telòmers. Amb el pas del temps s'activen mecanismes de dany al DNA no telomèric i la desrepressió del locus INK4/ARF que són capaços també d'induir senescència (Collado *et al.*, 2007). L'acumulació de cèl·lules senescentes en individus que envelleixen s'ha suggerit en diversos estudis, ja des del 1995 Dimri i els seus col·laboradors van detectar un increment de l'activitat SA- $\beta$ gal en la pell de persones d'edat avançada (Dimri *et al.*, 1995). A més a més, el nombre de cèl·lules senescentes incrementa d'un 8% a un 17% quan es comparen mostres de fetge de ratolí jove amb ratolins vells. Es van obtenir resultats similars en pell, pulmó i melsa, però no es van observar diferències en cor, múscul esquelètic i ronyó (Wang *et al.*, 2009). D'acord amb aquestes dades

podem afirmar que la senescència no és una característica generalitzada de tots els teixits dels organismes envellits. En el cas de les cèl·lules tumorals senescentes, existeixen evidències que es troben sota la vigilància estricta del sistema immune i s'eliminen per fagocitosi (Xue *et al.*, 2007; Hoenicke and Zender, 2012). Possiblement, l'acumulació de cèl·lules senescentes amb l'edat reflecteix un increment de la taxa de generació de cèl·lules senescentes i/o una disminució de la seva taxa d'eliminació com a conseqüència d'una resposta immune atenuada. Com que el número de cèl·lules senescentes incrementa amb l'edat està àmpliament acceptat que la senescència contribueix a l'envelliment. No obstant, aquest punt de vista subestima el que és possiblement el propòsit primari de la senescència, prevenir la propagació de les cèl·lules danyades i activar-ne la seva eliminació mitjançant el sistema immune. Per tant, és possible que la senescència sigui una resposta compensatòria que contribueixi a eliminar les cèl·lules danyades i potencialment oncogèniques dels teixits. Perquè aquesta resposta pugui tenir lloc correctament requereix un sistema eficient de recanvi cel·lular que implica l'eliminació de les cèl·lules senescentes i la mobilització de cèl·lules progenitores per re-establir el nombre de cèl·lules. En organismes envellits aquest sistema de recanvi es torna ineficient o es pot exhaurir la capacitat regenerativa de les cèl·lules progenitores, i amb el temps això resulta amb l'acumulació de cèl·lules senescentes que poden agreujar el dany i contribuir a l'envelliment.

Com ja hem comentat anteriorment, en els darrers anys s'ha descrit que les cèl·lules senescentes presenten alteracions en el seu secretoma (SASP), concretament es troba enriquit en citocines proinflamatòries i metal·loproteïnases de la matriu (Kuilman *et al.*, 2010; Rodier and Campisi, 2011). Aquest secretoma proinflamatori pot tenir un paper en l'envelliment. Tot i que el número de mecanismes implicats en la inducció de la senescència cel·lular han anat incrementant, les vies de p16INK4a/Rb i p19ARF/p53 continuen sent les més importants (Serrano *et al.*, 1997). La rellevància d'aquestes vies en l'envelliment esdevé confirmada amb la correlació dels nivells de p16 i p19 amb l'edat en l'anàlisi de diferents teixits tant de ratolí com humà (Krishnamurthy *et al.*, 2004; Ressler *et al.*, 2006). No es coneix l'expressió de cap altre gen o proteïna que correlacioni tan robustament amb l'envelliment en diferents teixits i espècies. Un meta-anàlisi de més de 300 GWAS (Genome-Wide Associations Studies) ha identificat el locus INK4a/ARF com el locus genòmic que es troba genèticament associat amb un nombre més elevat de patologies associades a l'edat, incloent diversos tipus de malalties cardiovasculars, diabetis, glaucoma i Alzheimer (Jeck *et al.*, 2012).

El paper crític de p16 i p53 en la inducció de la senescència cel·lular ha afavorit la hipòtesi que la senescència induïda per p16 i p53 contribueix a l'envelliment fisiològic. Així doncs, l'activitat pro-envelliment de p16 i p53 és un dany acceptable en comparació als beneficis que aporta en quan a la supressió tumoral. D'acord amb aquesta idea, en ratolins mutants que presenten un envelliment prematur observem nivells elevats de senescència i els seus fenotips progeroides milloren amb l'eliminació de p16 o p53. Aquest és el cas del ratolí deficient en BRCA1 (Cao *et al.*, 2003), d'un model murí de HGPS (Varela *et al.*, 2005) i d'una soca de ratolí amb

inestabilitat cromosòmica deguda a una mutació hipomòrfica de BubR1 (Baker *et al.*, 2011). No obstant, hi ha altres evidències que suggereixen l'existència d'un panorama més complicat. Per exemple, els ratolins que presenten un lleu increment sistèmic dels supressors tumorals p16, p19 o p53 exhibeixen un augment de la longevitat que no es pot explicar per una menor incidència de càncer (Matheu *et al.*, 2007; Matheu *et al.*, 2009). A més a més, l'eliminació de p53 agreuja els fenotips d'alguns models de ratolí de progèria (Begus-Nahrmann *et al.*, 2009; Murga *et al.*, 2009; Ruzankina *et al.*, 2009). Entre aquests casos i estudis trobem com dos intervencions conceptualment oposades són capaces d'allargar l'esperança de vida (Matheu *et al.*, 2007; Matheu *et al.*, 2009; Baker *et al.*, 2011).

L'activació de p53 i INK4a/ARF es pot considerar un resposta compensatòria beneficiosa per evitar la propagació de les cèl·lules danyades i les seves conseqüències en l'envelliment i el càncer. No obstant, quan el dany és generalitzat, la capacitat regenerativa dels teixits s'esgota o es satura i sota aquestes condicions extremes les respostes de p53 i INK4a/ARF poden esdevenir perjudicials i accelerar l'envelliment.

#### 4.3.4 El paper de la senescència en la regeneració tissular

La senescència cel·lular és una resposta al dany cel·lular que involucra inflamació i remodelació de la matriu extracel·lular per acabar amb l'eliminació de les cèl·lules senescentes per fagocitosi.

Si la finalitat de la senescència és l'eliminació de les cèl·lules el fet que no es dugui a terme d'una forma més ràpida i directa mitjançant apoptosi es pot explicar perquè les cèl·lules senescentes abans de morir d'aquesta forma fan un últim servei al teixit hoste provocant un procés de remodelació tissular que inclou la seva pròpia eliminació. Un exemple d'aquest paper de la senescència s'ha demostrat recentment en la participació de la senescència en múltiples processos del desenvolupament de vertebrats (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013) i amb el treball on Demaria i els seus col·laboradors que proporcionen evidències d'un paper fisiològic de la senescència en la remodelació dels teixits, concretament durant la cicatrització de ferides (Demaria *et al.*, 2014).

Ratolins modificats genèticament amb un augment o una disminució de l'activitat de gens crítics per la inducció de la senescència presenten defectes en la resposta al dany tissular. Per exemple, els ratolins deficientes en p53 mostren una cicatrització més ràpida de les ferides (Nakade *et al.*, 2004), mentre que els ratolins amb un excés de p53 exhibeixen un retard en la cicatrització de les ferides (Gannon *et al.*, 2011). Tot i que aquestes observacions són de gran interès, els models experimentals utilitzats no permeten distingir entre la contribució de la senescència depenent de p53 dels altres processos regulats per p53, incloent proliferació, apoptosi, diferenciació, resposta immune o angiogènesi. Per abordar el paper fisiològic de la senescència és necessari desenvolupar estratègies que permetin eliminar selectivament les cèl·lules senescentes *in vivo*. Per això són rellevants treballs com els de Demaria i col·laboradors

on han generat un ratolí transgènic en el qual el promotor de p16INK4a dirigeix l'expressió de proteïnes pro-apoptòtiques sota un estímul químic. Per tant, l'administració *in vivo* de l'interruptor químic converteix la senescència en apoptosi. Aquest ratolí s'ha utilitzat per estudiar el paper de la senescència durant la cicatrització de les ferides de la pell (Demaria *et al.*, 2014). Els investigadors observen com durant la cicatrització de les ferides hi ha un brot transitori de cèl·lules senescentes que s'esvaeixen amb el tancament de la ferida. És important destacar que la conversió de senescència a apoptosi es tradueix en un retard significatiu de la cicatrització de les ferides. Aquestes observacions constitueixen la primera demostració directa, en un context totalment normal *in vivo*, que la senescència cel·lular contribueix a la remodelació dels teixits. L'examinació histològica del procés de cicatrització revela que en absència de senescència les ferides acumulen teixit fibrós en excés. Aquestes observacions estan d'acord amb estudis previs que també conclouen que la senescència cel·lular és important per limitar la fibrosi durant la reparació tissular, com s'ha demostrat en pell (Jun and Lau, 2010), fetge (Krizhanovsky *et al.*, 2008), i en altres patologies fibròtiques (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

Estudis com aquests estan canviant la nostra comprensió de la senescència cel·lular, col·locant-la en el centre de la resposta de la regeneració de teixits. Els beneficis complets de la senescència s'aconsegueixen quan el procés inclou l'eliminació de les cèl·lules senescentes, restaurant així l'estat no danyat del teixit. No obstant, en situacions patològiques cròniques, incloent l'envelliment, les cèl·lules senescentes no són eficientment eliminades i el dany continu resulta en l'acumulació de cèl·lules senescentes que poden agreujar la disfunció del teixit. Aquesta doble cara de la senescència recorda a la inflamació, la qual és beneficiosa quan és transitòria i eficientment solucionada, però patològica quan és crònica i no resolta. Aquests matisos i complexitats de la senescència requereixen més estudis i recerca sobre el potencial terapèutic de l'activació o del bloqueig de la senescència en funció del context.

***Objectius***

---



## **1. Estudi del paper de Sprouty1 com un gen supressor de tumors durant el desenvolupament del carcinoma fol·licular de tiroide (FTC)**

1.1 Anàlisi dels marcadors de senescència cel·lular en la tiroide dels ratolins *knockout* per Sprouty1

1.2 Estudi de les vies de senyalització regulades per Sprouty1 implicades en l'activació de la senescència cel·lular

1.3 Anàlisi de la progressió tumoral de les tiroides dels ratolins doble heterozigots per Sprouty1 i Pten

1.4 Estudi dels nivells de Sprouty1 en mostres humanes de tumors fol·liculars

## **2. Estudi del paper de Sprouty1 en el desenvolupament del feocromocitoma**

2.1 Anàlisi de la progressió tumoral de les glàndules adrenals dels ratolins doble heterozigots per Sprouty1 i Pten

2.2 Anàlisi de la pèrdua d'heterozigositat de Sprouty1 i Pten en els feocromocitomes

2.3 Estudi de la malignitat dels tumors de la glàndula adrenal dels ratolins doble heterozigots per Sprouty1 i Pten

## **3. Estudi del paper de la tirosina 53 de Sprouty1 durant el desenvolupament del sistema genitourinari**

3.1 Generació de la línia de ratolí *knockin* Sprouty1 Y53A

3.2 Anàlisi del sistema genitourinari dels ratolins Sprouty1 Y53A





# ***Materials i Mètodes***

---



## 1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

### 1.1 Consideracions prèvies

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

- Llei 5/1995, de 21 de juny, de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques.
- Decret 214/1997, de 30 de juliol, que desenvolupa l'esmentada llei.
- Reial Decret 1201/2005, de 10 d'octubre, sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques.
- Directiva ECC 63/2010, del 22 de setembre, del Parlament Europeu, sobre la protecció d'animals utilitzats amb finalitats científiques.

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

Els ratolins van ser allotjats en instal·lacions barrera, seguint procediments lliures de patògens a les sales de treball. Els animals es van mantenir amb cicles de 12 hores de llum/fosc, a una temperatura de 22°C i accés *ad libitum* a aigua i menjar.

### 1.2 Soques de ratolins emprades

#### 1.2.1 Ratolins *knockout* per Sprouty1

Els ratolins *knockout* per Sprouty1 (Basson *et al.*, 2005) utilitzats en aquest treball van ser cedits amablement pel Dr M. Albert Basson (King's College, Londres). La generació d'aquests ratolins es va dur a terme mitjançant la tecnologia Cre/lox (Lewandoski *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 2000), aquestes línies de ratolí presentaven delecionada tota la seqüència codificant de l'al·lel de Spry1. Els experiments es van dur a terme amb ratolins que presentaven un fons genètic 129/SvJ, C57BL/6 o bé mixt (129/SvJ; C57BL/6). El fons genètic es va triar en funció del fons genètic de l'altre model murí amb què els estiguéssim comparant.

#### 1.2.2 Ratolins *knockout* per Pten

Els ratolins *knockout* per Pten utilitzats en aquest treball van ser generats pel laboratori del Dr R. Parson (Podsypanina *et al.*, 1999); i van ser adquirits per la *NCI mouse repository* (<http://mouse.ncifcrf.gov/>). Aquests animals es van generar mitjançant la tècnica

d'electroporació de cèl·lules mare embrionàries amb un plàsmid que conté la deleció dels exons 4 i 5 del gen de Pten; posteriorment aquestes cèl·lules mare embrionàries van ser injectades en blastocists i implantats en femelles pseudoembarassades. D'aquesta manera es van generar animals quimèrics per Pten. Aquests animals presenten l'expressió d'una proteïna truncada per Pten que ha perdut el seu domini fosfatasa (exó 5).

Els ratolins *knockout* per Pten són inviàbles i moren a dia embrionari 8.5, en canvi els ratolins heterozigots per aquesta mutació (Pten<sup>+/-</sup>) són viàbles, fèrtils tot i que als 6 mesos de vida presenten neoplàsies en múltiples òrgans.

### 1.2.3 Ratolins *knockout* per Sprouty2

Els ratolins *knockout* per Spry2 (B6.129P2(Cg)-Spry2tm1.1Mrt/Mmnc) van ser generats al laboratori de la Dra. Gail A Martin (Shim *et al.*, 2005) i van ser adquirits als Mutant Mouse Resource & Research Centers (MMRRC, <https://www.mmrrc.org>). La generació es va dur a terme utilitzant un targeting vector que eliminava l'exó2 (l'únic exó codificant) del gen Sprouty2. El 50% dels ratolins Spry2<sup>-/-</sup> moren durant les primeres sis setmanes de vida, la resta poden viure fins als sis mesos d'edat tot i que són significativament més petits que els ratolins *wild-type* de la mateixa camada. Els ratolins *knockout* per Spry2 presenten una hiperplàsia en els sistema nerviós entèric que provocava acalàsia de l'esòfag i pseudo-obstrucció intestinal. Els ratolins heterozigots per Spry2 són complement viàbles i fèrtils.

### 1.2.4 Ratolins *knockin* Ret<sup>EGFP</sup>

La soca reportera Ret<sup>EGFP</sup> (Hoshi *et al.*, 2012) es va obtenir a partir del ratolí reporter condicional Ret<sup>floxEGFP</sup> (Jain *et al.*, 2006) que expressava el cDNA de RET humà flanquejat per loxP i seguit del gen reporter EGFP. Va ser cedida amablement pel Dr. Sanjay Jain (Washington University, St Louis, USA). El ratolí Ret<sup>floxEGFP</sup> es va creuar amb la soca β-actin Cre (Meyers *et al.*, 1998) per escindir el cDNA de RET floxejat de la línia germinal i d'aquesta manera posicionant directament el reporter EGFP sota el control del promotor de Ret, resultant en una forta expressió de EGFP en tots els teixits que expressaven Ret. Els ratolins resultants Ret<sup>EGFP</sup> es van retrocreuar amb ratolins C57BL/6 més de 15 generacions i l'al·lel Cre va ser segregat.

Pel que fa al fenotip d'aquests ratolins, tant els mascles com les femelles Ret<sup>EGFP/+</sup> eren completament viàbles i fèrtils; mentre que els ratolins Ret<sup>EGFP/EGFP</sup> morien durant les primeres hores de vida a causa d'una severa agangliogènesi i agènesi renal. Els ratolins Ret<sup>EGFP/EGFP</sup> presentaven els mateixos fenotips que els descrits pel *knockout* de Ret, indicant així que l'al·lel Ret<sup>EGFP</sup> és un al·lel nul de Ret.

### 1.2.5 Ratolins *knockin* Axin2<sup>LacZ</sup>

Els ratolins Axin2<sup>LacZ</sup> (Lustig *et al.*, 2002) es van adquirir a través de Jackson Laboratories (B6N.129P2-Axin2tm1Wbm/J). Pel que fa a l'estratègia genètica que es va utilitzar per obtenir

aquesta línia *knockin*, es va utilitzar un *targeting vector* que tenia delecionat la major part de l'exó 2 del locus de l'*Axin2* a través de la inserció en pauta del gen de la  $\beta$ -galactosidasa amb localització nuclear (NLS-lacZ) seguit d'una senyal polyA i la cassette neo. El constructe es va electroporar en cèl·lules mare embrionàries (129P2/OlaHsd-derived E14 embryonic stem cells). Les cèl·lules ES es van injectar en els blastocists receptors i els ratolins quimera es van creuar amb ratolins C57BL/6NCrl per establir la colònia mutant. Seguidament, es va retrocreuar durant 15 generacions amb ratolins C57BL/6NCrl.

La mutació *Axin2*<sup>lacZ</sup> suprimeix la funció endògena del gen i expressa NLS-lacZ sota el control del promotor endogen. Els ratolins homozigots exhibeixen defectes en les estructures del crani resultant en un fenotip semblant a la craniosinostosi en humans. Específicament, els ratolins homozigots mostren una reducció obvia de la mida del cap a les tres setmanes de vida. Aquests defectes es deuen a un desenvolupament anormal dels osteoblasts dels ratolins deficientes per *Axin2*. Donat que l'*Axin2* és un regulador negatiu de la via canònica de Wnt que reprimeix la transducció de la senyal promovent la degradació de  $\beta$ -catenina, l'expressió de NLS-lacZ en els ratolins *Axin2*<sup>lacZ</sup> és útil pel monitoratge de la senyalització canònica de Wnt endògena en una gran varietat de teixits i òrgans durant el desenvolupament, la regeneració i la tumorigènesi.

### 1.2.8 Ratolins Flpe

Aquests ratolins expressen la recombinasa Flpe des del locus Rosa26. Van ser generats al laboratori de la Dra. Susan M. Dymecki (Farley *et al.*, 2000) i adquirits de Jackson Laboratories (Gt(ROSA)26Sortm1(FLP1)Dym).

### 1.2.9 Generació dels ratolins *Spry1*<sup>Y53A</sup>

Els ratolins *knockin* per la Tirosina 53 de *Spry1* es van generar al nostre laboratori amb la col·laboració del Servei de Transgènics de la Universitat de Lleida i del Dr. Joaquim Egea. A continuació explicarem amb més detall l'estratègia genètica que es va utilitzar per la seva generació.

#### 1.2.9.1 Construcció del *Spry1*<sup>Y53A</sup> *targeting vector*

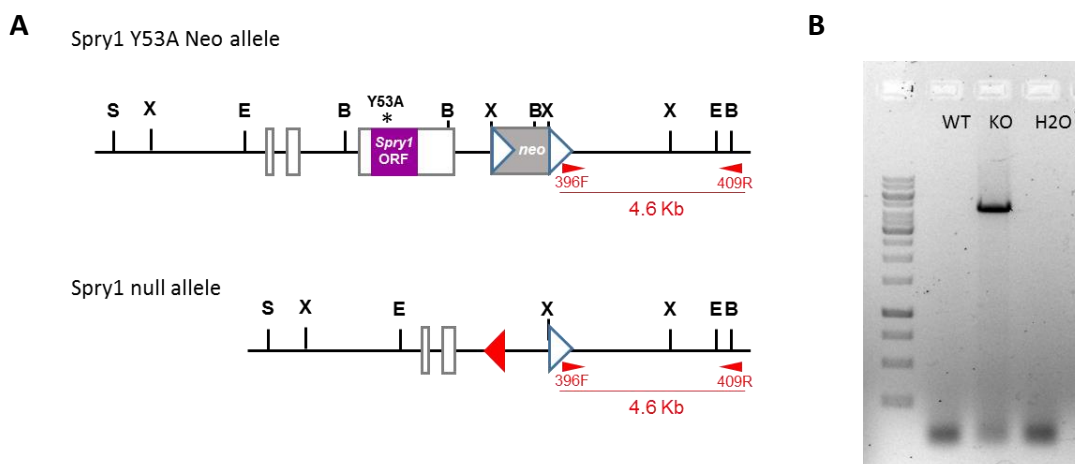
El *targeting vector* emprat per a la generació dels ratolins *Spry1*<sup>Y53A</sup> està basat en l'emprat per a la generació dels ratolins nuls per a *Spry1*, donat que aquests es van crear originalment com a ratolins flox per a després generar ratolins nuls per a *Spry1* en ser creuats amb la soca Cre corresponent (Basson *et al.*, 2005). Aquest *targeting vector* consisteix en un fragment EcoRI de DNA genòmic d'aproximadament 11.5 Kb, que inclou els tres exons de *Spry1*, clonat a pBluescript. Al tercer exó, que conté la pauta de lectura oberta sencera, s'hi ha introduït un canvi de dos nucleòtids (TAC→GGC) que converteix la Tirosina 53 en una Alanina. Per a la selecció positiva conté una cassette de resistència a neomicina flanquejada per llocs FRT, inserida al lloc BclI. El *targeting vector* va ser amablement cedit pel Dr. M.A. Basson (King's College, Londres). Al nostre laboratori hi vam introduir una cassette timidina cinasa (TK) sota el

promotor de la fosfoglicerat cinasa (PGK) a la diana Sall de pBluescript, per a la selecció negativa amb Ganciclovir. Aquest vector es va linearitzar amb AdhI i electroporar en cuvetes 4x50 mm (15 milions de cèl·lules + 30µg DNA per cuveta; 240 V, 400µF) a cèl·lules ES de la línia E14 fent servir un aparell Gene Pulser II de Bio-Rad. Les cèl·lules es van seleccionar en presència de 0.25 mg/ml G418 i 2µM Ganciclovir durant 8 dies, canviant el medi cada dia (4 dies amb G418, 3 dies amb G418 + Ganciclovir i 1 dia amb G418; la selecció comença 24 hores després de l'electroporació). Es van aïllar un total de 508 clons resistents a G418 i Ganciclovir, que es van créixer en plaques de 96 pouets. A mesura que arribaven a confluència, 2/3 parts dels clons es van congelar a -80°C en DMEM + 25% FCS + 10% DMSO i l'altre 1/3 es va amplificar en pouets de m24 per obtenir DNA genòmic (extracció amb proteïnasa K i precipitació amb isopropanol) i analitzar la recombinació homòloga per PCR i Southern Blot en els dos braços de recombinació abans d'injectar-los en els blastocists.

### 1.2.9.2 Anàlisi de la recombinació homòloga

#### Screening per PCR

El DNA genòmic obtingut es va fer servir per a un primer screening per PCR, utilitzant els primers 396F 5'-gtataggaacttctgatcatgatggc-3' i 409R 5'-cacctaacaaaaccacaagcttaagacc-3'. El primer 396F solapa parcialment el lloc FRT 3' que flanqueja la cassette Neo. El primer 409R anella a 3' del lloc EcoRI que delimita el targeting vector. Als al·lels generats per recombinació homòloga aquests primers produeixen un fragment de 4590 bp. Donat que aquest lloc FRT també es troba a l'al·lel *knockout*, es va fer servir genòmic del ratolí nul de *Spry1* com a control positiu. La PCR es va optimitzar per a fragments llargs fent servir una barreja de Taq i Pfx (30 unitats Taq; 1 unitat Pfx) i temps d'elongació de 3 minuts. Els productes de PCR es van resoldre en 1% d'agarosa. Es van detectar un total de 31 clons amb banda clara de PCR (6.1%). El DNA d'aquests clons es van analitzar per Southern blot utilitzant una sonda contra el braç 3'.



**Estratègia del screening per PCR dels clons resistents.** (A) Esquema dels al·lels *Spry1* Y53A Neo i *Spry1* KO. Els triangles blaus són els llocs FRT i el triangle vermell és el lloc loxP. (B) Imatge d'un gel d'agarosa del resultat de la PCR d'un control positiu (KO) i negatiu (WT).

### Southern Blot

Les mostres de DNA genòmic (aproximadament 10 µg) es van digerir durant tota la nit amb 20 unitats de BglII (braç d'homologia 3') o XbaI (braç d'homologia 5') a 37°C. L'endemà es van afegir 20 unitats més de l'enzim corresponent i es van digerir durant 3 hores més. Un cop digerides, les mostres es van carregar en gels de 0.7% d'agarosa i es van resoldre a 80V durant aproximadament 4-6 hores. Després de l'electroforesi, els gels es van incubar amb tampó de transferència alcalina (0.4N NaOH, 1M NaCl) dos cops durant 20 minuts a temperatura ambient amb lleugera agitació. Les membranes de Nylon (Roche) es van hidratar amb aigua destil·lada i posteriorment es van incubar amb tampó de transferència alcalina durant almenys 5 minuts. La transferència es va realitzar per capil·laritat durant unes 16-24 hores. Posteriorment les membranes es van incubar en tampó de neutralització (1M NaCl, 0.5M Tris HCl pH7.2) durant 15 minuts a temperatura ambient, i es van prehibridar durant 1-2 hores amb tampó d'hibridació [50% formamida, 5x SSC, 0.1% Sarkosyl, 0.02% SDS i 5% blocking reagent (Roche)] a 42°C. La hibridació es va realitzar en les mateixes condicions durant aproximadament 16 hores, en presència de sonda marcada amb digoxigenina prèviament desnaturalitzada.

Les sondes es van generar per PCR a partir de DNA genòmic i es van clonar en pCR4 TOPO (Invitrogen) segons les instruccions del fabricant. Per a la sonda 3' es van fer servir els següents primers: 392F 5'-gctgtgacataaccccatgaccaagg-3' i 393R 5'-gcttggtgtttgtaggtgaggtg-3'. Aquests primers amplifiquen un fragment de 369 bp just 3' de la diana EcoRI que delimita el targeting vector. Per a la sonda 5' es van fer servir els següents primers: 390F 5'-acacaatggaggcatttaagcagaa-3' i 391R 5'-acggttatgtgtggaattacatgca-3'. Aquests primers amplifiquen un fragment de 625 bp just 5' de la diana EcoRI que delimita el targeting vector. Les sondes es van marcar amb digoxigenina mitjançant PCR fent servir una barreja de dNTPS que contenen digoxigenina-11-uridina-5'-trifosfat (PCR DIG labeling mix plus, Roche).

Un cop hibridades, les membranes es van rentar quatre cops amb tampó de rentat (0.1x SSC, 0.1% SDS) a 65°C. Per a la immunodetecció, les membranes es van rentar amb tampó 1 (0.1 M Tris-HCl pH 8) dos cops durant 5 minuts a temperatura ambient, es van bloquejar en tampó 2 (0.5% blocking reagent en tampó 1) durant 1 hora a temperatura ambient, i es van incubar amb anticòs contra digoxigenina (Roche) diluït 1/10000 en tampó 2 durant 30 minuts a temperatura ambient. Després de rentar-se en tampó 1, les membranes es van incubar 5 minuts en tampó 3 (1% dietanolamina en aigua, pH 10) i es van revelar utilitzant el substrat quimioluminiscent CDP\* (Roche) diluït 1/100 en tampó 3). Les membranes es va exposar a films de raigs X durant 30 minuts a 3 hores. Dels 31 clons analitzats, 9 van donar el patró de restricció esperat per al braç d'homologia 3' (banda WT, 6.4 Kb vs. banda KI, 5.1 Kb), mentre que 8 van donar només banda WT. La resta de clons no va donar una senyal prou intensa al Southern blot com per a ser detectada. Tots 9 clons correctament recombinats a 3' van resultar positius per a recombinació homòloga del braç 5' (banda WT, 15.7 Kb vs. banda KI,



12.5 Kb). D'aquests 9 clons es van escollir 2 (clons 4A/D4 i 6D/A1) que presentaven una morfologia més desdiferenciada i es van injectar en blastocists obtinguts de mares pseudoprenyades C57BL/6. Es van obtenir 6 quimeres mascles de la línia 4A/D4 amb un percentatge de quimerisme de més del 60% de les quals 5 van donar transmissió germinal. Respecte al clon 6D/A1 només es va obtenir una quimera mascle, la qual també va donar transmissió germinal.

D'aquests creuaments vam obtenir la línia Spry1<sup>Y53ANeo</sup>, aleshores els ratolins Spry1<sup>Y53ANeo/+</sup> es van creuar entre ells per obtenir ratolins homozigots per la mutació. Per eliminar la *cassette* Neo es van creuar els ratolins Spry1<sup>Y53ANeo/+</sup> amb ratolins de la soca Flpe i les cries que havien patit l'escissió de la *cassette* Neo es van creuar amb ratolins C57BL/6 per segregar l'al·lel Flpe. Els resultats que es van obtenir amb el clons 4A/D4 i 6D/A1 van ser idèntics, però la majoria d'experiments s'han realitzat amb la línia provinent del clon 4A/D4.

### 1.3 Genotipatge de ratolins

Els ratolins es sexen i es deslleten als 21 dies, moment en el que es procedeix al seu genotipatge. S'obté una biòpsia de la cua dels ratolins i a continuació es digereix amb un tampó de genotipatge que conté 100mM Tris pH 8.5; 200mM NaCl, 5mM EDTA i 0.2% SDS i proteïnasa K a 1.5 mg/mL (Sigma Aldrich). La digestió es dur a terme a 55°C durant 16hores en agitació i es precipita el DNA amb etanol fred. Finalment el DNA es resuspèn en H<sub>2</sub>O MilliQ i es procedeix a dur a terme les reaccions de PCR per cada gen.

La deleció de l'al·lel de **Sprouty1** es va confirmar mitjançant el programa de genotipatge per PCR que consta de 33 cicles de 30'' a 94°C, 30'' a 57°C i 45'' a 72°C, amb un cicle final de 7 min a 72°C. Els primers utilitzats són:

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

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

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

Pel que fa a la deleció de l'al·lel de **Pten** es va confirmar gràcies a un programa de PCR que consta de 42 cicles de 1' a 94°C, 2' a 57°C i 1' a 72°C seguit d'un cicle final de 3 minuts a 72°C, amb els següents primers:

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

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

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

La deleció de l'al·lel de **Sprouty2** es va confirmar mitjançant el programa de genotipatge per PCR que consta de 36 cicles de 45'' a 94°C, 30'' a 59°C i 45'' a 72°C, amb un cicle final de 5 min a 72°C. Els *primers* utilitzats són:

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

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

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

El genotipatge de l'al·lel de **Ret<sup>EGFP</sup>** es va confirmar mitjançant el programa de PCR següent: 35 cicles de 45'' a 94°C, 45'' a 65°C i 45'' a 72°C, amb un cicle final de 5 min a 72°C. Els *primers* utilitzats són:

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

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

P3 (*primer* EGFP): 5'- TTTACGTCGCCGTCCAGCTCGA -3'

El genotipatge de l'al·lel **Axin2<sup>lacZ</sup>** es va confirmar mitjançant el programa de PCR següent: 35 cicles de 30'' a 94°C, 30'' a 67°C i 45'' a 72°C, amb un cicle final de 2 min a 72°C. Els *primers* utilitzats són:

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

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

P3 (*primer* lacZ): 5'- TGGTAATGCTGCAGTGGCTTG -3'

El genotipatge de l'al·lel **Flpe** es va confirmar mitjançant el programa de PCR següent: 42 cicles de 1' a 94°C, 2' a 58.8°C i 1' a 72°C, amb un cicle final de 10 min a 72°C. Els *primers* utilitzats són:

P1 (*primer* Fwd): 5'-CACTGATATTGTAAGTAGTTTGC-3'

P2 (*primer* Rev): 5'-CTAGTGCGAAGTAGTGATCAGG-3'

El genotipatge de l'al·lel **Spry1<sup>Y53ANeo</sup>** i **Spry1<sup>Y53A</sup>** es va confirmar mitjançant el programa de PCR següent: 40 cicles de 30'' a 94°C, 30'' a 60°C i 45'' a 72°C, amb un cicle final de 7 min a 72°C. Els *primers* utilitzats són:

P1 (*primer* Y53ANeo): 5'-CTACCGGTGGATGTGGAATGTGT-3'

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

P3 (*primer* WT/Y53A): 5'-TCTAAGAGCACCTCAGAAAGCCAGA-3'

### 1.4 Estimulació amb Lipopolisacàrid (LPS)

Per analitzar la translocació de p65 en la tiroide *in vivo*, vam injectar intraperitonealment els ratolins amb 75µg de LPS preparat de *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) durant 1 hora. Els controls es van tractar amb PBS durant el mateix temps. A continuació, els ratolins es van sacrificar mitjançant dislocació cervical i es van extreure les tiroides que es van processar ràpidament per dur a terme extracció de proteïna o immunofluorescència.

## 2. TÈCNiques DE CULTIUS CEL·LULARS

### 2.1 Cultiu de la línia cel·lular HEK 293T

Les cèl·lules HEK 293T són una línia cel·lular humana de ronyó embrionari, és un bon model per la sobreexpressió de proteïnes intracel·lulars, extracel·lulars, secretades o de membrana. És una variant de la línia cel·lular humana de l'epiteli renal 293, transformada amb el gen E1A d'adenovirus, que expressa l'antigen T de SV40. El manteniment d'aquesta línia cel·lular es realitza tripsinitzant les cèl·lules i després es centrifuguen a 1000rpm durant 3 minuts i es divideixen les cèl·lules 1:10 o 1:15, ja que el temps de duplicació és molt ràpid. Les cèl·lules es mantenen en DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, GIBCO Invitrogen) suplementat amb 10% de Sèrum Fetal Boví inactivat, 1% d'aminoàcids no essencials (NEAA, GIBCO), 1% de Piruvat de sodi (GIBCO) i 100µg/ml de Penicil·lina/Streptomicina (GIBCO) a 37°C en un atmosfera controlada del 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.2 Cultiu de la línia cel·lular IMR90

La línia IMR90 és una línia cel·lular de fibroblasts diploide humana derivada de teixit pulmonar d'un fetus de 16 setmanes d'una femella caucàsica. Aquestes cèl·lules són normals i no estan immortalitzades, per això tenen una esperança de vida limitada. Per aquest motiu aquesta línia és un model utilitzat per l'estudi de la senescència cel·lular. Aquesta línia es manté en MEM (Modified Eagle Medium, GIBCO Invitrogen) + 2mM de Glutamina + 1% Aminoàcids no essencials + 1% Piruvat de sodi + 10% de Sèrum Fetal Boví + 0.2% Penicil·lina/Estreptomicina. Les cèl·lules es divideixen entre 1:3 i 1:6 abans que arribin a la confluència (70-80%) sembrant 2-3x10.000 cèl·lules/cm<sup>2</sup> utilitzant 0.25% tripsina/EDTA i s'incuben en una atmosfera controlada del 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### 2.3 Cultiu primari de tiroide de ratolí

Els ratolins d'entre 5 i 12 setmanes d'edat es sacrifiquen mitjançant dislocació cervical, s'extreuen els dos lòbuls de la tiroide i es disgreguen en petits fragments de 1mm<sup>3</sup> aproximadament. Aquests fragments de tiroide es digereixen en un solució que conté 1mg/ml de Col·lagenasa IV (Worthington) i 1,2U/ml de Dispase II (Roche) en una solució de PBS durant

40 minuts a 37°C en moviment a 600rpm. Després es pipeteja la solució per tal de disgregar els fragments, es centrifuga a 1000rpm 5 minuts per tal que sedimentin al tub els fol·licles disgregats. A continuació es resuspenen els fol·licles en medi complet, que conté DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, GIBCO Invitrogen) suplementat amb 10% de Sèrum Fetal Boví inactivat, 10% d'aminoàcids no essencials (NEAA, GIBCO), 1nM Piruvat Sòdic (GIBCO) i 100µg/ml de Penicil·lina/Streptomicina (GIBCO), B27 (GIBCO) i 1mIU/ml de TSH (Sigma). Després les cèl·lules es planten en grups de fol·licles per mantenir al màxim l'estructura de la tiroide *in vivo*. Després de 48 hores ja es poden estimular o deixar créixer per fer assaigs de proliferació. Les cèl·lules es mantenen a 37°C en un atmosfera controlada del 5% de CO<sub>2</sub>.

Pels assaigs de proliferació les cèl·lules es sotmeten a un sistema 3T3 (3-day transfer, inoculum 3 x 10<sup>5</sup> cells) mentre que per a la resta d'experiments s'utilitzen les cèl·lules plantades en fol·licles 48 hores després del cultiu, moment en que el cultiu cel·lular ja està estable. Els cultius de fol·licles *in vitro* es van deprivar amb medi sense sèrum ni TSH durant 3 hores i després es van estimular amb 50ng/ml de IL-6 (GIBCO, Ref: PMC0065) durant 10 minuts o amb IL-1α (GIBCO, Ref: PHC0015) durant 24 hores. Seguidament es van recollir els sobrenedants per realitzar els experiments de ELISA i array d'anticossos, també es van obtenir extractes proteics de les cèl·lules en cultiu. Pels experiments amb els anticossos bloquejants, els cultius de les cèl·lules fol·liculars de la tiroide es van estimular amb αIL-6 (eBioscience Ref:16-7061-85) i αIL-6R (eBioscience Ref:16-1261-85) amb medi sense sèrum durant 48h, després es van recollir els sobrenedants i es van obtenir extractes proteics de les cèl·lules fol·liculars estimulades. El nivells de IL-6 i KC secretats al medi de cultiu es van analitzar mitjançant un ELISA (Tebu-Bio/RayBiotech Ref:ELM-IL6-001C i Tebu-Bio/Peptrotech Ref:167900-M127). Per l'anàlisi dels altres factor secretats pels cultius de les cèl·lules fol·liculars vam utilitzar un array d'anticossos de citocines pro-inflamatòries (CytokineG-arrayIII Tebu-Bio Ref: 126AAM-CYT-G).

#### 2.4 Cultiu primari de fibroblasts dèrmics de ratolí

Els ratolins d'entre 0 i 3 dies d'edat es sacrifiquen tallant el cap després d'haver estat en gel durant uns 10 minuts, es renten amb etanol 70% i s'eixuguen completament. A continuació es talla la cua amb unes tisores per procedir a l'extracció de DNA i genotipatge de cada ratolí. Amb unes agulles es clava el cos del ratolí en una placa de silicona per les extremitats amb la part de la panxa cap a la placa i amb l'ajuda d'unes pinces i unes tisores es disseca la pell de la part posterior. Seguidament es col·loca la pell ben estirada en una placa de petri de 35 mm buida de manera que la dermis quedi a la part de sota. Afegir uns 4mL d'una solució 0.25 % de tripsina (REF 15090-46, GIBCO) en HBSS (REF 14175-053, GIBCO) a la placa i deixar a 4°C *overnight*. És important que les pells flotin en la solució de tripsina. El dia següent es treu la pell de la tripsina i es col·loca en una placa de petri buida, s'estira i amb l'ajuda d'unes pinces es separa l'epidermis de la dermis començant des d'un extrem de la pell. La dermis s'incuba durant 30 minuts a temperatura ambient i en agitació en una solució 0.5mg/ml de col·lagenasa

en HBSS. Després s'homogeneïtza i es disgrega a través d'un *cell strainer* de 70µm amb l'ajuda d'un èmbol de xeringa. Aquest homogeneïtzat es recull en un falcon de 15ml on s'afegeixen 8ml de medi de cultiu (MEM + 10% FBS + 1% L-glutamina + 1% Penicil·lina/Estreptomicina). Es centrifuga 5 minuts a 1000 rpm, el pellet de cèl·lules es resuspèn en medi de cultiu, es planta en una p100 i es deixa a l'incubador a 37°C i amb un 5%CO<sub>2</sub> fins que les cèl·lules arribin a un 70% de confluència i es puguin dividir.

### 3. PRODUCCIÓ DE LENTIVIRUS

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

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

Al laboratori hem generat un vector lentiviral per tal de sobreexpressar el gen *Sprouty1* de ratolí i tota una sèrie de mutacions puntuals d'aquest gen. Les mutacions puntuals que hem generat són les següents: *Spry1* Y53A, *Spry1* R62A, *Spry1* R70A, *Spry1* C215F, *Spry1* C247F i *Spry1* R250D. La tècnica utilitzada per generar aquestes mutacions es coneix com a Megaprimer i explicarem en què consisteix a continuació.

Primerament el que vam fer va ser clonar el cDNA de *Spry1* en el vector FUSPa. El vector FUSPa és un vector lentiviral de sobreexpressió que conté el promotor de la ubiqüitina C seguit d'un *cloning site* únic (*Ascl*), a més d'un cassette d'expressió de resistència a puomicina. Aquest vector FUSPa-*Spry1* és el que hem utilitzat com a motlle per generar els mutants puntuals. Tots els mutants es van dissenyar de manera que continguessin un tag HA al seu extrem N-terminal. El sistema Megaprimer consisteix en dues amplificacions per PCR separades amb primers mutagènics que contenen una regió de solapament on es troba la mutació, seguit d'una altra PCR addicional que acaba fusionant els dos fragments obtinguts.

Els primers utilitzats per generar les mutacions són els següents: Y53A, Mutagenic Fwd CCATCAGAGGCAGCAATGAAGCCACAGAGGGACCTTCGGTAGC, Mutagenic Rev GCTACCGAAGGTCCCTCTGTGGCTTCATTGCTGCCTCTGATGG. R62A, Mutagenic Fwd GTAGCGAGAGCACCTGCTCCT, Mutagenic Rev AGGAGCAGGTGCTCTCGCTAC. R70A, Mutagenic Fwd ACTGC ACCAGCACCCGAAAAG, Mutagenic Rev CTTTTCGGGTCTGGTGCACT. C215F,

Mutagenic Fwd TACGGGACCTTCATGTGCCTG, Mutagenic Rev CAGGCACATGAAGGTCCCGTA. C247F, Mutagenic Fwd CAGTCCCCTTCTGCTCCAGA, Mutagenic Rev TCTGGAG CAGAAGTGGGACTG. R250D, Mutagenic Fwd TGCTGCTCCGATTACCTGTGC, Mutagenic Rev GCACAGGTAATCGGAGCAGCA. R290I, Mutagenic Fwd CCTGGCTGCA TTTGTAGAAAC, Mutagenic Rev GTTCTACACCTGCAGCCAGG.

Els primers comuns utilitzats per tots els mutants són el BamHI-Ascl-HA-mSpry1 Fwd AACGGATCCGGCGCGCCATGTATCCCTATGACGTCCCGACTATGCAGATCCCCAAGTCAGCATGGC y el BamHI-Ascl-mSpry1 Rev ATCGGATCCGGCGCGCCTCATGACAGCTTGCCCTGAGC.

El primer protocol de PCR és el següent: 1 cicle de 94°C durant 10 minuts, 25 cicles de 95°C 20 segons, 59°C 1 minut i 68°C 2 minuts i, finalment un cicle de 72°C durant 10 minuts. El protocol de la reacció de PCR que uneix els dos fragments mutagènics és diferent amb 1 cicle de 94°C durant 10 minuts, 36 cicles de 94°C durant 30 segons, 55°C 30 segons i 72°C 30 segons acabant amb un cicle de 72°C de 10 minuts. Un cop realitzades aquestes PCRs, es corren en un gel d'agarosa del 1% i s'extrau banda amb el kit MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN). Els dos fragments obtinguts de cada mutant s'utilitzen com a motlle i es realitza una altra PCR utilitzant els primers comuns, que uniran les dos seqüències en una que contindrà la mutació desitjada. Es torna a passar per un gel d'agarosa 1%, s'extrau banda i es realitza la digestió del fragment i del vector FUSPa amb Ascl (10U/μl, Biolabs) en EDTA i buffer de digestió. La defosforilació del vector i les lligacions es van dur a terme amb el Rapid DNA Dephospho and Ligation Kit de Roche. Les comprovacions es van realitzar amb EcoRI (10U/μl, Fermentas) i BstXI (10U/μl, Roche).

Per la introducció dels vectors clonats en bacteris Stbl3 s'utilitza un mètode físic de transformació mitjançant xoc tèrmic. S'incuben entre 1-5μl dels productes de lligació amb 50μl de bacteris competents durant 20 minuts en gel. Es duu a terme un xoc tèrmic a 42°C durant 45 segons i es deixa en gel durant 2 minuts més. A continuació, s'afegeixen 250μl de medi SOC i s'incuba durant una hora a 37°C. El cultiu resultant es plaqueja en plaques amb antibiòtic (LB + Ampicil·lina) per seleccionar els bacteris que hagin incorporat el vector ja que aquest conté resistència a l'antibiòtic.

### 3.2 Transducció lentiviral

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

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

Les partícules lentivirals van ser produïdes utilitzant la línia cel·lular HEK293T, mitjançant la co-transfecció amb la tècnica de fosfat càlcic. La **transfecció amb Fosfat Càlcic** és un mètode econòmic, senzill i molt utilitzat per la incorporació de material genètic de forma eficient a les

línees cel·lulars, com les 293T. Es basa en la formació de precipitats insolubles de sals de calci que atrapen el DNA i el dipositen a la superfície de les cèl·lules. Aquestes desencadenen un procés d'endocitosi per tal d'incorporar el material genètic i alliberar-lo dins de les cèl·lules en cultiu. És una tècnica poc utilitzada en cultius primaris, degut a la gran toxicitat cap a les cèl·lules, però és molt efectiva en altres línees cel·lulars, com és el cas de les 293T.

Per realitzar aquesta tècnica de transfecció s'utilitzen dos solucions, la primera conté el DNA plasmídic, aigua i  $\text{CaCl}_2$  250mM i la segona solució és un *buffer* BBS a pH 6.95 (concentració 2X), el qual es tira gota a gota sobre la primera solució. El pH del *buffer* BBS és un paràmetre crític per l'èxit d'aquest protocol.

Es transfecta un total de 30ug de DNA per placa p100 (75cm<sup>2</sup>), que correspon als tres vectors plasmídics en proporció 1:1:1. El primer vector utilitzat és el vector lentiviral que conté la seqüència de DNA a transferir a les cèl·lules diana, el segon vector conté totes les proteïnes necessàries per l'empaquetament del virus, en el nostre cas hem utilitzat el vector psPAX2 i el tercer vector conté totes les seqüències que codifiquen per l'embolcall del virus, el plàsmid PMD2G.

Els vectors lentivirals utilitzats han estat: el vector de sobreexpressió FUSPa, que conté el cDNA de *Sprouty1 full length* i amb les diferents mutacions, i vectors lentivirals per l'expressió de shRNA, el vector FSV, que conté la seqüència de shRNA per les proteïnes IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  (Dolcet *et al.*, 2006).

Un dia després de la transfecció es canvia el medi de les cèl·lules amb medi complet i es deixen incubant durant 72hores, perquè les cèl·lules 293T tinguin temps de produir les partícules víriques i les secretin al medi de cultiu. A continuació es recullen els sobrenadants de les plaques, on s'hi troben les partícules víriques, es filtren amb filtres de 0,45 $\mu\text{m}$  i finalment s'apliquen directament a les cèl·lules que es volen infectar.

### 3.2.2 Transducció de la línia cel·lular IMR90 i dels cultius primaris de tiroide

Es sembren les cèl·lules i es deixen com a mínim 24h a l'incubador perquè s'adhereixin i s'estabilitzin. S'afegeix el sobrenadant filtrat que conté les partícules virals. Les cèl·lules es deixen amb el medi que conté els virus durant 18-20 hores i es canvia el medi amb medi complet. Un cop han transcorregut unes 72 hores la transducció lentiviral és estable i per tant podem dur a terme els anàlisis de proliferació o realitzar tècniques de immunodetecció pertinents.

## 4. ASSAIGS DE PROLIFERACIÓ

### *In vitro*

#### 4.1 Recompte cel·lular mitjançant els sistema 3T3

Pel que fa a les tiroïdes i als fibroblasts dèrmics les cèl·lules es van sotmetre a un sistema 3T3 (3-day transfer, inoculum  $3 \times 10^5$  cells), és a dir, primer es van plantar 300.000 cèl·lules en p60 ( $21\text{cm}^2$ ) i cada tres dies es tripsinitzaven les cèl·lules i es plantaven 300.000 cèl·lules en plaques de p60, cada vegada que es tripsinitzen les cèl·lules es conta un passatge cel·lular.

#### 4.2 Assaig d'incorporació de Bromodeoxyuridina

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

Per fer aquest assaig d'incorporació és necessària la presència de BrdU en el medi de cultiu de les cèl·lules que volem analitzar. Així doncs, afegim la BrdU a una concentració final de  $4 \mu\text{g/ml}$  durant 4 hores tant en el cas dels cultius primaris de tiroide com dels fibroblasts de la dermis. Aquest temps depèn de la taxa de proliferació de cada tipus cel·lular.

Un cop transcorregut el temps necessari perquè tingui lloc la incorporació de la BrdU al DNA de les cèl·lules, les fixem amb una solució de paraformaldehid al 4% (PFA) durant 20 minuts a temperatura ambient. Tot seguit fem tres rentats amb solució salina (PBS) i afegim HCl 2M durant 30 minuts a  $37^\circ\text{C}$ , perquè el DNA de les cèl·lules es desnaturalitzi i l'anticòs primari sigui capaç de reconèixer la BrdU incorporada. Després d'aquests 30 minuts afegim Tetraborat Sòdic 0,1M durant 2 minuts per neutralitzar el HCl. Tot seguit tornem a fer 3 rentats amb PBS i afegim la solució de bloqueig que conté PBS + 5% *Horse Serum* (HS) + 5% *Fetal Bovine Serum* (FBS) + 0.2% glicina + 0.1% Tritó (TX-100), durant 1 hora a temperatura ambient. Després rentem 3 cops amb PBS, i incubem les cèl·lules amb l'anticòs primari durant 18 hores a  $4^\circ\text{C}$ . A continuació, realitzem tres rentats amb PBS i afegim l'anticòs secundari, en el nostre cas és un anticòs conjugant a un fluorocrom Dylight594 (Jackson) juntament amb  $0,5 \mu\text{g/ml}$  de Hoechst 33258 i ho incubem durant 1 hora a temperatura ambient protegit de la llum. Finalment es fan tres rentats amb PBS i es realitza el recompte del nombre de cèl·lules positives per BrdU utilitzant un microscopi òptic de fluorescència.

#### 4.3 Assaig clonogènic. Cristall violeta

Per realitzar els assaigs de colònies, es van plantar 20.000 cèl·lules IMR90 per pou de M6 ( $9,5\text{cm}^2$ ). Al cap de 15 dies en cultiu les cèl·lules es renten dos vegades amb PBS1x i es fixen 15



minuts amb una solució de 4% de PFA a temperatura ambient, seguidament es renta amb PBS1x dos cops i s'incuben les cèl·lules amb una solució de 0.1% de cristall violeta durant 30 minuts. Després es renten amb dos vegades amb aigua Mq per eliminar l'excès de cristall violeta i es deixa assecar.

### ***In vivo***

#### **4.4 Assaig d'incorporació de 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) en embrions**

Les femelles embarassades són injectades intraperitonealment amb 25mg/kg de 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU; Invitrogen). L'EdU s'utilitza com a reemplaçament de la BrdU i mesura directament la síntesi de DNA *de novo* o la fase S del cicle cel·lular utilitzant la química "click". La química "click" és un mètode d'acoblament covalent d'una àzida amb un alcalí.

Una hora després de la injecció amb EdU, es sacrifiquen les femelles per dislocació cervical i es recullen els embrions. Els embrions es fixen amb una solució de paraformaldehid al 2% durant 4 hores i es processen per fer seccions de teixit congelat. Es realitzen seccions seriades (12µm/secció) des de l'extrem caudal al cranial del WD. Les cèl·lules marcades amb Edu es tenyeixen utilitzant el Click-iT EdU Alexa Fluor 488 i 594 Imaging Kit (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant. El número total de cèl·lules (tenyides amb DAPI) i el nombre tota de cèl·lules EdU-positives es compten per cada porció epitelial. El percentatge de proliferació es calcula com la fracció de cèl·lules EdU-positives sobre el número total de nuclis.

#### **4.5 Anàlisi del nombre de mitosis**

Tot i que actualment no hi ha una aproximació estàndard pel que fa al recompte de mitosis en feocromocitoma, basant-nos en la metodologia establerta en altres tumors neuroendocrins, es recomana que el recompte mitòtic es basi en comptar 50 HPF (High Power Fields, objectiu 40x) en l'àrea amb una activitat mitòtica més elevada i que s'expressi com número de mitosis per 10 HFP. Més de 3 mitosis per 10 HPF es considera un índex mitòtic elevat i indicador de malignitat.

## **5. PCR EN TEMPS REAL: RT-PCR**

### **5. 1 Extracció de RNA**

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

En el cas dels cultius cel·lulars, el *buffer* d'extracció de RNA s'aplica directament a les cèl·lules, en canvi en el cas dels teixits primer s'esmicola el teixit amb Nitrogen líquid i la pressió del

teixit en un morteri després s'afegeix el *buffer* de lisi. Es quantifica la concentració de RNA obtinguda amb el NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 i posteriorment els extractes de RNA s'emmagatzemen a -80°C.

## 5.2 Síntesi de cDNA

Per la síntesi de cDNA es retrotranscriu entre 500ng i 1µg de RNA utilitzant el protocol descrit del *kit* Taqman<sup>®</sup> (Applied Biosystems). Les condicions de la reacció de retro-transcripció són: 2min a 90°C (només el RNA), 10min a 25°C, 60min a 42°C i 5min 95°C. Un cop sintetitzat el cDNA es pot utilitzar directament per la tècnica de RT-PCR.

## 5.3 RT-PCR

La tècnica de PCR en temps real utilitza una sonda específica per a cada gen a analitzar. Aquesta sonda està marcada amb un fluorocrom (normalment FAM) que el termociclador *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) llegeix i quantifica. El programa que utilitzem consta de 40 cicles de 15'' a 95°C i 1 minut a 60°C. Les sondes que es detallen a la Taula 5 van ser adquirides a *Applied Biosystems*. El gen de la GAPDH, tant humà com de ratolí, va ser utilitzat com a control d'expressió de les mostres analitzades.

Gen	Espècie	Referència
Sprouty1	ratolí	Mm01285700_m1
IGFBP7	ratolí	Mm03807886_m1
IL-6	ratolí	Mm00446190_m1
GAPDH	ratolí	Mm99999915_g1
Sprouty1	humà	Hs00398096_m1
IL-6	humà	Hs00985639_m1
GAPDH	humà	Hs99999905_m1

**Taula 5. Sondes Taqman utilitzades per realitzar RT-PCR obtingudes de *Applied Biosystems*.**

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

## 6. IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES

### EN LLISATS DE PROTEÏNA

#### 6.1 Western Blot i Immunoprecipitació

##### 6.1.1 Extracció de proteïna

L'extracció de proteïna s'ha de realitzar de forma ràpida i eficient per evitar degradacions, mantenir fosforilacions i perquè l'extracte proteic representi l'estat fisiològic de les proteïnes en la mostra.

Per extreure proteïna de cèl·lules en monocapa aquestes es renten amb tampó fosfat (PBS 1x) fred abans de processar la mostra. En el cas de l'extracció proteica dels diversos òrgans i teixits analitzats, primer s'extreu l'òrgan del ratolí es neteja acuradament i es congela ràpidament en nitrogen líquid, després amb l'ajuda d'un morter es tritura i s'hi aplica el *buffer* d'extracció proteica.

Pel que fa als *buffers* d'extracció o lisi proteica varien en funció de la finalitat i l'aplicació que vulguem atorgar a aquell extracte. Nosaltres bàsicament utilitzem dos *buffers* diferents: un que consisteix en una solució desnaturalitzant i un altre que conté una solució que manté l'estructura de les proteïnes (no desnaturalitzant, NP-40). En el primer cas s'utilitza un tampó d'extracció que conté Tris-HCl 62,5mM (pH 6,8) amb 2% de SDS. En el segon cas s'utilitza un *buffer* que conté 1% d'un detergent no iònic Nonidet P-40, 150mM NaCl, 50mM Tris pH8, 1mM EDTA, 1mM EGTA, complementat amb un còctel d'inhibidors de proteases (Roche), 1mM d'Ortovanadat Sòdic ( $\text{NaVO}_4$ ), 10mM Florur de Sodi (NaF) i 50mM de  $\beta$ -glicerofosfat.

##### 6.1.2 Immunoprecipitació

Pel assaigs d'immunoprecipitació és necessari mantenir l'estructura nativa de les proteïnes, per tant els extractes proteics es realitzaran amb el *buffer* NP-40 (no desnaturalitzant). Normalment s'utilitza entre 300-1000 ng de proteïna que s'incuba amb l'anticòs primari contra la proteïna que volem precipitar, juntament amb boles magnètiques unides a proteïna A i/o G (ThermoFisher) des de 2 hores a 16 hores (ON) a 4°C en rotació. Posteriorment es renten els immunocomplexes formats amb *buffer* NP-40 fresc, després es resuspenen amb *buffer* de Laemmli (LB) i finalment es bullen durant 5 minuts a 95°C pel posterior anàlisi mitjançant Western Blot.

##### 6.1.3 Western Blot

Un cop tenim els extractes de proteïna, aquests es resolen per electroforesi amb gels de poli-acrilamida amb SDS. Aquests gels s'utilitzen per separar extractes proteics complexos segons el seu pes molecular. Es preparen a partir de la solució ACRYL/BIS™, que conté un 39% d'acrilamida amb un 1% de bis-acrilamida. La reacció de polimerització es realitza amb 0,1% de

TEMED (Sigma) com a iniciador de la reacció i amb persulfat d'amoni (Sigma S208) al 0,05% com a catalitzador. Els gels estan formats bàsicament per dos parts; la part superior (o gel apilador) on es carreguen les mostres i s'utilitza un percentatge baix d'acrilamida (3-5%) i la part inferior (o gel separador) on el percentatge d'acrilamida dependrà del pes molecular de les proteïnes que volem separar. Les mostres ja quantificades, mitjançant el *kit* de *Lowry* (Bio-Rad), es preparen afegint tampó de càrrega 5x, compost per 10% SDS, 250 mM Tris pH 6,8, 50% glicerol, 720nM de  $\beta$ -mercaptoetanol i blau de bromofenol. L'electroforesi i la migració de les proteïnes es realitza a voltatge constant (150 V) amb un tampó de migració que conté 25mM Tris, 1,44% glicina i 0,1% SDS.

Un cop les proteïnes estan separades es realitza l'electro-transferència d'aquestes a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore), gràcies a una solució de transferència que conté 25 mM Tris, 192 mM glicina a pH 8,3 i es transfereix a voltatge constant (90-100V) durant 1 hora. Un cop finalitza la transferència, la membrana s'incuba amb solució de bloqueig que conté TBST (20 mM Tris a pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) amb 5% d'albumina de sèrum boví (BSA) durant una hora a temperatura ambient, per minimitzar i reduir les hibridacions inespecífiques.

A continuació s'incuba la membrana amb l'anticòs primari indicat en cada experiment (Taula 5) en una solució de TBST amb 3% de BSA i 0,02% d'Azida sòdica, tota la nit (ON) a 4°C, tot i que en alguns casos també es pot realitzar durant 1 hora a temperatura ambient.

Tot seguit la membrana es renta 3 vegades (3x 10 minuts) amb TBST i s'incuba amb l'anticòs secundari (Taula 6) en una solució de TBST amb 1% de BSA durant 1 hora a temperatura ambient. Finalment la membrana es renta 3 vegades (3x 10 minuts) amb TBST.

Antigen	Dilució	Proveïdor	Referència
<b><i>Anticossos primaris</i></b>			
Spry1 (D9V6P)	1/1000	Cell signaling	#13013S
p-ERK1/2	1/3000	Cell signaling	#9101S
Tubulin	1/10000	Sigma	T5168
p-Tirosina	1/1000	Millipore	4G10
Pten	1/1000	Cell signaling	#9559
IKB $\alpha$	1/1000	Santa Cruz	sc-371 (C-21)
$\beta$ -actina	1/5000	Santa Cruz	sc-1616 (I-19)
IKK $\alpha$	1/1000	Calbiochem	14A231
IKK $\beta$	1/1000	Calbiochem	OP134
HA	1/1000	Roche	11867423001(3F10)
Flag	1/1000	Sigma	F1804
Spry1 Homemade	1/100	Spry1KO mice	Anerillas C

**Anticossos secundaris**

Rabbit IgG-HRP	1/10000	Jackson	111-035-003
Mouse IgG-HRP	1/10000	Jackson	115-035-003
Goat IgG-HRP	1/10000	Jackson	705-035-147

**Taula 6. Anticossos primaris i secundaris utilitzats als assajos de Western Blot.**

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

**EN CÈL·LULES EN MONOCAPA I SECCIONS DE TEIXITS****6.2 Histologia i tècniques d'immunodetecció****6.2.1 Tècniques d'histologia bàsica**

Els òrgans dels ratolins s'extreuen de l'animal i immediatament es fixen amb paraformaldehid al 4% en PBS (pH 7.4) durant 2 hores a temperatura ambient. Posteriorment, en funció de la tècnica histològica que volem dur a terme, es poden seguir dos protocols diferents. Per protocols d'immunohistoquímica, els teixits s'inclouen en parafina i posteriorment es fan seccions de 5µm amb un micròtom per tal de fer tincions d'Hematoxilina-Eosina (H-E) a fi d'estudiar la histologia de cada teixit o tincions contra antígens específics per l'anàlisi de marcadors proteics. En canvi per realitzar protocols d'immunofluorescència, els teixits fixats es submergeixen en una solució de PBS amb 20% de sucrosa tota la nit a 4°C, per tal de crioprotegir el teixit. Posteriorment s'inclou el teixit en OCT per congelar el material a -80°C i poder fer seccions de 10µm amb un criostat.

**6.2.2 Immunohistoquímica**

Abans de començar el procés, els talls de 5µm de parafina s'assequen en una estufa a 65°C durant 1h, després es realitza un pretractament de desparafinació i rehidratació del teixit. Posteriorment es submergeixen els portaobjectes en un *buffer* que conté 50x Tris/EDTA a pH 9 a 95°C durant 20minuts, utilitzant un aparell de pre-tractament PTLINK (DAKO), per tal de recuperar els antígens emmascarats durant la preparació dels teixits per a la tinció (*epitope retrieval*). Abans de la tinció, els talls de parafina s'incuben amb 0.3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per bloquejar la peroxidasa endògena i reduir el fons quan utilitzem el cromogen. Després es fan tres rentats amb PBS i ja podem aplicar l'anticòs primari (Taula 6) durant 20-30 minuts a temperatura ambient. Seguidament es fan tres rentats amb PBS i s'aplica l'anticòs secundari. Si s'utilitza

directament l'anticòs secundari unit a la peroxidasa (HRP) s'incuba durant 30 minuts, en canvi si s'utilitza un sistema d'amplificació de la senyal, s'incuba primer l'anticòs unit a biotina durant 30 minuts, després es fan tres rentats amb PBS i s'incuba el teixit amb Streptavidina unida a peroxidasa (HRP) durant 15 minuts, tot a temperatura ambient. Finalment per tal de visualitzar la reacció s'aplica el cromogen de diaminobenzidina (DAB) i es contra-tenyeix amb Hematoxilina per marcar els nuclis de les cèl·lules del teixit analitzat.

Antigen	Dilució	Proveïdor	Nº Catàleg
<b><i>Anticossos primaris</i></b>			
$\beta$ -catenin	1/100	Dako	M3539
Ki67	1/250	Dako	M7249
Pten	1/100	Dako	M3627
Cyclin D1	1/25	Dako	M3642
TH	1/100	Millipore	Ab1542
Sinaptofisin			
<b><i>Anticossos secundaris</i></b>			
Sheep IgG-HRP	1/200	Sigma	A3415
Rabbit anti-biotin	1/200	Jackson	111-065-144
Rat anti-biotin	1/200	Jackson	712-065-150
Streptavidin-HRP	1/400	Jackson	016-030-084

**Taula 7. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en assaigs d'Immunohistoquímica.**

### 6.2.3 Immunofluorescència

La tècnica d'immunofluorescència l'hem realitzat tant en cèl·lules en cultiu fixades com amb talls congelats de criostat. En primer lloc es fan tres rentats amb PBS i en el cas de la detecció de p65 i Ki67 s'incuba amb metanol 100% fred durant 10 minuts, per tal de millorar la detecció nuclear.

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

L'anticòs primari (Taula 7) s'incuba tota la nit a 4°C. Després de tres rentats amb PBS s'incuba amb l'anticòs secundari unit al fluorocrom (Taula 8) i també s'afegeix el Hoeschst 33258 durant 2 hores a temperatura ambient. En acabar es fan tres rentats de 10 minuts amb PBS i ja es

poden observar i analitzar les mostres al microscopi òptic invertit d'epifluorescència Olympus 1X70 o bé al microscopi Confocal Olympus FV-1000.

Antigen	Dilució	Proveïdor	Nº Catàleg
<b><i>Anticossos primaris</i></b>			
BrdU	1/100	Dako	M0744
p65	1/200	Santa Cruz	sc372 (C-20)
Ki67	1/100	Dako	M7249
E-cadherin	1/250	Santa Cruz	sc7870 (H-108)
Cleaved Caspase-3	1/250	Cell signaling	#9661
HA	1/1000	Roche	11867423001(3F10)
<b><i>Anticossos secundaris</i></b>			
Mouse IgG Dylight488	1/500	Jackson	715-485-150
Rabbit IgG Dylight488	1/500	Jackson	711-485-152
Mouse IgG Dylight594	1/500	Jackson	715-515-150
Rabbit IgG Dylight594	1/500	Jackson	711-515-152
Rat IgG Dylight594	1/500	Jackson	712-515-150

**Taula 8. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en assaigs d'immunofluorescència.**

## 7. ELISA I ARRAY D'ANTICOSSOS

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) és una tècnica de laboratori que s'utilitza per quantificar la concentració d'antígens específics en llisats cel·lulars, sèrum o medis de cultiu entre altres. En el nostre treball hem mesurat la concentració d'IL-6, KC i IL-1 $\alpha$ . En el cas de la IL-6 hem utilitzat el Mouse IL-6 ELISA kit de RayBiotech (Norcross, GA, USA) seguint les instruccions del fabricant. Mentre que pel KC hem determinat la seva concentració a través del Murine KC Mini ELISA Development Kit de Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA).

Per la determinació de les múltiples citocines dels sobrenedadnts cel·lulars hem utilitzat el RayBio Mouse Cytokine Antibody Array G-Series 3 (no. AAM-CYT-G3-4) seguint les instruccions indicades pel fabricant. Les laminetes es van escanejar utilitzant el GenePix 4000A laser scanner (Axon, Sunnyvale, CA, USA).

## 8. ASSAIG LUCIFERASA

L'assaig luciferasa es realitza 24 hores després de la transfecció de 100.000 cèl·lules 293T per pouet de m24 amb 1µg de DNA total (0.5µg NFκB-Luc plàsmid + 0.5µg plàsmid X). Abans de lliar les cèl·lules es pot realitzar un estímul durant 3 hores amb 50ng/ml de TNFα com control positiu de l'activació de la via NFκB. Es clava en gel la placa i es renten dues vegades les cèl·lules amb PBS fred. Després s'afegeixen 80µl de buffer de lisi de l'assaig luciferasa i es deixa agitant 20 minuts en gel. A continuació, es recullen els llisats en tubs prèviament refredats i es centrifuguen durant 10 minuts a 15.000 rpm a 4°C. Amb el sobrenedant resultant es duu a terme l'assaig en una placa de 96 pouets opaca on després s'afegeix el buffer que conté el substrat de la luciferasa, anomenat luciferina. El buffer conté 4mM ATP, 200nM Acetil CoA, 200nM Luciferina i 30 mM Potassium Phosphate. S'afegeixen 25µl de buffer a 25µl de cada mostra, quedant al final diluïdes aquestes concentracions a la meitat.

## 9. ACTIVITAT β-GALACTOSIDASA

### 9.1 Activitat β-galactosidasa associada a la senescència (SA-β-gal)

Per analitzar l'activitat β-galactosidasa associada a la senescència cel·lular vam utilitzar tant cèl·lules en cultiu com seccions de tiroide congelades fixades amb un *buffer* de PBS amb 0.5% de glutaraldehyd o PFA al 4%, respectivament. En primer lloc, tant en el cas de les cèl·lules en cultiu com en les seccions de teixit es dur a terme una incubació de 10 minuts amb un *buffer* que conté PBS amb 2mM de MgCl<sub>2</sub> i seguidament s'incuben a 37°C amb la solució de tinció, composta per 1mg/ml X-Gal (Sigma), 5mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> i 2mM MgCl<sub>2</sub> en un *buffer* de PBS a pH 6. El temps d'incubació varia en funció del tipus cel·lular analitzat, per aquest motiu els temps poden oscil·lar entre les 2 i les 16 hores. El pH de la reacció és molt crític ja que l'activitat β-galactosidasa dels lisosomes només és activa a pH àcid. Per tal de poder comparar les mostres analitzades, l'assaig es va dur a terme amb totes les mostres simultàniament.

### 9.2 Tinció X-gal

L'enzim bacterià β-galactosidasa que és codificat pel gen LacZ és utilitzat com a reporter ja que es pot localitzar fàcilment incubant les cèl·lules amb el seu substrat artificial X-gal que es torna blau quan és processat per la β-galactosidasa. Els tractes reproductius inferiors es fixen durant 30 minuts a temperatura ambient amb un *buffer* que conté 4% de paraformaldehyd, 0.5% de glutaraldehyd i 0.1% de NP-40 en PBS. Després de rentar les mostres dos vegades amb PBS s'incuben tota la nit (≈16h) en el *buffer* X-gal (4mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>3</sub>, 4mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub> i 1mg/ml de X-gal en PBS pH 7.4 a 37°C en moviment. Finalment les mostres es post-fixen amb PFA al 4% durant 1 hora. Aquest protocol s'utilitza tant per fer tincions en *whole mount* com en seccions de teixit congelades.





***Resultats***





## **CAPÍTOL I**

### **PAPER DE SPROUTY1 COM A SUPRESSOR TUMORAL EN NEOPLÀSIES ENDOCRINES**

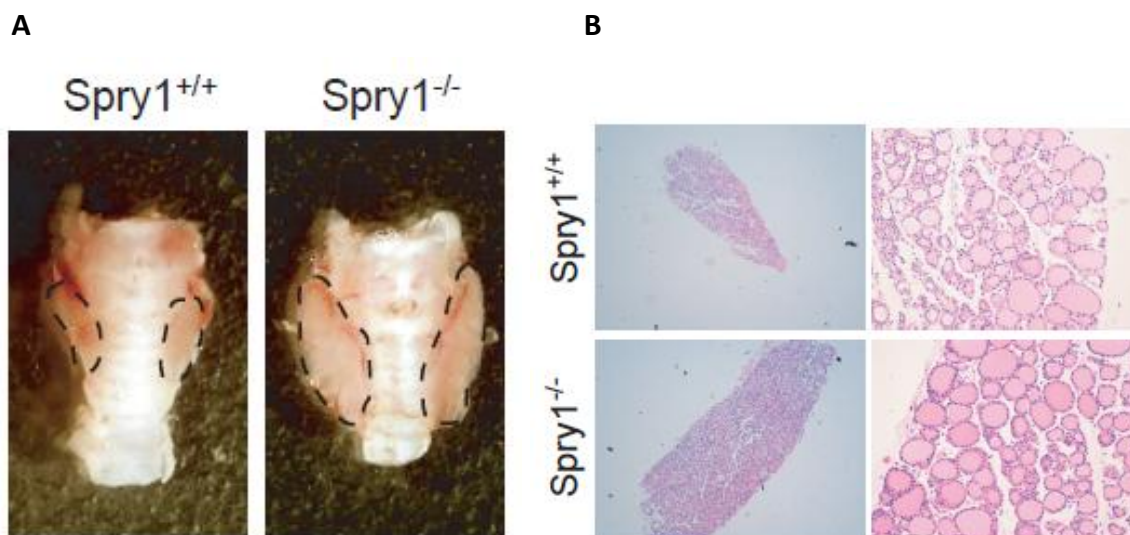
En aquest primer capítol ens hem centrat en l'estudi i l'anàlisi de la funció de Spry1 en el desenvolupament de tumors en diversos òrgans endocrins, concretament, en la glàndula tiroide i en la glàndula adrenal.

Com ja hem descrit a la introducció la tiroide està formada bàsicament per dos tipus de cèl·lules: les cèl·lules fol·liculars i les cèl·lules C o parafol·liculars. Els càncers que es produeixen en la glàndula tiroide es poden classificar en funció de les cèl·lules en les quals s'origina, així distingim entre els carcinomes fol·liculars quan són les cèl·lules fol·liculars les que l'originen i els carcinomes medul·lars que tenen un origen parafol·licular. En relació amb aquests últims tumors el nostre grup ha descrit anteriorment la relació entre la manca de Spry1 i el desenvolupament d'una lesió pre-maligna al desenvolupament del carcinoma medul·lar de tiroide (Macià *et al.*, 2012). Així doncs, hem continuat analitzant el paper de Spry1 en l'altre tipus cel·lular de la tiroide per determinar si Spry1 també és important en el desenvolupament del carcinoma fol·licular.

## 1. PAPER DE SPRY1 EN EL DESENVOLUPAMENT DEL CARCINOMA FOL·LICULAR DE TIROIDE

### 1.1 Els ratolins *knockout* per *Spry1* presenten un augment en la mida de la glàndula tiroide

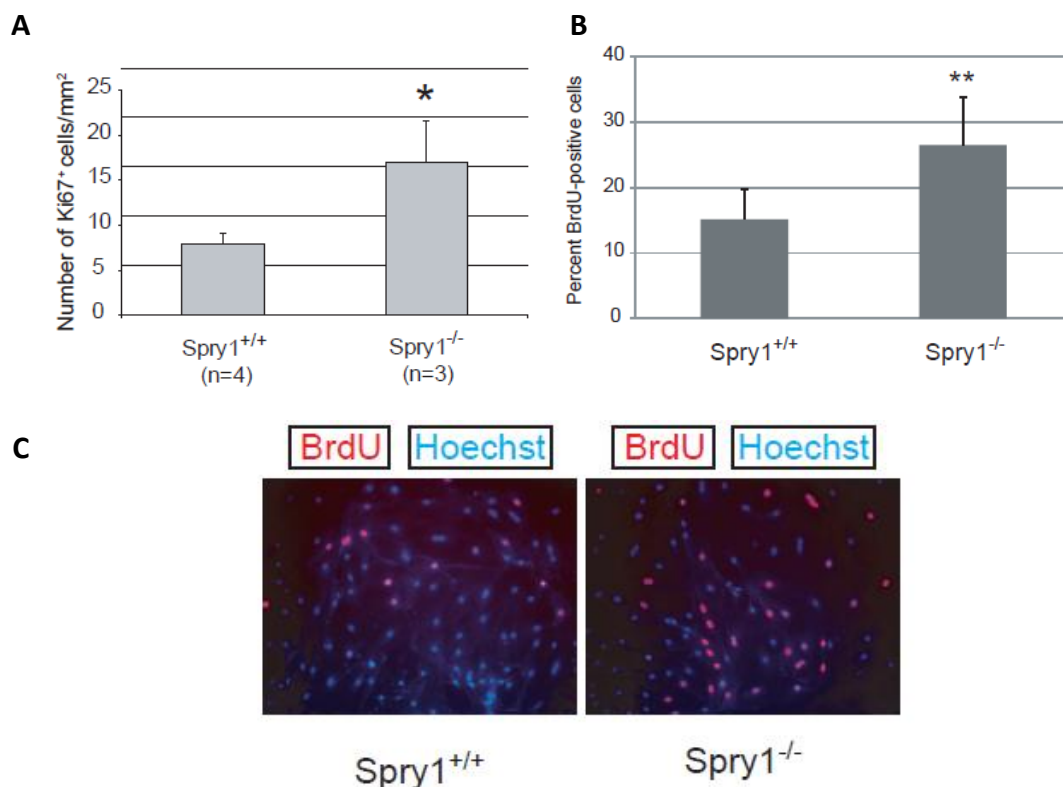
En treballs anteriors del nostre grup hem demostrat que la manca de *Spry1* provoca una hiperplàsia de les cèl·lules C de la tiroide (Macià *et al.*, 2012). Mentre estàvem examinant el número de cèl·lules C vam adonar-nos que les tiroides dels ratolins *Spry1 knockout* de tres mesos d'edat eren més grans que les dels ratolins *wild-type* tal i com es pot observar en la Figura 20A. És important assenyalar que a aquesta edat no hi havia diferències en el pes dels ratolins, indicant així que l'increment de tamany de la tiroide que estàvem observant era específic. A més a més, tot i que les glàndules tiroides dels ratolins *knockout* per *Spry1* eren més grans, aquestes mostraven una forma normal sense signes de malignitat. Per confirmar l'absència de transformació neoplàsica vam analitzar histològicament les tiroides d'ambdós genotips i tal i com es pot observar en la Figura 20B les tiroides procedents dels ratolins *knockout* per *Spry1* eren indistingibles de les *wild-type* i no mostraven cap zona sospitosa de malignitat. En conclusió, la pèrdua d'*Spry1* provoca un creixement anormal de la glàndula tiroide sense que aquesta presenti signes morfològics de transformació cel·lular.



**Figura 20.** La tiroide dels ratolins *knockout* per *Spry1* presenta un increment en la seva mida. (A) Imatges representatives de les glàndules tiroides dels genotips indicats. (B) Seccions de parafina tenyides amb hematoxilina-eosina de la glàndula tiroide de ratolins *wild-type* i *Spry1 knockout*.

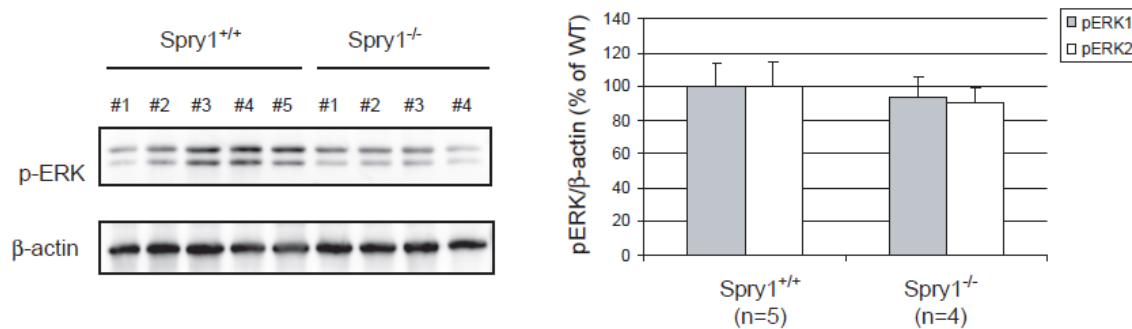
## 1.2 La pèrdua de *Spry1* resulta en un increment de la proliferació de les cèl·lules fol·liculars de la tiroide sense afectar la fosforilació de les ERK

Per avaluar si els efectes observats en la mida de la tiroide es devien a un increment de la proliferació de les cèl·lules fol·liculars vam analitzar la ràtio de proliferació d'aquestes cèl·lules tant *in vivo* com *in vitro*. Així doncs, vam realitzar una immunohistoquímica contra el marcador de proliferació Ki67 comparant seccions de tiroides de ratolins *knockout* per *Spry1* amb seccions *wild-type*. El resultat d'aquesta tècnica tal i com es pot veure en la Figura 21A mostrava com les tiroides que no expressaven *Spry1* presentaven un augment en el número de cèl·lules positives per Ki67, indicant així que la proliferació dels tiròcits era almenys en part responsable del fenotip observat. Aquestes dades, juntament amb els alts nivells d'expressió de *Spry1* en la tiroide de ratolí en comparació amb altres òrgans (Macià et al., 2012), suggereixen que *Spry1* influeix directament en la proliferació de les cèl·lules fol·liculars de forma autònoma. Per confirmar aquesta idea vam aïllar fol·licles de ratolins de tres mesos d'edat d'ambdós genotips i en vam analitzar la seva proliferació *in vitro* mitjançant un assaig d'incorporació de 5'-bromo-desoxiuridina (BrdU). Tal i com es pot observar en la Figura 21B i 21C les cèl·lules *knockout* per *Spry1* proliferaven més ràpid ja que presenten un increment en el percentatge de cèl·lules positives per BrdU.



**Figura 21.** Les cèl·lules fol·liculars de la tiroide dels ratolins *Spry1 knockout* mostren un augment en la seva ratio proliferativa. (A) Nombre de cèl·lules positives per Ki-67 en seccions de parafina de tiroides. (B,C) Assaig d'incorporació de BrdU que mostra com les cèl·lules fol·liculars del ratolí *knockout* per *Spry1* proliferen més ràpid *in vitro*. \* $p < 0.05$  i \*\* $p < 0.01$ , mitjançant t-test amb dues cues.

Com s'ha comentat en la introducció, les proteïnes de la família de Sprouty es consideren inhibidores de la via ERK MAP cinasa. Per tant, una hipòtesi temptadora per explicar les nostres observacions podia consistir en que els tiròcits *knockout* per *Spry1* fossin més responsius a mitògens degut a una hiperactivació de la via ERK. Així doncs, vam analitzar l'estat de la via ERK en les cèl·lules fol·liculars *in vivo* (Figura 22, panell esquerre) i curiosament no vam trobar evidències d'un increment en la fosforilació de les ERK en les cèl·lules deficientes en *Spry1*. La quantificació dels nivells de pERK mitjançant densitometria no va revelar diferències significatives entre les condicions *wild-type* i *knockout*, en tot cas, observàvem una tendència d'hipofosforilació en les tiroïdes dels ratolins *knockout* per *Spry1* (Figura 22, panell dret). En conclusió, aquest conjunt de dades ens suggereix que el sobrecreixement de les glàndules tiroïdes dels ratolins *knockout* per *Spry1* no es deu a una hiperactivació de la via de les ERK.



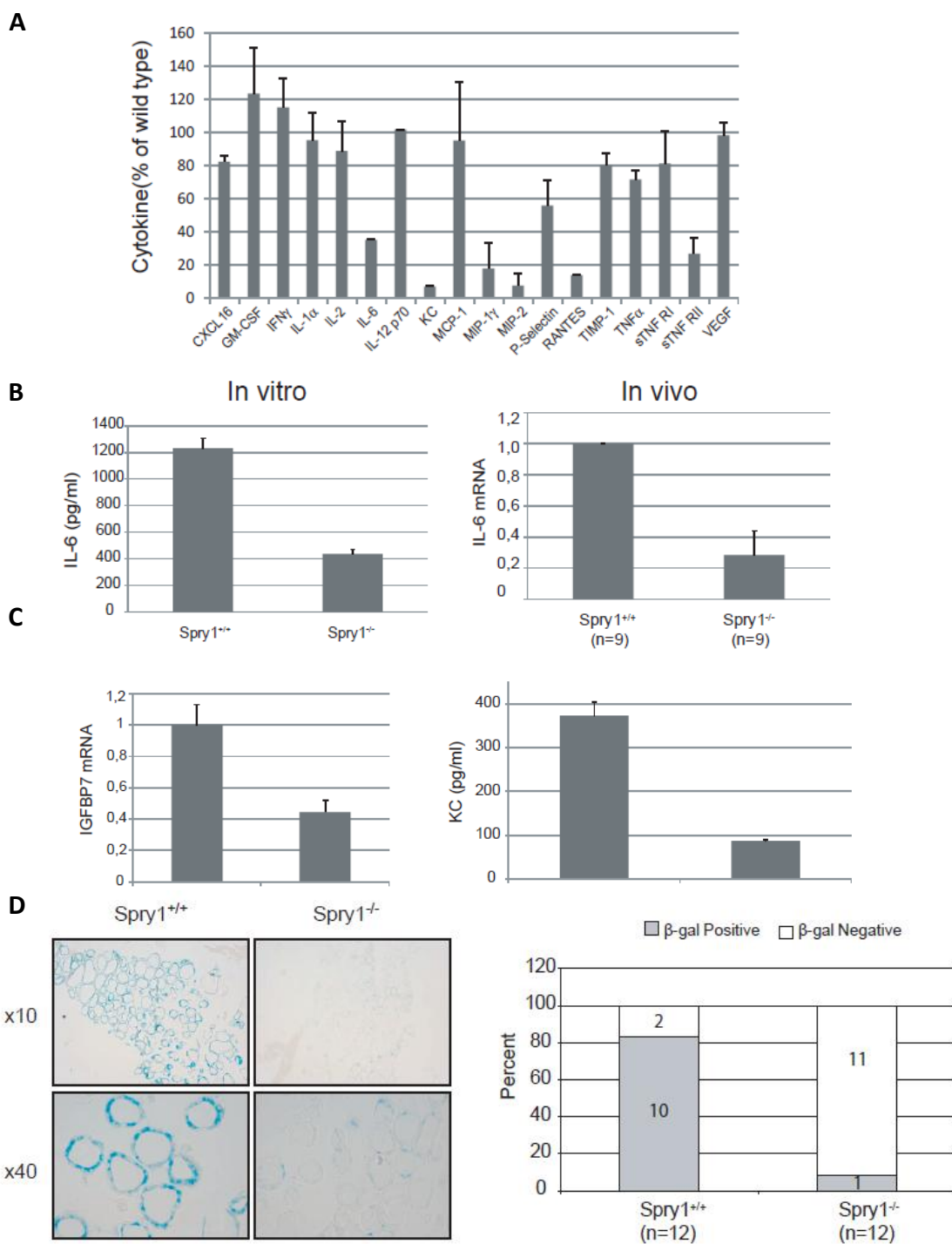
**Figura 22. La pèrdua de *Spry1* en la glàndula tiroide no indueix una hiperactivació de la via ERK.** Western blot i quantificació per densitometria on es mostren els nivells de la fosforilació *in vivo* de ERK1/2 en les glàndules tiroïdes d'ambdós genotips.

### 1.3 Les cèl·lules fol·liculars de la tiroide dels ratolins *knockout* per *Spry1* mostren una disminució dels marcadors de senescència cel·lular

La senescència cel·lular és un estat d'aturada proliferativa que tal i com hem comentat en la introducció pot ser desencadenada per l'escurçament dels telòmers, per un insult oncogènic (senescència induïda per oncogen, OIS) o per altres tipus d'estrès. Una característica distintiva de les cèl·lules senescentes és la secreció d'un conjunt de citocines i quimiocines que es coneixen com a Fenotip Secretor Associat a la Senescència (SASP) o Secretoma de Missatgeria-Senescent (SMS). La IL-6 i IL-8 són considerades dos de les principals citocines secretades per les cèl·lules senescentes, que també secreten IGFBP7, IL-1 $\alpha$  o CXCL1, entre altres. D'altra banda, resultats previs del nostre grup demostren com la sobreexpressió de *Spry1* en una línia cel·lular de carcinoma medul·lar de tiroide induïx senescència cel·lular (Macià *et al.*, 2012). Per explorar la possibilitat que *Spry1* pugui estar induint senescència cel·lular en les cèl·lules fol·liculars a través de la inducció del SASP, vam recollir sobrenedants de fol·licles aïllats de

tiroides *wild-type* i *knockout* per *Spry1* i vam mesurar 62 citocines i quimiocines diferents utilitzant una selecció d'anticossos (Figura 23A). Els nivells de diversos factors SASP es trobaven disminuïts en els sobrenedants de les cèl·lules deficientes en *Spry1*. Entre aquests factors SASP trobem la IL-6, KC (CXCL1), MIPs, RANTES o sTNFRII, mentre que els nivells IL-1 $\alpha$  no estaven afectats. La disminució dels nivells d'IL-6 es va confirmar mesurant els nivells de mRNA d'aquesta citocina en glàndules tiroides tant de ratolins *wild-type* com *knockout* per *Spry1* i també vam observar una dramàtica disminució dels nivells d'IL-6 en les glàndules dels ratolins *knockout* per *Spry1* (Figura 23B, panell dret). A més, vam aïllar fol·licles dels dos genotips i vam avaluar la seva capacitat de secretar IL-6 al medi de cultiu mitjançant ELISA. Tal i com es mostra en el panell esquerre de la Figura 23B les cèl·lules fol·liculars de la tiroide de ratolins *wild-type* secretaven quantitats notables d'IL-6, mentre que aquests nivells es trobaven dràsticament reduïts en el cas de les cèl·lules *knockout* per *Spry1*. Altres proteïnes involucrades en el SASP i que estaven presents en la selecció d'anticossos que vam utilitzar no es van detectar en les nostres mostres (per veure la llista completa de citocines analitzades vegeu la Taula 1 de l'apèndix). D'altra banda, els nivells de mRNA d'IGBP7 també es trobaven reduïts en les cèl·lules mutants (Figura 23C, panell esquerre). El gen KC, també conegut com CXCL1 o GRO- $\alpha$  en humans, es pensa que és un dels homòlegs funcionals del gen humà de la IL-8, el qual es troba deletat en ratolí. Ja que tant la IL-8 com el KC senyalitzen a través del receptor CXCR2 i que aquesta senyalització és crítica per la inducció de senescència, vam confirmar la reducció en la secreció de KC mitjançant ELISA (Figura 23C, panell dret). A més a més, vam dur a terme un assaig de  $\beta$ -galactosidasa associada a la senescència (SA- $\beta$ -Gal) en seccions de tiroides congelades de ratolins *wild-type* i *knockout* per *Spry1* de tres mesos d'edat. Aquest assaig i per tant la presència d'aquest enzim és el marcador de senescència cel·lular més àmpliament utilitzat. Tal i com es mostra en la Figura 23D, pràcticament totes les cèl·lules fol·liculars de les tiroides *wild-type* eren intensament positives per l'activitat SA- $\beta$ -Gal mentre que només una petita part de les cèl·lules de les tiroides dels ratolins *knockout* eren positives per aquesta tinció. Aquestes observacions, juntament amb l'increment de cèl·lules positives per Ki67 en les tiroides *knockout* per *Spry1* i l'augment de la proliferació d'aquestes cèl·lules fol·liculars *in vitro*, suggereixen que la manca d'expressió de *Spry1* promou l'escapament del programa de senescència cel·lular en el que està involucrada la glàndula tiroide normal.

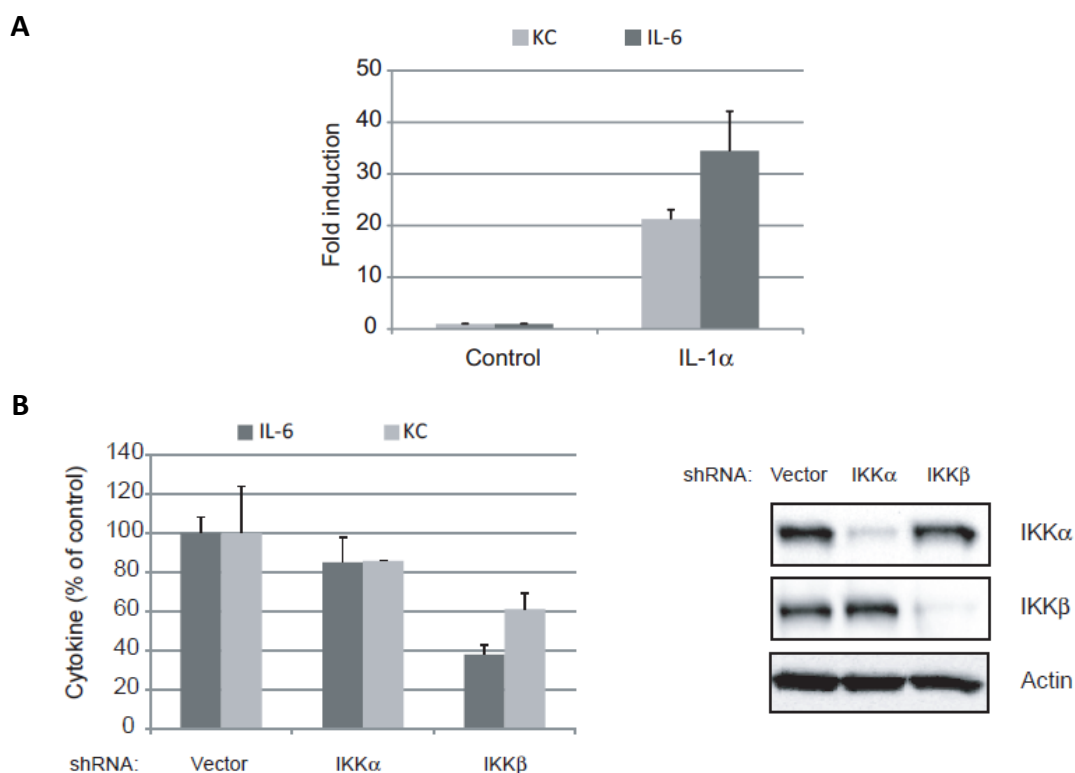




**Figura 23.** Les glàndules tiroides dels ratolins *knockout* per *Spry1* exhibeixen una reducció dels marcadors de senescència cel·lular. (A) Perfil de secreció de citoquines de fol·licles aïllats de tiroides de ratolins *Spry1*<sup>-/-</sup> (el 100% es refereix a la secreció dels fol·licles wild-type). (B) Panell esquerre, ELISA dels nivells secretats de IL-6 per fol·licles aïllats dels genotips indicats. Panell dret, nivells de mRNA de IL-6 de mostres de tiroides agrupades dels genotips indicats. (C) Panell esquerre, nivells de mRNA de IGFBP7 de mostres agrupades del número de glàndules tiroides indicades, i al panell dret, nivells secretats de KC per fol·licles aïllats dels genotips indicats. (D) Activitat  $\beta$ -galactosidasa associada a la senescència de seccions de tiroides de ratolins wild-type versus *Spry1* knockout.

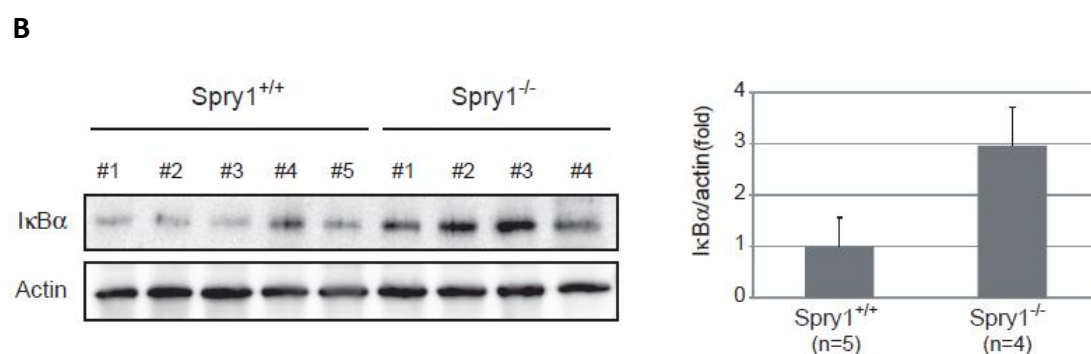
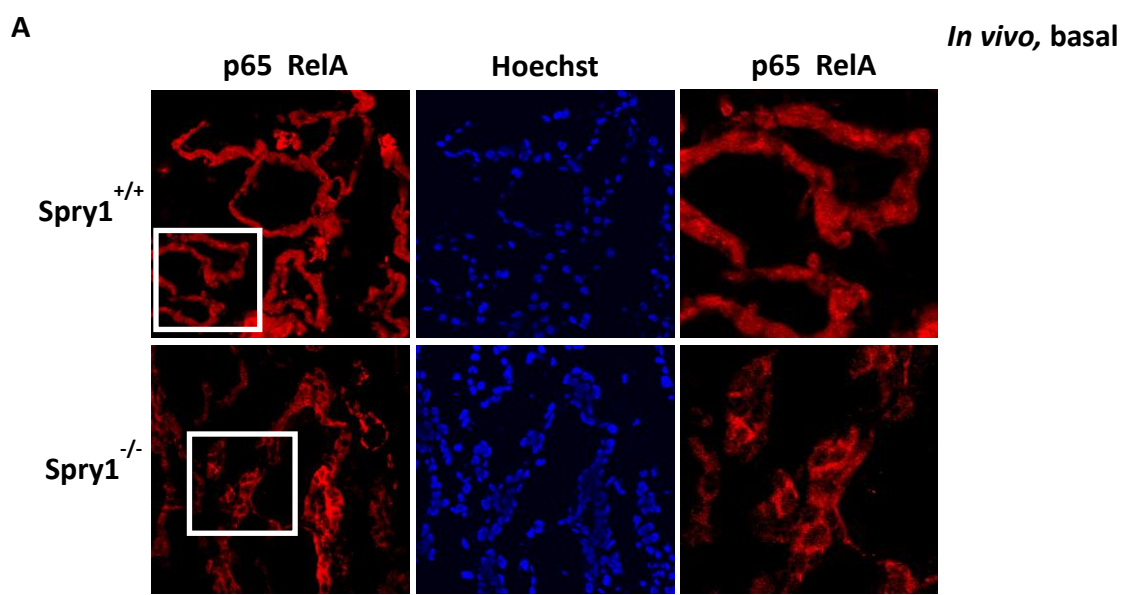
#### 1.4 L'activació de la via NFκB es troba afectada en les cèl·lules fol·liculars *Spry1 knockout*

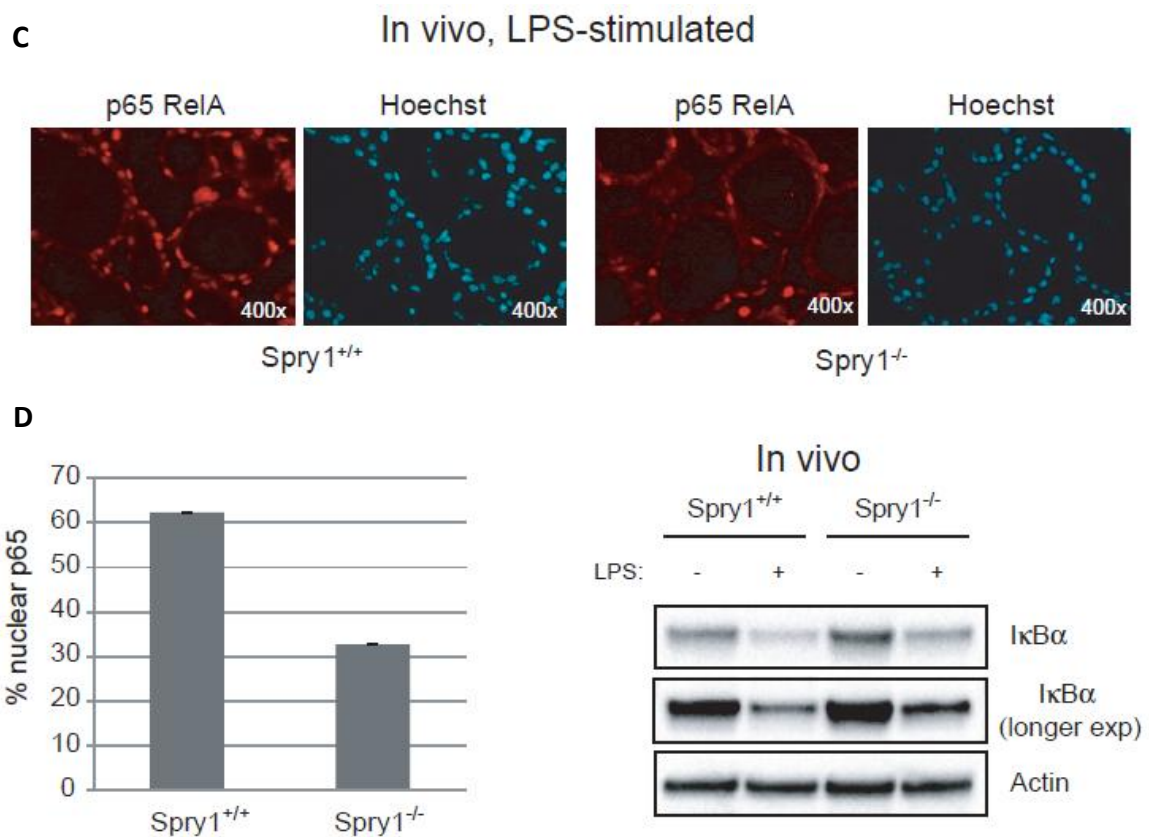
S'ha demostrat que la IL-1α regula la secreció de la IL-6 i IL-8 en cèl·lules humanes senescentes. El fet que els nivells d'IL-1α fossin similars en els sobredants de les cèl·lules *wild-type* i *knockout* va fer que ens plantejàssim la possibilitat que *Spry1* regulés la generació del SASP per sota de la IL-1α. Per comprovar aquesta hipòtesi vam aïllar fol·licles de tiroïdes *wild-type* i els vam incubar amb IL-1α per confirmar que tal i com s'aprecia a la Figura 24A aquesta citocina induïx una robusta secreció tant d'IL-6 com de KC. Està àmpliament acceptat que la IL-1α és una potent inductora de la via NFκB, aquesta citocina juntament amb el factor de transcripció C/EBPβ són elements crítics en la secreció de factors SASP. Seguidament el que vam fer va ser confirmar el paper de la via NFκB en el nostre sistema mitjançant el silenciament gènic d'IKKα o IKKβ en cultius primaris de cèl·lules fol·liculars i mesurant els nivells d'IL-6 i KC (Figura 24B). Mentre que el silenciament d'IKKα només tenia una discreta influència en la secreció de citocines, l'efecte de reprimir l'expressió d'IKKβ era més sever, tal i com s'esperava que la via canònica de NFκB afectés a la síntesi d'aquestes citocines.



**Figura 24.** La via NFκB està implicada en l'activació del SASP en les cèl·lules fol·liculars de la tiroïde. (A) ELISA dels nivells secretats de IL-6 i KC per fol·licles aïllats de tiroïdes *wild-type* després de ser estimulats amb IL-1α. (B) Panell dret, ELISA on es mostra com el silenciament de IKKβ redueix la secreció tant de IL-6 com de KC en fol·licles aïllats *wild-type*. Panell esquerre, Western Blot dels nivells d'IKKα i IKKβ dels fol·licles després de la infecció amb els shRNA corresponents.

Per testar directament si l'activació de la via NF $\kappa$ B es trobava compromesa en les tiroïdes dels ratolins *knockout* per *Spry1*, el primer que vam comprovar va ser la localització subcel·lular de p65, la principal subunitat de NF $\kappa$ B que s'acumula en la cromatina de les cèl·lules senescent. Tal i com s'observa en la Figura 25A p65 es trobava majoritàriament exclòs del nucli en les cèl·lules fol·liculars dels ratolins *knockout* per *Spry1* però no en els *wild-type*. Conseqüentment, els nivells d' I $\kappa$ B $\alpha$ , proteïna responsable de la retenció dels dímers de NF $\kappa$ B al citoplasma, estaven augmentats en la tiroide *knockout* per *Spry1* (Figura 25B). A més a més, després d'injectar LPS a ratolins *wild-type* i *knockout* per *Spry1* i analitzar la translocació nuclear de p65 en les cèl·lules fol·liculars de la tiroide, vam observar com aquesta translocació es trobava disminuïda en les tiroïdes dels ratolins mutants (Figures 25C i 25D). Malgrat que la degradació d' I $\kappa$ B $\alpha$  no estava afectada, els nivells d' I $\kappa$ B $\alpha$  romanien més alts en les tiroïdes *knockout* per *Spry1* després de l'estímul amb LPS quan les comparàvem amb les tiroïdes *wild-type* (Figura 25D). En conjunt aquestes dades ens suggereixen que les cèl·lules fol·liculars dels ratolins *knockout* per *Spry1* presenten un dèficit en l'activació de la via NF $\kappa$ B i conseqüentment fracassen a l'hora de sintetitzar les quantitats apropiades de factors SASP.

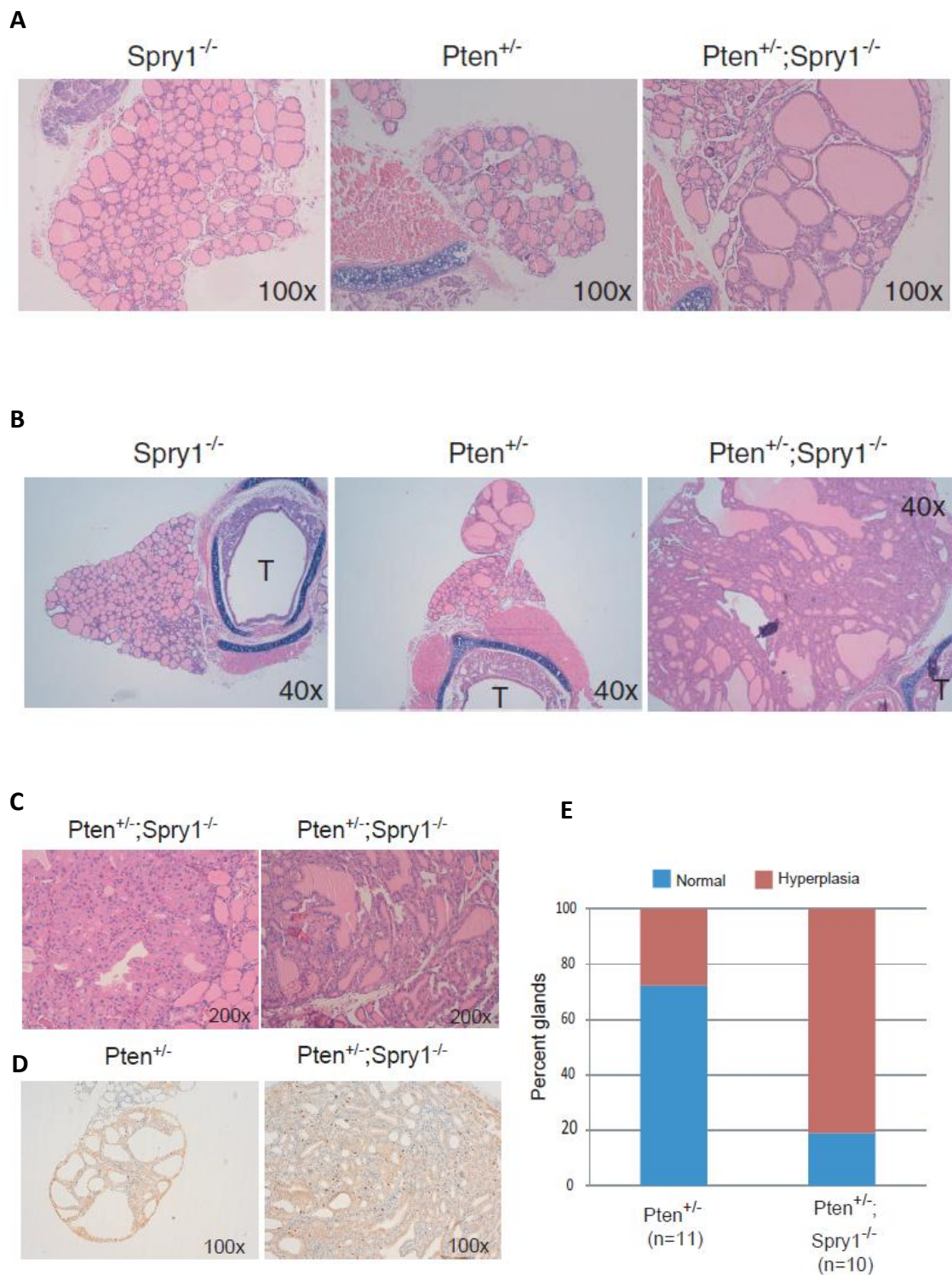




**Figura 25.** L'activació de la via NFκB es troba compromesa en les tiroïdes dels ratolins knockout per **Spry1**. (A) Immunofluorescència contra p65 en seccions congelades de tiroïdes dels genotips indicats. (B) Estat basal dels nivells de IκBα de tiroïdes de ratolins de tres mesos d'edat dels genotips indicats. (C) Immunofluorescència contra p65 de seccions congelades de tiroïdes dels ratolins dels genotips indicats estimulats amb LPS. (D) Panell esquerre, translocació nuclear de p65 a la tiroïde després de la estimulació amb LPS. Panell dret, nivells de IκBα de tiroïdes dels ratolins dels genotips indicats tractats amb PBS o LPS.

### 1.5 La deleció genètica de *Spry1* accelera la tumorigènesi de la tiroide induïda per *Pten*

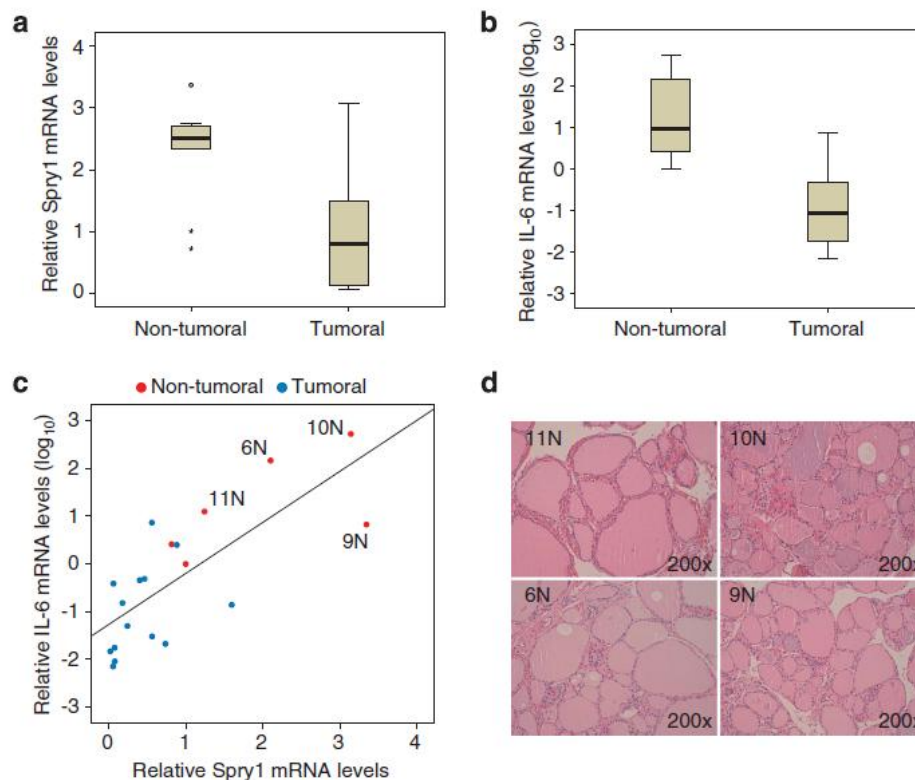
La senescència induïda per oncògens (OIS) és considerada un mecanisme de defensa contra la transformació tumoral provocada per un insult oncogènic. Per tant, les cèl·lules a les quals manca algun dels components essencials de la maquinària de la senescència cel·lular són més susceptibles a la transformació tumoral. L'anàlisi de les tiroïdes dels ratolins *knockout* per *Spry1* fins als cinc mesos (edat màxima de supervivència) no va revelar cap signe de malignitat. Com no era possible analitzar els fenotip de la tiroide d'aquests ratolins en edats més avançades, el que vam fer per analitzar si les cèl·lules de la tiroide dels ratolins *knockout* per *Spry1* eren més susceptibles a la transformació després d'un estímul oncogènic, va ser crear ratolins mutants de *Spry1* amb ratolins heterozigots per *Pten*. Vam escollir com a model el ratolí deficient en *Pten* per dos motius principals: primerament, aquests ratolins desenvolupen un ampli rang de tumors incloent carcinoma de tiroide (Di Cristofano *et al.*, 1998; Podsypanina *et al.*, 1999; Bayascas *et al.*, 2005); en segon lloc, la pèrdua de *Pten* s'ha descrit com un potent inductor de la senescència cel·lular (Chen *et al.*, 2005; Alimonti *et al.*, 2010). Així doncs, l'ablació genètica de *Spry1* en un context d'haploinsuficiència de *Pten* resultava en el desenvolupament de lesions fol·liculars hiperplàsiques als tres mesos de vida, edat en que les glàndules tiroïdes dels ratolins heterozigots per *Pten* eren completament normals (Figura 26A). Als cinc mesos d'edat, tot i que un percentatge important dels ratolins *Pten*<sup>+/-</sup> presentaven hiperplàsia nodular de les cèl·lules fol·liculars, les lesions observades en els ratolins doble mutants eren molt més extenses (Figura 26B), i ocasionalment presentaven àrees on els fol·licles normals havien set substituïts per lesions sòlides formades per cèl·lules grans eosinofíliques (Figura 26C). En les regions en les quals l'arquitectura fol·licular estava conservada, alguns fol·licles presentaven estructures similars a petites papil·les, mentre que altres estaven formats per cèl·lules elongades (Figura 26C). Finalment, tal i com es pot observar en la Figura 26D les tiroïdes dels dobles mutants mostraven una forta tinció pel marcador de proliferació Ki67. En conclusió, tot i que la pèrdua de *Spry1* per sí mateixa no és suficient per promoure la transformació tumoral del teixit de la tiroide, quan aquesta deleció es combina amb l'haploinsuficiència de *Pten* s'accelera l'aparició de neoplàsies a la glàndula tiroide (Figura 26E).



**Figura 26.** La pèrdua de Spry1 accelera la tumorigènesi de la glàndula tiroide en un context d'haploinsuficiència per Pten. (A) Tincions d'hematoxilina-eosina de glàndules tiroides d'animals de tres mesos d'edat dels genotips indicats. (B) Tincions d'hematoxilina-eosina de glàndules tiroides d'animals de cinc mesos d'edat dels genotips indicats. (C) Imatge a major augment de la tiroide d'un ratolí doble heterozigot. (D) Immunohistoquímica contra Ki-67 en seccions de parafina de tiroides de ratolins de cinc mesos d'edat dels genotips indicats. (E) Gràfic de barres apilades que mostra l'efecte de la pèrdua de Spry1 en la tumorigènesi de la tiroide en ratolins d'entre tres i cinc mesos d'edat.

### 1.6 Els nivells de Spry1 i IL-6 es troben reduïts en mostres humanes de carcinoma i adenoma fol·licular de tiroide

Per traslladar la rellevància dels nostres resultats a la patologia humana, vam analitzar l'expressió de SPRY1 en una sèrie de 14 adenomes i carcinomes fol·liculars de tiroides (9 adenomes i 5 carcinomes) i en 10 mostres de tiroides no tumorals adjacents i no relacionades. (Figura 27). L'expressió mediana de SPRY1 es trobava significativament reduïda en les mostres tumorals quan les comparàvem amb teixit no tumoral (Man Whitney's U test.  $p=0.017$ , Figura 27A). A més a més, en consonància amb els nostres resultats quan vam analitzar els nivells de mRNA d'IL-6, aquests també es trobaven reduïts en comparació als nivells que presentaven les mostres normals (Man Whitney's U test.  $p=0.002$ ; Figura 27B). L'anàlisi de regressió univariant va mostrar una associació significativa entre l'expressió de Spry1 i els nivells d'IL-6 ( $\beta$ : 1.072 CI95: 0.63-1.514;  $p<0.001$ .  $R^2$ : 0.576, Figura 27C). Finalment, les mostres de teixit normal es van tenyir amb hematoxilina i eosina i tal i com es pot apreciar en la Figura 27D, aquestes no mostraven signes d'infiltració descartant així la possibilitat de l'existència d'un efecte d'emascament per part de les cèl·lules del sistema immune en els nivells d'IL-6. En conclusió, aquests resultats suggereixen que SPRY1 pot tenir un paper com a supressor de tumors en el carcinoma fol·licular de tiroide.



**Figura 27.** Els nivells de Spry1 i IL-6 es troben reduïts en tumors de tiroide humans. (A) Nivells relatius de mRNA de Spry1 de teixit de tiroide no tumoral vs tumoral ( $p<0.05$  mitjançant el test Man Whitney U). (B) Nivells relatius de mRNA de IL-6 de teixit de tiroide tumoral vs no tumoral ( $p<0.01$  mitjançant el test Man Whitney U). (C) Gràfic de dispersió dels nivells de IL-6 vs els nivells de Spry1. (D) Tinció d'hematoxilina-eosina de teixit de tiroide normal de les mostres indicades (seleccionades pels seus elevats nivells de IL-6) en les quals es pot observar com no hi ha evidències d'infiltració.

En la segona part d'aquest capítol parlarem de l'efecte de la pèrdua de Spry1 en un altre tipus de neoplàsia endocrina, concretament en el feocromocitoma.

Quan estàvem analitzant els ratolins Spry1<sup>+/-</sup>; Pten<sup>+/-</sup> vam adonar-nos que a part dels tumors evidents a la glàndula tiroide aquests animals també presentaven unes glàndules adrenals d'una mida més gran de l'habitual. Així doncs vam decidir analitzar si Spry1 també tenia un rol en el desenvolupament del càncer en aquest teixit.

## 2. PAPER DE SPRY1 EN EL DESENVOLUPAMENT DEL FEOCROMOCITOMA

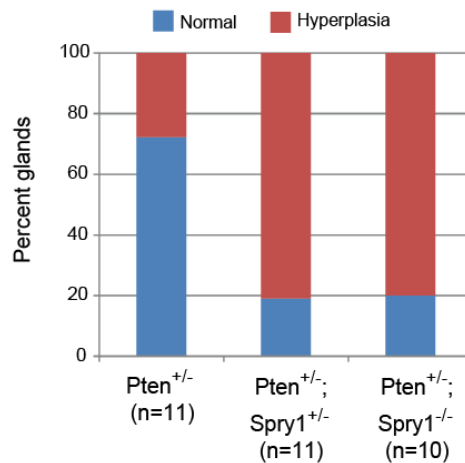
### 2.1 L'haploinsuficiència de Sprouty1 accelera el desenvolupament del feocromocitoma en ratolins Pten<sup>+/-</sup>

Els feocromocitomes són tumors secretors de catecolamines poc freqüents que provenen de les cèl·lules cromafines de la mèdulla adrenal. Els paragangliomes són tumors que estan estretament relacionats amb els feocromocitomes ja que comparteixen origen de desenvolupament però es produeixen fora de la glàndula adrenal, en el sistema paraganglionar. La majoria dels feocromocitomes són esporàdics; no obstant, al voltant d'un 25-30% estan associats a síndromes familiars causats per mutacions en la línia germinal d'almenys deu gens (Gimenez-Roqueplo *et al.*, 2012). La baixa incidència dels feocromocitomes dificulta el desenvolupament de marcadors tant de diagnòstic com de pronòstic així com també de teràpies efectives pel tractament d'aquests tumors. Per tant, són necessaris el desenvolupament de nous models animals i cel·lulars per l'estudi d'aquesta malaltia.

Així doncs, considerant aquesta situació quan vam adonar-nos que els ratolins doble heterozigots per Pten i Spry1 presentaven un fenotip en la glàndula adrenal no vam dubtar en analitzar i explorar si Spry1 també tenia un paper en el desenvolupament d'aquests tumors neuroendocrins.

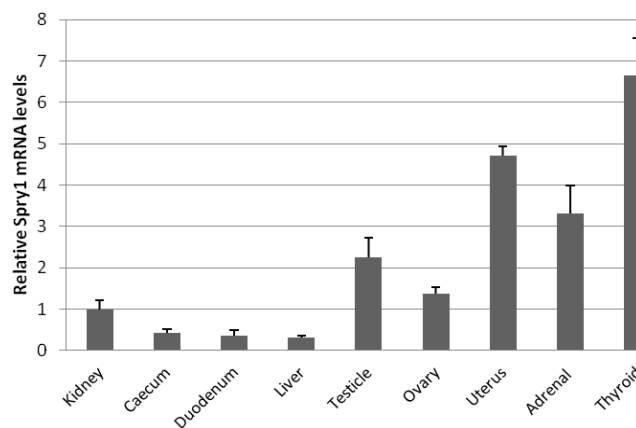
En la primera part d'aquest capítol hem descrit com ratolins que tenien delecionat un al·lel de Spry1 en un context d'haploinsuficiència de Pten desenvolupaven hiperplàsies fol·liculars en la tiroide amb unes freqüències més elevades i a edats més primerenques que els ratolins Pten<sup>+/-</sup>. Mentre examinàvem les tiroides d'aquests animals als tres i cinc mesos d'edat, ens vam adonar que els ratolins Spry1<sup>+/-</sup>; Pten<sup>+/-</sup> presentaven lesions hiperplàsiques a la tiroide amb una freqüència comparable a la que ho feien els Spry1<sup>-/-</sup>; Pten<sup>+/-</sup> (Figura 28). Aquesta dada ens indicava que la deleció d'un únic al·lel de Spry1 era suficient per accelerar la tumorigènesi de la tiroide en un context d'haploinsuficiència de Pten.





**Figura 28.** La deleció d'un únic al·lel de *Spry1* és suficient per accelerar la formació de tumors en la glàndula tiroide. Gràfic de barres apilades de les freqüències de l'aparició de lesions hiperplàsiques a la tiroide dels ratolins de tres a cinc mesos dels genotips indicats.

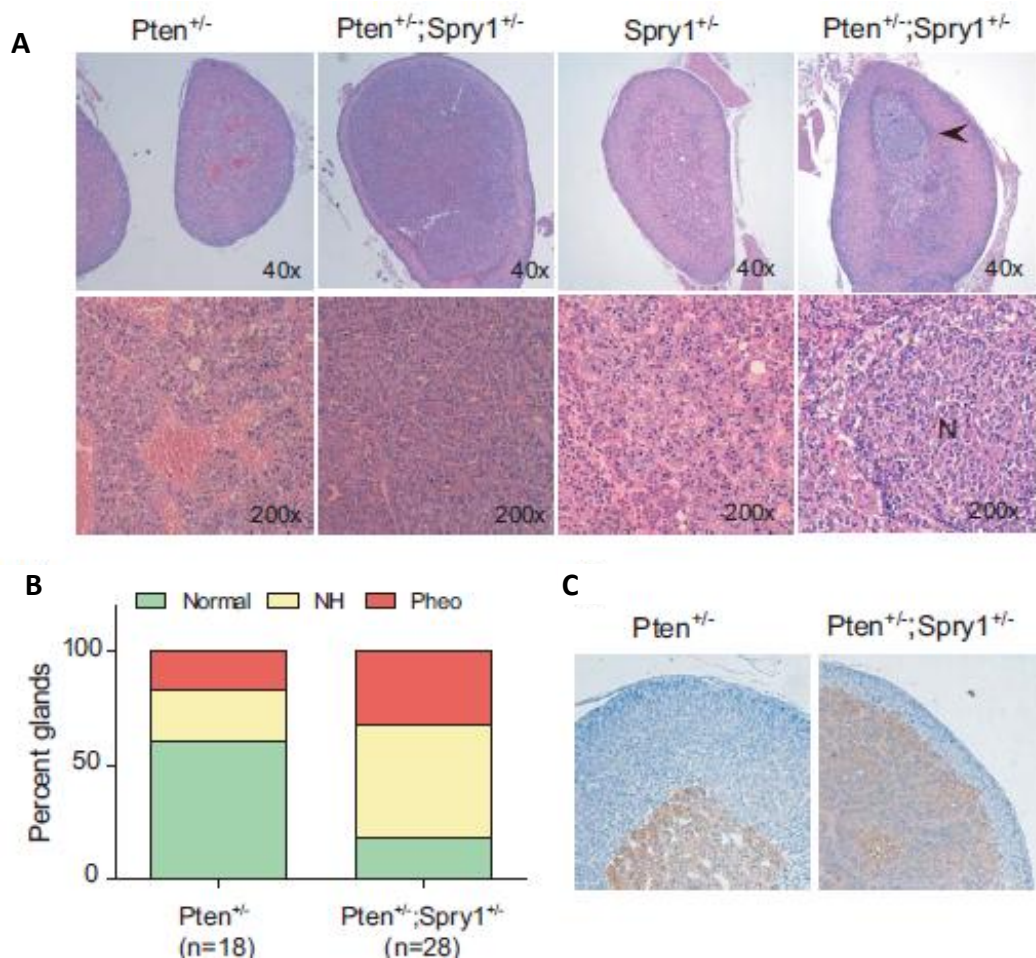
Així doncs vam continuar treballant amb aquest model i quan estàvem analitzant els ratolins *Spry1*<sup>+/-</sup>; *Pten*<sup>+/-</sup> i cercàvem tumors en altres teixits que expressessin *Spry1* vam observar un fenotip en les glàndules adrenals d'aquests. Tal i com es mostra en la Figura 29 la glàndula adrenal presenta uns alts nivells d'expressió de *Spry1* quan mesuràvem els nivells mitjançant PCR en temps real.



**Figura 29.** *Spry1* s'expressa a la glàndula adrenal de ratolí. Anàlisi dels nivells relatius de *Spry1* mitjançant RT-PCR de diferents òrgans de ratolins wild-type de tres mesos d'edat.

L'anàlisi histològic de les glàndules adrenals de ratolins de cinc mesos d'edat va revelar que aproximadament un terç (9/28; 32%) de les glàndules adrenals dels ratolins doble heterozigots presentaven feocromocitomes en comparació al 17% (3/18) de les adrenals dels ratolins *Pten*<sup>+/-</sup> (Figura 30A i 30B). En aquestes lesions, el patró alveolar o niat típic de les mètul·les normals es trobava reemplaçat per cordons o làmines de cèl·lules densament empaquetades que comprimien el parènquima cortical adjacent (Figura 30A).

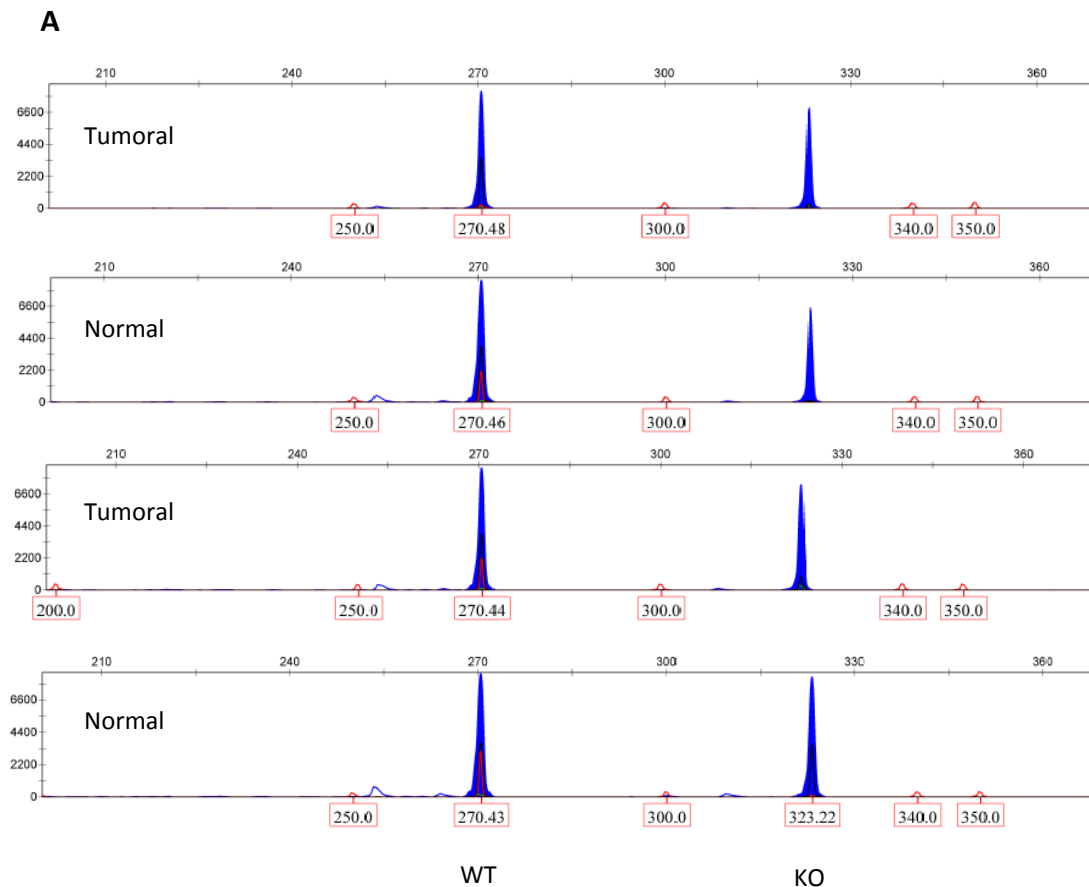
Pel que fa a la resta de glàndules adrenals dels ratolins doble heterozigots, la major part desenvolupaven hiperplàsies nodulars en la mèdul·la (15/28; 50%), aquestes hiperplàsies eren morfològicament similars als feocromocitomes però no comprimien l'escorça adrenal (Figura 30A i 30B). Pel contrari, només 4 de les 18 glàndules (22%) dels ratolins  $Pten^{+/-}$  desenvolupaven hiperplàsies nodulars a aquesta edat, essent el 60% restant completament normal. Globalment, als cinc mesos d'edat, més d'un 80% dels ratolins doble mutants en comparació al 40% dels  $Pten^{+/-}$  mostraven lesions neoplàsiques a la glàndula adrenal. Les mèdul·les dels ratolins  $Spry1^{+/-}$  eren normals en tots els casos i a totes les edats analitzades (Figura 30A). Tant els tumors procedents de ratolins  $Pten^{+/-}$  com de  $Spry1^{+/-}$ ;  $Pten^{+/-}$  eren positius per la tinció contra tirosina hidroxilasa, demostrant el seu origen cromafínic (Figura 30C).

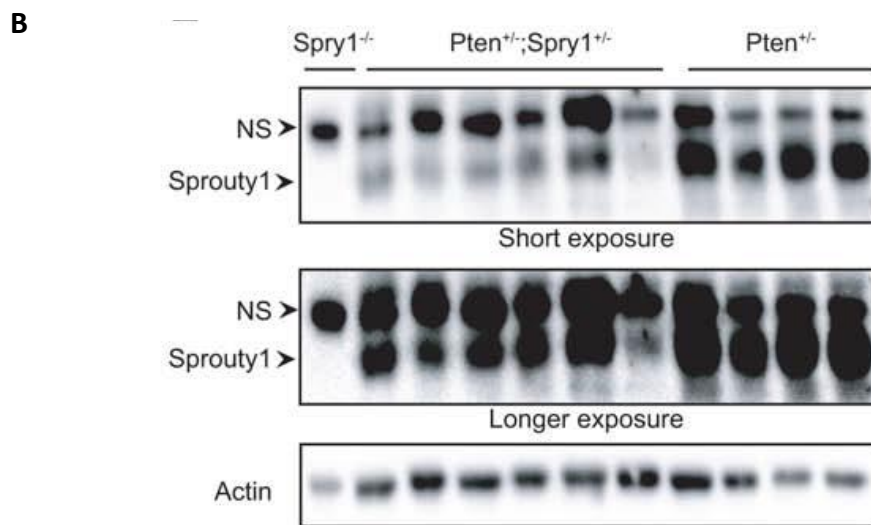


**Figura 30.** La pèrdua d'un al·lel de *Spry1* accelera la tumorigènesi de la mèdul·la adrenal en un context d'haploinsuficiència de *Pten*. (A) Imatges representatives de tincions amb hematoxilina-eosina de les glàndules adrenals dels ratolins de cinc mesos dels genotips indicats. La fletxa senyala un nòdul hiperplàsic, assenyalat com N en el panell inferior. (B) Freqüències de feocromocitoma (Pheo), d'hiperplàsia nodular (NH) o de mèdul·la normal (Normal) de ratolins de cinc mesos d'edat dels genotips indicats. (C) Immunohistoquímica contra la tirosina hidroxilasa (TH) de glàndules adrenals de ratolins de cinc mesos dels genotips indicats.

## 2.2 La pèrdua d'heterozigositat de *Spry1* no és responsable de l'acceleració en la tumorigènesi de la mèdulla adrenal induïda per *Pten*

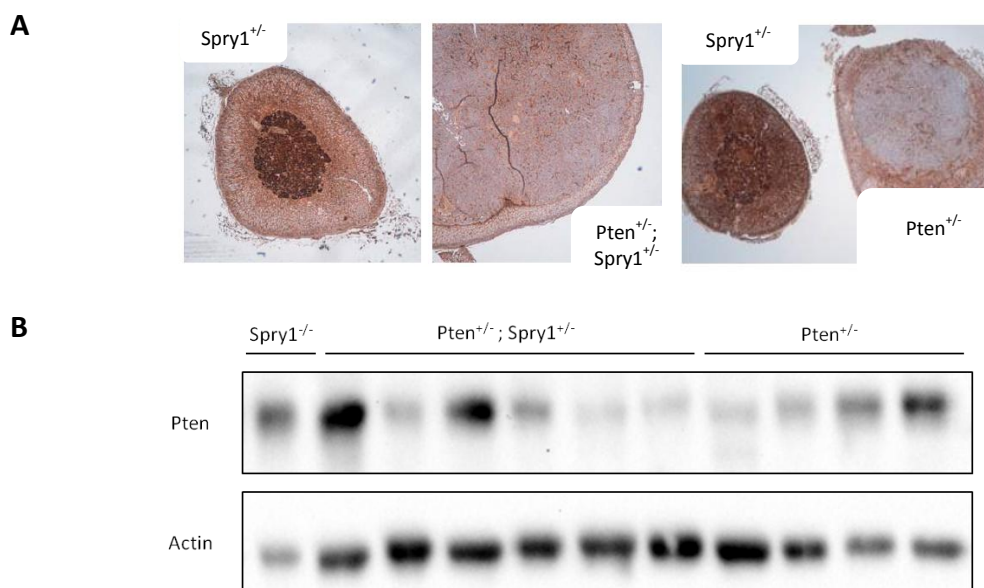
Seguidament vam dur a terme un anàlisi de pèrdua d'heterozigositat de *Spry1* mitjançant PCR, per fer-ho vam utilitzar primers que flanquejaven el lloc FRT present en l'al·lel *knockout* però no en el *wild-type* (Basson *et al.*, 2005). L'anàlisi dels fragments per electroforesi capil·lar va indicar que l'al·lel *wild-type* estava present en tots (10/10) els feocromocitomes dels ratolins doble heterozigots analitzats (Figura 31A). A més a més, també vam analitzar els nivells de *Spry1* per western blot utilitzant una anticòs específic i tal i com s'observa en la Figura 31B, l'expressió de *Spry1* es mantenia en cinc dels sis tumors analitzats provinents de ratolins doble heterozigots. Curiosament, els nivells proteics de *Spry1* estaven reduïts en els feocromocitomes dels ratolins doble heterozigots quan els comparàvem amb els dels ratolins *Pten*<sup>+/-</sup>, reflectint probablement que *Spry1* és sensible a la dosi gènica. Aquest fet concorda amb resultats previs del nostre grup que indiquen que *Spry1* també es comporta com un gen dosi-sensible durant el desenvolupament del sistema genitourinari, ja que la deleció d'un únic al·lel de *Spry1* rescata parcialment l'agènesi renal causada per mutacions en *Ret* (Rozen *et al.*, 2009). Així podem concloure que la pèrdua d'un únic al·lel de *Spry1* en un context d'haploinsuficiència de *Pten* accelera significativament ( $P = 0.01$ ,  $\chi^2$  test) l'aparició de lesions neoplàsiques a la mèdulla adrenal.





**Figura 31.** L'al·lel *wild-type* de *Spry1* no es perd en els feocromocitomes dels ratolins  $Pten^{+/-}$   $Spry1^{+/-}$ . (A) Resultats representatius de l'anàlisi de pèrdua d'heterozigositat de DNA de teixit tumoral vs normal de ratolins doble heterozigots de nou mesos d'edat. (B) Immunoblot de *Spry1* dels feocromocitomes dels ratolins dels genotips indicats. Els dos panells superiors són diferents exposicions de la mateixa membrana per mostrar la falta d'immunoreactivitat del primer carril que es correspon a la mèdulla adrenal del ratolí knockout per *Spry1*. La igualtat de càrrega es va avaluar mitjançant la immunodetecció de l'actina. NS, banda no específica.

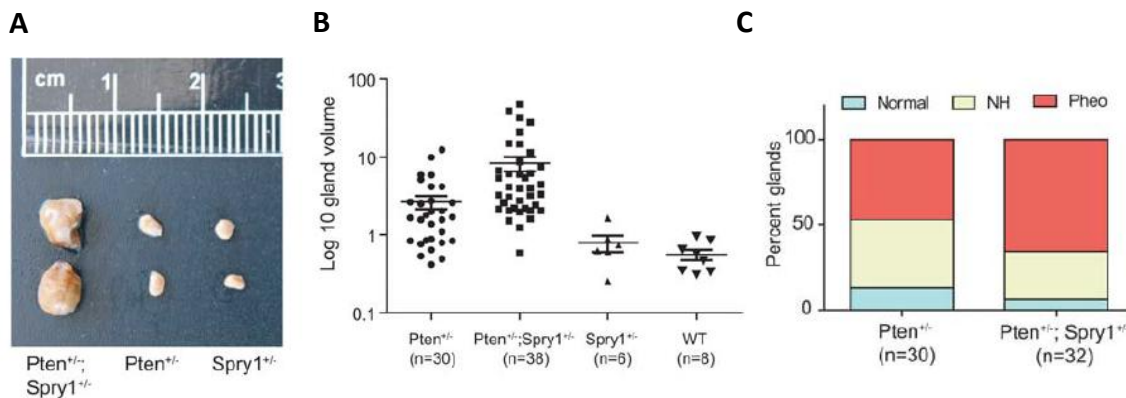
D'altra banda l'anàlisi de l'expressió de *Pten* mitjançant tècniques d'immunohistoquímica i per Western blot ens van revelar que l'expressió d'aquesta proteïna es perdia freqüentment en mostres de feocromocitomes d'ambdós genotips (Figura 32).



**Figura 32.** L'expressió de *Pten* es perd durant el desenvolupament del feocromocitoma. (A) Immunohistoquímica contra *Pten* de les glàndules adrenals dels genotips indicats. (B) Western blot dels nivells de *Pten* en els feocromocitomes dels genotips indicats.

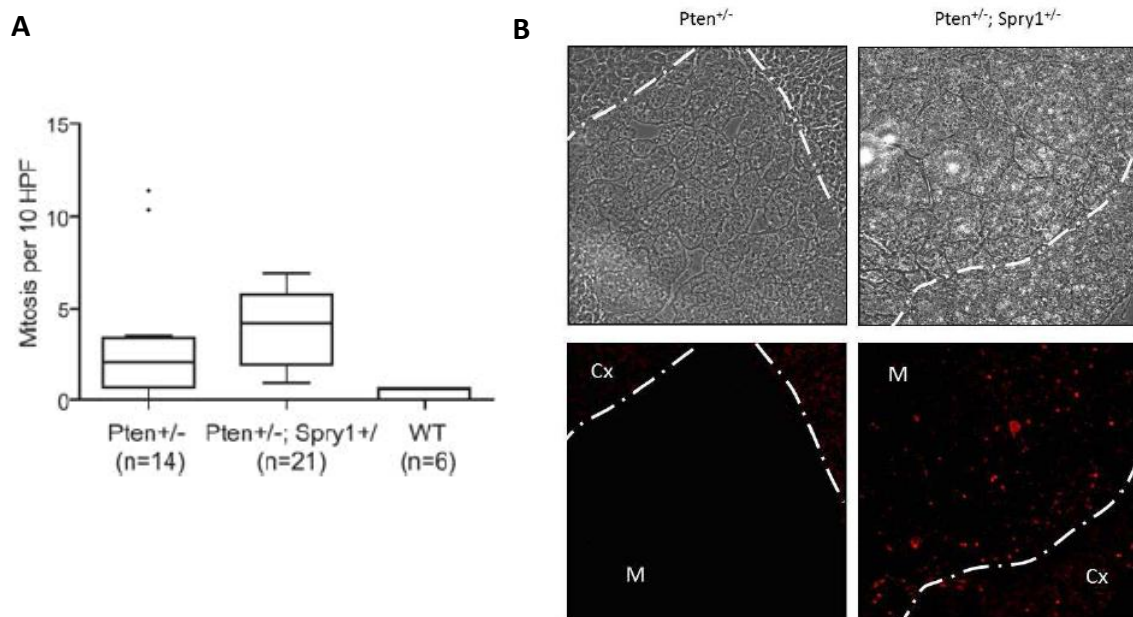
### 2.3 Els feocromocitomes dels ratolins $Spry1^{+/-}$ ; $Pten^{+/-}$ presenten signes de major agressivitat

Als nou mesos d'edat, pràcticament tots els ratolins doble heterozigots que vam examinar presentaven o bé feocromocitoma (21/32; 66%) o bé hiperplàsia nodular (9/32; 28%). Aquests percentatges passaven a ser del 47% (14/30) i del 40% (12/30), respectivament, en el cas de les glàndules adrenals dels ratolins  $Pten^{+/-}$  (Figura 33C). Aquestes diferències no eren estadísticament significatives ( $P = 0.29$ ,  $\chi^2$  test); no obstant, les glàndules adrenals dels ratolins doble heterozigots eren de mitjana quasi quatre vegades més grans que les dels ratolins  $Pten^{+/-}$  (Figura 33A i 33B). Així doncs, el volum mitjà les glàndules adrenals dels ratolins  $Spry1^{+/-}$  era de  $0.79 \pm 0.19 \text{ mm}^3$  (mitjana  $\pm$  error estàndard), el de les adrenals  $Pten^{+/-}$  era de  $2.64 \pm 0.51 \text{ mm}^3$  i en el cas de les glàndules dels ratolins  $Spry1^{+/-}$ ;  $Pten^{+/-}$  aquest valor passava a ser de  $8.28 \pm 1.77 \text{ mm}^3$ . Les diferències entre la mida de les adrenals dels ratolins  $Pten^{+/-}$  enfront als  $Spry1^{+/-}$ ;  $Pten^{+/-}$  era altament significativa ( $P = 0.0001$ , Mann — Whitney test).



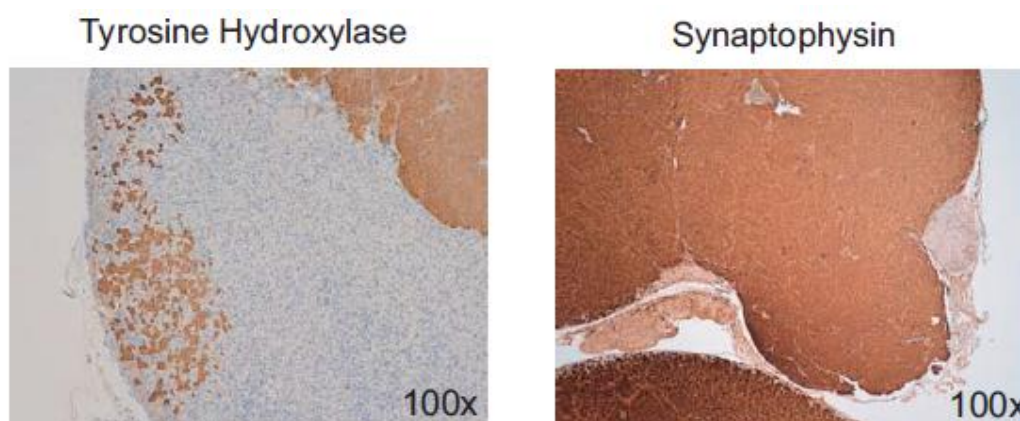
**Figura 33.** Els tumors de la mèdula adrenal dels ratolins doble heterozigots tendeixen a ser més agressius. (A) Imatges macroscòpiques, (B) Volum de les glàndules i (C) Freqüències de l'aparició de tumors en glàndules adrenals de ratolins de nou mesos d'edat dels genotips indicats.

El número de mitosis observades per 10 camps de gran augment també era significativament més elevat en els feocromocitomes dels ratolins doble heterozigots que en els ratolins  $Pten^{+/-}$  ( $P = 0.033$ , Mann — Whitney test), Figura 34A). D'un total de 14 feocromocitomes  $Pten^{+/-}$ , cinc (36%) presentaven més de tres mitosis per 10 camps de gran augment, mentre que aquest percentatge pràcticament es duplicava en el cas dels feocromocitomes dels ratolins  $Spry1^{+/-}$ ;  $Pten^{+/-}$  (15/21; 71%). Aquestes diferències mostraven una tendència però no eren estadísticament significatives ( $P = 0.07$ ,  $\chi^2$  test). A més a més, vam realitzar una immunofluorescència contra Ki67, un marcador de proliferació cel·lular, i tal i com s'observa en la Figura 34B els feocromocitomes dels ratolins doble heterozigots presenten un elevat número de cèl·lules positives per Ki67 corroborant així la seva gran capacitat proliferativa.



**Figura 34.** Els feocromocitomes dels ratolins Pten<sup>+/-</sup>; Spry1<sup>+/-</sup> presenten signes de major proliferació. (A) Número de mitosis per 10 camps de gran augment de les glàndules adrenals de ratolins de nou mesos d'edat dels genotips indicats. (B) Immunohistoquímica contra el marcador de proliferació Ki-67 de les glàndules adrenals dels genotips indicats. Cx, còrtex; M, mèdula.

Finalment, la tinció contra la tirosina hidroxilasa i la sinaptofisina van revelar que les glàndules més grans dels ratolins doble heterozigots però no les dels Pten<sup>+/-</sup> presentaven sovint cèl·lules cromafíniques que envaïen l'escorça adrenal o travessaven la càpsula adrenal (Figura 35).



**Figura 35.** Els feocromocitomes dels ratolins doble mutants envaeixen la càpsula de la glàndula. Immunohistoquímica contra la tirosina hidroxilasa (A) i la sinaptofisina (B) de tumors de ratolins Pten<sup>+/-</sup>; Spry1<sup>+/-</sup> de nou mesos d'edat.

Tot i que no hi ha uns criteris fiables pel que fa a la predicció de la malignitat del feocromocitoma, la mida del tumor, la invasió local o l'índex mitòtic han estat proposats com a signes de malignitat per diversos autors (Metz *et al.*, 2014). En conclusió, les nostres dades demostren com la pèrdua d'un únic al·lel de *Spry1* accelera tant l'aparició del feocromocitoma com la seva ràtio de creixement. Actualment desconeixem el mecanisme pel qual *Spry1* inhibeix el creixement de les cèl·lules de feocromocitoma; però hi ha una sèrie de possibilitats que comentarem a l'apartat de la discussió i que es mereixen una futura atenció.

## CAPÍTOL II

### **PAPER DE LA TIROSINA 53 DE SPRY1 EN EL DESENVOLUPAMENT DEL SISTEMA GENITOURINARI**

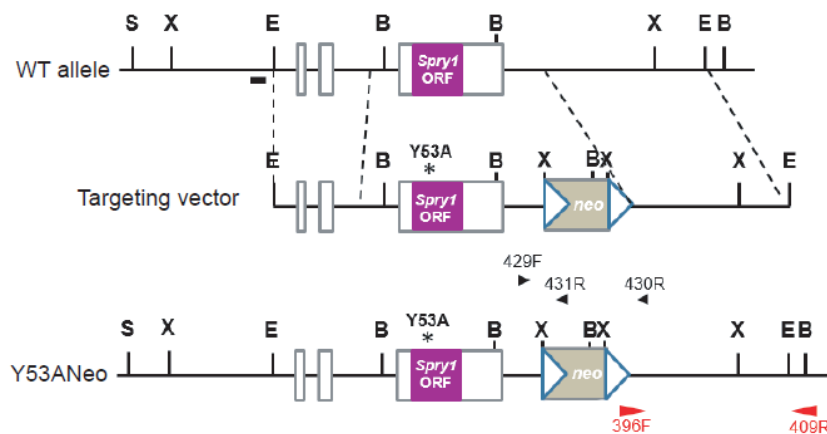
En aquest segon capítol ens hem centrat en l'estudi de la funció de Spry1 en el sistema genitourinari. Com ja hem comentat en la introducció una de les funcions clàssiques descrites per Spry1 és la inhibició de vies senyalització mediades per l'activació de receptors tirosina cinasa. Durant el desenvolupament del sistema genitourinari s'ha descrit la funció de RTKs com Ret o FGFR entre altres. El laboratori de Basson i col·laboradors va descriure el 2005 com la manca de Spry1 causava l'aparició de defectes renals (CAKUT) en ratolins deficientes per aquest gen. Posteriorment, el nostre grup va descriure com la manca de Spry1 rescatava el fenotip d'agenesis renal dels ratolins que presentaven una mutació hipomorfa del receptor Ret, confirmant així la interacció genètica de Ret i Spry1 durant el desenvolupament del ronyó (Rozen *et al.*, 2009).

D'altra banda també com ja hem introduït anteriorment, la funció de Spry1 està regulada per l'activitat d'una tirosina de l'extrem N-terminal. Aquesta tirosina està conservada en tots els membres de la família de Sprouty, però la importància de la seva funció fins a dia d'avui només s'ha demostrat *in vitro*. És per això que un dels nostres objectius és avaluar la funció d'aquesta tirosina *in vivo*. Concretament, nosaltres ens hem centrat en l'anàlisi de la tirosina 53 de Spry1. Per poder dur-ho a terme hem generat un ratolí *knockin* per aquesta tirosina i hem analitzat el seu paper en el desenvolupament del sistema genitourinari.



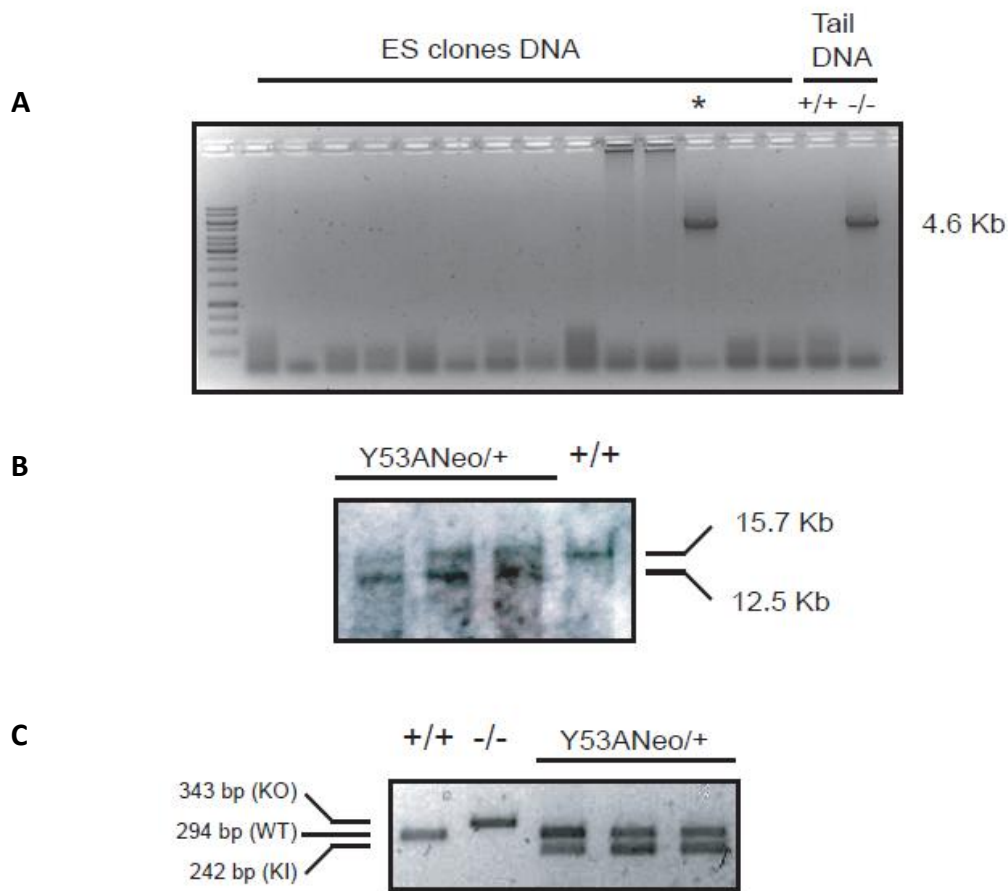
### 1.1 Generació del ratolí *knockin* $Spry1^{Y53ANeo}$

Per explorar la funció de la tirosina 53 de *Spry1* *in vivo*, vam generar ratolins *knockin* portadors d'una mutació de tirosina a alanina en aquest residu. Per generar el ratolí vam seguir la mateixa estratègia que es va utilitzar per generar el ratolí *knockout* per *Spry1* (Basson *et al.*, 2005), però utilitzant un *targeting vector* modificat, al qual li havíem eliminat els llocs loxP que flanquejaven l'exó únic de *Spry1* i contenia un canvi d'un únic nucleòtid que es traduïa en la substitució de l'aminoàcid de la posició 53 (Y53A) (Figura 36).



**Figura 36. Generació de l'al·lel  $Spry1^{Y53ANeo}$  en ratolí.** Representació esquemàtica de l'al·lel wild-type de *Spry1*, del *targeting vector* i de l'al·lel  $Spry1^{Y53ANeo}$  produït mitjançant recombinació homòloga en el locus de *Spry1* en cèl·lules ES. La línia horitzontal representa el DNA genòmic de *Spry1*; el quadre lila representa la pauta oberta de lectura de *Spry1* (ORF), la qual està continguda en un dels tres exons (quadres blancs). Al *targeting vector* se li han eliminat els llocs loxP que flanquejaven la ORF de *Spry1* i s'ha introduït el canvi de nucleòtid que es tradueix en el canvi d'aminoàcid Y53A (asterisc), a més a més d'una PGKneo cassette flanquejada per llocs frt (triangles blaus) a 3' del gen. B, BglII; E, EcoRI; S, SpeI; X, XbaI.

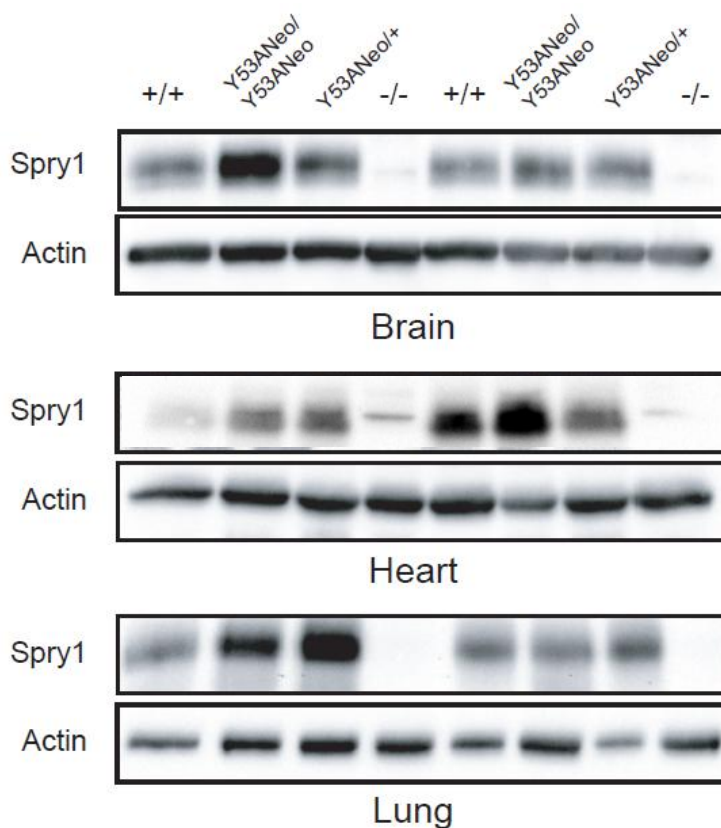
Les cèl·lules mare embrionàries (ES) es van electroporar amb la construcció linealitzada i es va analitzar la recombinació homòloga en els clons de cèl·lules resistents a l'antibiòtic G418 mitjançant PCR (Figura 37A) tal i com es descriu en l'apartat de material i mètodes. La inserció dirigida dels dos braços homòlegs dels clon positius per PCR es va confirmar mitjançant Southern Blot (Figura 37B). La presència de la mutació puntual es va confirmar per seqüenciació. Dos clons independents de cèl·lules mare embrionàries, el 4AD4 i el 6DA1, van ser els que es van utilitzar per generar els ratolins *knockin* heterozigots portadors de la mutació Y53A amb la *cassette* Neo ( $Spry1^{Y53ANeo/+}$ ). Seguidament vam crear ratolins  $Spry1^{Y53ANeo/+}$  entre ells per obtenir ratolins *knockin* homozigots i examinar les camades al naixement. En la Figura 37C es mostra el resultat de la PCR del genotipatge d'aquests ratolins.



**Figura 37. Generació de l'al·lel  $Spry1^{Y53ANeo}$  en ratolí.** (A) Imatge de l'electroforesi del producte de PCR de 14 dels clons resistents a la doble selecció. Els clons de cèl·lules ES que contenen l'al·lel modificat ( $Spry1Y53ANeo$ ) es van identificar mitjançant PCR utilitzant els primers 396F i 409R (fletxes vermelles Figura 36), el producte de PCR és un fragment de 4.6 kb i s'utilitza DNA de la cua d'un ratolí  $Spry1^{-/-}$  i  $Spry1^{+/+}$  com a controls positiu i negatiu, respectivament. (B) Es va confirmar la inserció de l'al·lel  $Spry1Y53ANeo$  en els clons de cèl·lules ES positius per PCR mitjançant Southern blot utilitzant una sonda que contenia seqüències 5' de les utilitzades en el targeting vector (barra negra Figura 36). Es mostren els resultats de tres clons heterozigots per l'al·lel  $Spry1Y53ANeo$  independents i un clon wild-type. (C) Imatge del resultat del genotipatge de ratolins heterozigots utilitzant els primers (429, 430 i 431) localitzats en les posicions que s'indiquen en la Figura 36. També es mostra el resultat de la PCR d'un ratolí  $Spry1$  knockout i un wild-type.

## 1.2 La mutació de la tirosina 53 de Spry1 no afecta els seus nivells d'expressió *in vivo*

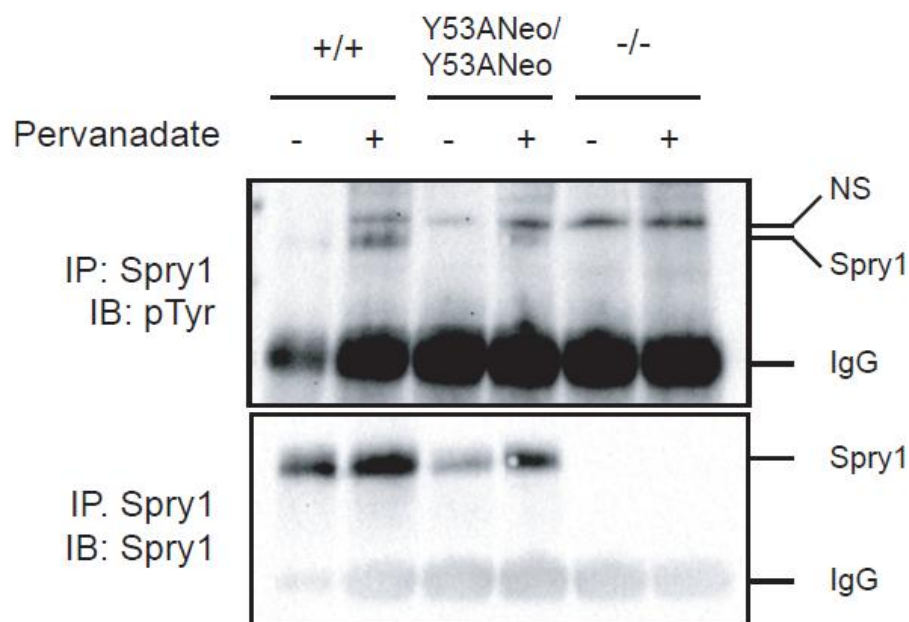
Un cop vam obtenir les primeres camades de ratolins homozigots per la mutació vam analitzar l'expressió de Spry1 en diversos teixits d'animals recent nascuts per assegurar-nos que la mutació que havíem introduït no estava afectant els nivells de proteïna. Així doncs vam comprovar mitjançant Western Blot els nivells de proteïna de Spry1 en cervell, cor i pulmó i tal i com es pot veure en la Figura 38 no van revelar diferències entre mostres de ratolins *wild-type*, Spry1<sup>Y53ANeo/+</sup> i Spry1<sup>Y53ANeo/Y53ANeo</sup> de la mateixa camada. A més a més, es van utilitzar mostres de teixits del ratolí *knockout* per Spry1 per confirmar l'especificitat de l'anticòs utilitzat.



**Figura 38.** La mutació de la tirosina 53 de Spry1 no afecta als seus nivells d'expressió. Western blot de Spry1 d'extractes de proteïna de cervell, cor i pulmó de ratolins nounats dels genotips indicats. S'utilitzen llisats dels mateixos teixits de ratolí Spry1 knockout com a control negatiu de l'anticòs.

### 1.3 La tirosina 53 és un lloc de fosforilació principal de Spry1

Diversos treballs *in vitro* així com resultats d'estudis recollits en la base de dades PhosphositePlus (<http://www.phosphosite.org>) han demostrat que la tirosina 53 de Spry1 és un dels principals llocs de fosforilació d'aquesta proteïna. Per tant, els nostres ratolins mutants a l'haver substituït aquesta tirosina per un altre residu no fosforilable havien de presentar un dèficit en la fosforilació d'aquesta tirosina. Per confirmar-ho el que vam fer va ser analitzar la contribució de la tirosina 53 de Spry1 al patró global de fosforilació en tirosines de la proteïna. Així doncs, vam posar en cultiu fibroblasts de la dermis de ratolins recent nascuts  $Spry1^{Y53ANeo/Y53ANeo}$  i *wild-type*, i els vam estimular amb pervanadat de sodi. Després de la lisis, vam immunoprecipitar Spry1 i vam analitzar la seva fosforilació utilitzant anticossos anti-fosfotirosina. Novament, els fibroblasts de la dermis de ratolins *knockout* per Spry1 ens van servir com a control negatiu. Tal i com es mostra en la Figura 39, el pervanadat provoca un robusta fosforilació de les tirosines de Spry1 que es redueix però no s'elimina totalment quan es muta la tirosina 53 d'aquest. Tal i com s'esperava no s'observava banda en les cèl·lules *knockout* immunoprecipitades. Per tant, podem afirmar que la tirosina 53 constitueix una de les tirosines fosforilables principals de Spry1 però que no n'és la única.



**Figura 39.** La tirosina 53 és una de les principals tirosines fosforilables de Spry1. Fibroblasts de la dermis dels ratolins dels genotips indicats es van estimular 20 minuts amb pervanadat de sodi (20 $\mu$ M). Al panell superior es mostra l'immunoblot contra pTyr del Spry1 endogen immunoprecipitat. Al panell inferior s'observa el Western Blot contra Spry1 de la mateixa membrana per comprovar la càrrega. S'utilitzen llisats de fibroblasts dèrmics  $Spry1^{-/-}$  com a control negatiu.

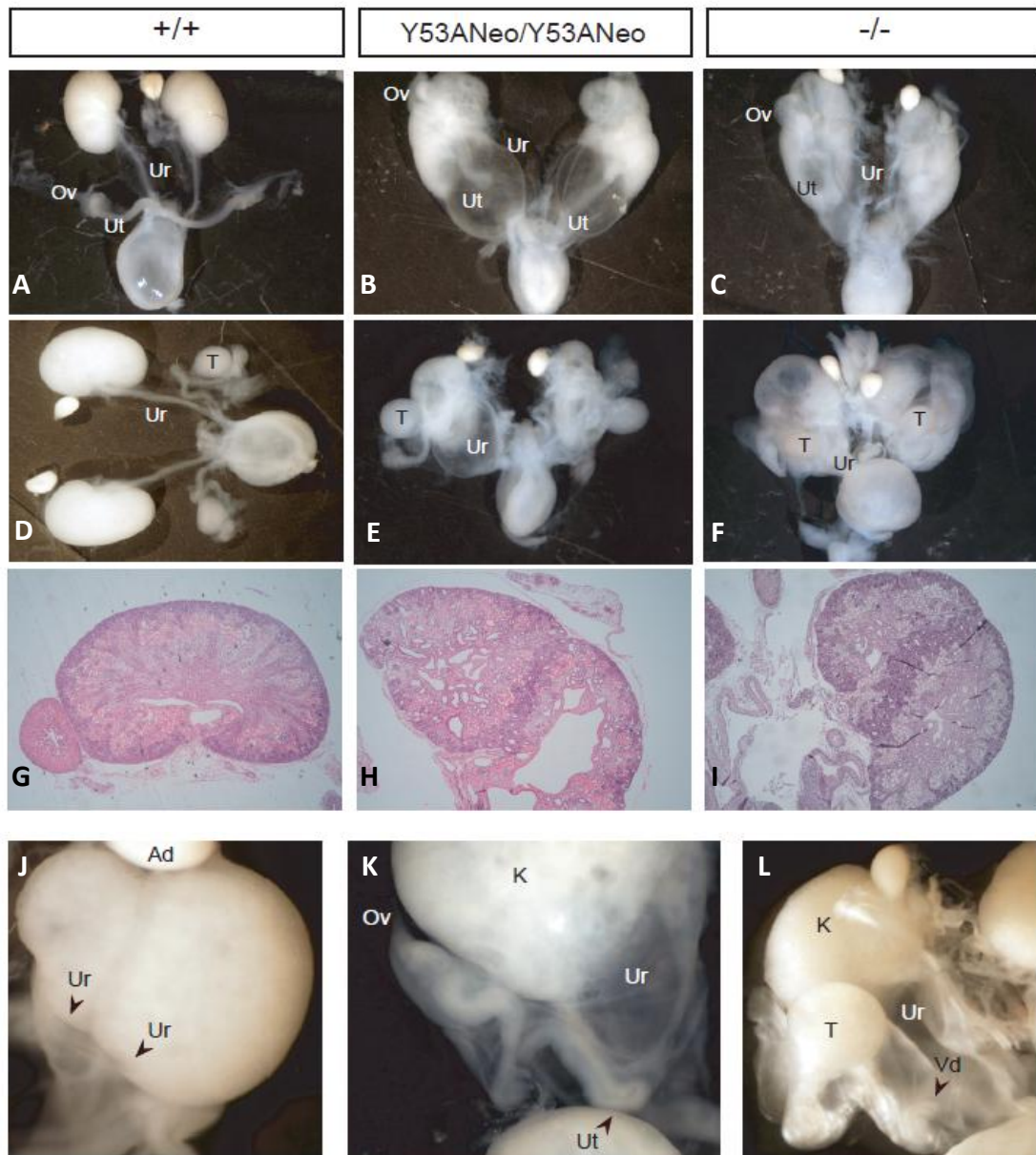
#### 1.4 La deleció de la tirosina 53 de *Spry1* fenocopia alguns dels defectes del ratolí *knockout* per *Spry1* però també promou l'aparició de nous fenotips

Un cop vam obtenir les primeres camades de ratolins *Spry1*<sup>Y53ANeo/Y53ANeo</sup> vam analitzar les proporcions en que els diferents genotips eren obtinguts i tal i com s'observa en la Taula 9 els ratolins *Spry1*<sup>Y53ANeo/Y53ANeo</sup> naixien en proporcions mendelianes.

	Freqüència esperada (%)	Freqüència observada (%)
<b><i>Spry1</i><sup>+/+</sup></b>	15,25	13
<b><i>Spry1</i><sup>Y53ANeo/+</sup></b>	30,5	32
<b><i>Spry1</i><sup>Y53ANeo/Y53ANeo</sup></b>	15,25	16
Total (n)	61	61

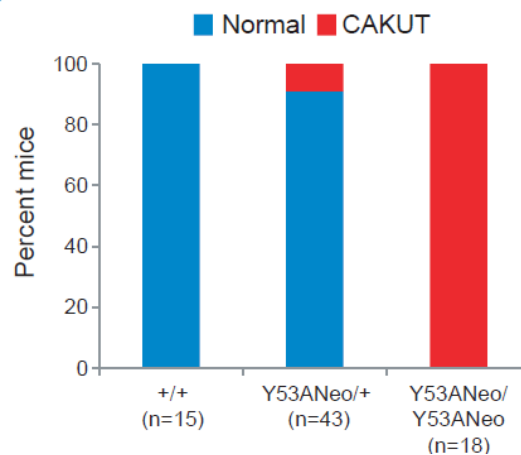
Taula 9. Freqüències al·lèliques dels genotips indicats en el moment del naixement.

L'examen del sistema genitourinari en el moment del naixement va revelar una sèrie d'anormalitats generals que incloïen megaurèter bilateral, hidrourèter, urèters duplicats i urèters cecs, totes aquestes malformacions eren indistingibles de les que presenta el ratolí *knockout* per *Spry1* (Figura 40). De la mateixa manera, l'examinació histològica dels ronyons va revelar que tal i com s'observa en el cas del *knockout* de *Spry1*, els ronyons del ratolí *knockin* consistien en dos o més ronyons supernumeraris fusionats, amb zones nefrogèniques fora de la perifèria, grans cavitats cístiques i hidronefrosis severa (Figura 40G-I). D'altra banda, les femelles *Spry1*<sup>Y53ANeo/Y53ANeo</sup> presentaven una sèrie d'anormalitats en els genitals interns, com ara emplaçament ectòpic dels ovaris a la zona ventral del ronyó, amb les banyes uterines unides als urèters i que en la majoria de casos acabaven cegues enlloc de fusionar-se entre elles (Figura 40K). En el cas dels mascles *knockin* trobàvem els testicles posicionats a prop dels ronyons i els conductes deferents estaven fusionats amb els urèters (Figura 40L).



**Figura 40.** El ratolí *Spry1*<sup>Y53ANeo/Y53ANeo</sup> fenocopia els defectes del sistema genitourinari del ratolí nul per *Spry1*. (A-F) Imatges macroscòpiques dels ronyons i sistemes urogenitals de femelles (A-C) i mascles (D-F) de ratolins nounats wild-type, knockin i knockout per *Spry1*. (G-I) Seccions renals tenyides amb hematoxilina-eosina dels genotips indicats. (J-L) Imatges a major augment d'un ronyó supernumerari amb múltiples urèters (J), de l'úter d'una femella fusionat a l'urèter (K) i del conducte deferent d'un mascle fusionat a l'hidroureter (L) de ratolins *Spry1*<sup>Y53ANeo/Y53ANeo</sup>. Abreviatures: Ad, adrenal; K, ronyó; Ov, ovari; T, testicle; Ut, úter; Ur, urèter; Vd, vas deferent.

Aquests defectes eren totalment penetrants en els ratolins homozigots mentre que una petita proporció (~10%) de ratolins heterozigots presentaven megaurèter i defectes renals unilaterals (Figura 41). Totes aquestes malformacions eren indistingibles de les que havien estat descrites en el ratolí *knockout* per *Spry1* (Basson *et al.*, 2005). És important remarcar el fet que els ratolins *knockin* generats a partir de dos clons independents de cèl·lules ES (4AD4 i 6DA1) presentaven fenotips similars. Com els nivells de proteïna de Sprouty1 eren similars entre els genotips de tots els teixits analitzats, podíem afirmar que aquests defectes trobats en els ratolins homozigots per la mutació no estaven causats per una disminució de la quantitat de *Spry1*. En conclusió, la mutació de la tirosina 53 de *Spry1* causa defectes en el sistema genitourinari que fenocopien aquells descrits en el ratolí *knockout* per *Spry1* confirmant així que aquesta tirosina té un paper crucial en la funció de *Spry1* durant el desenvolupament del sistema genitourinari.



**Figura 41.** Freqüències del nombre de ratolins recent nascuts que exhibien defectes en el sistema genitourinari (CAKUT) dels genotips indicats.

Com ja hem comentat a la introducció, els defectes renals que presenten els ratolins *knockout* per *Spry1* es deuen a un defecte en la formació i ramificació de la gemma uretèrica durant el procés de morfogènesi del ronyó. Tot i que tal i com es pot observar en la Figura 40 en el moment del naixement els fenotips renals dels ratolins *knockin* i *knockout* eren idèntics, vam voler comprovar que durant el desenvolupament embrionari d'aquesta estructura la mutació de la tirosina 53 no provoqués l'aparició d'algun defecte diferencial transitori. Per dur-ho a terme vam utilitzar la soca de ratolí  $Ret^{EGFP}$  que expressa una còpia d'EGFP al locus de *Ret* i que per tant ens permet marcar les cèl·lules i estructures que expressen *Ret* durant el desenvolupament (Hoshi *et al.*, 2012). En el nostre cas ens hem centrat en l'anàlisi d'algunes estructures precursors del sistema genitourinari com són el conducte de Wolff i la gemma uretèrica dels ratolins  $Spry1^{-/-}$  i  $Spry1^{Y53ANeo/Y53ANeo}$ . Per generar embrions  $Spry1^{-/-}; Ret^{EGFP/+}$  i  $Spry1^{Y53ANeo/Y53ANeo}; Ret^{EGFP/+}$  es va seguir l'esquema de creuaments de la Figura 42 tenint en compte que tant els ratolins  $Spry1^{-/-}$  com els  $Spry1^{Y53ANeo/Y53ANeo}$  són estèrils i que els ratolins  $Ret^{EGFP/EGFP}$  moren poques hores després de néixer degut a l'agènesi renal provocada per la manca de *Ret*.

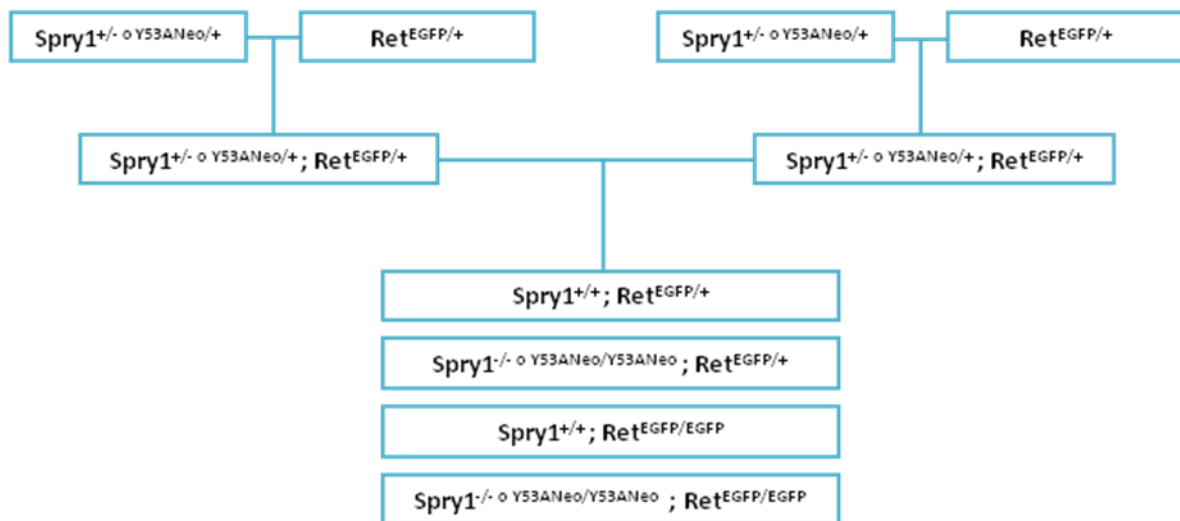
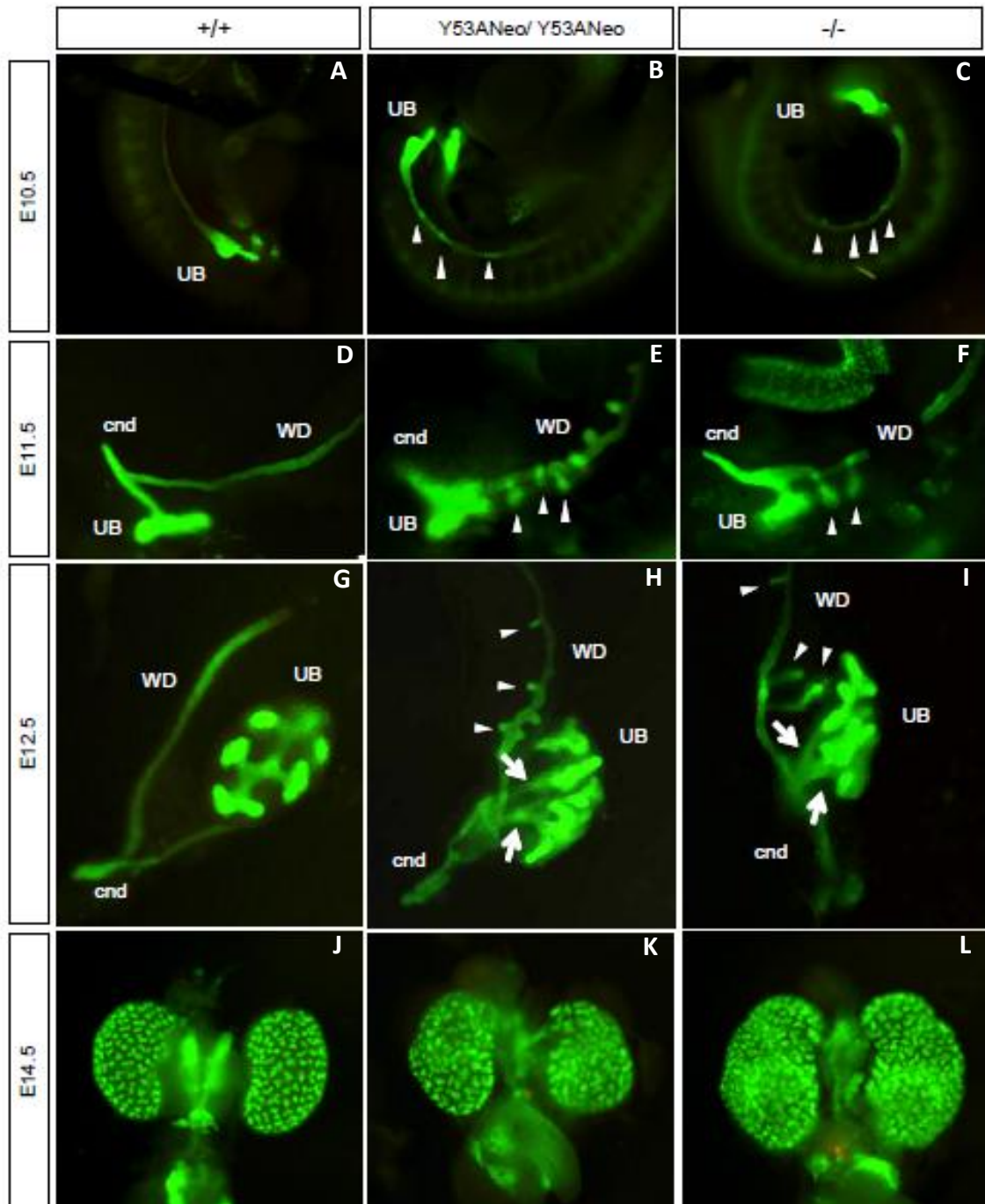


Figura 42. Estratègia de cria per la generació dels embrions *Spry1 knockout* i *Spry1 Y53A* amb l'al·lel *RetEGFP*.

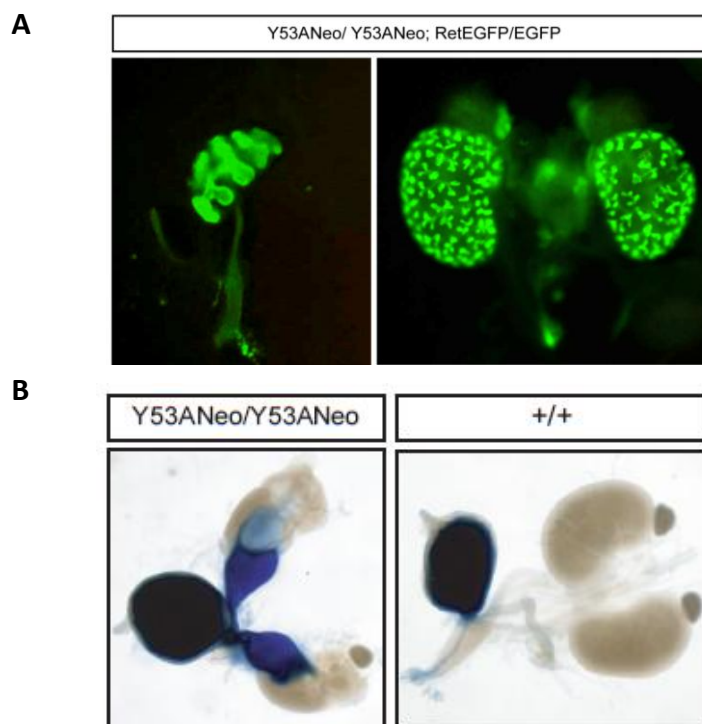
Així doncs, vam generar embrions d'ambdues línies des de dia E10.5 fins a E14.5, etapa en la que té lloc la formació i ramificació de la UB, i tal i com es pot observar en la Figura 43 els defectes entre la línia *knockout* i *knockin* per *Spry1* eren indistingibles. A dia E10.5 és quan s'inicia la formació de la UB a partir del conducte de Wolff, en els embrions *wild-type* es forma una única UB en la part caudal del WD (Figura 43A) mentre que ens els embrions de les dues línies mutants observem l'aparició de UB's ectòpiques al llarg de tot el WD (Figura 43B i 43C). A E11.5 la UB ja ha format la bifurcació en forma de T ("T-shape", Figura 43D) que posteriorment es sotmetrà a cicles de ramificació i elongació fins al dia E14.5 quan ja dóna lloc a la formació d'un ronyó perfectament ramificat (Figura 43J). En canvi, en el cas dels embrions  $Spry1^{-/-}$  i  $Spry1^{Y53ANeo/Y53ANeo}$  a dia E11.5 la UB no es bifurca correctament i es forma una estructura aberrant juntament amb la presència de gemmes ectòpiques (Figura 43E i 43F). A dia E12.5 observem la formació de ronyons múltiples que es generen a partir de gemmes ectòpiques, però a aquesta edat també observem l'aparició de defectes en la formació de l'urèter, concretament els embrions mutants presenten urèters duplicats (Figura 43H i 43I, fletxes blanques). A més a més, a E12.5 en l'embrió *wild-type* ja s'ha produït la separació entre el WD i el CND tal i com es pot veure en la Figura 43G, mentre que en ambdós mutants aquests conductes no s'arriben a separar generant una mena de dilatació en aquesta zona. Finalment, a dia E14.5 els ronyons de les dues línies presenten un ramificació excessiva i desorganitzada que es tradueix en un increment del número de "tips" i de la mida del ronyó (Figura 43K i 43L).





**Figura 43.** Etapes del desenvolupament embrionari del sistema genitourinari del ratolí *Spry1 knockout* i *Spry1 Y53A*. (A-L) Imatges de fluorescència del tracte genitourinari de ratolins portadors d'un al·lel *Ret<sup>EGFP</sup>* de les edats embrionàries i genotips indicats. Els triangles blanc senyalen les gemmes uretèriques ectòpiques i les fletxes blanques els urèters duplicats. Abreviatures: *cnd*, common nephric duct; *UB*, Ureteric Bud; *WD*, Wolffian Duct.

En treballs anteriors del nostre i altres grups s'ha descrit com la pèrdua de *Spry1* rescata l'agènesi renal provocada per la manca de *Ret*. Per testar si aquest rescat també es produïa en el ratolí *Spry1*<sup>Y53ANeo</sup> o bé el mecanisme molecular implicat era independent de la Tyr53 vam generar ratolins *Spry1*<sup>Y53ANeo/Y53ANeo</sup>; *Ret*<sup>EGFP/EGFP</sup> i tal i com es pot observar en la Figura 44A es rescaten els defectes renals del ratolí *knockout* per *Ret*. A E12.5 observem la formació d'un únic ronyó sense UB ectòpiques, mentre que a E14.5 el patró de ramificació renal no és completament normal, amb branques irregulars i espais . També és interessant assenyalar que tot i que el WD i CND es separen (Figura 44A) encara observem un CND anormalment dilatat. La unió ureterovesical (UVJ) funciona com una vàlvula de sentit únic que impedeix el flux retrògrad de la orina des de la bufeta cap al ronyó. La presència de reflux vesicoureteric (VUR) és una de les anomalies característiques del CAKUT i tal i com s'observa a la Figura 44B quan injectàvem blau de tripà a la bufeta del ratolí mutant observàvem com els urèters s'omplien de líquid indicant la presència de reflux vesicoureteric (VUR), fenomen que no succeïa en el cas dels ratolins *wild-type*. Tot i que les conseqüències de les anomalies en la separació del WD i del CND són desconegudes, és possible que afectin a la formació de la unió ureterovesical i causin reflux vesicoureteric. No obstant, cal seguir investigant per esbrinar quina és la seva funció concreta.



**Figura 44. Rescat renal dels ratolins *Spry1*<sup>Y53ANeo/Y53ANeo</sup>; *Ret*<sup>EGFP/EGFP</sup>.** (A) Imatges macroscòpiques del rescat renal d'embrions E12.5 (panell esquerre) i E14.5 (panell dret). (B) Imatges del sistema genitourinari post-injecció amb blau de tripà a la bufeta dels genotips indicats. S'aprecia la presència de reflux vesicoureteric en el ratolí *knockin* per *Spry1*.

No obstant, a diferència del ratolí *knockout* per *Spry1*, els animals  $Spry1^{Y53ANeo/Y53ANeo}$  en el moment del deslletament les freqüències al·lèliques de les femelles no es corresponien amb les esperades i presentaven una disminució dels individus *knockin* (Figura 45A). A més a més, els ratolins  $Spry1^{Y53ANeo/Y53ANeo}$  eren notablement més petits en el moment del deslletament, pesant al voltant d'un 30% menys en ambdós sexes (Figura 45B).

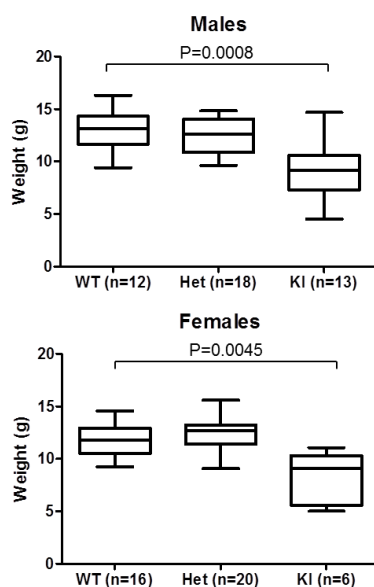
A

Mascles	Freqüència esperada (%)	Freqüència observada (%)
$Spry1^{+/+}$	12,5	13
$Spry1^{Y53ANeo/+}$	25	23
$Spry1^{Y53ANeo/Y53ANeo}$	12,5	14
Total (n)	50	50

Femelles	Freqüència esperada (%)	Freqüència observada (%)
$Spry1^{+/+}$	11	17
$Spry1^{Y53ANeo/+}$	21	20
$Spry1^{Y53ANeo/Y53ANeo}$	11	6
Total (n)	43	43

B



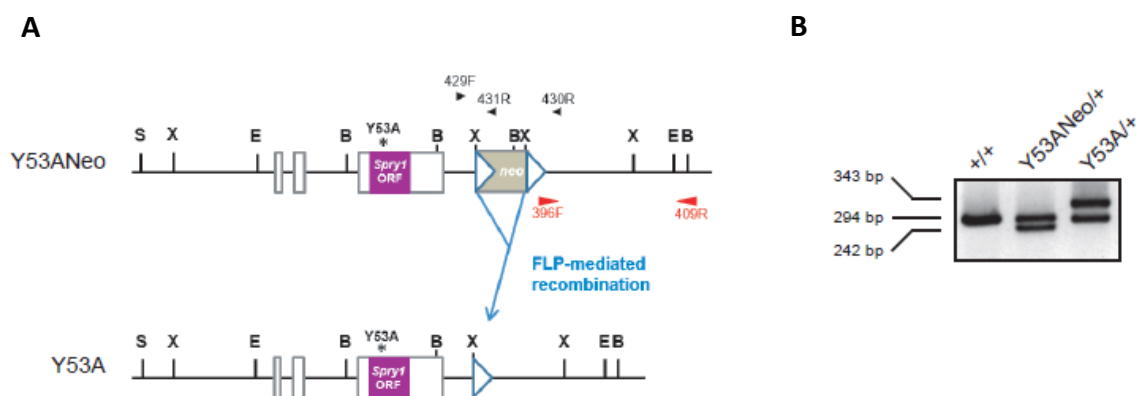
C



**Figura 45.** Els ratolins  $Spry1^{Y53ANeo/Y53ANeo}$  presenten una reducció de mida i pes en el moment del deslletament. (A) Freqüències al·lèliques dels genotips indicats dels mascles (taula superior) i de les femelles (taula inferior) en el moment del deslletament. (B) Panell superior, Whisker plot del pes dels ratolins mascle de tres setmanes dels genotips indicats ( $p=0.0008$ , t-test) Panell inferior, Whisker plot dels ratolins femella de tres setmanes dels genotips indicats ( $p=0.0045$ , t-test). (C) Imatge d'un ratolí wild-type (esquerra) i un ratolí knockin de *Spry1* (dreta) de tres setmanes d'edat.

### 1.5 L'eliminació de la *cassette* Neo revela un paper de dominant negatiu de la mutació *Spry1* Y53A *in vivo*

El fet de no observar diferències entre els nivells de proteïna de *Spry1* de ratolins *Spry1*<sup>Y53ANeo</sup> i *wild-type* de la mateixa camada va ser en certa manera sorprenent, a que s'ha demostrat que aquesta tirosina regula la degradació proteosomal de *Spry2* mitjançant la unió de c-Cbl (Rubin et al., 2003; Hall et al., 2003; DaSilva et al., 2006), i *Spry1* també conté un lloc d'unió canònic de c-Cbl al voltant de la tirosina 53 (Guy et al., 2009). Per analitzar si la presència de la *cassette* Neo podia estar interferint en la expressió correcta de la proteïna, vam crear ratolins *Spry1*<sup>Y53ANeo/+</sup> amb ratolins que expressaven Flpe per eliminar la *cassette* Neo (Figura 46).

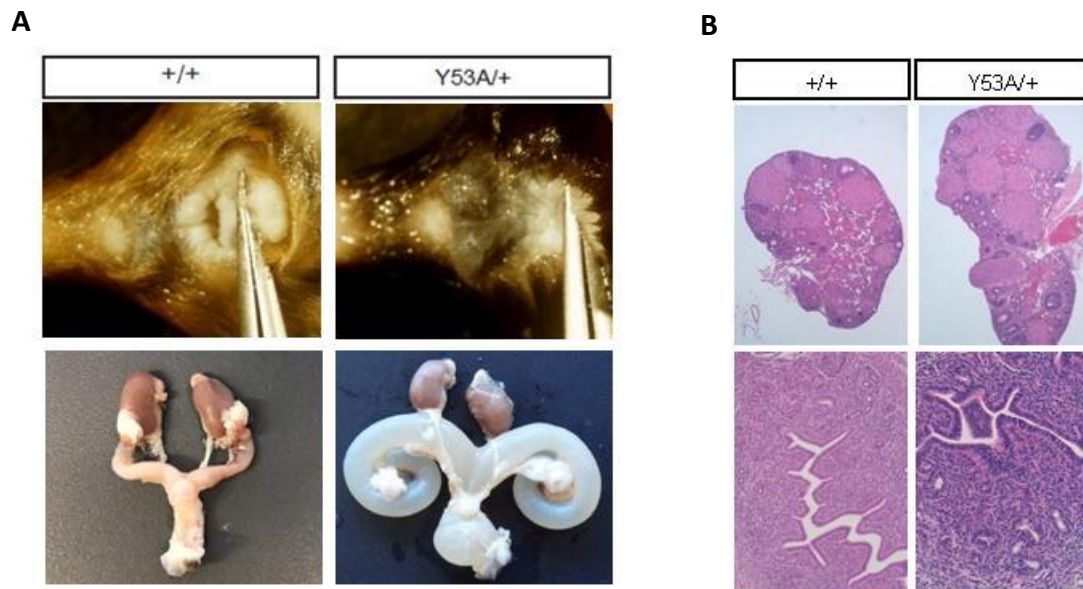


**Figura 46.** Generació de l'al·lel *Spry1*<sup>Y53A</sup> en ratolí. (A) Representació esquemàtica de l'al·lel *Spry1*<sup>Y53ANeo</sup> i de l'al·lel *Spry1*<sup>Y53A</sup> després d'eliminar la *cassette* PGKneo mitjançant el creuament de la soca *Spry1*<sup>Y53ANeo</sup> amb el ratolí deleter Flpe. (B) Imatge del resultat de l'electroforesi del genotipatge de ratolins dels genotips indicats.

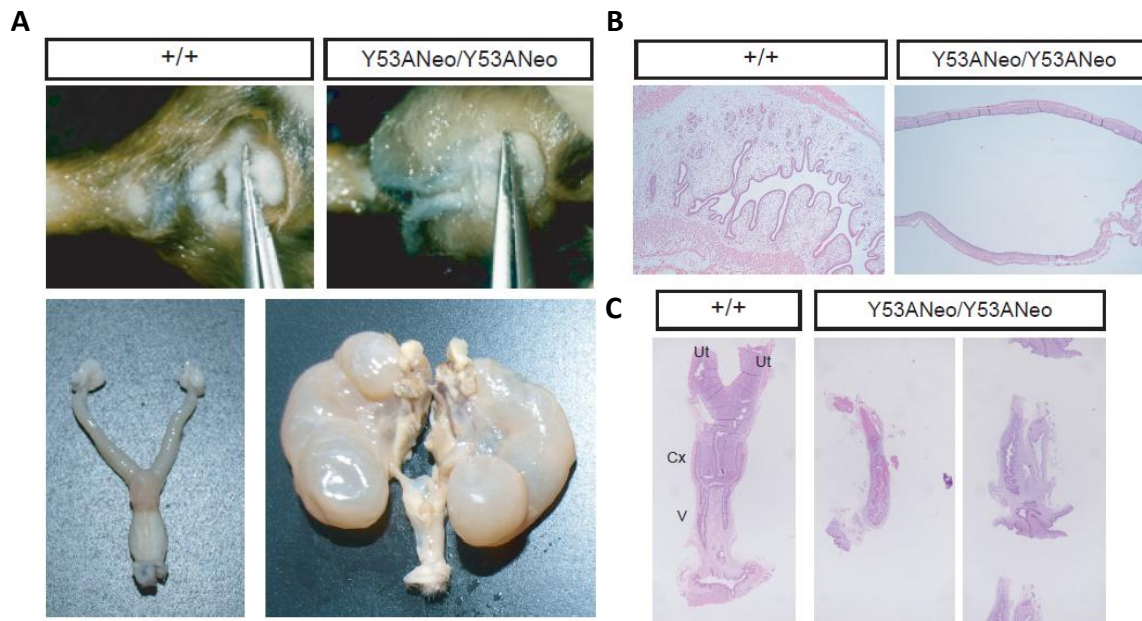
La seva descendència es va creuar amb ratolins *wild-type* C57BL/6 per segregar l'al·lel Flpe donat que aquesta soca de Flpe dona lloc a mosaïcisme. Els ratolins que eren portadors de l'al·lel ΔNeo i havien perdut l'al·lel Flpe (*Spry1*<sup>Y53A/+</sup>) es van creuar entre ells per obtenir ratolins *knockin* homozigots, però cap dels creuaments va produir una sola camada.

L'examen macrosòpic de les femelles *Spry1*<sup>Y53A/+</sup> va revelar que totes elles (n=12) presentaven defectes en l'obertura de la vagina i hidrometrocolpos, un úter massivament engrandit i ple de líquid que ocupava la major part de la cavitat abdominal degut a l'acumulació de secrecions de les glàndules uterines (Figura 47A). Les femelles *Spry1*<sup>-/-</sup> o *Spry1*<sup>Y53ANeo/Y53ANeo</sup> també presentaven la vagina imperforada i mostraven gairebé de forma invariable la presència de banyes uterines cegues amb un epiteli comprimit per l'acumulació de secrecions (Figura 48A i 48B) i una vagina vestigial ("vagina sinus"), curta i cega que recordava a la trobada en els ratolins Tfm (Lyon and Hawkes, 1970), Figura 48C). A diferència de les anteriors, les banyes uterines de les femelles *Spry1*<sup>Y53A/+</sup> es fusionaven correctament entre elles i formaven una vagina anatòmicament normal, amb les seves porcions superiors formant correctament un cervix (Figura 49E i 49F). No obstant això, l'anàlisi histològic d'aquestes vagines va revelar que

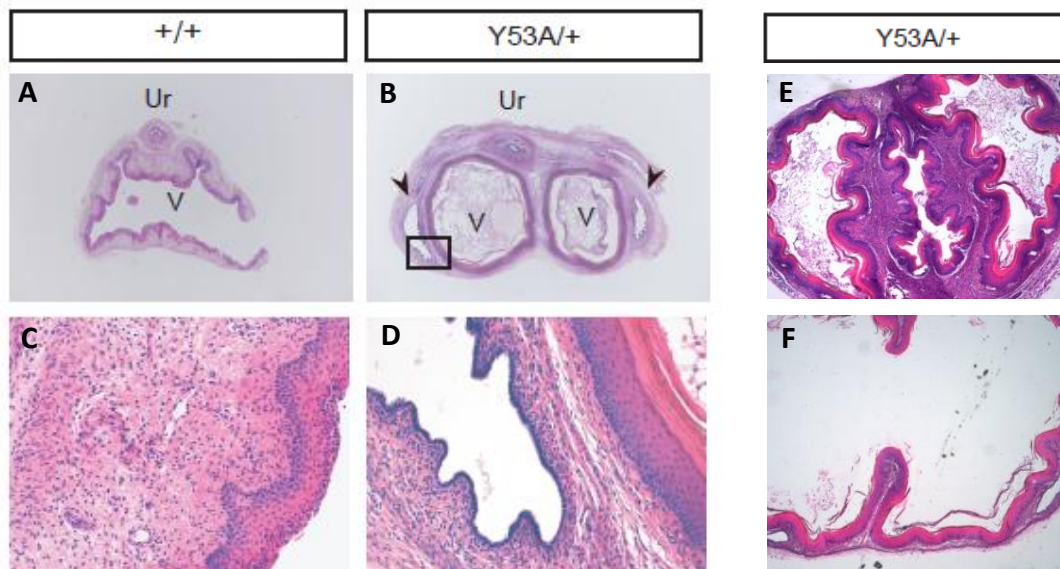
acabaven cegues i que presentaven un septe caudal que de vegades resultava en la formació d'una vagina completament duplicada (Figura 49B). En tots els casos les parets vaginals presentaven un parell de cavitats cístiques que es trobaven paral·lelament al lumen de la vagina i que estaven formades per un epitelí monoestratificat cúbic semblant als conductes de Gartner, romanents del conducte de Wolff que ocasionalment es troben a les parets caudals de la vagina en humans (Gartner ducts, fletxes negres Figura 49B i 49D). L'obertura de la vagina en ratolí és un procés dependent d'estrogens, que promouen la formació de l'orifici vaginal per apoptosi durant la pubertat. L'epitelí vaginal de les femelles *Spry1*<sup>Y53A/+</sup> era aparentment normal i presentava totes les fases del cicle estral. A més a més, l'epitelí uterí era normal i contenia glàndules endometrials correctament formades i els ovaris presentaven les estructures fol·liculars pròpies de les diferents fases del cicle ovàric (Figura 47C). Aquestes observacions suggereixen producció normal d'estrògens als ratolins *Spry1*<sup>Y53A/+</sup>.



**Figura 47.** Les femelles *Spry1*<sup>Y53A/+</sup> exhibeixen defectes en l'obertura de la vagina. (A) Imatges representatives de l'obertura vaginal i del sistema genitourinari de femelles de tres mesos d'edat dels genotips indicats. (B) Tincions d'hematoxilina-eosina de seccions de l'ovari i úter de femelles de tres mesos dels genotips indicats.

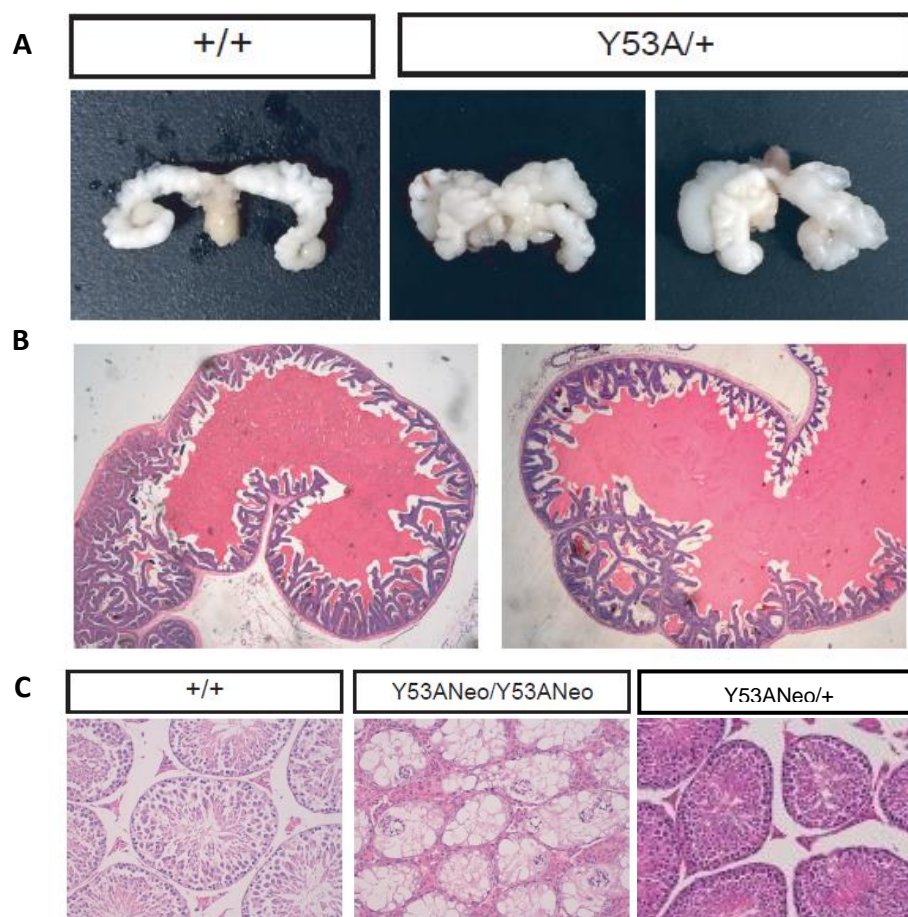


**Figura 48.** Les femelles  $Spry1^{Y53ANeo/Y53ANeo}$  exhibeixen defectes en l'obertura de la vagina. (A) Imatges representatives de l'obertura vaginal i del sistema reproductor de cinc setmanes d'edat dels genotips indicats. (B) Seccions d'endometri dels genotips indicats tenyides amb hematoxilina-eosina. (C) Seccions transversals de la vagina dels genotips indicats tenyides amb hematoxilina-eosina. Abreviatures: Cx, cèrvix; Ut, úter; V, vagina.



**Figura 49.** Les femelles  $Spry1^{Y53A/+}$  exhibeixen defectes en els genitals interns. (A,B) Tincions d'hematoxilina-eosina de seccions de la part caudal de la vagina de femelles de cinc setmanes d'edat dels genotips indicats. (C,D) Imatges a major augment de l'epiteli vaginal i d'un Gartner cyst. (E,F) Seccions tenyides amb hematoxilina-eosina de la zona del cèrvix. Les fletxes negres senyalen els Gartner cysts i el quadre negre la zona ampliada en la imatge D. Abreviatures: V, vagina; U, uretra.

D'altra banda, els mascles  $Spry1^{Y53A/+}$  tot i que no presentaven defectes evidents en els genitals externs, eren estèrils en la majoria de casos (6 de 7 animals analitzats) ja que eren incapaçs de produir descendència quan els creuàvem repetidament amb femelles *wild-type*. Un dels defectes observats en els mascles nounats  $Spry1^{-/-}$  i  $Spry1^{Y53ANeo/Y53ANeo}$  era l'emplaçament ectòpic dels testicles, aquest defecte impedia el descens dels testicles durant la pubertat i per tant, acabava desembocant en una reducció severa del número d'espermatozoides (Figura 50C). Els mascles  $Spry1^{Y53A/+}$  presentaven testicles normals que havien descendit correctament des de la cavitat abdominal. L'epidídim i el conducte deferent presentaven una morfologia normal, però les vesícules seminals estaven duplicades en 20 de 21 animals (95%, Figura 50A). L'examinació microscòpica de les vesícules seminals mostrava una histologia normal i cap defecte més enllà de la pròpia duplicació d'aquestes (Figura 50B). És important remarcar que a diferència dels ratolins  $Spry1^{-/-}$  o  $Spry1^{Y53ANeo/Y53ANeo}$ , els ronyons i els tractes urinaris inferiors dels ratolins  $Spry1^{Y53A/+}$  eren normals, indicant que els defectes observats en els genitals interns no eren secundaris a defectes en la formació de la gemma uretèrica o en la maduració de l'urèter.



**Figura 50.** Els mascles  $Spry1^{Y53A/+}$  exhibeixen defectes en els genitals interns. (A) Imatges macroscòpiques de les vesícules seminals de mascles de cinc setmanes d'edat dels genotips indicats. (B) Tincions d'hematoxilina-eosina de seccions de vesícules seminals dels genotips indicats. (C) Tincions d'hematoxilina-eosina de seccions de testicle dels genotips indicats.

Aquestes observacions ens van portar a realitzar un anàlisi exhaustiu dels genitals interns dels ratolins  $Spry1^{Y53ANeo/+}$ , ja que aquests defectes ens havien passat inadvertits. Pel que fa a les femelles, menys d'un 20% (n=37) presentaven vagines cegues i septades amb hidrometrocolpos, mentre que prop d'un 30% (n=43) dels mascles exhibien vesícules duplicades. La resta dels animals  $Spry1^{Y53ANeo/+}$  eren normals. Per altra banda, els ratolins  $Spry1^{+/-}$  només presentaven vesícules duplicades en aproximadament el 10% dels casos (n=9), mentre que els genitals interns de totes les femelles analitzades (n=20) era normal. Així doncs, la presència de la mutació Y53A provocava l'aparició d'un fenotip als genitals interns amb una penetrància molt més gran que als heterozigots per a la mutació nul·la, suggerint un paper de dominant negatiu per a aquest mutant puntual. Cal dir però que el fons genètic dels tres fenotips analitzats ( $Spry1^{+/-}$ ,  $Spry1^{Y53ANeo/+}$  i  $Spry1^{Y53A/+}$ ) era lleugerament diferent, sent en els dos primers cassos una barreja d'aproximadament 50% entre C57BL/6 i 129Sv, mentre que l'eliminació de la *cassette* Neo comportava el retrocreuament durant dues generacions amb *background* pur C57BL/6, donat que els ratolins Flpe estaven en aquest fons genètic. Per aquest motiu vàrem analitzar l'efecte del *background* genètic en l'aparició d'aquests defectes en els genitals interns. Com es pot apreciar a la taula 10, la freqüència dels defectes als genitals interns a ratolins  $Spry1^{+/-}$  en un fons C57BL/6 pur (N>10) incrementava a aproximadament un 40%, lluny però del fenotip totalment penetrant observat en ratolins  $Spry1^{Y53A/+}$ . En conclusió, la mutació de la tirosina 53 de  $Spry1$  es comporta com una mutació dominant negativa durant el desenvolupament dels genitals interns, sent els efectes de la mateixa molt més penetrants en un fons C57BL/6.

A part dels defectes en el desenvolupament dels genitals interns en els ratolins  $Spry1^{Y53A/+}$  també vam observar un increment en la penetrància dels defectes renals respecte al ratolí  $Spry1^{+/-}$ , passant d'un 11% a un 30% (Taula 10). A més a més el 12% dels defectes del ratolí  $Spry1^{Y53A/+}$  consistien en hidrourèters bilaterals (Taula 11), característica pròpia dels ratolins  $Spry1^{-/-}$ . Així doncs, aquestes dades ens indicaven una vegada més l'efecte de dominant negatiu de la forma  $Spry1^{Y53A}$  *in vivo*.



Soca	Sexe	% C57BL/6			% C57BL/6		
		n	~50%		n	~100%	
			Genital	Renal		Genital	Renal
Spry1 +/-	Mascles	9	1 (11.1%)	0 (0%)	28	13 (46.4%)	3 (10.7%)
	Femelles	20	0 (0%)	0 (0%)	25	9 (36%)	3 (12%)
	<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>1 (3.4%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>53</b>	<b>22 (41.5%)</b>	<b>6 (11.3%)</b>
Spry1 Y53A/+	Mascles	14	8 (57.1%)	1 (7.1%)	21	20 (95.2%)	5 (23.9%)
	Femelles	23	4 (17.4%)	3 (13%)	12	12 (100%)	5 (41.7%)
	<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>12 (32.4%)</b>	<b>4 (10.8%)</b>	<b>33</b>	<b>32 (97%)</b>	<b>10 (30.3%)</b>
Spry1 Y53ANeo/+	Mascles	43	12 (27.9%)	3 (7%)	8	8 (100%)	2 (25%)
	Femelles	37	7 (18.9%)	3 (8.1%)	14	7 (50%)	3 (21.4%)
	<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>19 (23.8%)</b>	<b>6 (7.5%)</b>	<b>22</b>	<b>15 (68.2%)</b>	<b>5 (22.7%)</b>

Taula 10. Efecte del fons genètic i de la *cassette* Neo sobre les freqüències de les anomalies genitals i renals.

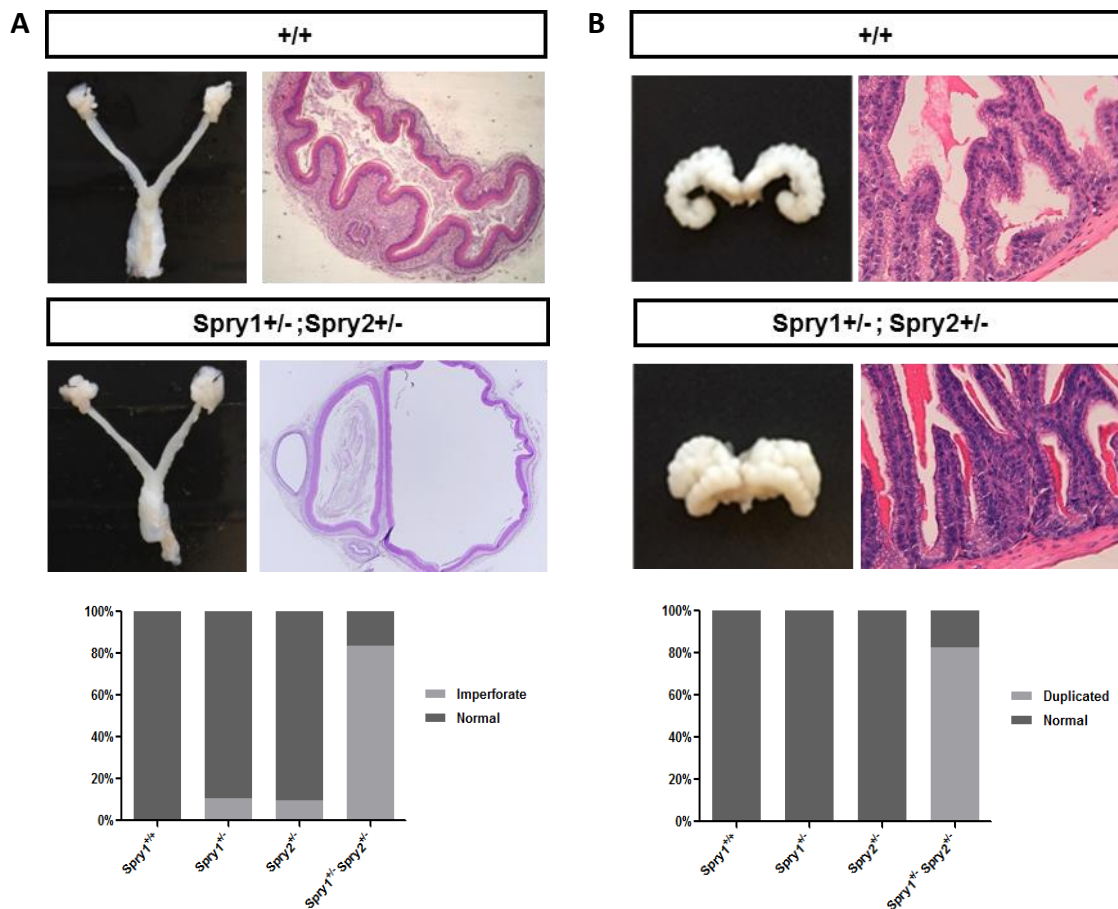
Soca	Sexe	% C57BL/6			% C57BL/6		
		n	~50%		n	~100%	
			Defectes renals			Defectes renals	
			Unilateral	Bilateral		Unilateral	Bilateral
Spry1 +/-	Mascles	9	0 (0%)	0 (0%)	28	3 (10.7%)	0 (0%)
	Femelles	20	0 (0%)	0 (0%)	25	3 (12%)	0 (0%)
	<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>53</b>	<b>6 (11.3%)</b>	<b>0 (0%)</b>
Spry1 Y53A/+	Mascles	14	1 (7.1%)	0 (0%)	21	2 (9.5%)	3 (14.3%)
	Femelles	23	3 (13%)	0 (0%)	12	4 (33.3%)	1 (8.3%)
	<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>4 (10.8%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>33</b>	<b>6 (18.2%)</b>	<b>4 (12.1%)</b>
Spry1 Y53ANeo/+	Mascles	43	2 (4.7%)	1 (2.3%)	8	2 (25%)	0 (0%)
	Femelles	37	3 (8.1%)	0 (0%)	14	3 (21.4%)	0 (0%)
	<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>5 (6.25%)</b>	<b>1 (1.3%)</b>	<b>22</b>	<b>5 (22.7%)</b>	<b>0 (0%)</b>

Taula 11. Detall dels defectes renals en funció del fons genètic i de la *cassette* Neo.

Pel que fa a la *cassette* Neo vam observar que també juga algun rol en la susceptibilitat dels ratolins a desenvolupar aquests defectes en el sistema genitourinari. Tal i com es pot apreciar en la Taula 10 l'anàlisi de la presència de la *cassette* Neo en el total dels animals sembla que disminuïxi la incidència tant dels defectes genitals com renals independentment del fons genètic en que ens trobem. Però a l'analitzar les dades amb deteniment s'observen diferències entre sexes que es capgiren quan es canvia de fons genètic. Malgrat que desconeixem el motiu d'aquestes diferències sabem que la presència de la *cassette* Neo permet l'expressió de la forma *Spry1* Y53A però, podria estar afectant súbtilment als seus nivells o bé modificant la regulació transcripcional del gen i que aquests canvis en fossin els responsables. Tot i que per aclarir aquest fenomen seria necessari dur-ne a terme un anàlisi més exhaustiu, cal dir que l'efecte de dominant negatiu de la mutació Y53A també es mantenia en els ratolins *Spry1*<sup>Y53ANeo/+</sup> i que per tant l'efecte que pugui tenir la *cassette* Neo no acaba emmascarant la funció de dominant negatiu.

### 1.6 *Spry1* i *Spry2* col·laboren durant el desenvolupament dels genitals interns

Tenint en compte el comportament com a dominant negatiu del mutant *Spry1* Y53A *in vitro* vam explorar la possibilitat que els defectes en els genitals externs dels ratolins *Spry1*<sup>Y53A/+</sup> poguessin ser deguts a la interferència amb altres membres de la família de Sprouty. Per tant, vam creuar ratolins *Spry1*<sup>+/-</sup> amb *Spry2*<sup>+/-</sup> per obtenir animals que fossin doble heterozigots. Quan vam examinar els genitals externs de catorze femelles *Spry1*<sup>+/-</sup> ; *Spry2*<sup>+/-</sup> vam observar que onze d'elles (78%) presentaven vagina imperforada amb hidrometrocolpos, tot i mostrar una correcta formació dels ronyons i dels tractes urinaris inferiors (Figura 51A). D'altra banda, els mascles doble heterozigots presentaven les vesícules seminals duplicades en 17 de 20 (85%) casos, sense mostrar cap altra anormalitat aparent en els testicles, epidídim i conductes deferents (Figura 51B). En aquesta sèrie d'experiments tal i com es pot observar en els gràfics de la Figura 51, la freqüència de defectes als genitals interns en les femelles *Spry1*<sup>+/-</sup> va ser de prop del 10% (6 animals de 50), però no es va detectar cap mascle *Spry1*<sup>+/-</sup> amb vesícules seminals duplicades (n=30). Pel que fa als ratolins *Spry2*<sup>+/-</sup>, tots els mascles analitzats van resultar normals (n=12), mentre que un 9.5% de les femelles presentaven vagines septades (n=19). Així doncs, l'eliminació d'un al·lel de *Spry1* i *Spry2* resultava en un gran percentatge d'animals que exhibien un fenotip genital idèntic a l'observat en els ratolins *Spry1*<sup>Y53A/+</sup>, suggerint que l'expressió de l'al·lel *Spry1* Y53A actua com a dominant negatiu durant el desenvolupament dels genitals interns.

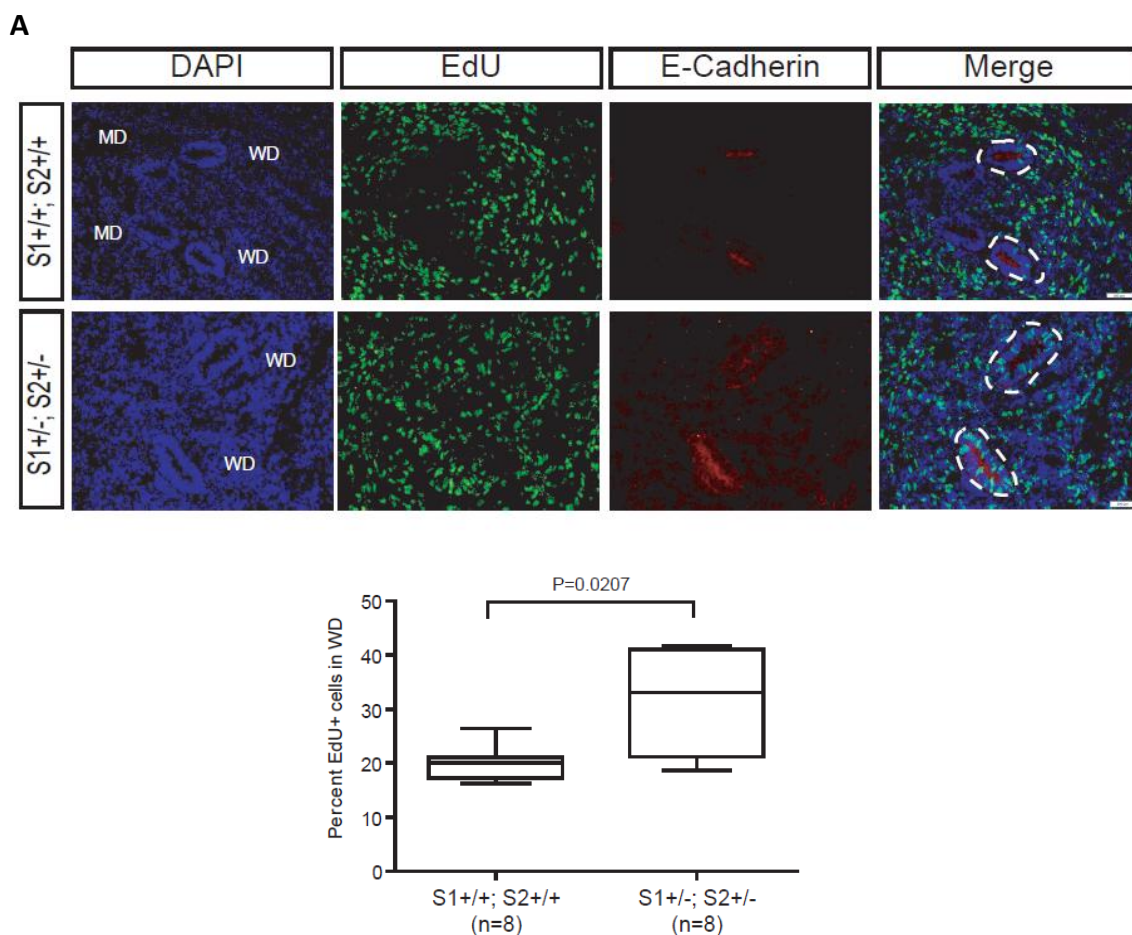


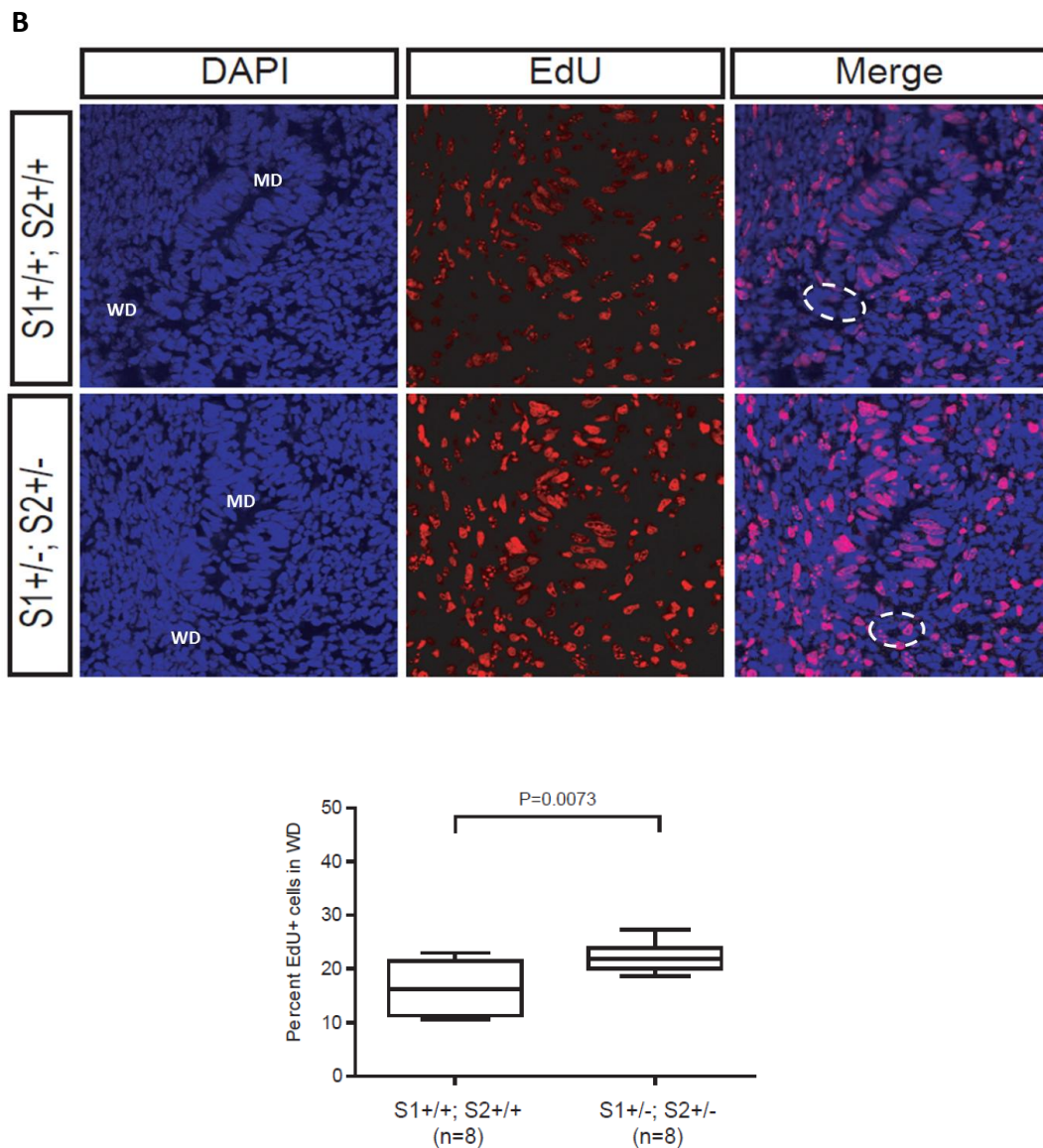
**Figura 51.** Els ratolins  $Spry1^{+/-}; Spry2^{+/-}$  presenten els mateixos defectes en els genitals interns que els ratolins  $Spry1^{Y53A/+}$ . (A) A dalt, imatges macroscòpiques i seccions d'hematoxilina-eosina del tracte reproductor femení dels ratolins dels genotips indicats de cinc setmanes d'edat. A baix, gràfic de barres apilades de les freqüències de vagina imperforada en les femelles dels genotips indicats. (B) A dalt, imatges macroscòpiques i seccions d'hematoxilina-eosina de les vesícules seminals. A baix, gràfic de barres apilades de les freqüències de duplicació de la vesícula seminal en ratolins de cinc setmanes dels genotips indicats.

### 1.7 La formació incorrecta dels genitals interns dels ratolins $Spry1^{+/-}; Spry2^{+/-}$ pot ser conseqüència dels defectes en la morfogènesi de la part caudal del conducte de Wolff

Tot i que l'origen del desenvolupament de la vagina tal i com hem comentat a la introducció ha estat motiu de controvèrsia des de fa molts anys, estudis recents de rastreig de llinatge en ratolí indiquen que l'epiteli la vagina adulta deriva completament dels conductes de Müller. Els conductes de Müller es fusionen entre ells en el pla mig del cos del ratolí aproximadament al voltant del dia E16.5, contacten amb el sinus urogenital i aleshores creixen caudalment fins que assoleixen la superfície perineal. Els conductes de Wolff no contribueixen a la formació de l'epiteli vaginal adult però tenen un paper com a guia durant el desenvolupament de la vagina

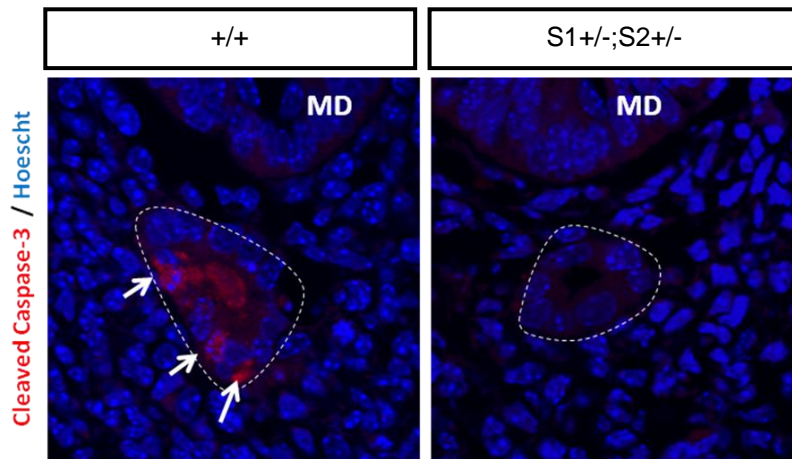
Mülleriana, ja que la seva porció més caudal és fàcilment identificable en la unió del sinus urogenital amb la vagina Mülleriana, zona a partir de la qual aquesta última s'elonga. No obstant, només restes dels conductes de Wolff estan presents en les parets de l'extrem distal de la vagina dels ratolins recent nascuts, formant en condicions patològiques el que es coneix com quists de Gartner. Dades d'expressió de la literatura indiquen que *Spry1* i en menor grau *Spry2* s'expressen en el conducte de Wolff però no en el de Müller en estadis primerencs de desenvolupament (E11.5-E12.5). Curiosament, des de E18.5 fins al naixement el WD estava present al llarg de pràcticament tota la vagina Mülleriana en els ratolins doble mutants, però només el trobàvem en l'extrem distal d'alguns ratolins *wild-type*. No vam observar diferències morfològiques en el WD o MD de ratolins *wild-type* i doble mutants en estadis primerencs de desenvolupament. Seguidament vam analitzar si un increment en la proliferació de les cèl·lules epitelials de la part caudal del conducte de Wolff podia ser responsable dels defectes trobats ens els genitals interns tant en els ratolins *Spry1*<sup>Y53A/+</sup> com en els *Spry1*<sup>+/-</sup>; *Spry2*<sup>+/-</sup>. Per analitzar la proliferació d'aquestes cèl·lules *in vivo* vam injectar intraperitonealment femelles embarassades a dia E14.5 i E15.5 amb 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU), vam extreure els embrions i vam tenyir les cèl·lules positives per aquest marcador de proliferació en seccions seriades d'embrions *wild-type* i *Spry1*<sup>+/-</sup>; *Spry2*<sup>+/-</sup> d'una mateixa camada. Tal i com s'observa en la Figura 52 els embrions doble heterozigots mostren un increment significatiu en el nombre de cèl·lules epitelials proliferatives del conducte de Wolff caudal tant a E14.5 com a E15.5.





**Figura 52.** L'extrem caudal del conducte de Wolff de les femelles  $Spry1^{+/-}$ ;  $Spry2^{+/-}$  presenta una major proliferació cel·lular. (A) A dalt, imatges representatives de la porció caudal del WD a E14,5. Les cèl·lules en proliferació estan marcades amb EdU (verd), amb vermell s'observa la E-cadherina i els nuclis s'han tenyit amb DAPI (blau). A baix, quantificació de les cèl·lules EdU-positives. Whisker plot de la ratio de cèl·lules positives per EdU pel total de cèl·lules de l'epiteli del WD caudal en embrions wild-type i  $Spry1^{+/-}$ ;  $Spry2^{+/-}$  a E14,5. (B) A dalt, imatges representatives de la part caudal del WD a E15,5. Les cèl·lules en proliferació estan marcades amb EdU (vermell) i els nuclis amb DAPI (blau). A baix, quantificació de les cèl·lules EdU-positives. Whisker plot de la ratio de cèl·lules positives per EdU pel total de cèl·lules de l'epiteli del WD caudal en embrions wild-type i  $Spry1^{+/-}$ ;  $Spry2^{+/-}$  a E15,5. MD, Müllerian duct; WD, Wolffian duct; Línia discontinua, Wolffian duct.

Així doncs, a E14.5 que és l'edat embrionària en la qual els conductes de Wolff haurien d'estar regressant en les femelles, observem un increment en la proliferació de la part caudal de les femelles *Spry1*<sup>+/-</sup>; *Spry2*<sup>+/-</sup>. A més, pràcticament no trobem cèl·lules positives per la forma processada de Caspasa-3 (Figura 53), dada que encaixa perfectament ja que si les cèl·lules estan proliferant no estaran entrant en apoptosi per regressar.



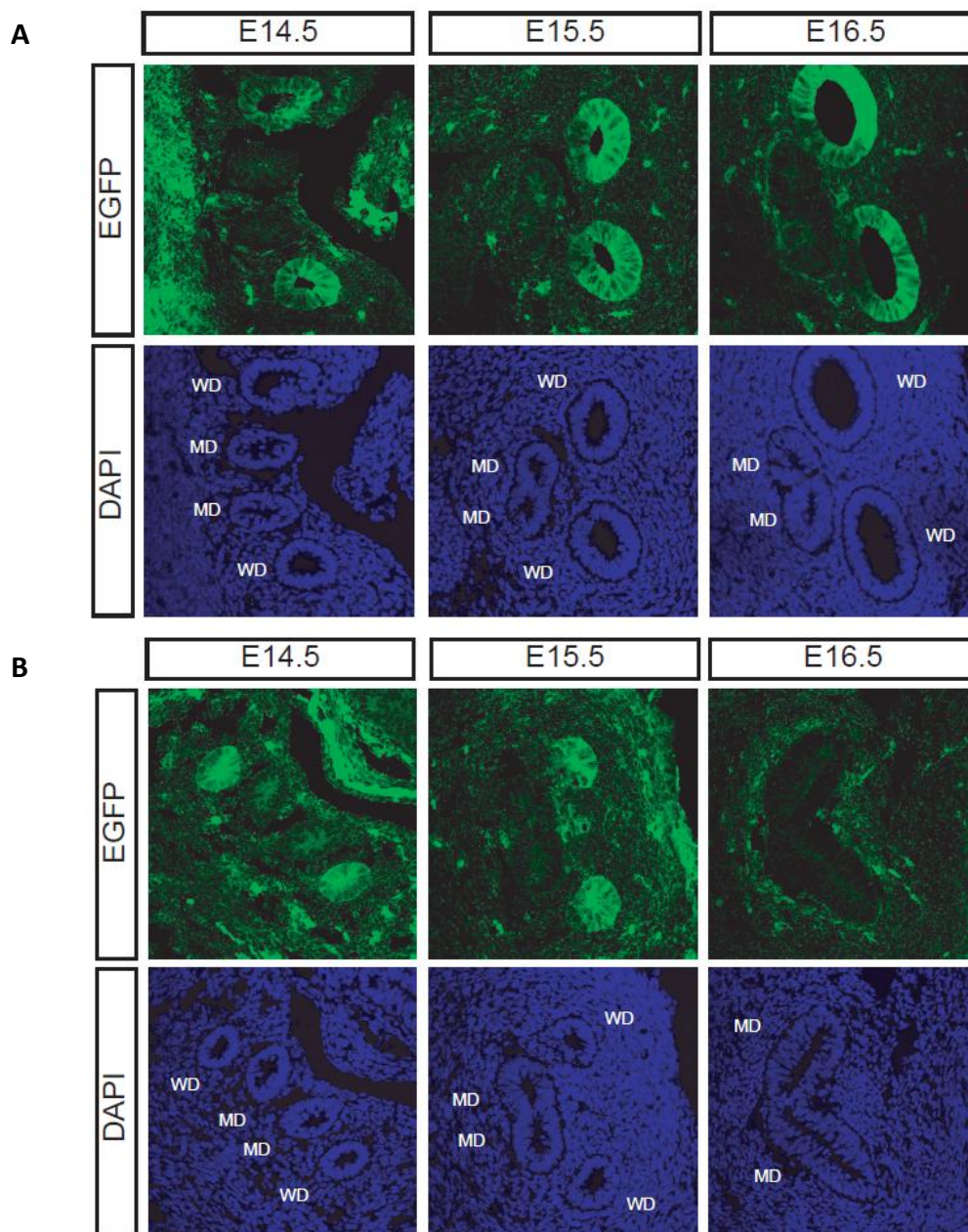
**Figura 53.** Absència de cèl·lules apoptòtiques en el moment de la regressió del conducte de Wolff caudal en les femelles *Spry1*<sup>+/-</sup>; *Spry2*<sup>+/-</sup>. Immunofluorescència contra la caspasa-3 processada (vermell). Els nuclis estan tenyits amb DAPI (blau). Les fletxes blanques senyalen cèl·lules apoptòtiques positives per la caspasa-3 processada. Línia discontinua, Wolffian duct; MD, Müllerian duct.

### 1.8 Els defectes en el conducte de Wolff caudal no són deguts a una hiperactivació de la senyalització de Ret

Donat que *Spry1* antagonitza la senyalització de Ret durant la formació i la ramificació de la gemma uretèrica, vam analitzar si una activitat desregulada de Ret també era responsable d'aquests defectes en els genitals interns. Primerament, vam examinar l'expressió de Ret en els sistema genitourinari utilitzant un model murí *knockin* heterozigot de Ret que expressa una còpia de EGFP al locus de Ret [*Ret*<sup>EGFP/+</sup>, (Hoshi *et al.*, 2012)], permetent-nos així rastrejar fàcilment les cèl·lules expressores de Ret. En el moment del naixement, les cèl·lules que expressaven Ret es trobaven confinades als extrems de les gemmes uretèriques del ronyó sense expressió als urèters ni a la bufeta. A part d'en la innervació que provenia dels ganglis pèlvics no observàvem cèl·lules positives en les vagines de les femelles recent nascudes (Figura 56A). En el cas del mascles, s'observava una feble tinció puntejada dins dels testicles que probablement representaven les cèl·lules germinals, mentre que l'epidídim i el conducte deferent eren negatius per la fluorescència GFP. Curiosament, les vesícules seminals però no la pròstata mostraven una robusta expressió de Ret (Figura 56A).

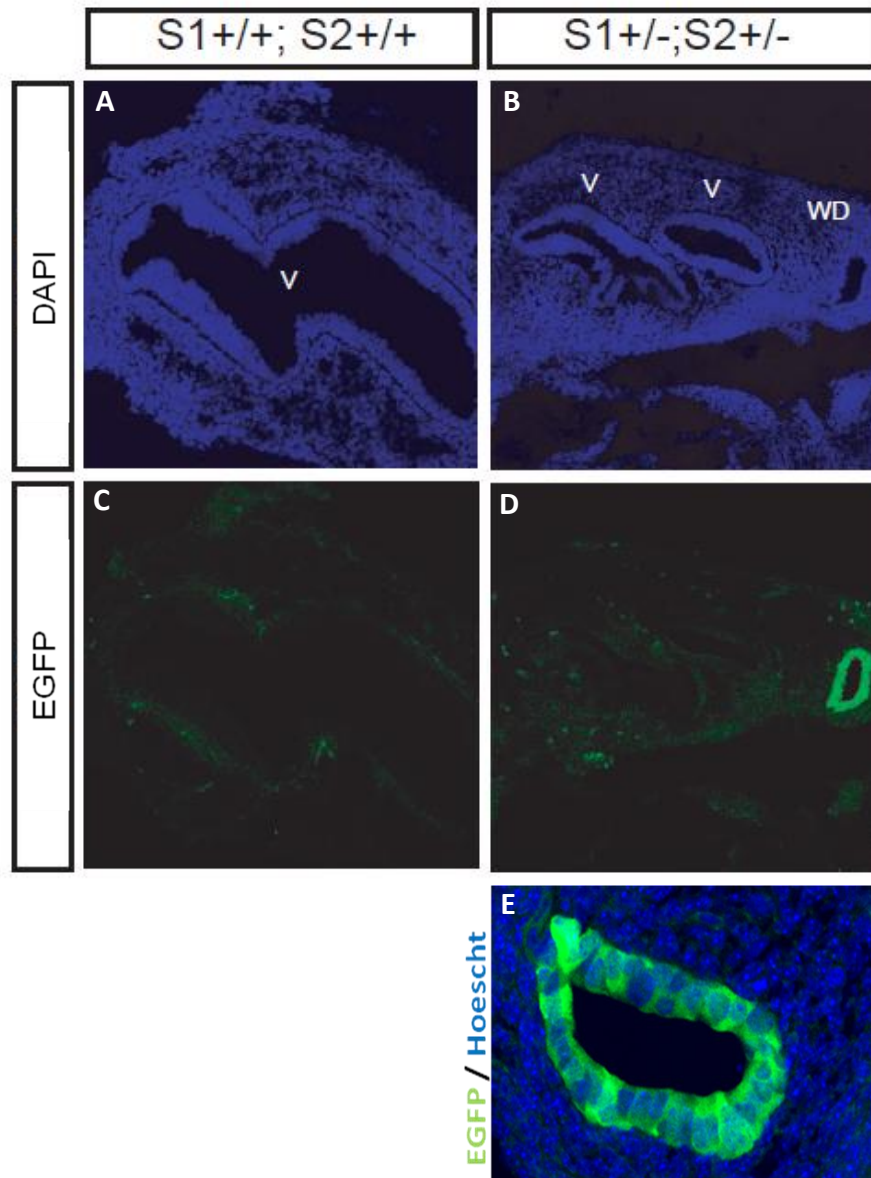
L'expressió de Ret estava present en el conducte de Wolff caudal des de E14.5 fins a E16.5, estadi embrionari durant els quals tenen lloc la fusió dels conductes de Müller i la formació de les vesícules seminals. Aquesta expressió es pot observar en la Figura 54 a través de l'expressió de EGFP en les cèl·lules epitelials del WD tant en embrions mascles com femelles

fins a dia E15.5. A dia E14.5 resulta pràcticament impossible distingir el sexe de l'embrió guiant-nos per la mida dels MD i WD i el patró d'expressió de Ret en el WD d'ambdós sexes també és idèntic. A E15.5 s'observa un augment de la mida dels MD i una reducció de la dels WD en femelles, fenomen contrari al que experimenten els mascles, en els quals incrementa la mida dels WD i en disminueix la dels MD, en aquest estadi embrionari observem expressió de Ret en els WD d'ambdós sexes. En canvi, a dia E16.5 només observem cèl·lules EGFP positives en els mascles ja que el WD ha regressat en les femelles.



**Figura 54.** Ret es troba expressat en la part caudal del conducte de Wolff durant el desenvolupament del sistema genitourinari del ratolí. Imatges de microscòpia confocal de l'expressió d'EGFP en els conductes de Wolff de femelles (A) i de mascles (B) knockin per  $Ret^{EGFP/+}$  de les edats embrionàries indicades. Aquests ratolins expressen EGFP en el locus de Ret i per tant la fluorescència EGFP recapitula fidelment l'expressió de Ret. WD, Wolffian duct; MD, Müllerian duct.

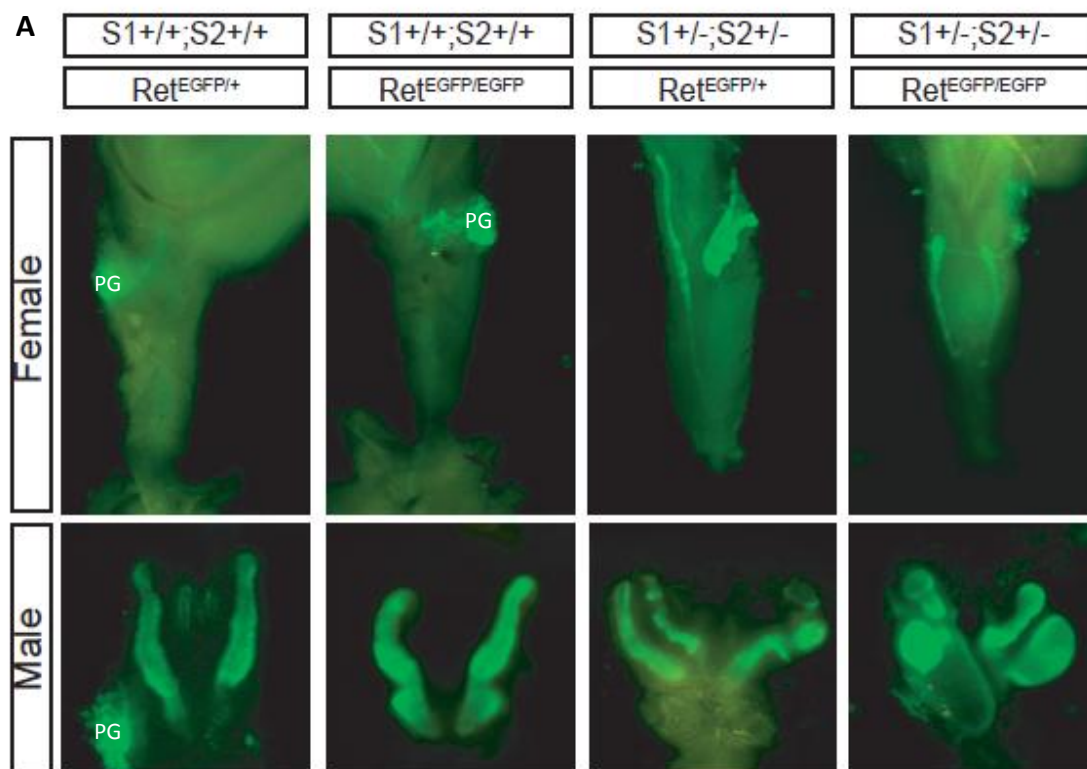
Un cop comprovada l'expressió de Ret en el conducte de Wolff, això ens va permetre utilitzar Ret com a marcador de WD. Així doncs quan vam creuar ratolins Ret<sup>EGFP/+</sup> amb ratolins Spry1<sup>+/-</sup>; Spry2<sup>+/-</sup> i vam analitzar les vagines de les femelles Spry1<sup>+/-</sup>; Spry2<sup>+/-</sup>; Ret<sup>EGFP/+</sup>. Tal i com es pot observar en la Figura 55 els túbuls epitelials que presentaven eren positius per la fluorescència EGFP confirmant així que eren derivats dels conductes de Wolff.



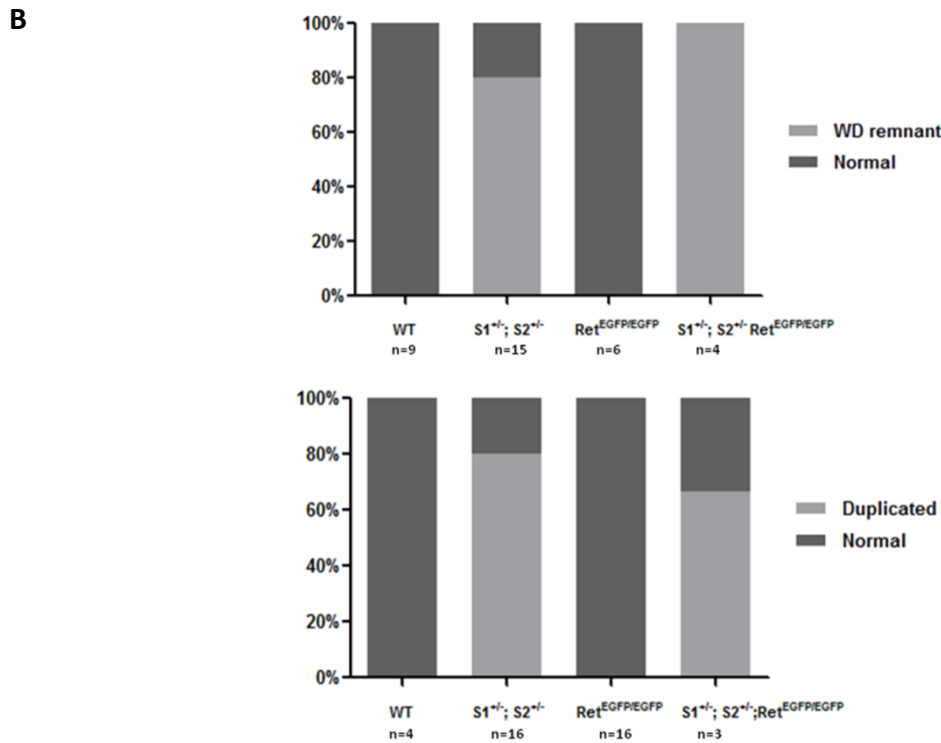
**Figura 55.** Les cavitats cístiques de les vagines de les femelles Spry1<sup>+/-</sup>; Spry2<sup>+/-</sup> són derivats del conducte de Wolff. (A,B) Tinció dels nuclis amb DAPI. La presència de la duplicació de la vagina és evident en la femella doble heterozigota. (C,D) Imatges de fluorescència EGFP de les seccions de vagina dels genotips indicats. S'observa la presència de túbuls epitelials positius per EGFP en les femelles recent nascudes Spry1<sup>+/-</sup>; Spry2<sup>+/-</sup>; Ret<sup>EGFP/+</sup>. (E) Imatge a major augment del Gartner cyst d'una femella doble heterozigota RetEGFP.



A continuació, vam creuar ratolins  $Ret^{EGFP/+}$  per obtenir ratolins *knockout* de *Ret* i analitzar la formació de la vagina i de les vesícules seminals. Aquests animals moren poc després del naixement i per tant no vam poder avaluar si l'obertura vaginal es produïa correctament. No obstant, les porcions caudals de l'úter estaven correctament fusionades i formaven una única cavitat vaginal en el moment del naixement, indicant que *Ret* és dispensable per la formació de la vagina. Encara era més important el fet que no vam identificar restes de conductes de Wolff en la paret vaginal de ratolins  $Ret^{EGFP/EGFP}$  noutats ( $n=6$ ), mentre que aquests romanents estaven clarament presents en les vagines dels ratolins  $Ret^{EGFP/+}; Spry1^{+/-}; Spry2^{+/-}$  ( $n=15$ ) a aquesta edat (Figura 56). A més a més, els mascles noutats exhibien una formació correcta de les vesícules seminals amb una única ramificació a cada banda ( $n=16$ ). Aquestes dades ens indiquen que tot i que *Ret* s'expressa intensament en la part caudal del conducte de Wolff, la seva activitat no és necessària per la formació dels seus derivats. D'altra banda, l'eliminació dels dos al·lells de *Ret* en un context d'heterozigotat de *Spry1* i *Spry2* no rescatava els defectes vaginals ( $n=4$ ) ni la duplicació de les vesícules seminals ( $n=3$ ) (Figura 56). En conjunt, aquestes observacions indiquen que els defectes del conducte de Wolff responsables de les malformacions en els genitals interns presentades pels ratolins  $Spry1^{+/-}; Spry2^{+/-}$  no són degudes a una desregulació de la senyalització per *Ret*.

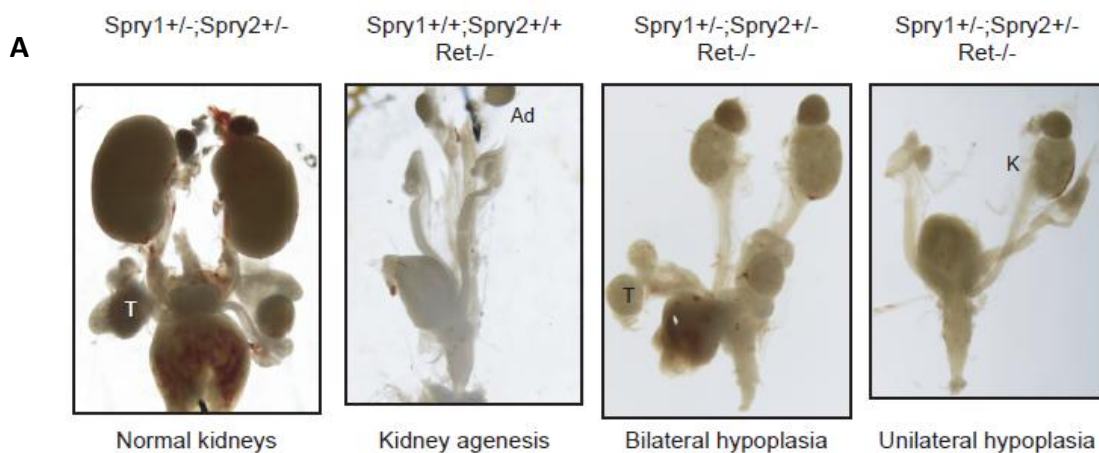


**Figura 56A.** L'ablació dels dos al·lells de *Ret* en el context d'heterozigotat de *Spry1* i *Spry2* no rescata els defectes dels genitals interns. Imatges de vagines i vesícules seminals de ratolins noutats dels genotips indicats. És important assenyalar la presència de romanents del conducte de Wolff i la duplicació de les vesícules seminals en un context  $Spry1^{+/-}; Spry2^{+/-}$ . Abreviatures: PG, Gangli pèlvic.

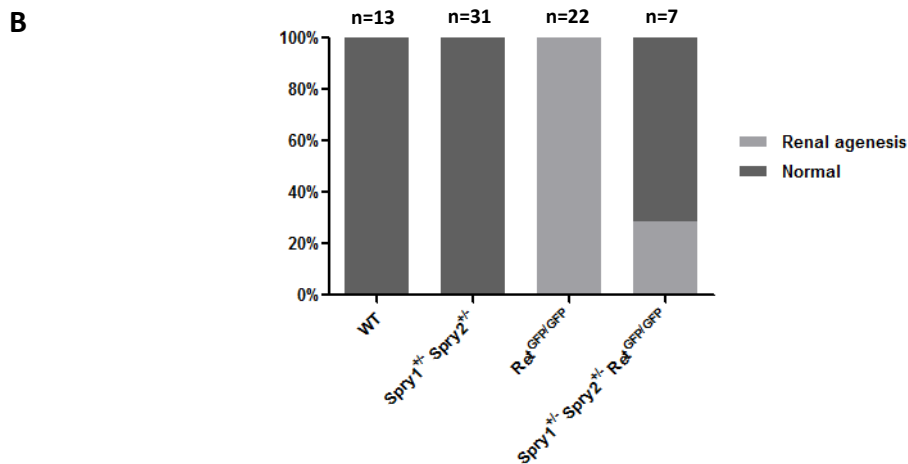


**Figura 56B.** L'ablació dels dos al·lels de Ret en el context d'heterozigotitat de Spry1 i Spry2 no rescata els defectes dels genitals interns. Panell superior, gràfic de barres apilades de la incidència dels defectes en els genitals interns de les femelles dels genotips indicats. Panell inferior, gràfic de barres apilades de la incidència dels defectes en els genitals interns dels mascles dels genotips indicats.

Tot i que els defectes del conducte de Wolff caudal són independents de Ret vam observar un rescat parcial de l'agènesi renal dels ratolins *knockout* de Ret a l'eliminar un al·lel de Spry1 i un al·lel de Spry2 (Figura 57). Aquestes dades reforcen una vegada més l'existència d'un efecte de solapament i cooperació entre els diferents membres de la família de Sprouty, i suggereixen que la formació de l'UB i el desenvolupament de la porció caudal del WD són esdeveniments governats per mecanismes moleculars diferents.



**Figura 57A.** La pèrdua d'un al·lel de Spry1 i un al·lel de Spry2 rescata parcialment els defectes renals del ratolí *knockout* per Ret. Imatges representatives del sistema genitourinari dels ratolins dels genotips indicats. Abreviatures: Ad, adrenal; K, ronyó; T, testicle.



**Figura 57B.** La pèrdua d'un al·lel de *Spry1* i un al·lel de *Spry2* rescata parcialment els defectes renals del ratolí *knockout* per *Ret*. Gràfic de barres apilades de les freqüències dels defectes renals dels mateixos genotips.

### 1.9 *Spry1* i *Spry2* afecten al patró d'expressió de $\beta$ -catenina durant el desenvolupament dels genitals interns

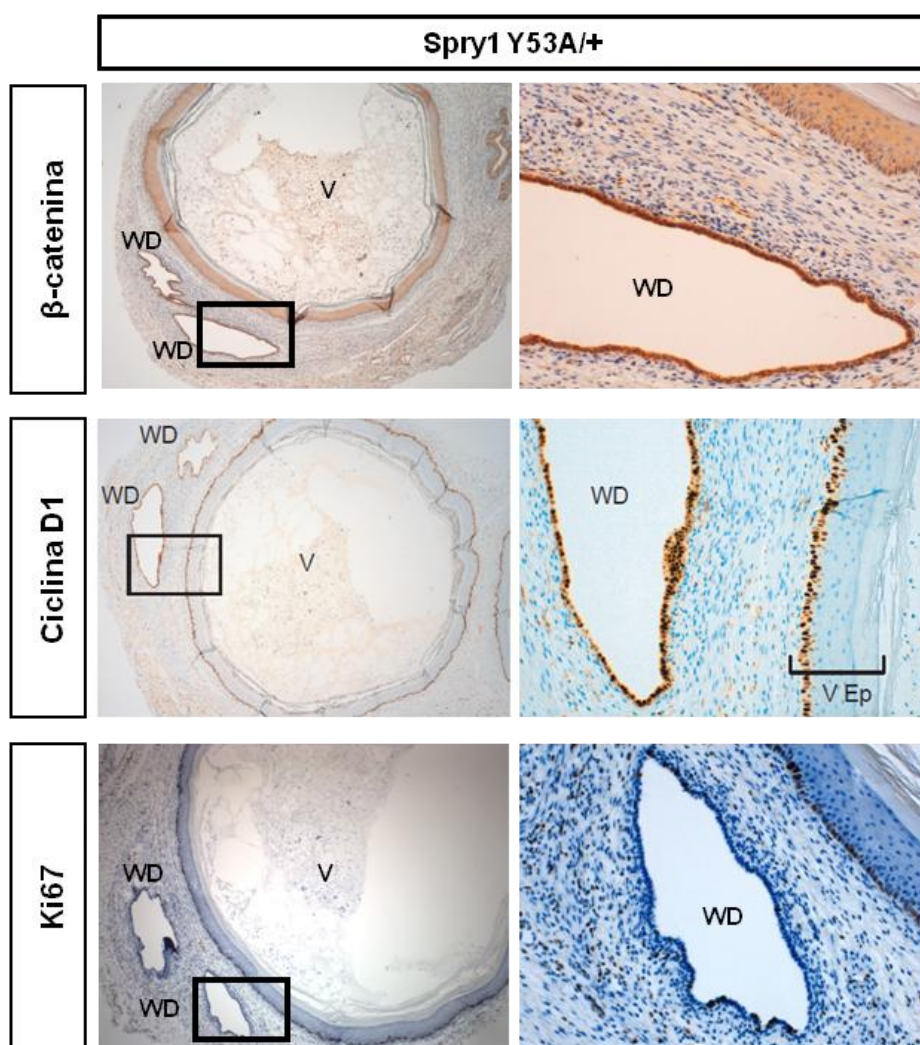
Un cop demostrat que el desenvolupament anòmal del WD en ratolins doble heterozigots per a *Spry1* i *Spry2* era independent de *Ret*, vam realitzar una búsqueda a la literatura per trobar ratolins mutants amb un fenotip similar. Vam trobar que el fenotip del ratolí doble heterozigot era sorprenentment similar al d'un ratolí mutant que expressava una mutació puntual de  $\beta$ -catenina (C429S). El fenotip d'aquest ratolí s'ha identificat recentment mitjançant un rastreig de mutacions d'alt rendiment en ratolins tractats amb el mutàgen ENU. Aquests ratolins tenien un problema d'infertilitat degut a la presència de vagines imperforades i septades en femelles, i vesícules duplicades en els mascles, cal dir que no presentaven cap altra alteració en el sistema genitourinari. Utilitzant una soca de ratolí transgènic reporter *ins-TOPGAL*, els autors van demostrar l'existència d'una activitat ectòpica de  $\beta$ -catenina tant en les restes dels conductes de Wolff de les femelles com en les vesícules seminals dels mascles. Per determinar si els ratolins *Spry1*<sup>+/-</sup> ; *Spry2*<sup>+/-</sup> presentaven un patró similar pel que fa a l'activitat de  $\beta$ -catenina, vam creuar-los amb una soca reportera que expressava LacZ en el locus del gen *Axin2* que és sensible a l'activitat de  $\beta$ -catenina. S'ha descrit que tant la vagina com la vesícula seminal de ratolins *wild-type* presenten activitat *Wnt*/ $\beta$ -catenina (Mehta *et al.*, 2011; Murata *et al.*, 2014), característica que també es pot observar en la Figura 58A i 58E. Un cop generats els ratolins *Spry1*<sup>+/-</sup> ; *Spry2*<sup>+/-</sup> ; *Axin2*<sup>LacZ/+</sup> vam analitzar l'activitat  $\beta$ -catenina del seu tracte reproductor; tal i com es pot veure en la Figura 58B-D els conductes de Wolff residuals presents en la vagina de les femelles *Spry1*<sup>+/-</sup> ; *Spry2*<sup>+/-</sup>, però absents en les de les femelles *wild-type* de la mateixa camada, mostraven una forta tinció X-gal indicant l'expressió

sostinguda de la senyalització Wnt/ $\beta$ -catenina en aquestes estructures. De la mateixa manera, les vesícules seminals ectòpiques dels mascles doble heterozigots també eren positives per l'activitat  $\beta$ -galactosidasa (Figura 58F). Durant l'organogènesi de la vagina i de la vesícula seminal l'activitat de la senyalització de Wnt/ $\beta$ -catenina ha d'estar espacial i temporalment regulada. En aquest context, les nostres dades tot i que de forma preliminar suggereixen que els gens de *Spry1* i *Spry2* poden estar implicats en aquesta regulació.

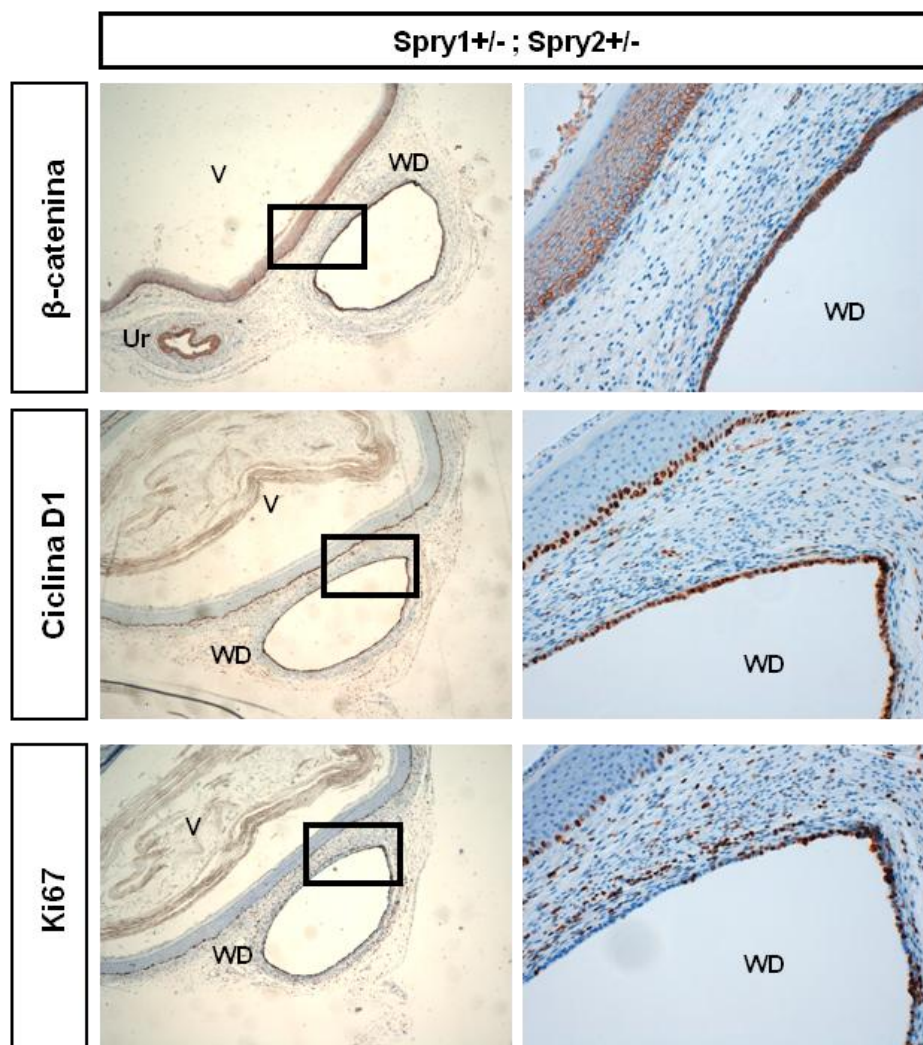


**Figura 58. Senyalització ectòpica de Wnt/ $\beta$ -catenina durant l'organogènesi de la vagina i de les vesícules seminals dels ratolins doble heterozigots de *Spry1* i *Spry2*. (A-D) Tinció X-gal de seccions de vagina dels genotips indicats. C i D mostren imatges a un major augment dels Gartner cysts. (E-F) Tinció X-gal de les vesícules seminals dels genotips indicats. Abreviatures: Ur, uretra; V, vagina.**

Tècniques de tinció immunohistoquímica contra  $\beta$ -catenina van confirmar que les restes dels conductes de Wolff tant dels ratolins *Spry1*<sup>Y53A/+</sup> (Figura 59A i 59B) com de les femelles *Spry1*<sup>+/-</sup>; *Spry2*<sup>+/-</sup> (Figura 61A i 61B) expressaven grans quantitats d'aquesta proteïna. En la Figura 59B i 60B es pot observar com la senyal provinent de l'epiteli del WD és més intensa que la senyal de l'epiteli vaginal adjacent. A més a més, la tinció contra ciclina D1 (Figura 59C-D i 60C-D), un gen diana de l'activitat  $\beta$ -catenina, també va confirmar l'elevada activitat d'aquesta en el WD, així com el sòlid fenotip proliferatiu d'aquestes cèl·lules. Finalment, aquest fenotip proliferatiu es va corroborar mitjançant la tinció contra el marcador de proliferació Ki67 i tal i com s'observa en la Figura 59E-F i 60E-F l'epiteli dels residus dels conductes de Wolff continuen proliferant fins i tot a les cinc setmanes d'edat.



**Figura 59.** Anàlisi de l'expressió de  $\beta$ -catenina i de la proliferació de l'epiteli dels romanents del conducte de Wolff de femelles *Spry1*<sup>Y53A/+</sup> en edat adulta. Imatges representatives de la immunodetecció de  $\beta$ -catenina (A i B), ciclina D1 (C i D) i Ki67 (E i F). El quadre negre senyala la zona de la imatge ampliada en la imatge contigua. Abreviatures: V, vagina; V Ep, Vaginal epithelium; WD, Wolffian Duct.



**Figura 60.** Anàlisi de l'expressió de  $\beta$ -catenina i de la proliferació de l'epiteli dels romanents del conducte de Wolff de femelles  $Spry1^{+/-}$  ;  $Spry2^{+/-}$  en edat adulta. Imatges representatives de la immunodetecció de  $\beta$ -catenina (A i B), ciclina D1 (C i D) i Ki67 (E i F). El quadre negre senyala la zona de la imatge ampliada en la imatge contigua. Abreviatures: V, vagina; V Ep, Vaginal epithelium; WD, Wolffian Duct.



***Discussió***

---





Aquest treball es compon de dos capítols clarament diferenciats, en el primer capítol parlem de la funció de Sprouty1 en el desenvolupament de dos tipus de càncer endocrí com són el carcinoma de tiroide i el feocromocitoma, i en el segon capítol ens centrem en l'estudi del paper de Sprouty1 en el desenvolupament del sistema genitourinari. Tot i que els dos capítols engloben àrees molt diferents (càncer i desenvolupament), el nexa que els uneix és Sprouty, i és que aquest treball és una mostra més de la importància i la rellevància que tenen gens com Sprouty que són considerats reguladors de vies de senyalització iniciades per RTK. Cada cop és més evident que aquestes proteïnes són necessàries tant per mantenir l'homeòstasi cel·lular durant el desenvolupament embrionari com per controlar la formació i el creixement tumoral i, per tant, conèixer els mecanismes moleculars implicats en la seva funció i regulació pot resultar de gran utilitat en l'àmbit terapèutic.

En la primera part del primer capítol confirmem el paper de Sprouty1 com a gen supressor tumoral en la glàndula tiroide *in vivo* mitjançant la inducció del fenotip secretor associat a la senescència a través de l'activació de la via NFκB. I parlem de confirmació perquè en treballs previs del nostre grup (Macià *et al.*, 2012) ja havíem proposat Spry1 com un gen supressor tumoral en el desenvolupament del carcinoma medul·lar de tiroide (MTC). Es va demostrar que Sprouty1 inhibia la proliferació cel·lular d'una línia de MTC tant *in vitro* com en el creixement de xenògrafs *in vivo* induint senescència cel·lular; a més es va descriure que mostres de tiroide de pacients amb MTC presentaven nivells baixos de Sprouty1 que es correlacionaven amb la hipermetilació del promotor i també que els ratolins *knockout* per Sprouty1 desenvolupaven una hiperplàsia de les cèl·lules C de la tiroide (lesió pre-maligna del MTC) però que fins als cinc mesos d'edat, que és quan moren els ratolins Spry1KO, aquests no desenvolupaven MTC. Així doncs com la manca de Sprouty no és suficient per promoure l'aparició de tumors (almenys fins als cinc mesos) i com ens resultava impossible envellir més els ratolins, el que hem fet en aquest treball és aportar un insult oncogènic creuant els ratolins Spry1<sup>+/-</sup> amb ratolins heterozigots per Pten per analitzar la seva funció de supressor tumoral, a més d'elucidar un mecanisme a través del qual Spry1 promou la inducció de la senescència cel·lular en la glàndula tiroide.

Hem descrit una nova funció de Spry1 en la inducció de la senescència cel·lular, a través d'un mecanisme independent de la via MAPK/ERK. Així doncs, hem demostrat que la pèrdua de Spry1 interromp un bucle de senyalització autocrina reduint la síntesi de IL-6 i consegüentment la fosforilació de STAT3. Tot i que aquestes dades no es mostren en els resultats d'aquest treball es poden trobar en la publicació que recull part dels experiments d'aquesta tesi (Macià *et al.*, 2014). El gen de STAT3 codifica per un factor de transcripció pleiotròpic que regula processos de proliferació, diferenciació i supervivència de diversos tipus cel·lulars. En funció del context i del tipus cel·lular STAT3 pot promoure la transcripció i l'expressió de gens diana com la Ciclina D o c-Myc i induir proliferació, o bé la seva activació pot tenir un efecte citostàtic a través de la inducció d'inhibidors de cicle cel·lular com p21CIP, p27KIP o p14ARF (Smithgall *et al.*, 2000; Bowman *et al.*, 2001). Aquest mecanisme d'acció dual

es reflecteix en els efectes oposats que pot tenir la forma activa de STAT3 en la tumorigènesi. S'ha descrit com un oncogen en diversos tipus de càncer com limfoma o càncer de mama (Bromberg *et al.*, 1999; Chiarle *et al.*, 2005; Ling and Arlinghaus, 2005; Schlessinger and Levy, 2005) però el seu paper com a supressor tumoral també s'ha descrit en glioma, hepatocarcinoma, càncer de mama, càncer de colon, càncer de cap i coll i càncer de tiroide (Dolled-Filhart *et al.*, 2003; De La Iglesia *et al.*, 2008; Musteanu *et al.*, 2010; Pectasides *et al.*, 2010; Schneller *et al.*, 2011; Couto *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012). Curiosament, Couth i el seus col·laboradors han demostrat que el bucle autocrí IL-6/gp130/JAK és responsable de mantenir els nivells alts de la forma fosforilada de STAT3 en línies cel·lulars de carcinoma de tiroide i que la seva activació suprimeix la tumorigènesi.

Les proteïnes STAT no només transmeten una senyal des de la superfície cel·lular al nucli sinó que també participen directament en la regulació gènica (Ihle and Kerr, 1995; Darnell, 1997). L'activació fisiològica de les proteïnes STAT resulta en l'expressió de gens que controlen funcions cel·lulars crítiques com són la proliferació cel·lular, la supervivència, la diferenciació i el desenvolupament, així com també altres funcions cel·lulars especialitzades com les associades a la resposta immune. S'ha descrit que les proteïnes STAT estan implicades en la senyalització a través de diverses citocines com les de la família de la IL-6 (Hirano *et al.*, 1997; Taga and Kishimoto, 1997) i nombrosos factors de creixement com EGF i PDGF (Schindler and Darnell, 1995; Leaman *et al.*, 1996). A diferència del que succeeix durant la senyalització normal on l'activació de les STAT és ràpida i transitòria, la senyalització constitutiva a través de les STAT s'associa amb processos de progressió tumoral.

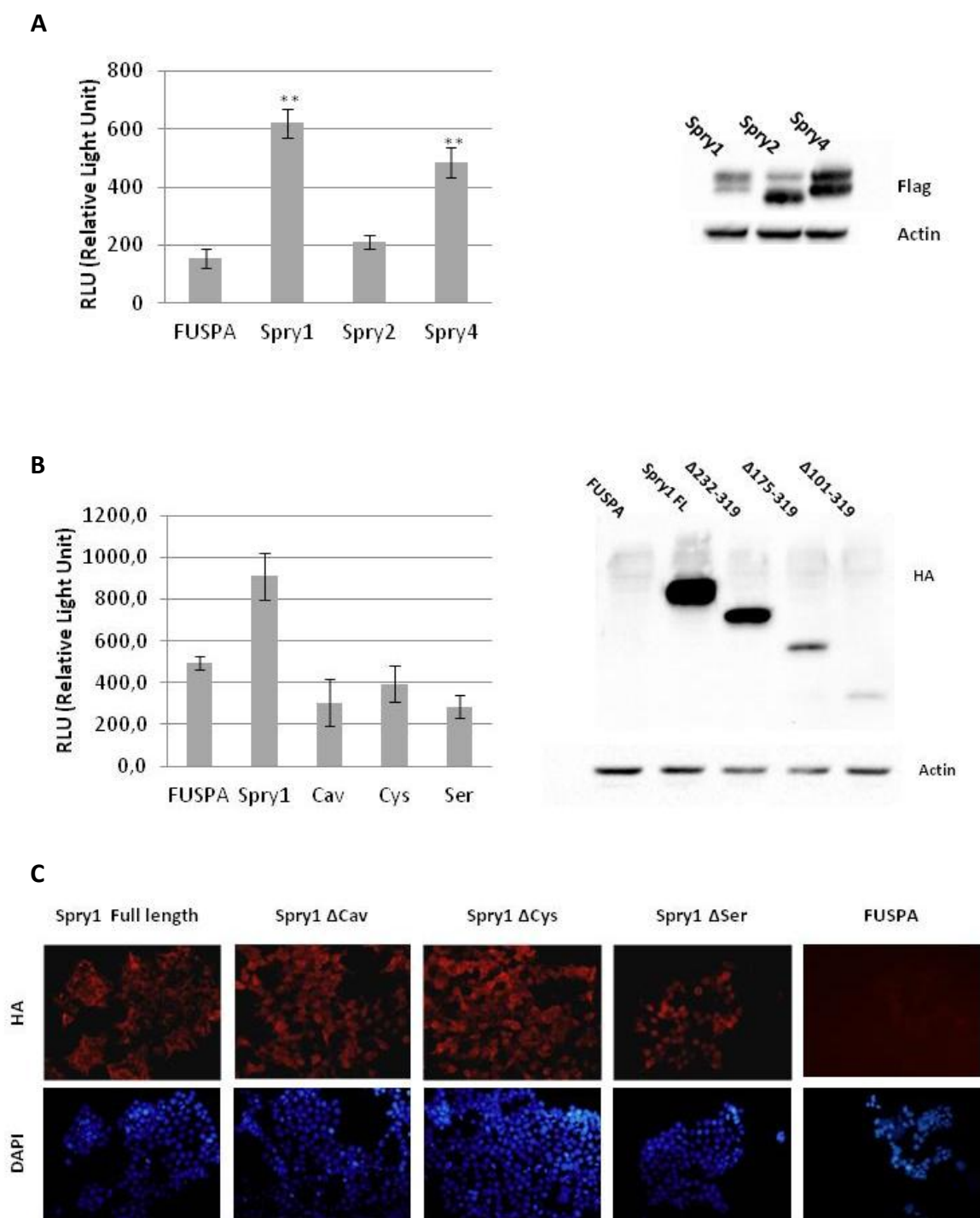
Tot i que els nostres resultats es podrien explicar per la disrupció d'aquest bucle autocrí i els seus efectes en la fosforilació de STAT3, les cèl·lules *knockout* per *Spry1* no només presenten defectes en la secreció de IL-6 sinó que també en presenten en la secreció d'una sèrie de factors que pertanyen al SASP. Alguns d'aquests factors SASP poden induir respostes proliferatives de forma paracrina (Freund *et al.*, 2010), no obstant, a dia d'avui es sap que factors com la IL-6, IL-8 i IGFBP7 tenen una funció en la inducció i el manteniment tant de la senescència replicativa com de la induïda per oncògens (OIS) de manera autocrina (Acosta *et al.*, 2008; Kuilman *et al.*, 2008; Wajapeyee *et al.*, 2008).

S'ha demostrat en diversos treballs que les cèl·lules senescentes poden persistir en l'organisme adult, per exemple en lesions benignes o pre-malignes de la pell com poden ser les pigues i també en teixits normals (Dimri *et al.*, 1995; Campisi, 2005; Jeyapalan *et al.*, 2007). D'acord amb aquestes dades cal destacar que la glàndula tiroide és considerada un òrgan latent, no regeneratiu i amb un recanvi cel·lular molt lent (les cèl·lules fol·liculars s'estima que es divideixen unes cinc vegades durant la vida adulta) i per tant, la presència de cèl·lules senescentes tal i com descrivim és totalment raonable (Dumont *et al.*, 1992).

Un número creixent d'evidències ha relacionat l'activació de la via NFκB amb la inducció de SASP i de la senescència cel·lular (Burgess, 2011; Rovillain *et al.*, 2011; Salminen *et al.*, 2012).

De fet, experiments amb CHIP han demostrat que p65 és el factor de transcripció més abundant que es troba unit a la cromatina senescent (Chien *et al.*, 2011).

La manca d'un mecanisme d'acció universal de les proteïnes de Spry fa més difícil explorar vies i mecanismes candidats a través dels quals Spry1 modula l'activitat NFκB. Degut a la manca de veraders dominis conservats en les proteïnes de Spry, una estratègia que s'ha seguit per intentar elucidar el mecanisme d'acció és la identificació de molècules interactores mitjançant una aproximació de tipus "guilty-by-association" (Guy *et al.*, 2009). D'acord amb aquest raonament, podem proposar una sèrie de mecanismes mitjançant els quals Spry1 podria estar modulant aquesta via. Per exemple, les cèl·lules dendrítiques deficientes per c-Cbl (E3 ubiquitin ligase que interacciona amb Spry) mostren un increment en la secreció de citocines degut a un augment de l'activitat NFκB (Chiou *et al.*, 2011). D'altra banda la proteïna adaptadora CIN85, que també interacciona amb Spry, és necessària per l'activació de la via NFκB en limfòcits B després de l'estimulació del seu receptor (Kometani *et al.*, 2011). Finalment, les cinases de la família de Raf inclouen la proteïna B-Raf s'ha descrit que interaccionen amb Spry1 (Guy *et al.*, 2009) i l'activació de Raf s'ha relacionat mecanísticament amb l'activació de la via NFκB (Liu *et al.*, 2007). Podem concloure que existeixen molts mecanismes potencials pels quals Spry1 pot induir l'activitat NFκB, però requereixen ser investigats en profunditat. En aquest context, dades del nostre grup d'assaigs luciferasa en cèl·lules 293 indiquen que la sobreexpressió de Spry1 i Spry4 però no la de Spry2 provoca un increment de l'activitat NFκB (Figura 61). Tot i que les seqüències de Spry1 i Spry2 són molt similars existeixen diferències subtils com per exemple la presència en l'extrem C-terminal de Spry2 d'un motiu ric en prolines (PxxPxR) que s'ha descrit com un domini d'unió de Grb2 (Guy *et al.*, 2009). L'ús de sistemes més manipulables com l'ús de línies cel·lulars com les 293 ens permeten investigar i analitzar amb més detall aquests mecanismes, ja que mitjançant tècniques de mutagènesi dirigida hem introduït deleccions en diferents dominis de Spry1 per intentar caracteritzar el domini o dominis implicats en l'activació de la via NFκB. Concretament, hem generat tres formes mutants de Spry1: Spry1Δ232-319 (Cav), Spry1Δ175-319 (Cys) i Spry1Δ101-319 (Ser). Aquests mutants consisteixen en l'eliminació consecutiva i additiva des de l'extrem C-terminal de la seqüència que comprèn el domini d'unió a caveolina, el domini ric en cisteïnes i el domini ric en serines, respectivament. La sobreexpressió d'aquests mutants de Spry1 en cèl·lules 293 no activa la via NFκB (Figura 61) suggerint que el domini responsable de l'activitat NFκB es troba entre els aminoàcids 232 i 319. Curiosament, tal i com hem comentat anteriorment és en aquesta part de la seqüència on difereixen les isoformes de Spry1 i Spry2. Així doncs, aquestes dades suggereixen que el motiu responsable de l'activació de la via NFκB es troba en l'extrem C-terminal però cal seguir investigant per afinar i concretar quins són els residus implicats.



**Figura 61. Efecte de la sobreexpressió dels membres de Sprouty en l'activació de la via NFκB.** (A,B) Panell esquerre, assaig luciferasa de l'activitat NFκB en cèl·lules 293 sobreexpressores dels plàsmids indicats. Panell dret, Western blot dels nivells de les isoformes de Sprouty indicades de les cèl·lules utilitzades per l'assaig luciferasa. (C) Imatges representatives de la immunofluorescència contra el tag HA (vermell) dels plàsmids indicats. En blau es mostren els nuclis de les cèl·lules tenyits amb DAPI.

Pel que fa al mecanisme mitjançant el qual l'expressió de Spry1 indueix la senescència cel·lular, a més de la inducció del SASP a través de l'activació de NFκB no podem descartar l'existència d'altres mecanismes alternatius. Per exemple, s'ha demostrat que Spry1 s'uneix a la proteïna adenoviral E1A (Zaremba *et al.*, 2011) i que aquesta proteïna és capaç d'evadir la senescència induïda per Ras. D'altra banda, també s'ha descrit que la cinasa Dyrk1A, un altre interactor de Spry (Edwin *et al.*, 2009; Guy *et al.*, 2009), promou la inducció de la senescència cel·lular a través de la fosforilació de LIN52 i l'assemblatge del repressor transcripcional DREAM (Litovchick *et al.*, 2011).

En aquest primer capítol també hem demostrat com la deleció de Spry1 accelera l'aparició de tumors en la tiroide i també en la glàndula adrenal en un context d'haplinsuficiència per Pten. Aquestes dades concorden amb els treballs de (Patel *et al.*, 2013) i (Schutzman and Martin, 2012) on mostren que la deleció de membres de la família de Spry en ratolins heterozigots per Pten accelera la tumorigènesi de la pròstata. Durant els darrers anys, s'ha confirmat el paper de la OIS com un mecanisme potent contra la progressió i la transformació tumoral *in vivo*. Així doncs, l'expressió en ratolí de la forma activada dels oncògens Ras, E2f3 o B-Raf indueix senescència cel·lular en tumors pre-malignes de pulmó, pàncrees, glàndula mamària, hipòfisi i melanoma. La pèrdua de la resposta senescent induïda per l'ablació genètica de Cdkn2a o Trp53 condueix a la progressió maligna d'aquests tumors (Priour and Peepers, 2008; Collado and Serrano, 2010). De manera similar, la deleció condicional de Pten a la pròstata indueix processos de senescència cel·lular que són sobrepassats amb la deleció concomitant de Trp53 (Chen *et al.*, 2005). És important destacar que el bypass de la OIS i la subseqüent progressió tumoral també pot desencadenar-se degut a l'eliminació de factors SASP o dels seus receptors, aquest mecanisme s'ha demostrat en adenoma de colon, carcinoma de pròstata i melanoma (Acosta *et al.*, 2008; Kuilman *et al.*, 2008; Wajapeyee *et al.*, 2008).

Finalment, hem descrit que mostres de pacients amb adenomes i carcinomes fol·liculars de tiroide mostren una reducció dels nivells de SPRY1 i IL-6 quan els comparem amb teixit normal. D'acord amb les nostres dades també s'ha demostrat que els carcinomes de tiroide ben diferenciats presenten una disminució dels nivells de IL-6, i aquesta reducció es fa més evident a mesura que els tumors progressen cap a carcinomes de tiroides desdiferenciats (Basolo *et al.*, 1998). A més a més, hi ha evidències que apunten a l'existència d'un paper important de IGFBP7 en la OIS i la supressió del carcinoma de tiroide (Vizioli *et al.*, 2010). Els promotors de SPRY1 i SPRY2 s'han trobat hipermetilats en tumors de tiroide (Rodríguez-Rodero *et al.*, 2013).

En conclusió, hem demostrat que Spry1 controla l'entrada en senescència del tiròcits regulant l'aparició del SASP. Curiosament, un estudi mostra com mecanismes de regulació negativa (incloent l'expressió de Spry1) en resposta a l'activació de la via Ras/Raf/ERK són responsables de la resposta senescent (Courtois-Cox *et al.*, 2006). Per tant, seria interessant plantejar que les proteïnes Spry actuen com a sensors de l'activitat mitogènica, però la seva resposta no

només es basa en atenuar la senyalització de les mateixes vies sinó que també poden induir processos de senescència cel·lular per evitar la proliferació descontrolada.

En l'apartat de Spry i càncer també dediquem un espai a l'estudi de la funció de Spry1 en el desenvolupament del feocromocitoma. Avui dia no existeix cura ni un pronòstic fidedigne pel feocromocitoma o marcadors de diagnòstic histopatològic de malignitat, per això establir i estudiar les vies de tumorigènesi i malignitat en el feocromocitoma representa un objectiu important. A més a més, tot i la caracterització de la funcionalitat i del fons genètic d'aquests tumors, i la gran quantitat d'informació disponible sobre la biologia de les cèl·lules cromafines, la raresa d'aquest tipus de tumor fa que els estudis clínics sobre feocromocitoma sovint impliquin grups de casos massa petits que impedeixen assolir resultats concloents.

En línia amb els resultats de càncer de tiroide, hem descrit que la pèrdua de Spry1 en un context d'haploinsuficiència per Pten accelera també la tumorigènesi en la glàndula adrenal. A més, demostrem que no es deu a una pèrdua d'heterozigositat del gen de Spry1, ja que es manté l'al·lel *wild-type* tant a nivell de DNA com de proteïna. Tot i que els criteris de malignitat associats al feocromocitoma no estan clars, alguns autors proposen la mida del tumor, la invasió local o l'índex mitòtic com característiques diferencials entre els tumors benignes i els malignes (Mete *et al.*, 2014). Així doncs, la deleció d'un al·lel de Spry1 promou la formació de tumors més grans en la mèdulla adrenal, amb més mitosis per camp i que envaeixen la càpsula adrenal. Per tant, la manca d'un únic al·lel de Spry1 accelera tant l'aparició del feocromocitoma com la ràtio de creixement dels mateixos.

El mecanisme mitjançant el qual Spry1 reprimeix la proliferació de les cèl·lules del feocromocitoma a dia d'avui encara no està clar, però existeix tota una sèrie de possibilitats que en un futur seria molt interessant explorar. Anàlisis transcriptòmics de mostres humanes de feocromocitomes i paragangliomes revelen l'existència de dos *clusters* diferents caracteritzats per l'expressió de diferents mutacions (Gimenez-Roqueplo *et al.*, 2012). El *Cluster 1* comprèn mutacions en els gens SDHx, FH, VHL o HIF2A i presenta un patró de pseudo-hipòxia caracteritzat pel canvi de fosforilació oxidativa a glicòlisi aeròbica, procés que es coneix com efecte Warburg. En canvi el *Cluster 2* inclou mutacions en RET, NF1, TMEM127 o MAX i mostra una activació aberrant de les vies MAPK i mTOR.

Spry1 i Spry2 antagonitzen la senyalització de Ret durant el desenvolupament renal i del sistema nerviós entèric a través de la inhibició de les vies MAPK i PI3K (Masoumi-Moghaddam *et al.*, 2014). Així doncs, l'activació ectòpica de la via MAPK degut a la pèrdua de Spry1 podria ser un mecanisme interessant d'estudiar en el desenvolupament del feocromocitoma. D'altra banda, tant estudis previs del nostre grup (Macià *et al.*, 2012) com els resultats d'aquest treball en càncer de tiroide senyalen la inducció de senescència cel·lular com un mecanisme de supressió tumoral regulat per Spry1. Per tant, de manera similar la inducció de la senescència cel·lular podria explicar els efectes de Spry1 en el control del desenvolupament del feocromocitoma. D'acord amb aquesta hipòtesi, You i els seus col·laboradors han demostrat

l'increment de la incidència de feocromocitoma en ratolins  $Pten^{+/-}$  als quals se'ls ha deletat el locus  $INK4a/ARF$ , un regulador clau de la senescència cel·lular.

Estudis recents han demostrat que l'escapament de la senescència va acompanyat d'un canvi metabòlic on les cèl·lules passen d'un estat de fosforilació oxidativa a glicòlisi aeròbica (Kaplon *et al.*, 2013), semblant-se més al perfil pseudo-hipòxic del tumors del Cluster 1.

En conclusió, es necessiten més estudis per poder determinar si  $Spry1$  inhibeix el creixement del feocromocitoma mitjançant la inhibició de la via MAPK, a través de la inducció de la senescència cel·lular o bé a partir d'una combinació dels dos mecanismes.



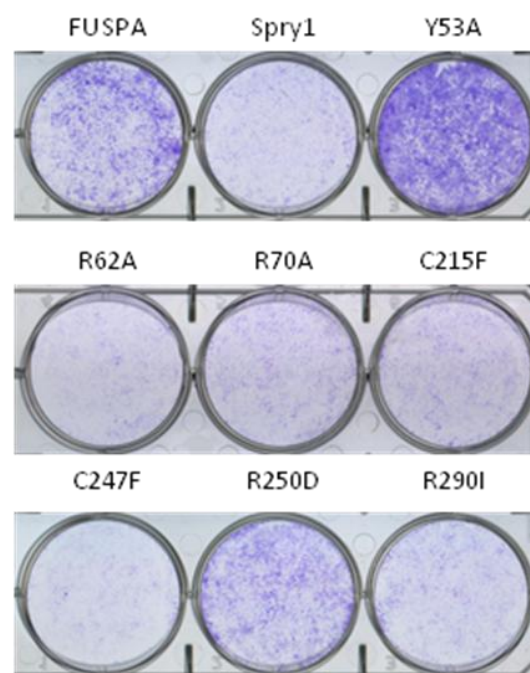
En el segon capítol d'aquesta tesi ens hem centrat en l'estudi de la funció de la tirosina 53 de Spry1 en el desenvolupament del sistema genitourinari. Des de fa més de deu anys es coneix el paper crucial de Spry1 en la formació i ramificació de la gemma uretèrica (Basson *et al.*, 2005; Basson *et al.*, 2006). També s'han descrit diverses vies de senyalització implicades en aquest procés, així com la rellevància de la interacció genètica entre Spry1-Ret-Gdnf (Rozen *et al.*, 2009; Michos *et al.*, 2010). No obstant, a dia d'avui no es coneix un mecanisme d'acció universal de Sprouty. Així doncs, els mecanismes moleculars implicats tant en la regulació de l'activitat de la pròpia proteïna com en el seu mode d'acció continuen sent objecte de controvèrsia. Tal i com hem comentat en la introducció aquests mecanismes varien segons el context i tipus cel·lular, així com també depenen del membre de Sprouty implicat i dels factors de creixement. Nombrosos treballs *in vitro* així com múltiples dades d'estudis de proteòmica han revelat la importància de la tirosina conservada de la regió N-terminal de les proteïnes Sprouty així com la funcionalitat del seu estat de fosforilació. És important senyalar que tot i la quantitat d'informació que existeix sobre aquest residu de tirosina, mai ningú havia demostrat prèviament la seva funció en un model *in vivo*. En aquest context la generació del ratolí *knockin* Spry1 Y53A ens ofereix un enorme ventall de possibilitats per poder analitzar tant la funció com la regulació de la tirosina i en conseqüència la de la pròpia proteïna de Spry1 i els seus mecanismes d'acció.

En primer lloc vam generar la línia de ratolí Spry1 Y53A mitjançant recombinació homòloga en cèl·lules mare embrionàries. Després d'una sèrie de creuaments vam obtenir ratolins homozigots per la mutació i seguidament vam comprovar els nivells d'expressió de Spry1 en diversos teixits i la fosforilació de la tirosina 53. Un cop realitzades les comprovacions bàsiques per assegurar la correcta construcció del mutant vam analitzar el sistema genitourinari dels ratolins Spry1 Y53A, ja que la funció principal de Spry1 durant el desenvolupament embrionari es troba en aquest sistema. La deleció de la tirosina 53 fenocopia els defectes renals del ratolí deficient per Spry1 presentant els mateixos fenotips des d'estadis embrionaris fins al moment del naixement. Entre les anomalies renals provocades per la manca d'aquesta tirosina o de tota la proteïna en el cas del ratolí Spry1 KO trobem hidrourèters, ronyons supernumeraris i urèters duplicats entre altres. Tots aquests defectes recorden a les anomalies observades en els pacients amb CAKUT (Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract) i que estan causades per aberracions en la regulació espai-temporal de les senyals genètiques, epigenètiques, mediambientals i moleculars durant les etapes clau del desenvolupament del tracte urinari. Entre un 5% i un 30% dels pacients amb CAKUT presenten mutacions del receptor tirosina cinasa Ret i tot i que no s'ha descrit cap cas de mutació de Spry1 en aquesta patologia, les similituds entre el desenvolupament renal humà i el de ratolí juntament amb els defectes deguts a una senyalització aberrant de la via Ret-Gdnf-Spry1 ha promogut l'ús d'aquesta senyalització com un paradigma per determinar els principis fonamentals del desenvolupament del tracte urinari superior i inferior i per comprendre millor la patogènesi del CAKUT. Per tant, l'ús del model de ratolí *knockin* Spry1 Y53A pot ser molt útil per elucidar-

ne els mecanismes implicats ja que com hem demostrat en aquest treball la tirosina 53 de Spry1 té un paper crucial durant la morfogènesi del ronyó.

La mutació *in vitro* de la tirosina conservada tant de Spry1 com de Spry2 i Spry4 dona lloc a la generació de mutants dominants negatius (Sasaki *et al.*, 2001; Hanafusa *et al.*, 2002; Alsina *et al.*, 2012). Aquests treballs han utilitzat diferents línies cel·lulars i diversos factors de creixement entre els quals trobem FGF, EGF i VEGF. En aquests estudis es demostra com la pèrdua d'aquest residu de tirosina no només anul·la la funció del membre de Sprouty en qüestió sinó que també inhibeix la funció de la forma *wild-type* de Sprouty provocant un increment i/o prolongació de l'activació de les vies de senyalització que regulen (normalment la MAPK/ERK), així com l'exacerbació dels processos cel·lulars mediat per Sprouty. Tant les vies com els processos cel·lulars implicats varien en funció del tipus i context cel·lular i segons el membre de Sprouty. A més, tots aquests treballs són estudis realitzats *in vitro* amb línies cel·lulars i que s'han dut a terme manipulant els nivells de Sprouty exògenament.

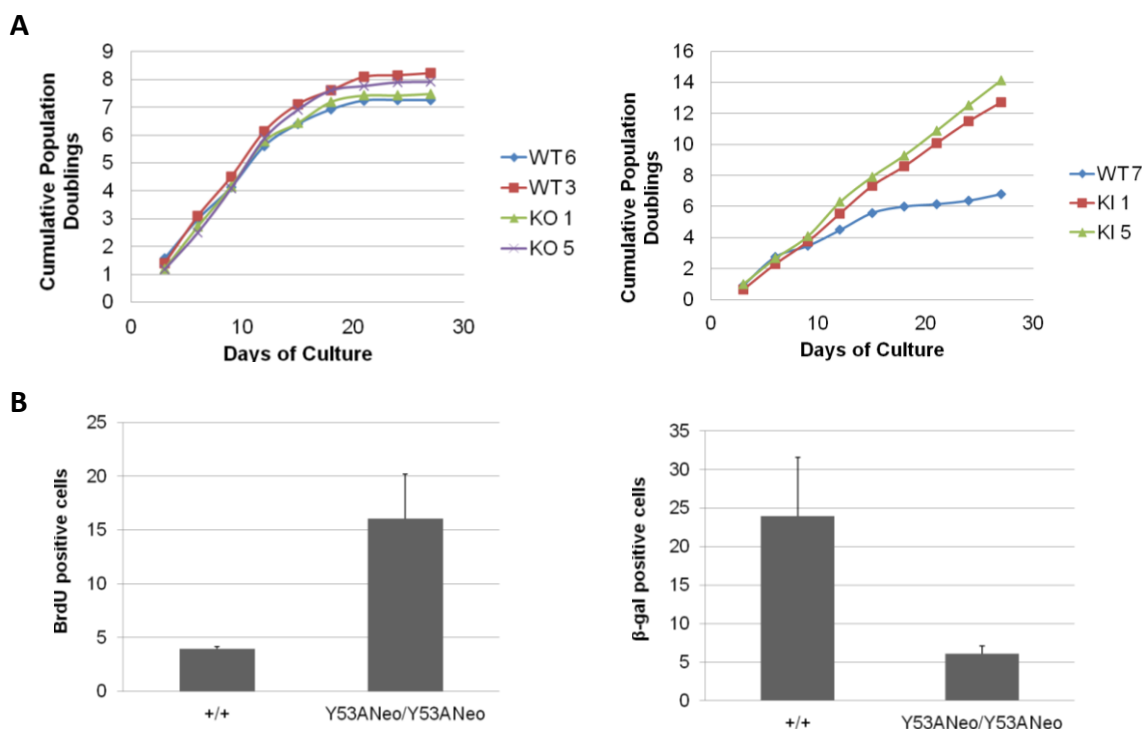
En resultats d'aquesta tesi i en treballs anteriors del nostre grup hem demostrat com la manca de Spry1 provoca una disminució de la senescència cel·lular en la glàndula tiroide. En aquest context dades del nostre grup demostren com en un model *in vitro* ben establert de senescència cel·lular com és la línia cel·lular de fibroblasts IMR90, la sobreexpressió de Spry1 també indueix senescència cel·lular (Figura 62). A més a més, per intentar conèixer i situar els residus implicats en aquesta funció de Spry, hem generat tota una sèrie de mutants puntuals de Spry1 i hem infectat cèl·lules IMR90 amb tots ells i n'hem analitzat la proliferació (Figura 62).



**Figura 62.** Tinció amb cristall violeta de cèl·lules IMR90 infectades amb els lentivirus de sobreexpressió de les formes de Spry1 indicades, o lentivector buit (FUSPA).

Les mutacions s'han escollit en funció de dos criteris: el primer implicant residus rellevants estructuralment i el segon es basa en escollir mutacions presents en mostres tumorals. Així doncs, d'acord amb el primer criteri hem generat els mutants Y53A, per la seva importància àmpliament reconeguda en la funció i regulació de Spry1; el R62A i R70A per la seva implicació en la unió de Spry1 a CIN85, molècula adaptadora necessària per l'activació de la via NFκB (Kometani *et al.*, 2011) i el R250D que es troba en el domini CRD i és necessari per la unió de Spry1 a Caveolina-1 i permetre la translocació de Spry1 a la membrana plasmàtica (Impagnatiello *et al.*, 2001). Pel que fa a les mutacions en càncer hem seleccionat tres mutacions de la base de dades COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) que es donaven reiteradament en diferents tipus de tumors: C215F, C247F i R290I. Tal i com es pot observar en la Figura 62 només hi ha dos mutants que es comporten diferent que la forma Spry1 *wild-type*: el Y53A i el R250D. El mutant Spry1 Y53A no només no és capaç d'induir senescència sinó que provoca un increment de la proliferació dels fibroblasts IMR90 respecte a la condició infectada amb lentivector buit. Aquestes dades a part d'indicar la importància de la tirosina 53 en la inducció de la senescència a través de Spry1 també suggereixen que la forma Spry1 Y53A pot actuar com un mutant dominant negatiu en aquest procés. Mentre que la forma Spry1 R250D ha perdut l'habilitat d'induir senescència i es comporta com la condició amb vector buit. Tot i que cal analitzar amb més profunditat els mecanismes moleculars implicats en aquest procés una possibilitat en el cas del mutant R250D seria a través de la via NFκB, ja que aquest residu es troba en la zona C-terminal truncada del mutant Spry1 Δ232 responsable de l'activació de NFκB. Tot i que no s'ha descrit una relació entre aquest residu de Spry1 i la via NFκB sí que es coneix la relació entre aquesta arginina i Caveolina-1; i paral·lelament entre Caveolina-1 i NFκB, ja que s'ha descrit que la regió intrònica de Caveolina-1 conté llocs de consens de NFκB i que l'activació amb LPS de cèl·lules endotelials promou un increment de l'expressió de Caveolina-1 que depèn de NFκB (Tiruppathi *et al.*, 2008). Curiosament, l'expressió de Caveolina-1 induïx senescència en fibroblasts de ratolí (Volonte *et al.*, 2002) i és ben sabut que Spry1 interacciona amb Caveolina-1 i que per fer-ho l'arginina 250 és crucial. Així doncs, resulta molt interessant explorar aquesta possibilitat i analitzar si el mecanisme pel qual Spry1 induïx senescència implica la funció de Caveolina-1 i la via NFκB.

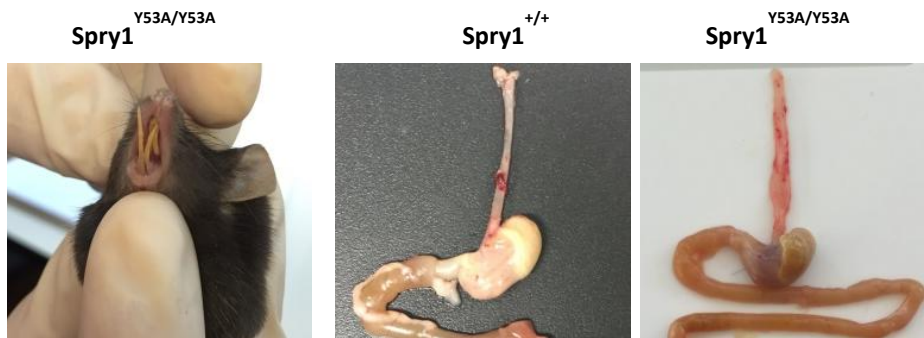
Pel que fa a la mutació Y53A i en línia amb les observacions en les IMR90, resultats recents del grup mostren com en el cultiu de fibroblasts de la dermis de ratolins homozigots per la mutació Spry1Y53A en un esquema de proliferació 3T3, aquests proliferen de forma constant fins al dia 28 (últim punt temporal analitzat), mentre que en el cas dels fibroblasts *wild-type* o *knockout* per Spry1 aquests s'estanquen i es tornen senescents a partir del dia 15 (Figura 63A). La mesura de la incorporació de BrdU i l'anàlisi de l'activitat β-gal associada a la senescència confirmen que els fibroblasts de la dermis dels ratolins Spry1Y53A escapen de la senescència cel·lular (Figura 63B).



**Figura 63.** Els fibroblasts de la dermis de ratolí *Spry1*<sup>Y53Aneo/Y53Aneo</sup> escapen de la senescència cel·lular. (A) Corbes de proliferació cel·lular dels genotips indicats. (B) Percentatge de cèl·lules positives per l'assaig d'incorporació de BrdU (esquerra) i SA-β-gal (dreta) dels genotips indicats.

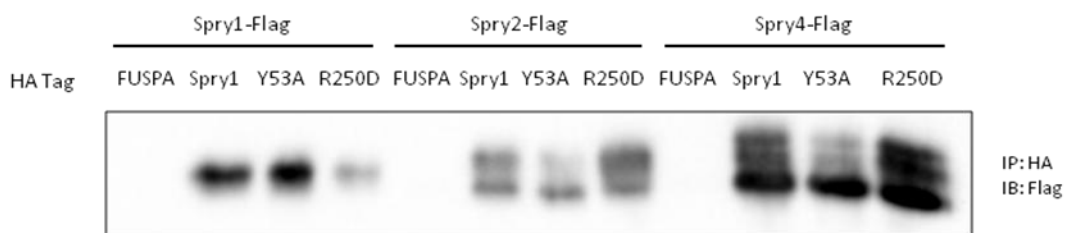
En conjunt, les nostres dades indiquen que la tirosina 53 és necessària per al correcte desenvolupament del sistema genitourinari i sembla actuar com mutant dominant negatiu durant la inducció de la senescència cel·lular dels fibroblasts dèrmics.

Fins aquí estem revelant una nova funció del mutant de la tirosina 53 com a dominant negatiu en la inducció de senescència i tot i que estem aportant noves dades *in vitro* a la llista ja existent, la diferència rau en l'ús de cèl·lules provinents de cultius primaris de fibroblasts de ratolins *Spry1* Y53A on no es manipulen els nivells d'expressió de Sprouty de forma exògena. A més a més, la generació del ratolí *knockin* *Spry1* Y53A també ens ha proporcionat una sèrie d'evidències *in vivo* que donen suport a la funció d'aquesta mutació com una forma dominant negativa. En el moment del deslletament recuperem al voltant d'un 50% menys de femelles *knockin* de les esperades i un percentatge dels ratolins *knockin* recuperats són més petits. A més a més, tot i que de forma molt esporàdica al realitzar les necròpsies dels *Spry1* Y53A que morien abans del deslletament hem observat casos d'acalàsia de l'esòfag i de maloclusió dels incisius (Figura 64). Aquests fenotips juntament amb la reducció de mida són algunes característiques pròpies de ratolins *knockout* d'altres membres de la família de Sprouty, concretament de *Spry2* i *Spry4* (Taketomi *et al.*, 2005; Taniguchi *et al.*, 2007). Així doncs, tot i que de forma molt preliminar la mutació Y53A de *Spry1* podria estar afectant la funció d'altres membres de *Spry in vivo*.



**Figura 63.** Defectes en la dentadura i en l'esòfag dels ratolins *knockin* Spry1 Y53A.

La idea de l'existència d'interaccions entre els diferents membres de la família de Sprouty no és nova i s'ha demostrat *in vitro* i *in vivo* en diferents contextos i sistemes cel·lulars. Experiments *in vitro* han mostrat que les quatre isoformes de Sprouty interaccionen entre elles formant hetero- i homo-oligòmers (Sasaki *et al.*, 2001; Mason *et al.*, 2004; Ozaki *et al.*, 2005b). Tot i que s'ha demostrat que qualsevol dels membres de Sprouty és capaç d'inhibir per sí mateix l'activació de la via de ERK induïda per FGF, els hetero-oligòmers mostren una activitat inhibidòria més pronunciada. Les interaccions cooperatives observades entre les isoformes de Sprouty poden representar un sistema de regulació de l'estat d'activació de la via RTK/ERK entre altres. No obstant, la interacció entre Spry's s'ha descrit també independentment de l'estimulació amb factors de creixement (Mason *et al.*, 2004). La funció de la tirosina N-terminal en la formació d'aquests complexos sembla ser dispensable, ja que tant en experiments amb cèl·lules 293T realitzats pel nostre grup (Figura 64) on mostrem que la forma mutant Spry1 Y53A continua interaccionant amb Spry2 i Spry4, com en treballs com el de Mason i col·laboradors on demostren que la mutació de la Tyr55 de Spry2 no afecta a la interacció amb els altres membres de Spry (Mason *et al.*, 2004). Aquestes interaccions s'ha descrit que es duen a terme a través dels dominis C-terminal (Ozaki *et al.*, 2005b), concretament del CRD (Sasaki *et al.*, 2001), per aquest motiu la mutació de la tirosina conservada no té un efecte directe en la formació dels oligòmers. No obstant, el fet que la forma Spry1 Y53A pugui formar oligòmers i actuï com a dominant negatiu es podria explicar per la substitució de molècules Spry-WT per molècules Spry1 Y53A creant una forma mutant no funcional. D'altra banda, aquest residu de tirosina és necessari per la unió a diverses molècules efectores i/o adaptadores que regulen la funció de Sprouty com per exemple Grb2 i c-Cbl (Hanafusa *et al.*, 2002; Mason *et al.*, 2004) i per tant, la seva funció com a dominant negatiu també pot venir donada per la senyalització alterada a partir d'aquestes proteïnes ja sigui afectant l'activació de Spry o la regulació dels nivells de proteïna. Tots aquests experiments s'han realitzat *in vitro* i en la majoria de casos s'ha utilitzat sistemes de sobreexpressió, pel que fa a les evidències *in vivo* a dia d'avui no s'havia descrit cap funció de dominància negativa de cap dels mutants de la tirosina N-terminal de Spry.



**Figura 64.** La mutació de la tirosina 53 no afecta a la homo i/o heterodimerització entre els membres de la família de Sprouty. Western blot de les diferents isoformes de Sprouty de les immunoprecipitacions indicades.

Totes les dades que es coneixen de models de ratolí *in vivo* es centren en l'estudi de les funcions de redundància i cooperació de les diferents isoformes de Sprouty en diversos òrgans i sistemes. En aquest context la generació del ratolí Spry1 Y53A és el primer model que ens permet estudiar *in vivo* la funció de dominant negatiu de la Tyr53. A banda dels resultats preliminars dels fibroblasts de ratolí Spry1 Y53A en el camp de la senescència cel·lular i de les troballes puntuals de fenotips relacionats amb la deleció d'altres membres de Sprouty; l'eliminació de la *cassette* Neo durant la generació del ratolí Spry1 Y53A revela un paper de dominant negatiu d'aquesta mutació durant el desenvolupament dels genitals interns. Les femelles heterozigotes per la mutació Y53A mostren defectes en la formació de la vagina que comporten la imperforació de la seva obertura i la presència de hidrometrocolpos, mentre que els mascles exhibeixen una duplicació de les vesícules seminals. El fet que els ratolins Spry1<sup>+/-</sup> presentin aquest fenotip amb una freqüència molt menor juntament amb les dades de redundància i de dominància negativa entre membres de Spry suggereix que els defectes en els genitals interns es puguin deure a la interferència de la forma Spry1 Y53A amb altres membres de la família de Sprouty. La presència d'aquestes anomalies genitals en 8 de cada 10 ratolins Spry1<sup>+/-</sup>; Spry2<sup>+/-</sup> confirma una vegada més la cooperació i redundància d'aquests gens i suggereix que l'expressió d'un al·lel Spry1 Y53A actuï com a dominant negatiu interferint amb la funció de Spry2 en aquest sistema. La troballa de formes de Sprouty que actuïn com mutants dominants negatius facilitarà l'estudi dels mecanismes moleculars i de les funcions fisiològiques de Sprouty.

S'han descrit funcions de Sprouty en molts òrgans i sistemes diferents, des de diferents estructures del sistema nerviós fins a la morfogènesi del pulmó i del ronyó. La funció de Spry1 en aquest últim està molt ben establerta i els seus mecanismes també. El paper de Spry1 i també de Spry2 en el desenvolupament dels genitals interns és un nou descobriment pel que fa a les funcions d'aquests gens durant el desenvolupament embrionari. Tot i que l'origen dels genitals interns i del ronyó comparteix el paper d'una estructura embrionària comú, el conducte de Wolff, les funcions de Sprouty en ambdós sistemes són independents ja sigui perquè impliquen mecanismes moleculars diferents o bé per una qüestió de sensibilitat i/o dosatge genètic. Durant el desenvolupament de la oïda interna Wright i col·laboradors

mostren com la penetrància del fenotip es correlaciona amb el nombre d'al·lels de *Spry1* i *Spry2* deletats (Wright *et al.*, 2015), així doncs el procés de formació de la gemma uretèrica del ronyó pot ser menys sensible a la dosi de *Sprouty* que el procés de formació dels genitals interns. Tot i la redundància entre els gens de *Spry* en alguns sistemes, hi ha determinats membres que són imprescindibles pel desenvolupament d'un sistema concret. Per exemple, *Spry1* és crucial per la formació de la gemma uretèrica i *Spry2* ho és per el desenvolupament del sistema nerviós entèric (Basson *et al.*, 2005; Taketomi *et al.*, 2005). Així doncs, en la morfogènesi del ronyó tot i que *Spry2* també és capaç d'inhibir la ramificació de la gemma uretèrica (Chi *et al.*, 2004), la seva funció en el ronyó no és indispensable i és menys sensible a la dosi de *Spry2* que a la de *Spry1*. La prova més evident és que els ratolins *Spry1*<sup>+/-</sup>; *Spry2*<sup>+/-</sup> no presenten anomalies renals.

Al realitzar l'anàlisi de les anomalies en els genitals interns dels ratolins *Spry1* Y53A ens vam adonar que la penetrància del fenotip també depenia del fons genètic del ratolí, accentuant-se en un les soques C57BL/6. En tots els casos la mutació de la tirosina 53 d'un al·lel de *Spry1* provocava un increment del percentatge de ratolins amb malformacions genitals, però les freqüències passaven d'un 32% en 50% C57BL/6 a un 97% en un *background* C57BL/6 pràcticament pur. Aquestes diferències també es mantien en el ratolí *Spry1*<sup>+/-</sup> passant d'un 4% a un 40% en C57BL/6. A més l'estudi dels diferents fons genètics també ens va revelar una funció de dominant negatiu de la tirosina 53 en la formació del ronyó que també varia en funció del fons genètic. El fons genètic en l'anàlisi de línies de ratolins modificats genèticament és un aspecte important que cal tenir en consideració, ja que una mateixa modificació pot resultar en la manifestació de fenotips diferents i/o en diferències en el grau de penetrància d'aquests. Un exemple n'és el ratolí *knockout* per *Spry2* que en un fons genètic BL6 la deleció en provoca la mort post-natal i en un fons genètic mixte els *knockout* sobreviuen fins a les tres setmanes. A part de l'efecte del fons genètic que s'ha descrit i discutit en múltiples ocasions (Montagutelli, 2000; Doetschman, 2009) també hem observat un efecte de la *cassette* Neo en la penetrància dels fenotips. Tot i que desconeixem el mecanisme molecular implicat, cal dir que no és un fenomen nou ni aïllat. Fa un parell d'anys es va descriure que aproximadament la meitat dels *knockdowns* amb morfollinos en peix zebra no presentaven el mateix fenotip que el mutant del mateix gen (Kok *et al.*, 2015). I molt recentment també s'ha descrit que la inactivació d'un gen mitjançant CRISPR ha resultat en un fenotip diferent del ratolí *knockout* clàssic del mateix gen (Lin *et al.*, 2017). L'eliminació d'un fragment d'un gen mitjançant recombinació homòloga amb ES pot comportar l'eliminació de seqüències reguladores, explícites o críptiques, i/o de fragments d'altres gens que es trobin anidats i coexisteixin en la mateixa localització genòmica. D'acord amb aquesta darrera opció és interessant assenyalar l'existència d'un nou gen predit (MGI transcript name: Gm43820-001) que comparteix localització genòmica amb *Spry1*. Així doncs, la *cassette* Neo podria tenir algun rol en aquestes zones del gen.

Durant el desenvolupament dels genitals interns es formen en els dos sexes els conductes de Wolff i de Müller. En els mascles el WD dóna lloc al conducte deferent, l'epidídim i la vesícula seminal mentre que el MD degenera. I en el cas de les femelles el MD es diferencia en l'oviducte, l'úter, el cèrvix i la vagina i és el WD el conducte que degenera i regressa. No obstant, la part més caudal del WD té un paper com a guia durant la formació de la vagina (Drews, 2007; Murata *et al.*, 2014). El fet que els defectes en els genitals interns dels diversos ratolins mutants de Sprouty afectin a la vagina i a la vesícula seminal juntament amb la implicació del WD en el desenvolupament d'ambdós òrgans ens suggereix que l'estructura responsable d'aquestes anomalies sigui el conducte de Wolff. A l'analitzar els WD de les femelles *Spry1*<sup>+/-</sup>; *Spry2*<sup>+/-</sup> o *Spry1*<sup>Y53A/+</sup> observem un increment en la proliferació de la part caudal d'aquests i una manca de cèl·lules apoptòtiques en l'estadi embrionari en el qual haurien d'estar degenerant que es tradueix en la presència de quists de Gartner en edat post-natal. Per tant, l'elongació o persistència anormal de la part caudal del WD en les femelles mutants de Spry pot estar impeding la fusió dels MD per a formar una cavitat vaginal única, donant lloc així a vagines septades. Per una altra banda, una possibilitat interessant és que la formació d'una cavitat vaginal única sigui un prerrequisit per a la correcta apertura de la vagina durant la pubertat. En aquest sentit resultaria molt aclaridor examinar l'expressió del receptor d'estrògens a les vagines de ratolins mutants, donat que l'apoptosi induïda per estrògens és la responsable de la perforació de la vagina. . Tot i que els defectes morfològics són hiperplàstics en la vesícula seminal i hipoplàstics en la vagina, els WD caudals són hiperplàstics en ambdós sexes. El fet que en els mascles s'observi un excés de ramificació i en les femelles una elongació simple pot ser degut a que els defectes hiperplàstics del WD caudal tinguin lloc després de la determinació sexual.

El conducte de Wolff és un primordi del tracte reproductor masculí i del sistema col·lector del ronyó. Es sap que les interaccions recíproques entre l'epiteli del WD i el mesènquima nefrogènic adjacent són essencials durant la morfogènesi de totes les estructures renals (Batourina *et al.*, 2001). A nivell molecular, en aquestes interaccions s'ha caracteritzat la senyalització per factors de creixement, incloent les vies de senyalització de Ret-Gdnf, Wnt/ $\beta$ -catenina i Fgf. La desregulació d'aquestes vies sovint causa la formació de gemmes uretèriques ectòpiques en la part caudal del mesonefros (Kume *et al.*, 2000; Brophy *et al.*, 2001; Grieshammer *et al.*, 2004; Basson *et al.*, 2005); (Michos *et al.*, 2004; Shakya *et al.*, 2005; Mendelsohn, 2009; Nishita *et al.*, 2014). Malgrat que les funcions de la senyalització de Ret, Wnt i FGF en la morfogènesi del ronyó metanèfric han set analitzades, les seves funcions en el WD no estan tan explorades (Pichel *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 1996; Sainio *et al.*, 1997; Costantini and Shakya, 2006; Bates, 2011). A més a més, l'existència de mecanismes compensatoris entre diferents RTKs en el WD no s'han investigat en profunditat.

En aquest treball hem demostrat que el mecanisme a través del qual Sprouty regula la formació correcta del WD és independent de la senyalització de Ret. Tot i que *Spry1* antagonitza la senyalització de Ret durant la formació de la gemma uretèrica i que Ret es troba



expressat en els conductes de Wolff i de Müller, l'eliminació dels dos al·lels de Ret en un context d'heterozigositat de Spry1 i Spry2 no rescata els defectes en el desenvolupament de la vagina i de la vesícula seminal. En conclusió, les malformacions dels genitals interns dels mutants de Spry no es deuen a una hiperactivació de Ret, i a més l'activitat de Ret no és necessària per la seva formació ja que el ratolí *knockout* de Ret no presenta anomalies en la vagina ni en la vesícula seminal. A més, el fet que tant la manca de Spry1, la manca de la tirosina 53 de Spry1 o la deleció d'un al·lel de Spry1 i Spry2 sigui suficient per rescatar (parcialment, en el cas de Spry1<sup>+/-</sup>;Spry2<sup>+/-</sup>) els defectes renals provocats per la manca de Ret però que els defectes dels genitals interns siguin independents d'aquesta senyalització ens proporciona una evidència més de l'existència de mecanismes alternatius regulats per Sprouty.

Durant el desenvolupament del conducte de Wolff s'ha descrit la implicació de diverses vies i gens, una de les quals és la via de Wnt/ $\beta$ -catenina. En els darrers anys, diversos grups han generat línies de ratolí que reporten l'activitat transcripcional Lef/Tcf i presumiblement l'activitat de  $\beta$ -catenina (Dasgupta and Fuchs, 1999; Jho *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2002; Lustig *et al.*, 2002; Maretto *et al.*, 2003; Iglesias *et al.*, 2007). Almenys tres d'aquestes soques de ratolí mostren activitat transcripcional en el ronyó embrionari essent concretament elevada en el conducte de Wolff i en la gemma uretèrica. El procés de desenvolupament del tracte urogenital implica la funció de diversos gens de la família Wnt, entre aquests lligands trobem Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt9b i Wnt11. Els ratolins *knockout* per algun d'aquests gens presenten ronyons hipoplàsics o vestigials i/o defectes en la formació o regressió dels conductes de Wolff i/o Müller (Stark *et al.*, 1994; Parr and McMahon, 1998; Vainio *et al.*, 1999; Mericskay *et al.*, 2004; Carroll *et al.*, 2005). També s'ha descrit que la deleció dels receptors de Wnt Fz4 i Fz8 provoca la reducció de la ramificació de la gemma uretèrica amb la formació de ronyons hipoplàstics (Ye *et al.*, 2011). L'element clau d'aquesta via és el gen de la  $\beta$ -catenina i la seva implicació en la morfogènesi del ronyó està ben caracteritzada. El ratolí *knockout* per  $\beta$ -catenina és letal embrionari i mor durant la gastrulació (Haegel *et al.*, 1995) i per tant, els estudis s'han realitzat amb models condicionals delecionant el gen en diferents llinatges cel·lulars. Bàsicament s'ha estudiat el efecte de la deleció i sobreexpressió de  $\beta$ -catenina en el mesènquima metanèfric i en l'epiteli uretèric. La manca de  $\beta$ -catenina provoca agènesi o hipoplàsia renal mentre que la sobreexpressió promou l'aparició de fenotips de displàsia renal que van des de l'agènesi a la formació de ronyons multicístics. Aquestes diferències depenen del llinatge cel·lular en que s'estabilitza l'activitat de  $\beta$ -catenina i de la línia Cre de ratolí utilitzada (Kobayashi *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007). Tots aquests fenotips renals acaben convergint en la presència de defectes en la ramificació de la gemma uretèrica revelant mecanismes autònoms i no cell-autònoms de  $\beta$ -catenina. Entre aquests mecanismes es troba involucrada la senyalització de Ret-Gdnf, i és que  $\beta$ -catenina té una funció tant per sobre com per sota de Ret. Interacciona directament amb Ret i també promou la transcripció de Gdnf (Sarin *et al.*, 2014). A més també s'ha descrit una via genètica en la que  $\beta$ -catenina regula l'expressió de Gata3 per sobre de Ret i que Gata3 inhibeix la diferenciació de les cèl·lules del

conduïte nèfric independentment de Ret (Grote *et al.*, 2008). Per tant la funció de Sprouty es podria trobar afectant aquesta altra via. Tot i que la funció de  $\beta$ -catenina en els processos de formació i regressió del conducte de Wolff són en gran part desconeguts, sí que es coneix el seu paper en la regressió i diferenciació del conducte de Müller. La funció de  $\beta$ -catenina en el mesènquima del MD és necessària per la seva regressió en mascles i diferenciació en femelles (Allard *et al.*, 2000; Deutscher and Hung-Chang Yao, 2007; Kobayashi *et al.*, 2011) mentre que la deleció de  $\beta$ -catenina en l'epiteli del MD no té cap efecte. Fins ara els treballs que s'han dut a terme manipulant els nivells de  $\beta$ -catenina en el conducte de Wolff s'han centrat en el desenvolupament renal i no en l'anàlisi de les estructures del sistema reproductor que deriven d'aquest mateix conducte. Marose T i col·laboradors descriuen una funció de  $\beta$ -catenina en l'epiteli del WD en el manteniment de l'estat indiferenciat de les cèl·lules que a part del fenotip renal també provoca la manca de l'úter i la part superior de la vagina en les femelles i la presència d'un epidídim i conducte deferent dilatat i anormal en els mascles (Marose *et al.*, 2008). Més recentment s'ha descrit el fenotip d'un mutant de  $\beta$ -catenina ( $\beta$ -catenina<sup>C429S</sup>) que presenta defectes en els conductes de Wolff que desemboquen en anomalies en els genitals interns que curiosament coincideixen amb les dels nostres mutants de Spry (Murata *et al.*, 2014).

L'existència d'aquestes evidències ens va incitar a l'estudi de l'estat d'aquesta via de senyalització en el conducte de Wolff dels ratolins mutants de Sprouty. Així doncs, hem descrit que Spry1 i Spry2 afecten al patró d'expressió de  $\beta$ -catenina ja que els romanents del WD dels ratolins Spry1<sup>+/-</sup>; Spry2<sup>+/-</sup>; Axin2<sup>LacZ/+</sup> mostren una forta tinció X-gal indicant la presència d'activitat  $\beta$ -catenina. Murata T en el seu treball descriuen la presència d'una activitat  $\beta$ -catenina ectòpica en el conducte de Wolff amb una funció en el desenvolupament dels genitals interns, tot i que no està clar si la mutació és de guany o pèrdua de funció. Per tant, si Sprouty restringeix o activa aquesta via no està clar i és necessari realitzar experiments addicionals, com per exemple experiments de rescat eliminant gens inhibidors o activadors de la via de senyalització Wnt/ $\beta$ -catenina com per exemple Axin2 i  $\beta$ -catenina, respectivament. En aquest context, resultats preliminars *in vitro* del nostre grup suggereixen que Spry1 podria estar actuant com un inhibidor de la via Wnt/ $\beta$ -catenina. A més, durant el desenvolupament de l'oïda interna Spry1 i Spry2 restringeixen l'activitat de Wnt/ $\beta$ -catenina (Wright *et al.*, 2015).

Una altra via de senyalització candidata que podria estar implicada en la funció de Sprouty en aquest sistema és la senyalització a través de FGF, ja que inicialment les proteïnes de Sprouty es van identificar com antagonistes de la senyalització induïda per FGF. Es coneixen quatre FGFR que interaccionen amb 18 lligands FGF en mamífer (Ornitz and Itoh, 2001; Beenken and Mohammadi, 2009). L'expressió de Fgfr1 i Fgfr2 es detecta en el metanefros i en la part cranial del mesonefros (Orr-Urtreger *et al.*, 1991; Peters *et al.*, 1992; Cancilla *et al.*, 1999; Dudley *et al.*, 1999; Poladia *et al.*, 2006; Kitagaki *et al.*, 2011). L'ús de models *knockout* condicionals de ratolí ha revelat la funció crucial de Fgfr1 i Fgfr2 en el mesènquima per la formació inicial del mesènquima metanèfric i per la inducció de la gemma uretèrica (Walker *et al.*, 2013; Hains *et*

*al.*, 2008; Poladia *et al.*, 2006). D'altra banda, la senyalització de FGFR en l'epiteli regula el procés de ramificació del ronyó metanèfric i té funcions més modestes en la formació inicial de la gemma uretèrica (Zhao *et al.*, 2004). La manca de Fgf7o Fgf10 també provoca una reducció de la ramificació de la gemma uretèrica que desemboca en la formació de ronyons més petits (Ohuchi *et al.*, 2000 ; Qiao *et al.*, 1999). Malgrat que les funcions de la senyalització de FGF en la morfogènesi del ronyó metanèfric han set analitzades detingudament, les seves funcions en el WD no estan tan explorades. En aquesta línia, els ratolins deficientes o amb mutacions de pèrdua de funció en Fgf10 o Fgfr2 mostren alguns defectes en els genitals interns incloent l'agènesi de la pròstata i de la vesícula seminal (Donjacour *et al.*, 2003; Kuslak *et al.*, 2007). Recentment, s'ha descrit la funció de la senyalització a través de FGFR2 en el desenvolupament de la part caudal del conducte de Wolff. L'absència de Fgfr2 en l'epiteli del WD provoca la regressió i disminució de la proliferació de la part caudal del WD i l'aparició de defectes en els genitals masculins. Tant la part cranial del conducte de Wolff com la gemma uretèrica no es troben afectats i curiosament la disminució de la senyalització per RTK en els WD dels ratolins mutants per Fgfr2 és independent de Ret (Okazawa *et al.*, 2015). A més a més, la interacció entre Spry1 i la senyalització de FGF en el desenvolupament del ronyó s'ha demostrat en el treball de Michos O et al on demostren que la el procés de ramificació de la gemma uretèrica requereix Fgf10 en absència de Gdnf i Spry1. Per tant, podria ser que la pèrdua de Spry en el WD provoqués un increment de la senyalització a través de Fgfr2 promovent l'augment de la proliferació de la part caudal del WD impedit-ne la seva regressió i generant l'aparició dels defectes dels genitals interns. Per tant la possibilitat que Sprouty antagonitzi la senyalització per FGF durant el desenvolupament de la part caudal del WD és una possibilitat interessant que requereix ser investigada amb més profunditat.

Tant la senyalització a través de Ret, de Wnt/ $\beta$ -catenina com de FGF regulen vies i processos durant el desenvolupament del sistema genitourinari que poden estar interconectats i/o es poden solapar entre ells. Diversos treballs indiquen que la senyalització a través de FGFR compensa la pèrdua de la senyalització de Gdnf-Ret, la qual és la senyalització per RTK essencial durant el procés de formació i ramificació de la UB (Maeshima *et al.*, 2007; Michos *et al.*, 2010; Tee *et al.*, 2013). A més, també s'ha descrit la cooperació entre la senyalització de FGF, Wnt i Sprouty en el desenvolupament de la oïda interna (Wright *et al.*, 2015). La importància de cada una d'aquestes tres vies pot variar en cada procés de desenvolupament i Sprouty pot tenir un paper en la regulació de totes les vies que serà més o menys crític en funció de la importància d'aquella via en aquell procés així com de la indispensabilitat del membre de Sprouty implicat. Per tot això, resulta força complicat l'anàlisi i la dissecció dels mecanismes de Sprouty implicats en el desenvolupament de les diferents estructures del sistema genitourinari i són necessaris més estudis per analitzar si Sprouty regula la senyalització de Ret, FGF o Wnt/ $\beta$ -catenina durant el desenvolupament de la part caudal WD.

Per una altra banda, la senescència programada durant el desenvolupament embrionari és un concepte de senescència cel·lular bastant innovador. Dos laboratoris independents han

caracteritzat l'existència d'aquest tipus de senescència durant el desenvolupament de diverses estructures embrionàries (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013). Curiosament, entre aquestes estructures es troben el mesonefros i el conducte de Wolff, dos àrees o zones del sistema genitourinari en les quals hem descrit una funció de Spry1 (en aquest treball però, només es mostren les dades del conducte de Wolff). Tant els túbuls mesonèfrics com els conductes de Wolff (en el cas de les femelles) són estructures transitòries que degeneren al voltant del dia E14. Fins ara aquesta regressió s'acceptava que era un procés apoptòtic, no obstant el descobriment de la presència de cèl·lules senescents en el moment de la degeneració d'ambdues estructures posa en manifest la relació entre aquests dos processos: senescència i apoptosi. A nivell molecular, els dos treballs coincideixen en que la senescència programada durant el desenvolupament és un tipus de senescència depenent de p21 i independent de p53 i del dany al DNA. La pèrdua de p21 provoca un retard en la regressió dels túbuls mesonèfrics i del conducte de Wolff en les femelles i promou un increment de la proliferació de les cèl·lules dels epitelis de les dos estructures. En el cas dels túbuls mesonèfrics la pèrdua de la senescència es compensa per un increment de l'apoptosi posteriorment. La persistència del conducte de Wolff en les femelles *knockout* de p21 provoca defectes en el desenvolupament de la vagina (vagina septada). Tant els defectes en la regressió dels conductes de Wolff dels ratolins Spry1<sup>+/-</sup>; Spry2<sup>+/-</sup> i Spry<sup>Y53A/+</sup> com en els túbuls mesonèfrics dels ratolins Spry1<sup>Y53A/Y53A</sup> es correlacionen amb els defectes provocats per una manca de senescència. Aquestes evidències juntament amb el paper reconegut de Spry1 com inductor de la senescència cel·lular en la glàndula tiroide suggereixen que els defectes que observem en el conducte de Wolff i en els genitals interns dels mutants de Sprouty es poden deure a una manca de senescència cel·lular. Així doncs, és necessari realitzar anàlisis exhaustius de l'estat de les vies de senescència en el conducte de Wolff i en el mesonefros dels mutants de Sprouty per confirmar-ne el seu paper.

Tenint en compte que Sprouty1 té una funció en el desenvolupament d'ambdues estructures i que hem descrit en diverses ocasions el paper de Spry1 com a inductor de la senescència cel·lular en la tiroide, sembla bastant probable que el mecanisme molecular en el desenvolupament d'aquest sistema impliqui la inducció de senescència i que un regulador clau sigui Sprouty1. La funció de Spry1 en la inducció de senescència com a barrera de la progressió tumoral en la tiroide implica l'activació de la via NFκB i el SASP, no obstant fins a dia d'avui la senescència programada durant el desenvolupament del mesonefros i/o del conducte de Wolff no s'ha descrit que impliqui el SASP sinó que depèn de p21. Entre les vies de senyalització implicades en aquest tipus d'inducció de senescència es troben la via de NFκB, Wnt, TGFβ o PI3K-FOXO entre altres. Així doncs, són necessaris més estudis per analitzar quina o quines vies de senyalització podria estar regulant Spry1.

Les dades d'aquest treball d'una banda ens confirmen el paper de Spry1 com un gen supressor de tumors en la glàndula tiroide i en el feocromocitoma, i d'altra banda la generació del ratolí Spry1 Y53A ens confirma la importància de la funció de la tirosina 53 de Spry1 en el

desenvolupament del sistema genitourinari. A més a més, de revelar-nos una nova funció d'aquest mutant de Spry1 com dominant negatiu en el sistema genitourinari durant la formació i ramificació de la gemma uretèrica i també durant el desenvolupament dels genitals interns o del conducte de Wolff. La senescència cel·lular és un mecanisme tant de supressió tumoral com programat de forma fisiològica durant el desenvolupament de diverses estructures embrionàries. Així doncs, Spry1 podria estar regulant els dos tipus de senescència cel·lular tot i que els mecanismes moleculars implicats puguin diferir en alguns aspectes i coincidir en altres. Per aclarir la funció de Spry1 en la inducció de la senescència programada durant el desenvolupament embrionari i elucidar els mecanismes moleculars implicats aquest procés requereix ser investigat amb més profunditat. El paper de Spry1 en biologia s'ha anat expandint per abastar més vies de senyalització i processos biològics tot i que encara hi ha moltes incògnites pel que fa als mecanismes d'acció de Sprouty en les vies de senyalització, ara està clar que les proteïnes de Sprouty són multifuncionals i estan altament regulades en la seva expressió i funció. Els propers estudis amb el model de ratolí Spry1 Y53A esdevindran una eina molt útil que servirà per aclarir la complexitat de la funció de Sprouty en el control de les cascades de senyalització induïdes per mitògens en processos tant fisiològics com patològics i que ens aportarà nous coneixements sobre la funció molecular de Sprouty que ens seran útils a l'hora de desenvolupar estratègies terapèutiques per interferir els processos patològics en els que es trobi implicat.

## ***Conclusions***

---



**Primera.** Els ratolins *knockout* per Sprouty1 presenten un augment de la mida de la glàndula tiroide causada per un increment de la proliferació de les cèl·lules fol·liculars.

**Segona.** Sprouty1 no inhibeix la senyalització de la via MAPK/ERK en la glàndula tiroide.

**Tercera.** Les cèl·lules fol·liculars de la tiroide dels ratolins *knockout* per Sprouty1 presenten una disminució dels marcadors de senescència cel·lular.

**Quarta.** Sprouty1 indueix la secreció de citocines i factors característics del fenotip secretor associat a la senescència (SASP) mitjançant l'activació de la via NFκB en la glàndula tiroide.

**Cinquena.** La deleció de Sprouty1 en un context d'haploinsuficiència per Pten accelera la tumorigènesi de la glàndula tiroide.

**Sisena.** Els nivells de Sprouty1 i IL-6 es troben reduïts en mostres humanes d'adenomes i carcinomes fol·liculars de tiroide.

**Setena.** La deleció de Sprouty1 en un context d'haploinsuficiència per Pten accelera la tumorigènesi de la glàndula adrenal.

**Vuitena.** La pèrdua d'heterozigotitat de Sprouty1 i/o Pten no és responsable de l'augment de la incidència de feocromocitoma en el ratolí doble mutant de Sprouty1 i Pten.

**Novena.** Els feocromocitomes dels ratolins doble mutants de Sprouty1 i Pten tendeixen a ser més agressius i malignes.

**Desena.** La tirosina 53 de Sprouty1 és necessària per la funció de Sprouty durant el desenvolupament del sistema genitourinari.

**Onzena.** La tirosina 53 és un dels principals llocs de fosforilació de Sprouty1.

**Dotzena.** La forma Sprouty1 Y53A actua com mutant dominant negatiu durant el desenvolupament dels genitals interns.

**Tretzena.** Sprouty1 i Sprouty2 cooperen durant la morfogènesi de la part caudal del conducte de Wolff.

**Catorzena.** Les anomalies dels genitals interns dels ratolins doble heterozigots de Sprouty1 i Sprouty2 causats pels defectes en el desenvolupament del conducte de Wolff caudal són independents de la senyalització de Ret.





## ***Bibliografia***

---



ABE, M.; NASKI, M. C. Regulation of sprouty expression by PLCgamma and calcium-dependent signals. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 323, n. 3, p. 1040-7, Oct 2004. ISSN 0006-291X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381104> >.

ACOSTA, J. C. et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. **Nat Cell Biol**, v. 15, n. 8, p. 978-90, Aug 2013. ISSN 1476-4679. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770676> >.

\_\_\_\_\_. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. **Cell**, v. 133, n. 6, p. 1006-18, Jun 2008. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18555777> >.

AIRAKSINEN, M. S.; SAARMA, M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 5, p. 383-94, May 2002. ISSN 1471-003X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988777> >.

ALBRECHT, K. H. et al. Defective mesonephric cell migration is associated with abnormal testis cord development in C57BL/6J XY(Mus domesticus) mice. **Dev Biol**, v. 225, n. 1, p. 26-36, Sep 2000. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964462> >.

ALESSI, D. R.; PEARCE, L. R.; GARCIA-MARTINEZ, J. M. New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. **Sci Signal**, v. 2, n. 67, p. pe27, 2009. ISSN 1937-9145 (Electronic). Available at: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19383978](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19383978) >.

ALIMONTI, A. et al. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. **J Clin Invest**, v. 120, n. 3, p. 681-93, Mar 2010. ISSN 1558-8238. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20197621> >.

ALLARD, S. et al. Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of beta-catenin. **Development**, v. 127, n. 15, p. 3349-60, Aug 2000. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10887090> >.

ALSANEA, O. Familial nonmedullary thyroid cancer. **Curr Treat Options Oncol**, v. 1, n. 4, p. 345-51, Oct 2000. ISSN 1527-2729. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12061376> >.

ALSINA, F. C. et al. Sprouty4 is an endogenous negative modulator of TrkA signaling and neuronal differentiation induced by NGF. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e32087, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22384148> >.

AMAR, L. et al. Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 34, p. 8812-8, Dec 2005. ISSN 0732-183X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314641> >.

AMORESANO, A. et al. Direct interactions among Ret, GDNF and GFRalpha1 molecules reveal new insights into the assembly of a functional three-protein complex. **Cell Signal**, v. 17, n. 6, p. 717-27, Jun 2005. ISSN 0898-6568. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15722196> >.

ANCRILE, B.; LIM, K. H.; COUNTER, C. M. Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. **Genes Dev**, v. 21, n. 14, p. 1714-9, Jul 2007. ISSN 0890-9369. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17639077> >.

ANDERS, J.; KJAR, S.; IBÁÑEZ, C. F. Molecular modeling of the extracellular domain of the RET receptor tyrosine kinase reveals multiple cadherin-like domains and a calcium-binding site. **J Biol Chem**, v. 276, n. 38, p. 35808-17, Sep 2001. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11445581> >.

ANDERSSON, S. et al. Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. **Nature**, v. 354, n. 6349, p. 159-61, Nov 1991. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1944596> >.

ARANDA, S. et al. Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 19, p. 5899-911, Oct 2008. ISSN 1098-5549. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18678649> >.

ARIGHI, E.; BORRELLO, M. G.; SARIOLA, H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 4-5, p. 441-67, 2005 Aug-Oct 2005. ISSN 1359-6101. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15982921> >.

BAKER, D. J. et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. **Nature**, v. 479, n. 7372, p. 232-6, Nov 2011. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22048312> >.

BALL, D. W. Medullary thyroid cancer: monitoring and therapy. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 36, n. 3, p. 823-37, viii, Sep 2007. ISSN 0889-8529. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17673130> >.

BARBÁCHANO, A. et al. SPROUTY-2 and E-cadherin regulate reciprocally and dictate colon cancer cell tumorigenicity. **Oncogene**, v. 29, n. 34, p. 4800-13, Aug 2010. ISSN 1476-5594. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20543868> >.

BARLOW, A.; DE GRAAFF, E.; PACHNIS, V. Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. **Neuron**, v. 40, n. 5, p. 905-16, Dec 2003. ISSN 0896-6273. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14659090> >.

BARSOUM, I.; YAO, H. H. The road to maleness: from testis to Wolffian duct. **Trends Endocrinol Metab**, v. 17, n. 6, p. 223-8, Aug 2006. ISSN 1043-2760. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16822678> >.

BARTHOLOMEW, J. N.; VOLONTE, D.; GALBIATI, F. Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53-mediated pathway. **Cancer Res**, v. 69, n. 7, p. 2878-86, Apr 2009. ISSN 1538-7445. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318577> >.

BARTKOVA, J. et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 864-70, Apr 2005. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829956> >.

BASOLO, F. et al. Reduced expression of interleukin 6 in undifferentiated thyroid carcinoma: in vitro and in vivo studies. **Clin Cancer Res**, v. 4, n. 2, p. 381-7, Feb 1998. ISSN 1078-0432. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516926> >.

BASSON, M. A. et al. Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction. **Dev Cell**, v. 8, n. 2, p. 229-39, Feb 2005. ISSN 1534-5807. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15691764> >.

\_\_\_\_\_. Branching morphogenesis of the ureteric epithelium during kidney development is coordinated by the opposing functions of GDNF and Sprouty1. **Dev Biol**, v. 299, n. 2, p. 466-77, Nov 2006. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17022962> >.

BATES, C. M. Role of fibroblast growth factor receptor signaling in kidney development. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 301, n. 2, p. F245-51, Aug 2011. ISSN 1522-1466. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613421> >.

BATOURINA, E. et al. Distal ureter morphogenesis depends on epithelial cell remodeling mediated by vitamin A and Ret. **Nat Genet**, v. 32, n. 1, p. 109-15, Sep 2002. ISSN 1061-4036. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12195422> >.

\_\_\_\_\_. Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression. **Nat Genet**, v. 27, n. 1, p. 74-8, Jan 2001. ISSN 1061-4036. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11138002> >.

\_\_\_\_\_. Apoptosis induced by vitamin A signaling is crucial for connecting the ureters to the bladder. **Nat Genet**, v. 37, n. 10, p. 1082-9, Oct 2005. ISSN 1061-4036. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16186816> >.

BAVIK, C. et al. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. **Cancer Res**, v. 66, n. 2, p. 794-802, Jan 2006. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424011> >.

BAYASCAS, J. R. et al. Hypomorphic mutation of PDK1 suppresses tumorigenesis in PTEN(+/-) mice. **Curr Biol**, v. 15, n. 20, p. 1839-46, Oct 2005. ISSN 0960-9822. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16243031> >.

BEARD, C. M. et al. Occurrence of pheochromocytoma in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. **Mayo Clin Proc**, v. 58, n. 12, p. 802-4, Dec 1983. ISSN 0025-6196. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6645626> >.

BEEKEN, A.; MOHAMMADI, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 3, p. 235-53, Mar 2009. ISSN 1474-1784. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19247306> >.

BEGUS-NAHRMANN, Y. et al. p53 deletion impairs clearance of chromosomal-instable stem cells in aging telomere-dysfunctional mice. **Nat Genet**, v. 41, n. 10, p. 1138-43, Oct 2009. ISSN 1546-1718. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19718028> >.

BENETTI, E. et al. 10p12.1 deletion: HDR phenotype without DGS2 features. **Exp Mol Pathol**, v. 86, n. 1, p. 74-6, Feb 2009. ISSN 1096-0945. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022243> >.

BENSON, G. V. et al. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. **Development**, v. 122, n. 9, p. 2687-96, Sep 1996. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8787743> >.

BENTVELSEN, F. M. et al. Developmental pattern and regulation by androgens of androgen receptor expression in the urogenital tract of the rat. **Mol Cell Endocrinol**, v. 113, n. 2, p. 245-53, Sep 1995. ISSN 0303-7207. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674832> >.

BESANCENOT, R. et al. A senescence-like cell-cycle arrest occurs during megakaryocytic maturation: implications for physiological and pathological megakaryocytic proliferation. **PLoS Biol**, v. 8, n. 9, Sep 2010. ISSN 1545-7885. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20838657> >.

BHATIA, B. et al. Evidence that senescent human prostate epithelial cells enhance tumorigenicity: cell fusion as a potential mechanism and inhibition by p16INK4a and hTERT. **Int J Cancer**, v. 122, n. 7, p. 1483-95, Apr 2008. ISSN 1097-0215. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18059027> >.

BIELOHUBY, M. et al. Growth analysis of the mouse adrenal gland from weaning to adulthood: time- and gender-dependent alterations of cell size and number in the cortical compartment. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, n. 1, p. E139-46, Jul 2007. ISSN 0193-1849. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17374700> >.

BILIMORIA, K. Y. et al. Adrenocortical carcinoma in the United States: treatment utilization and prognostic factors. **Cancer**, v. 113, n. 11, p. 3130-6, Dec 2008. ISSN 0008-543X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18973179> >.

BLOOMFIELD, A. The Development of the Lower End of the Vagina. **J Anat**, v. 62, n. Pt 1, p. 9-32, Oct 1927. ISSN 0021-8782. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17104175> >.

BODNAR, A. G. et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. **Science**, v. 279, n. 5349, p. 349-52, Jan 1998. ISSN 0036-8075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9454332> >.

BOLAND, G. W. et al. Characterization of adrenal masses using unenhanced CT: an analysis of the CT literature. **AJR Am J Roentgenol**, v. 171, n. 1, p. 201-4, Jul 1998. ISSN 0361-803X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9648789> >.

BONGARZONE, I. et al. Molecular characterization of a thyroid tumor-specific transforming sequence formed by the fusion of ret tyrosine kinase and the regulatory subunit RI alpha of cyclic AMP-dependent protein kinase A. **Mol Cell Biol**, v. 13, n. 1, p. 358-66, Jan 1993. ISSN 0270-7306. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678053> >.

BORNSTEIN, S. R.; STRATAKIS, C. A.; CHROUSOS, G. P. Adrenocortical tumors: recent advances in basic concepts and clinical management. **Ann Intern Med**, v. 130, n. 9, p. 759-71, May 1999. ISSN 0003-4819. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10357696> >.

BOUCHARD, M.; PFEFFER, P.; BUSSLINGER, M. Functional equivalence of the transcription factors Pax2 and Pax5 in mouse development. **Development**, v. 127, n. 17, p. 3703-13, Sep 2000. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10934015> >.

BOUCHARD, M. et al. Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. **Genes Dev**, v. 16, n. 22, p. 2958-70, Nov 2002. ISSN 0890-9369. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12435636> >.

BOWMAN, T. et al. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 13, p. 7319-24, Jun 2001. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404481> >.

BRACKEN, A. P. et al. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. **Genes Dev**, v. 21, n. 5, p. 525-30, Mar 2007. ISSN 0890-9369. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17344414> >.

BRAIG, M. et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 660-5, Aug 2005. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079837> >.

BREN-MATTISON, Y. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR(gamma)) inhibits tumorigenesis by reversing the undifferentiated phenotype of metastatic non-small-cell lung cancer cells (NSCLC). **Oncogene**, v. 24, n. 8, p. 1412-22, Feb 2005. ISSN 0950-9232. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608671> >.

BRENNAN, J.; KARL, J.; CAPEL, B. Divergent vascular mechanisms downstream of Sry establish the arterial system in the XY gonad. **Dev Biol**, v. 244, n. 2, p. 418-28, Apr 2002. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11944948> >.

BRENNER-ANANTHARAM, A. et al. Tailbud-derived mesenchyme promotes urinary tract segmentation via BMP4 signaling. **Development**, v. 134, n. 10, p. 1967-75, May 2007. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442697> >.

BRIDGEWATER, D. et al. Canonical WNT/beta-catenin signaling is required for ureteric branching. **Dev Biol**, v. 317, n. 1, p. 83-94, May 2008. ISSN 1095-564X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18358465> >.

BROMBERG, J. F. et al. Stat3 as an oncogene. **Cell**, v. 98, n. 3, p. 295-303, Aug 1999. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458605> >.

BROPHY, P. D. et al. Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene. **Development**, v. 128, n. 23, p. 4747-56, Dec 2001. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731455> >.

BROWN, T. R. et al. Deletion of the steroid-binding domain of the human androgen receptor gene in one family with complete androgen insensitivity syndrome: evidence for further genetic heterogeneity in this syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 21, p. 8151-5, Nov 1988. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3186717> >.

BULMER, D. The development of the human vagina. **J Anat**, v. 91, n. 4, p. 490-509, Oct 1957. ISSN 0021-8782. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13475148> >.

\_\_\_\_\_. The epithelium of the urogenital sinus in female human foetuses. **J Anat**, v. 93, p. 491-8, Oct 1959. ISSN 0021-8782. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13805891> >.

BUNDSCHU, K.; WALTER, U.; SCHUH, K. Getting a first clue about SPRED functions. **Bioessays**, v. 29, n. 9, p. 897-907, Sep 2007. ISSN 0265-9247. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17691106> >.

BURGESS, D. J. Senescence. NF- $\kappa$ B shows its beneficial side. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 12, p. 832-3, Oct 2011. ISSN 1474-1768. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020169> >.

BUSH, K. T. et al. Development and differentiation of the ureteric bud into the ureter in the absence of a kidney collecting system. **Dev Biol**, v. 298, n. 2, p. 571-84, Oct 2006. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16934795> >.

CABRITA, M. A.; CHRISTOFORI, G. Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. **Angiogenesis**, v. 11, n. 1, p. 53-62, 2008. ISSN 0969-6970 (Print)0969-6970 (Linking). Available at: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10456-008-9089-1> >.



CACALANO, G. et al. GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. **Neuron**, v. 21, n. 1, p. 53-62, Jul 1998. ISSN 0896-6273. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9697851> >.

CAI, Y. Revisiting old vaginal topics: conversion of the Müllerian vagina and origin of the "sinus" vagina. **Int J Dev Biol**, v. 53, n. 7, p. 925-34, 2009. ISSN 1696-3547. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19598112> >.

CAIN, J. E. et al. GLI3 repressor controls functional development of the mouse ureter. **J Clin Invest**, v. 121, n. 3, p. 1199-206, Mar 2011. ISSN 1558-8238. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21339645> >.

CAMPISI, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 513-22, Feb 2005. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734683> >.

CAMPISI, J. et al. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? **Semin Cancer Biol**, v. 21, n. 6, p. 354-9, Dec 2011. ISSN 1096-3650. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21925603> >.

CAMPISI, J.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 9, p. 729-40, Sep 2007. ISSN 1471-0080. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17667954> >.

CANCILLA, B.; FORD-PERRISS, M. D.; BERTRAM, J. F. Expression and localization of fibroblast growth factors and fibroblast growth factor receptors in the developing rat kidney. **Kidney Int**, v. 56, n. 6, p. 2025-39, Dec 1999. ISSN 0085-2538. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594778> >.

CAO, L. et al. Senescence, aging, and malignant transformation mediated by p53 in mice lacking the Brca1 full-length isoform. **Genes Dev**, v. 17, n. 2, p. 201-13, Jan 2003. ISSN 0890-9369. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12533509> >.

CARROLL, T. J. et al. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. **Dev Cell**, v. 9, n. 2, p. 283-92, Aug 2005. ISSN 1534-5807. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054034> >.

CARTER, M. T. et al. Conservation of RET proto-oncogene splicing variants and implications for RET isoform function. **Cytogenet Cell Genet**, v. 95, n. 3-4, p. 169-76, 2001. ISSN 0301-0171. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12063395> >.

CASCI, T.; VINÓS, J.; FREEMAN, M. Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. **Cell**, v. 96, n. 5, p. 655-65, Mar 1999. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10089881> >.

CAUBIT, X. et al. Teashirt 3 is necessary for ureteral smooth muscle differentiation downstream of SHH and BMP4. **Development**, v. 135, n. 19, p. 3301-10, Oct 2008. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18776146> >.

CEBRIÁN, C. et al. Morphometric index of the developing murine kidney. **Dev Dyn**, v. 231, n. 3, p. 601-8, Nov 2004. ISSN 1058-8388. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15376282> >.

CHAMBERS, D.; MASON, I. Expression of sprouty2 during early development of the chick embryo is coincident with known sites of FGF signalling. **Mech Dev**, v. 91, n. 1-2, p. 361-4, Mar 2000. ISSN 0925-4773. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10704865> >.

CHEN, Q. et al. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 10, p. 4337-41, May 1995. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7753808> >.

CHEN, Z. et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 725-30, Aug 2005. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079851> >.

CHI, L. et al. Sprouty proteins regulate ureteric branching by coordinating reciprocal epithelial Wnt11, mesenchymal Gdnf and stromal Fgf7 signalling during kidney development. **Development**, v. 131, n. 14, p. 3345-56, Jul 2004. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15201220> >.

CHIA, I. et al. Nephric duct insertion is a crucial step in urinary tract maturation that is regulated by a Gata3-Raldh2-Ret molecular network in mice. **Development**, v. 138, n. 10, p. 2089-97, May 2011. ISSN 1477-9129. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21521737> >.

CHIARLE, R. et al. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. **Nat Med**, v. 11, n. 6, p. 623-9, Jun 2005. ISSN 1078-8956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15895073> >.

CHICAS, A. et al. Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. **Cancer Cell**, v. 17, n. 4, p. 376-87, Apr 2010. ISSN 1878-3686. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385362> >.

CHIEN, Y. et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- $\kappa$ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. **Genes Dev**, v. 25, n. 20, p. 2125-36, Oct 2011. ISSN 1549-5477. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21979375> >.

CHING, S. T. et al. Coordinated activity of Spry1 and Spry2 is required for normal development of the external genitalia. **Dev Biol**, v. 386, n. 1, p. 1-11, Feb 2014. ISSN 1095-564X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24361260> >.

CHIOU, S. H. et al. The E3 ligase c-Cbl regulates dendritic cell activation. **EMBO Rep**, v. 12, n. 9, p. 971-9, Sep 2011. ISSN 1469-3178. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21799517> >.

CHUPRIN, A. et al. Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. **Genes Dev**, v. 27, n. 21, p. 2356-66, Nov 2013. ISSN 1549-5477. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24186980> >.

CLEVERS, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. **Cell**, v. 127, n. 3, p. 469-80, Nov 2006. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17081971> >.

COLLADO, M.; BLASCO, M. A.; SERRANO, M. Cellular senescence in cancer and aging. **Cell**, v. 130, n. 2, p. 223-33, Jul 2007. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17662938> >.

COLLADO, M. et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 642, Aug 2005. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079833> >.

COLLADO, M.; SERRANO, M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 6, p. 472-6, 06 2006. ISSN 1474-175X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16723993> >.

\_\_\_\_\_. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 1, p. 51-7, Jan 2010. ISSN 1474-1768. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029423> >.

COLVIN, J. S. et al. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. **Nat Genet**, v. 12, n. 4, p. 390-7, Apr 1996. ISSN 1061-4036. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8630492> >.

COPPÉ, J. P. et al. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. **Annu Rev Pathol**, v. 5, p. 99-118, 2010. ISSN 1553-4014. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20078217> >.

\_\_\_\_\_. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. **J Biol Chem**, v. 281, n. 40, p. 29568-74, Oct 2006. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16880208> >.

\_\_\_\_\_. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. **PLoS Biol**, v. 6, n. 12, p. 2853-68, Dec 2008. ISSN 1545-7885. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19053174> >.

CORVI, R. et al. RET rearrangements in familial papillary thyroid carcinomas. **Cancer Lett**, v. 170, n. 2, p. 191-8, Sep 2001. ISSN 0304-3835. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463498> >.

COSTANTINI, F. GDNF/Ret signaling and renal branching morphogenesis: From mesenchymal signals to epithelial cell behaviors. **Organogenesis**, v. 6, n. 4, p. 252-62, 2010 Oct-Dec 2010. ISSN 1555-8592. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220964> >.

COSTANTINI, F.; KOPAN, R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. **Dev Cell**, v. 18, n. 5, p. 698-712, May 2010. ISSN 1878-1551. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20493806> >.

COSTANTINI, F.; SHAKYA, R. GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. **Bioessays**, v. 28, n. 2, p. 117-27, Feb 2006. ISSN 0265-9247. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16435290> >.

COURTOIS-COX, S. et al. A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. **Cancer Cell**, v. 10, n. 6, p. 459-72, Dec 2006. ISSN 1535-6108. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157787> >.

COUTO, J. P. et al. STAT3 negatively regulates thyroid tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 35, p. E2361-70, Aug 2012. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22891351> >.

CROISILLE, Y.; GUMPEL-PINOT, M.; MARTIN, C. [Differentiation of secretory tubes of avian kidney : effect of heterogenous inducers]. **C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D**, v. 282, n. 22, p. 1987-90, Jun 1976. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/821670> >.

CUNHA, G. R. et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocr Rev**, v. 8, n. 3, p. 338-62, Aug 1987. ISSN 0163-769X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3308446> >.

DACKIW, A. P. et al. Adrenal cortical carcinoma. **World J Surg**, v. 25, n. 7, p. 914-26, Jul 2001. ISSN 0364-2313. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11572033> >.

DARNELL, J. E. STATs and gene regulation. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1630-5, Sep 1997. ISSN 0036-8075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9287210> >.

DASGUPTA, R.; FUCHS, E. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. **Development**, v. 126, n. 20, p. 4557-68, Oct 1999. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10498690> >.

DASILVA, J. et al. Regulation of sprouty stability by Mnk1-dependent phosphorylation. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 5, p. 1898-907, Mar 2006. ISSN 0270-7306. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16479008> >.

DAVALOS, A. R. et al. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, n. 2, p. 273-83, Jun 2010. ISSN 1573-7233. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20390322> >.

DAVIES, J. A.; FISHER, C. E. Genes and proteins in renal development. **Exp Nephrol**, v. 10, n. 2, p. 102-13, 2002. ISSN 1018-7782. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937757> >.

DAVIS, A. P. et al. Absence of radius and ulna in mice lacking hoxa-11 and hoxd-11. **Nature**, v. 375, n. 6534, p. 791-5, Jun 1995. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7596412> >.

DAVIS, T. K.; HOSHI, M.; JAIN, S. To bud or not to bud: the RET perspective in CAKUT. **Pediatr Nephrol**, v. 29, n. 4, p. 597-608, Apr 2014. ISSN 1432-198X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24022366> >.

DE, A. Wnt/Ca2+ signaling pathway: a brief overview. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 43, n. 10, p. 745-56, Oct 2011. ISSN 1745-7270. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21903638> >.

DE LA IGLESIA, N. et al. Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway. **Genes Dev**, v. 22, n. 4, p. 449-62, Feb 2008. ISSN 0890-9369. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18258752> >.

DE MAXIMY, A. A. et al. Cloning and expression pattern of a mouse homologue of drosophila sprouty in the mouse embryo. **Mech Dev**, v. 81, n. 1-2, p. 213-6, Mar 1999. ISSN 0925-4773. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10330503> >.

DEBACQ-CHAINIAUX, F. et al. p38(MAPK) in the senescence of human and murine fibroblasts. **Adv Exp Med Biol**, v. 694, p. 126-37, 2010. ISSN 0065-2598. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20886761> >.

DEL VECCHIO, F. R. [Development of the caudal portions of the Müllerian ducts in the rat (*Rattus norvegicus*)]. **Acta Anat (Basel)**, v. 113, n. 3, p. 235-45, 1982. ISSN 0001-5180. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7124339> >.

DELELLIS, R. A. Pathology and genetics of thyroid carcinoma. **J Surg Oncol**, v. 94, n. 8, p. 662-9, Dec 2006. ISSN 0022-4790. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17131411> >.

DEMARIA, M. et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. **Dev Cell**, v. 31, n. 6, p. 722-33, Dec 2014. ISSN 1878-1551. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25499914> >.

DEUTSCHER, E.; HUNG-CHANG YAO, H. Essential roles of mesenchyme-derived beta-catenin in mouse Müllerian duct morphogenesis. **Dev Biol**, v. 307, n. 2, p. 227-36, Jul 2007. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17532316> >.

DI CRISTOFANO, A. et al. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. **Nat Genet**, v. 19, n. 4, p. 348-55, Aug 1998. ISSN 1061-4036. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9697695> >.

DIMRI, G. P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 20, p. 9363-7, Sep 1995. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7568133> >.

DING, W. et al. Functional analysis of the human Sprouty2 gene promoter. **Gene**, v. 322, p. 175-85, Dec 2003. ISSN 0378-1119. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644509> >.

\_\_\_\_\_. Genomic structure and promoter characterization of the human Sprouty4 gene, a novel regulator of lung morphogenesis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 287, n. 1, p. L52-9, Jul 2004. ISSN 1040-0605. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977631> >.

\_\_\_\_\_. Sprouty2 downregulation plays a pivotal role in mediating crosstalk between TGF-beta1 signaling and EGF as well as FGF receptor tyrosine kinase-ERK pathways in mesenchymal cells. **J Cell Physiol**, v. 212, n. 3, p. 796-806, Sep 2007. ISSN 0021-9541. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17516543> >.

DING, W.; WARBURTON, D. Down-regulation of Sprouty2 via p38 MAPK plays a key role in the induction of cellular apoptosis by tumor necrosis factor-alpha. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 375, n. 3, p. 460-4, Oct 2008. ISSN 1090-2104. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18713620> >.

DOETSCHMAN, T. Influence of genetic background on genetically engineered mouse phenotypes. **Methods Mol Biol**, v. 530, p. 423-33, 2009. ISSN 1064-3745. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19266333> >.

DOLCET, X. et al. Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. **J Biol Chem**, v. 281, n. 31, p. 22118-30, Aug 4 2006. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M601350200> >.

DOLLED-FILHART, M. et al. Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 2, p. 594-600, Feb 2003. ISSN 1078-0432. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12576423> >.

DORMAN, K. et al. CtBP1 interacts with Ikaros and modulates pituitary tumor cell survival and response to hypoxia. **Mol Endocrinol**, v. 26, n. 3, p. 447-57, Mar 2012. ISSN 1944-9917. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22301782> >.

DOWNWARD, J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. **Semin Cell Dev Biol**, v. 15, n. 2, p. 177-82, Apr 2004. ISSN 1084-9521 (Print)1084-9521 (Linking). Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

DREWS, U. Local mechanisms in sex specific morphogenesis. **Cytogenet Cell Genet**, v. 91, n. 1-4, p. 72-80, 2000. ISSN 0301-0171. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11173834> >.

\_\_\_\_\_. Helper function of the Wolffian ducts and role of androgens in the development of the vagina. **Sex Dev**, v. 1, n. 2, p. 100-10, 2007. ISSN 1661-5433. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391520> >.

DUDLEY, A. T.; GODIN, R. E.; ROBERTSON, E. J. Interaction between FGF and BMP signaling pathways regulates development of metanephric mesenchyme. **Genes Dev**, v. 13, n. 12, p. 1601-13, Jun 1999. ISSN 0890-9369. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10385628> >.

DUMONT, J. E. et al. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. **Physiol Rev**, v. 72, n. 3, p. 667-97, Jul 1992. ISSN 0031-9333. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1320763> >.

EDSTRÖM ELDER, E. et al. The management of benign and malignant pheochromocytoma and abdominal paraganglioma. **Eur J Surg Oncol**, v. 29, n. 3, p. 278-83, Apr 2003. ISSN 0748-7983. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12657240> >.

EDWIN, F.; ANDERSON, K.; PATEL, T. B. HECT domain-containing E3 ubiquitin ligase Nedd4 interacts with and ubiquitinates Sprouty2. **J Biol Chem**, v. 285, n. 1, p. 255-64, Jan 2010. ISSN 1083-351X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19864419> >.

EDWIN, F. et al. Intermolecular interactions of Sprouty proteins and their implications in development and disease. **Mol Pharmacol**, v. 76, n. 4, p. 679-91, Oct 2009. ISSN 1521-0111. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19570949> >.

\_\_\_\_\_. The tumor suppressor PTEN is necessary for human Sprouty 2-mediated inhibition of cell proliferation. **J Biol Chem**, v. 281, n. 8, p. 4816-22, Feb 2006. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371366> >.

EFEYAN, A.; SERRANO, M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. **Cell Cycle**, v. 6, n. 9, p. 1006-10, May 2007. ISSN 1551-4005. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17457049> >.

EGAN, J. E. et al. The bimodal regulation of epidermal growth factor signaling by human Sprouty proteins. In: (Ed.). **Proc Natl Acad Sci U S A**. United States, v.99, 2002. p.6041-6. ISBN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking).

EKLOF SPINK, K.; FRIDMAN, S. G.; WEIS, W. I. Molecular mechanisms of beta-catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC-beta-catenin complex. **EMBO J**, v. 20, n. 22, p. 6203-12, Nov 2001. ISSN 0261-4189. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11707392> >.

ENG, C. et al. Heterogeneous mutation of the RET proto-oncogene in subpopulations of medullary thyroid carcinoma. **Cancer Res**, v. 56, n. 9, p. 2167-70, May 1996. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8616867> >.

ENG, P. H. et al. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. **Endocrinology**, v. 140, n. 8, p. 3404-10, Aug 1999. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10433193> >.

ENOMOTO, H. et al. GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. **Neuron**, v. 21, n. 2, p. 317-24, Aug 1998. ISSN 0896-6273. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9728913> >.

\_\_\_\_\_. GFRalpha1 expression in cells lacking RET is dispensable for organogenesis and nerve regeneration. **Neuron**, v. 44, n. 4, p. 623-36, Nov 2004. ISSN 0896-6273. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541311> >.

EVAN, G. I.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: hot or what? **Curr Opin Genet Dev**, v. 19, n. 1, p. 25-31, Feb 2009. ISSN 1879-0380. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19181515> >.

FAEDO, A.; BORELLO, U.; RUBENSTEIN, J. L. Repression of Fgf signaling by sprouty1-2 regulates cortical patterning in two distinct regions and times. **J Neurosci**, v. 30, n. 11, p. 4015-23, Mar 2010. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20237272> >.

FARATIAN, D. et al. Sprouty 2 is an independent prognostic factor in breast cancer and may be useful in stratifying patients for trastuzumab therapy. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23772, 2011. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21909357> >.

FARLEY, F. W. et al. Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. **Genesis**, v. 28, n. 3-4, p. 106-10, 2000 Nov-Dec 2000. ISSN 1526-954X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11105051> >.

FENG, Y. H. et al. Sprouty2 protein enhances the response to gefitinib through epidermal growth factor receptor in colon cancer cells. **Cancer Sci**, v. 101, n. 9, p. 2033-8, Sep 2010. ISSN 1349-7006. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624167> >.

\_\_\_\_\_. Deregulated expression of sprouty2 and microRNA-21 in human colon cancer: Correlation with the clinical stage of the disease. **Cancer Biol Ther**, v. 11, n. 1, p. 111-21, Jan 2011. ISSN 1555-8576. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21099344> >.

FENTON, R. A.; KNEPPER, M. A. Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. **Physiol Rev**, v. 87, n. 4, p. 1083-112, Oct 2007. ISSN 0031-9333. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928581> >.

FERRIS, D. G. Lower genital tract disease. **J Low Genit Tract Dis**, v. 8, n. 3, p. 177-8, Jul 2004. ISSN 1089-2591. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15874859> >.

FONG, C. W. et al. Tyrosine phosphorylation of Sprouty2 enhances its interaction with c-Cbl and is crucial for its function. **J Biol Chem**, v. 278, n. 35, p. 33456-64, Aug 2003. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12815057> >.

FOTTNER, C. et al. Role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis. **Horm Metab Res**, v. 36, n. 6, p. 397-405, Jun 2004. ISSN 0018-5043. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15241731> >.

FRANK, M. J. et al. Expression of sprouty2 inhibits B-cell proliferation and is epigenetically silenced in mouse and human B-cell lymphomas. **Blood**, v. 113, n. 11, p. 2478-87, Mar 2009. ISSN 1528-0020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147787> >.

FRATTINI, M. et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. **Oncogene**, v. 23, n. 44, p. 7436-40, Sep 2004. ISSN 0950-9232. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15273715> >.

FREUND, A. et al. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. **Mol Biol Cell**, v. 23, n. 11, p. 2066-75, Jun 2012. ISSN 1939-4586. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22496421> >.

\_\_\_\_\_. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. **Trends Mol Med**, v. 16, n. 5, p. 238-46, May 2010. ISSN 1471-499X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20444648> >.

FROLOV, A. et al. Response markers and the molecular mechanisms of action of Gleevec in gastrointestinal stromal tumors. **Mol Cancer Ther**, v. 2, n. 8, p. 699-709, Aug 2003. ISSN 1535-7163. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12939459> >.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Programmed cell death in animal development and disease. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 742-58, Nov 2011. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22078876> >.

FUMAGALLI, M. et al. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. **Nat Cell Biol**, v. 14, n. 4, p. 355-65, Mar 2012. ISSN 1476-4679. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22426077> >.

FUNAYAMA, R.; ISHIKAWA, F. Cellular senescence and chromatin structure. **Chromosoma**, v. 116, n. 5, p. 431-40, Oct 2007. ISSN 0009-5915. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17579878> >.

GANNON, H. S. et al. Mdm2-p53 signaling regulates epidermal stem cell senescence and premature aging phenotypes in mouse skin. **Dev Biol**, v. 353, n. 1, p. 1-9, May 2011. ISSN 1095-564X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21334322> >.

GEORGAKOPOULOU, E. A. et al. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. **Aging (Albany NY)**, v. 5, n. 1, p. 37-50, Jan 2013. ISSN 1945-4589. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23449538> >.

GIL, J.; PETERS, G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 9, p. 667-77, Sep 2006. ISSN 1471-0072. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921403> >.

GIMENEZ-ROQUEPLO, A. P.; DAHIA, P. L.; ROBLEDO, M. An update on the genetics of paraganglioma, pheochromocytoma, and associated hereditary syndromes. **Horm Metab Res**, v. 44, n. 5, p. 328-33, May 2012. ISSN 1439-4286. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22328163> >.

GIMENEZ-ROQUEPLO, A. P. et al. Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. **Cancer Res**, v. 63, n. 17, p. 5615-21, Sep 2003. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14500403> >.



GOLDEN, J. P. et al. Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. **Exp Neurol**, v. 158, n. 2, p. 504-28, Aug 1999. ISSN 0014-4886. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415156> >.

GOLDSTEIN, R. E. et al. Clinical experience over 48 years with pheochromocytoma. **Ann Surg**, v. 229, n. 6, p. 755-64; discussion 764-6, Jun 1999. ISSN 0003-4932. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10363888> >.

GRAHAM, T. A. et al. Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. **Cell**, v. 103, n. 6, p. 885-96, Dec 2000. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136974> >.

GRIBOUVAL, O. et al. Mutations in genes in the renin-angiotensin system are associated with autosomal recessive renal tubular dysgenesis. **Nat Genet**, v. 37, n. 9, p. 964-8, Sep 2005. ISSN 1061-4036. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16116425> >.

GRIESHAMMER, U. et al. SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. **Dev Cell**, v. 6, n. 5, p. 709-17, May 2004. ISSN 1534-5807. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15130495> >.

GROBSTEIN, C. Inductive tissue interaction in development. **Adv Cancer Res**, v. 4, p. 187-236, 1956a. ISSN 0065-230X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13381610> >.

\_\_\_\_\_. Trans-filter induction of tubules in mouse metanephrogenic mesenchyme. **Exp Cell Res**, v. 10, n. 2, p. 424-40, Apr 1956b. ISSN 0014-4827. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13317909> >.

GROSS, I. et al. Sprouty2 inhibits BDNF-induced signaling and modulates neuronal differentiation and survival. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 10, p. 1802-12, Oct 2007. ISSN 1350-9047. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17599098> >.

\_\_\_\_\_. Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. **J Biol Chem**, v. 276, n. 49, p. 46460-8, Dec 2001. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585837> >.

\_\_\_\_\_. The receptor tyrosine kinase regulator Sprouty1 is a target of the tumor suppressor WT1 and important for kidney development. **J Biol Chem**, v. 278, n. 42, p. 41420-30, Oct 2003. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12882970> >.

GROTE, D. et al. Gata3 acts downstream of beta-catenin signaling to prevent ectopic metanephric kidney induction. **PLoS Genet**, v. 4, n. 12, p. e1000316, Dec 2008. ISSN 1553-7404. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19112489> >.

\_\_\_\_\_. Pax 2/8-regulated Gata 3 expression is necessary for morphogenesis and guidance of the nephric duct in the developing kidney. **Development**, v. 133, n. 1, p. 53-61, Jan 2006. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319112> >.

GUBBAY, J. et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. **Nature**, v. 346, n. 6281, p. 245-50, Jul 1990. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2374589> >.

GUPTA, C.; SINGH, M. Stimulation of epidermal growth factor gene expression during the fetal mouse reproductive tract differentiation: role of androgen and its receptor. **Endocrinology**, v. 137, n. 2, p. 705-11, Feb 1996. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8593821> >.

GUY, G. R. et al. Sprouty proteins: modified modulators, matchmakers or missing links? **J Endocrinol**, v. 203, n. 2, p. 191-202, Nov 2009. ISSN 1479-6805. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19423641> >.

HACOHEN, N. et al. sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways. **Cell**, v. 92, n. 2, p. 253-63, Jan 1998. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9458049> >.

HAEGEL, H. et al. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. **Development**, v. 121, n. 11, p. 3529-37, Nov 1995. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8582267> >.

HALAZONETIS, T. D.; GORGOLIS, V. G.; BARTEK, J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. **Science**, v. 319, n. 5868, p. 1352-5, Mar 2008. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18323444> >.

HALL, A. B. et al. hSpry2 is targeted to the ubiquitin-dependent proteasome pathway by c-Cbl. In: (Ed.). **Curr Biol**. England, v.13, 2003. p.308-14. ISBN 0960-9822 (Print)0960-9822 (Linking).

HAMMER, G. D.; PARKER, K. L.; SCHIMMER, B. P. Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1018-24, Mar 2005. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15604207> >.

HANAFUSA, H. et al. Shp2, an SH2-containing protein-tyrosine phosphatase, positively regulates receptor tyrosine kinase signaling by dephosphorylating and inactivating the inhibitor Sprouty. **J Biol Chem**, v. 279, n. 22, p. 22992-5, May 2004. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031289> >.

\_\_\_\_\_. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. In: (Ed.). **Nat Cell Biol**. England, v.4, 2002. p.850-8. ISBN 1465-7392 (Print)1465-7392 (Linking).

HANNA, J. et al. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. **Nature**, v. 462, n. 7273, p. 595-601, Dec 2009. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898493> >.

HANNEMA, S. E.; HUGHES, I. A. Regulation of Wolffian duct development. **Horm Res**, v. 67, n. 3, p. 142-51, 2007. ISSN 0301-0163. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077643> >.

HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**, v. 345, n. 6274, p. 458-60, May 1990. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2342578> >.

HART, D. B. Morphology of the Human Urinogenital Tract. **J Anat Physiol**, v. 35, n. Pt 3, p. 330-75, Apr 1901. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17232475> >.

HAWKINS, P. T.; JACKSON, T. R.; STEPHENS, L. R. Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P3 by activating a PtdIns(4,5)P2 3-OH kinase. **Nature**, v. 358, n. 6382, p. 157-9, Jul 9 1992. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836 (Linking). Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/358157a0> >.

HAYFLICK, L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. **Exp Cell Res**, v. 37, p. 614-36, Mar 1965. ISSN 0014-4827. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14315085> >.

HE, W. W.; KUMAR, M. V.; TINDALL, D. J. A frame-shift mutation in the androgen receptor gene causes complete androgen insensitivity in the testicular-feminized mouse. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 9, p. 2373-8, May 1991. ISSN 0305-1048. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2041777> >.

HE, X. et al. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. **Development**, v. 131, n. 8, p. 1663-77, Apr 2004. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084453> >.

HERSHKOVITZ, L. et al. Adrenal 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the mouse catabolizes progesterone and 11-deoxycorticosterone and is restricted to the X-zone. **Endocrinology**, v. 148, n. 3, p. 976-88, Mar 2007. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17122075> >.

HIRANO, T.; NAKAJIMA, K.; HIBI, M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 8, n. 4, p. 241-52, Dec 1997. ISSN 1359-6101. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620640> >.

HIRATA, Y. et al. Acidification of the Golgi apparatus is indispensable for maturation but not for cell surface delivery of Ret. **J Neurochem**, v. 115, n. 3, p. 606-13, Nov 2010. ISSN 1471-4159. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20796177> >.

HOAR, R. M. Comparative developmental aspects of selected organ systems. II. Gastrointestinal and urogenital systems. **Environ Health Perspect**, v. 18, p. 61-6, Dec 1976. ISSN 0091-6765. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1030401> >.

HOEFLICH, A. et al. Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) separates hypertrophic and hyperplastic effects of growth hormone (GH)/IGF-I excess on adrenocortical cells in vivo. **FASEB J**, v. 16, n. 13, p. 1721-31, Nov 2002. ISSN 1530-6860. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12409314> >.

HOENICKE, L.; ZENDER, L. Immune surveillance of senescent cells--biological significance in cancer- and non-cancer pathologies. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 6, p. 1123-6, Jun 2012. ISSN 1460-2180. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22470164> >.

HOLGREN, C. et al. Sprouty-2 controls c-Met expression and metastatic potential of colon cancer cells: sprouty/c-Met upregulation in human colonic adenocarcinomas. **Oncogene**, v. 29, n. 38, p. 5241-53, Sep 2010. ISSN 1476-5594. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20661223> >.

HOSHI, M. et al. Novel mechanisms of early upper and lower urinary tract patterning regulated by RetY1015 docking tyrosine in mice. **Development**, v. 139, n. 13, p. 2405-15, Jul 2012. ISSN 1477-9129. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22627285> >.

HOSSAIN, A.; SAUNDERS, G. F. Synergistic cooperation between the beta-catenin signaling pathway and steroidogenic factor 1 in the activation of the Mullerian inhibiting substance type II receptor. **J Biol Chem**, v. 278, n. 29, p. 26511-6, Jul 2003. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724325> >.

HSIEH-LI, H. M. et al. Gsh-2, a murine homeobox gene expressed in the developing brain. **Mech Dev**, v. 50, n. 2-3, p. 177-86, Apr 1995. ISSN 0925-4773. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7619729> >.

HUBACKOVA, S. et al. IL1- and TGF $\beta$ -Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'bystander senescence'. **Ageing (Albany NY)**, v. 4, n. 12, p. 932-51, Dec 2012. ISSN 1945-4589. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23385065> >.

HUBER, A. H.; NELSON, W. J.; WEIS, W. I. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. **Cell**, v. 90, n. 5, p. 871-82, Sep 1997. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298899> >.

HUBER, A. H.; WEIS, W. I. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. **Cell**, v. 105, n. 3, p. 391-402, May 2001. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348595> >.

IGLESIAS, D. M. et al. Canonical WNT signaling during kidney development. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 293, n. 2, p. F494-500, Aug 2007. ISSN 1931-857X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17494089> >.

IHLE, J. N.; KERR, I. M. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. **Trends Genet**, v. 11, n. 2, p. 69-74, Feb 1995. ISSN 0168-9525. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7716810> >.

IMPAGNATIELLO, M. A. et al. Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells. **J Cell Biol**, v. 152, n. 5, p. 1087-98, Mar 2001. ISSN 0021-9525. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238463> >.

ISHIDA, M. et al. Sprouty2 regulates growth and differentiation of human neuroblastoma cells through RET tyrosine kinase. **Cancer Sci**, v. 98, n. 6, p. 815-21, Jun 2007. ISSN 1347-9032. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17388787> >.

ISHIZAKA, Y. et al. Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. **Oncogene**, v. 4, n. 12, p. 1519-21, Dec 1989. ISSN 0950-9232. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2687772> >.

ITAHANA, K.; DIMRI, G.; CAMPISI, J. Regulation of cellular senescence by p53. **Eur J Biochem**, v. 268, n. 10, p. 2784-91, May 2001. ISSN 0014-2956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358493> >.

JACOBS, J. J. et al. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. **Nature**, v. 397, n. 6715, p. 164-8, Jan 1999. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9923679> >.

JAIN, S. The many faces of RET dysfunction in kidney. **Organogenesis**, v. 5, n. 4, p. 177-90, Oct 2009. ISSN 1555-8592. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20539737> >.

JAIN, S. et al. Critical and distinct roles for key RET tyrosine docking sites in renal development. **Genes Dev**, v. 20, n. 3, p. 321-33, Feb 2006. ISSN 0890-9369. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452504> >.

JAMIN, S. P. et al. Requirement of Bmpr1a for Müllerian duct regression during male sexual development. **Nat Genet**, v. 32, n. 3, p. 408-10, Nov 2002. ISSN 1061-4036. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12368913> >.

JARVIS, L. A. et al. Sprouty proteins are in vivo targets of Corkscrew/SHP-2 tyrosine phosphatases. **Development**, v. 133, n. 6, p. 1133-42, Mar 2006. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16481357> >.

JECK, W. R.; SIEBOLD, A. P.; SHARPLESS, N. E. Review: a meta-analysis of GWAS and age-associated diseases. **Aging Cell**, v. 11, n. 5, p. 727-31, Oct 2012. ISSN 1474-9726. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22888763> >.

JEYAPALAN, J. C. et al. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. **Mech Ageing Dev**, v. 128, n. 1, p. 36-44, Jan 2007. ISSN 0047-6374. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116315> >.

JHO, E. H. et al. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 4, p. 1172-83, Feb 2002. ISSN 0270-7306. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11809808> >.

JOST, A. [Fetal intersexuality induced by methylandrostenediol in the rat; with reference to a probably similar clinical observation]. **C R Seances Soc Biol Fil**, v. 147, n. 23-24, p. 1930-3, Dec 1953. ISSN 0037-9026. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13161296> >.

\_\_\_\_\_. A new look at the mechanisms controlling sex differentiation in mammals. **Johns Hopkins Med J**, v. 130, n. 1, p. 38-53, Jan 1972. ISSN 0021-7263. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4481103> >.

JUN, J. I.; LAU, L. F. Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. **Aging (Albany NY)**, v. 2, n. 9, p. 627-31, Sep 2010. ISSN 1945-4589. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20930261> >.

JUNG, J. E. et al. Sprouty1 regulates neural and endothelial differentiation of mouse embryonic stem cells. **Stem Cells Dev**, v. 21, n. 4, p. 554-61, Mar 2012. ISSN 1557-8534. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595564> >.

KAM, R. K. et al. Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development. **Cell Biosci**, v. 2, n. 1, p. 11, Mar 2012. ISSN 2045-3701. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439772> >.

KANETSKY, P. A. et al. Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer. **Nat Genet**, v. 41, n. 7, p. 811-5, Jul 2009. ISSN 1546-1718. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19483682> >.

KANG, M. K. et al. Senescence-associated genes in normal human oral keratinocytes. **Exp Cell Res**, v. 287, n. 2, p. 272-81, Jul 2003. ISSN 0014-4827. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12837283> >.

KAPLON, J. et al. A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. **Nature**, v. 498, n. 7452, p. 109-12, Jun 2013. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685455> >.

KARPAC, J. et al. Development, maintenance, and function of the adrenal gland in early postnatal proopiomelanocortin-null mutant mice. **Endocrinology**, v. 146, n. 6, p. 2555-62, Jun 2005. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731356> >.

KAWAKAMI, Y. et al. Involvement of frizzled-10 in Wnt-7a signaling during chick limb development. **Dev Growth Differ**, v. 42, n. 6, p. 561-9, Dec 2000. ISSN 0012-1592. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11142678> >.

KEEFE DAVIS, T.; HOSHI, M.; JAIN, S. Stage specific requirement of Gfra1 in the ureteric epithelium during kidney development. **Mech Dev**, v. 130, n. 9-10, p. 506-18, 2013 Sep-Oct 2013. ISSN 1872-6356. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23542432> >.

KEEGAN, C. E.; HAMMER, G. D. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, n. 5, p. 200-8, Jul 2002. ISSN 1043-2760. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12185666> >.

KELLY, J. et al. Senescence regulates macrophage activation and angiogenic fate at sites of tissue injury in mice. **J Clin Invest**, v. 117, n. 11, p. 3421-6, Nov 2007. ISSN 0021-9738. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17975672> >.

KIEFER, S. M. et al. Sall1-dependent signals affect Wnt signaling and ureter tip fate to initiate kidney development. **Development**, v. 137, n. 18, p. 3099-106, Sep 2010. ISSN 1477-9129. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702564> >.

KIKUCHI, A. et al. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. **Int Rev Cell Mol Biol**, v. 291, p. 21-71, 2011. ISSN 1937-6448. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22017973> >.

KIM, W. G. et al. Basal STAT3 activities are negatively correlated with tumor size in papillary thyroid carcinomas. **J Endocrinol Invest**, v. 35, n. 4, p. 413-8, Apr 2012. ISSN 1720-8386. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21897114> >.

KIM, W. Y.; SHARPLESS, N. E. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. **Cell**, v. 127, n. 2, p. 265-75, Oct 2006. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055429> >.

KIMURA, E. T. et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. **Cancer Res**, v. 63, n. 7, p. 1454-7, Apr 2003. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12670889> >.

KITAGAKI, J. et al. FGF8 is essential for formation of the ductal system in the male reproductive tract. **Development**, v. 138, n. 24, p. 5369-78, Dec 2011. ISSN 1477-9129. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22110055> >.

KJAER, S. et al. Mammal-restricted elements predispose human RET to folding impairment by HSCR mutations. **Nat Struct Mol Biol**, v. 17, n. 6, p. 726-31, Jun 2010. ISSN 1545-9985. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473317> >.

KLEIN, O. D. et al. Sprouty genes control diastema tooth development via bidirectional antagonism of epithelial-mesenchymal FGF signaling. **Dev Cell**, v. 11, n. 2, p. 181-90, Aug 2006. ISSN 1534-5807. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16890158> >.

KNAUF, J. A. et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. **Cancer Res**, v. 65, n. 10, p. 4238-45, May 2005. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899815> >.

KOBAYASHI, A.; BEHRINGER, R. R. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. **Nat Rev Genet**, v. 4, n. 12, p. 969-80, Dec 2003. ISSN 1471-0056. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14631357> >.

KOBAYASHI, A. et al. Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. **Development**, v. 132, n. 12, p. 2809-23, Jun 2005. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15930111> >.

\_\_\_\_\_. Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development. **Development**, v. 131, n. 3, p. 539-49, Feb 2004. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14695376> >.

\_\_\_\_\_.  $\beta$ -Catenin is essential for Müllerian duct regression during male sexual differentiation. **Development**, v. 138, n. 10, p. 1967-75, May 2011. ISSN 1477-9129. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21490063> >.

KOFF, A. K. Development of the vagina in the human fetus. **Contrib Embryol**, v. 24, n. 140, p. 59-91, Sep 1933. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12332362> >.

KOHLHASE, J. et al. Mutations in the *SALL1* putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. **Nat Genet**, v. 18, n. 1, p. 81-3, Jan 1998. ISSN 1061-4036. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9425907> >.

KOK, F. O. et al. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. **Dev Cell**, v. 32, n. 1, p. 97-108, Jan 2015. ISSN 1878-1551. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25533206> >.

KOMETANI, K. et al. *CIN85* drives B cell responses by linking BCR signals to the canonical NF- $\kappa$ B pathway. **J Exp Med**, v. 208, n. 7, p. 1447-57, Jul 2011. ISSN 1540-9538. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708930> >.

KONDO, T.; EZZAT, S.; ASA, S. L. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 4, p. 292-306, Apr 2006. ISSN 1474-175X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557281> >.

KOOPMAN, P. et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. **Nature**, v. 351, n. 6322, p. 117-21, May 1991. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2030730> >.

\_\_\_\_\_. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. **Nature**, v. 348, n. 6300, p. 450-2, Nov 1990. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2247150> >.

KOPP, H. G. et al. Beta-galactosidase staining on bone marrow. The osteoclast pitfall. **Histol Histopathol**, v. 22, n. 9, p. 971-6, 09 2007. ISSN 1699-5848. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17523074> >.

KORTLEVER, R. M.; HIGGINS, P. J.; BERNARDS, R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. **Nat Cell Biol**, v. 8, n. 8, p. 877-84, Aug 2006. ISSN 1465-7392. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16862142> >.

KRAMER, S. et al. Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in Drosophila. **Development**, v. 126, n. 11, p. 2515-25, Jun 1999. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10226010> >.

KRISHNAMURTHY, J. et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. **J Clin Invest**, v. 114, n. 9, p. 1299-307, Nov 2004. ISSN 0021-9738. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520862> >.

KRIZHANOVSky, V.; LOWE, S. W. Stem cells: The promises and perils of p53. **Nature**, v. 460, n. 7259, p. 1085-6, Aug 2009. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19713919> >.

KRIZHANOVSky, V. et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. **Cell**, v. 134, n. 4, p. 657-67, Aug 2008. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18724938> >.

KRTOLICA, A. et al. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 21, p. 12072-7, Oct 2001. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11593017> >.

KSIAZEK, K.; JÖRRES, A.; WITOWSKI, J. Senescence induces a proangiogenic switch in human peritoneal mesothelial cells. **Rejuvenation Res**, v. 11, n. 3, p. 681-3, Jun 2008. ISSN 1549-1684. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593286> >.

KUILMAN, T. et al. The essence of senescence. **Genes Dev**, v. 24, n. 22, p. 2463-79, Nov 2010. ISSN 1549-5477. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21078816> >.

\_\_\_\_\_. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. **Cell**, v. 133, n. 6, p. 1019-31, Jun 2008. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18555778> >.

KUILMAN, T.; PEEPER, D. S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 2, p. 81-94, Feb 2009. ISSN 1474-1768. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19132009> >.

KUME, T.; DENG, K.; HOGAN, B. L. Murine forkhead/winged helix genes Foxc1 (Mf1) and Foxc2 (Mfh1) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract. **Development**, v. 127, n. 7, p. 1387-95, Apr 2000. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10704385> >.

KURACHA, M. R. et al. Spry1 and Spry2 are necessary for lens vesicle separation and corneal differentiation. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 52, n. 9, p. 6887-97, Aug 2011. ISSN 1552-5783. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21743007> >.

\_\_\_\_\_. Spry1 and Spry2 are necessary for eyelid closure. **Dev Biol**, v. 383, n. 2, p. 227-38, Nov 2013. ISSN 1095-564X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055172> >.

KURITA, T. Developmental origin of vaginal epithelium. **Differentiation**, v. 80, n. 2-3, p. 99-105, 2010 Sep-Oct 2010. ISSN 1432-0436. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20638775> >.

\_\_\_\_\_. Normal and abnormal epithelial differentiation in the female reproductive tract. **Differentiation**, v. 82, n. 3, p. 117-26, Oct 2011. ISSN 1432-0436. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21612855> >.



KURODA, T. et al. Mullerian inhibiting substance ontogeny and its modulation by follicle-stimulating hormone in the rat testes. **Endocrinology**, v. 127, n. 4, p. 1825-32, Oct 1990. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2119293> >.

KURZ, D. J. et al. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. **J Cell Sci**, v. 113 ( Pt 20), p. 3613-22, Oct 2000. ISSN 0021-9533. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11017877> >.

KWABI-ADDO, B.; REN, C.; ITTMANN, M. DNA methylation and aberrant expression of Sprouty1 in human prostate cancer. **Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 54-61, Jan 2009. ISSN 1559-2308. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164898> >.

LABASTIE, M. C. et al. The GATA-3 gene is expressed during human kidney embryogenesis. **Kidney Int**, v. 47, n. 6, p. 1597-603, Jun 1995. ISSN 0085-2538. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7643528> >.

LABERGE, R. M. et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. **Cancer Microenviron**, v. 5, n. 1, p. 39-44, Apr 2012. ISSN 1875-2284. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21706180> >.

LAO, D. H. et al. Direct binding of PP2A to Sprouty2 and phosphorylation changes are a prerequisite. **J Biol Chem**, v. 282, n. 12, p. 9117-26, Mar 23 2007a. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258 (Linking). Available at: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M607563200> >.

\_\_\_\_\_. Direct binding of PP2A to Sprouty2 and phosphorylation changes are a prerequisite for ERK inhibition downstream of fibroblast growth factor receptor stimulation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 12, p. 9117-26, Mar 2007b. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17255109> >.

\_\_\_\_\_. Direct binding of PP2A to Sprouty2 and phosphorylation changes are a prerequisite for ERK inhibition downstream of fibroblast growth factor receptor stimulation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 12, p. 9117-26, Mar 2007c. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17255109> >.

LEAMAN, D. W. et al. Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. **FASEB J**, v. 10, n. 14, p. 1578-88, Dec 1996. ISSN 0892-6638. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9002549> >.

LEE, S. A. et al. Integration of genomic analysis and in vivo transfection to identify sprouty 2 as a candidate tumor suppressor in liver cancer. **Hepatology**, v. 47, n. 4, p. 1200-10, Apr 2008. ISSN 1527-3350. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18214995> >.

\_\_\_\_\_. Synergistic role of Sprouty2 inactivation and c-Met up-regulation in mouse and human hepatocarcinogenesis. **Hepatology**, v. 52, n. 2, p. 506-17, Aug 2010. ISSN 1527-3350. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683950> >.

LEEKSMAN, O. C. et al. Human sprouty 4, a new ras antagonist on 5q31, interacts with the dual specificity kinase TESK1. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 10, p. 2546-56, May 2002. ISSN 0014-2956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12027893> >.

LEHNERT, H.; MUNDSCHENK, J.; HAHN, K. Malignant pheochromocytoma. **Front Horm Res**, v. 31, p. 155-62, 2004. ISSN 0301-3073. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14674310> >.

LEUNG, J. Y. et al. Activation of AXIN2 expression by beta-catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. **J Biol Chem**, v. 277, n. 24, p. 21657-65, Jun 2002. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11940574> >.

LEWANDOSKI, M.; MEYERS, E. N.; MARTIN, G. R. Analysis of Fgf8 gene function in vertebrate development. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 62, p. 159-68, 1997. ISSN 0091-7451 (Print). Available at: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9598348](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9598348) >.

LIN, A. et al. CRISPR/Cas9 mutagenesis invalidates a putative cancer dependency targeted in ongoing clinical trials. **Elife**, v. 6, Mar 2017. ISSN 2050-084X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28337968> >.

LINDSTEN, T. et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. **Mol Cell**, v. 6, n. 6, p. 1389-99, Dec 2000. ISSN 1097-2765. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163212> >.

LING, X.; ARLINGHAUS, R. B. Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice. **Cancer Res**, v. 65, n. 7, p. 2532-6, Apr 2005. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805244> >.

LIPSCHUTZ, J. H. et al. Clonality of urogenital organs as determined by analysis of chimeric mice. **Cells Tissues Organs**, v. 165, n. 2, p. 57-66, 1999. ISSN 1422-6405. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516418> >.

LITO, P. et al. Sprouty 2 regulates DNA damage-induced apoptosis in Ras-transformed human fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 284, n. 2, p. 848-54, Jan 2009. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008219> >.

\_\_\_\_\_. Evidence that sprouty 2 is necessary for sarcoma formation by H-Ras oncogene-transformed human fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 283, n. 4, p. 2002-9, Jan 2008. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18048363> >.

LITOVCHICK, L. et al. DYRK1A protein kinase promotes quiescence and senescence through DREAM complex assembly. **Genes Dev**, v. 25, n. 8, p. 801-13, Apr 2011. ISSN 1549-5477. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21498570> >.

LIU, D.; HORNSBY, P. J. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. **Cancer Res**, v. 67, n. 7, p. 3117-26, Apr 2007. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409418> >.

LIU, J. et al. Oncogenic BRAF regulates beta-Trcp expression and NF-kappaB activity in human melanoma cells. **Oncogene**, v. 26, n. 13, p. 1954-8, Mar 2007. ISSN 0950-9232. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17001349> >.

LIU, L. H.; BAKHOS, R.; WOJCIK, E. M. Concomitant papillary thyroid carcinoma and Hashimoto's thyroiditis. **Semin Diagn Pathol**, v. 18, n. 2, p. 99-103, May 2001. ISSN 0740-2570. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11403259> >.

LO, T. L. et al. The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer. **Cancer Res**, v. 64, n. 17, p. 6127-36, Sep 2004. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15342396> >.

LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 20, p. 781-810, 2004. ISSN 1081-0706. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15473860> >.

LOVELL-BADGE, R.; ROBERTSON, E. XY female mice resulting from a heritable mutation in the primary testis-determining gene, Tdy. **Development**, v. 109, n. 3, p. 635-46, Jul 1990. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2401216> >.

LU, B. C. et al. Etv4 and Etv5 are required downstream of GDNF and Ret for kidney branching morphogenesis. **Nat Genet**, v. 41, n. 12, p. 1295-302, Dec 2009. ISSN 1546-1718. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898483> >.

LU, W. et al. Disruption of ROBO2 is associated with urinary tract anomalies and confers risk of vesicoureteral reflux. **Am J Hum Genet**, v. 80, n. 4, p. 616-32, Apr 2007. ISSN 0002-9297. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17357069> >.

LUNG, B.; CUNHA, G. R. Development of seminal vesicles and coagulating glands in neonatal mice. I. The morphogenetic effects of various hormonal conditions. **Anat Rec**, v. 199, n. 1, p. 73-88, Jan 1981. ISSN 0003-276X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7224202> >.

LUSTIG, B. et al. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 4, p. 1184-93, Feb 2002. ISSN 0270-7306. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11809809> >.

LYON, M. F.; HAWKES, S. G. X-linked gene for testicular feminization in the mouse. **Nature**, v. 227, n. 5264, p. 1217-9, Sep 1970. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5452809> >.

MA, L. Endocrine disruptors in female reproductive tract development and carcinogenesis. **Trends Endocrinol Metab**, v. 20, n. 7, p. 357-63, Sep 2009. ISSN 1879-3061. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19709900> >.

MACDONALD, B. T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Dev Cell**, v. 17, n. 1, p. 9-26, Jul 2009. ISSN 1878-1551. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19619488> >.

MACIP, S. et al. Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. **EMBO J**, v. 21, n. 9, p. 2180-8, May 2002. ISSN 0261-4189. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11980715> >.

MACIÀ, A. et al. Sprouty1 is a candidate tumor-suppressor gene in medullary thyroid carcinoma. **Oncogene**, v. 31, n. 35, p. 3961-72, Aug 2012. ISSN 1476-5594. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158037> >.

\_\_\_\_\_. Sprouty1 induces a senescence-associated secretory phenotype by regulating NFκB activity: implications for tumorigenesis. **Cell Death Differ**, v. 21, n. 2, p. 333-43, Feb 2014. ISSN 1476-5403. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270409> >.

MAESHIMA, A. et al. Glial cell-derived neurotrophic factor independent ureteric bud outgrowth from the Wolffian duct. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 12, p. 3147-55, Dec 2007. ISSN 1533-3450. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18003772> >.

MAHENDROO, M. S. et al. Unexpected virilization in male mice lacking steroid 5 alpha-reductase enzymes. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4652-62, Nov 2001. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606430> >.

MAHONEY ROGERS, A. A.; ZHANG, J.; SHIM, K. Sprouty1 and Sprouty2 limit both the size of the otic placode and hindbrain Wnt8a by antagonizing FGF signaling. **Dev Biol**, v. 353, n. 1, p. 94-104, May 2011. ISSN 1095-564X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21362415> >.

MARETTO, S. et al. Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 6, p. 3299-304, Mar 2003. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626757> >.

MAROSE, T. D. et al. Beta-catenin is necessary to keep cells of ureteric bud/Wolffian duct epithelium in a precursor state. **Dev Biol**, v. 314, n. 1, p. 112-26, Feb 2008. ISSN 1095-564X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177851> >.

MASON, J. M. et al. Tyrosine phosphorylation of Sprouty proteins regulates their ability to inhibit growth factor signaling: a dual feedback loop. **Mol Biol Cell**, v. 15, n. 5, p. 2176-88, May 2004. ISSN 1059-1524. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004239> >.

\_\_\_\_\_. Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. In: (Ed.). **Trends Cell Biol**. England, v.16, 2006. p.45-54. ISBN 0962-8924 (Print)0962-8924 (Linking).

MASOUMI-MOGHADDAM, S.; AMINI, A.; MORRIS, D. L. The developing story of Sprouty and cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 33, n. 2-3, p. 695-720, Sep 2014. ISSN 1573-7233. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24744103> >.

MASSÉ, J. et al. The developing female genital tract: from genetics to epigenetics. **Int J Dev Biol**, v. 53, n. 2-3, p. 411-24, 2009. ISSN 1696-3547. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19412895> >.

MATHEU, A. et al. Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. **Ageing Cell**, v. 8, n. 2, p. 152-61, Apr 2009. ISSN 1474-9726. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19239418> >.

\_\_\_\_\_. Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. **Nature**, v. 448, n. 7151, p. 375-9, Jul 2007. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17637672> >.

MAUCH, R. B.; THIEDEMANN, K. U.; DREWS, U. The vagina is formed by downgrowth of Wolffian and Müllerian ducts. Graphical reconstructions from normal and Tfm mouse embryos. **Anat Embryol (Berl)**, v. 172, n. 1, p. 75-87, 1985. ISSN 0340-2061. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4037375> >.

MAZZAFERRI, E. L.; KLOOS, R. T. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 4, p. 1447-63, Apr 2001. ISSN 0021-972X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297567> >.

MAZZANTI, C. et al. Using gene expression profiling to differentiate benign versus malignant thyroid tumors. **Cancer Res**, v. 64, n. 8, p. 2898-903, Apr 2004. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087409> >.

MCKIE, A. B. et al. Epigenetic inactivation of the human sprouty2 (hSPRY2) homologue in prostate cancer. **Oncogene**, v. 24, n. 13, p. 2166-74, Mar 2005. ISSN 0950-9232. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15735753> >.

MCLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse. **Dev Biol**, v. 262, n. 1, p. 1-15, Oct 2003. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14512014> >.

MEHTA, V. et al. Atlas of Wnt and R-spondin gene expression in the developing male mouse lower urogenital tract. **Dev Dyn**, v. 240, n. 11, p. 2548-60, Nov 2011. ISSN 1097-0177. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21936019> >.

MENDELSON, C. Using mouse models to understand normal and abnormal urogenital tract development. **Organogenesis**, v. 5, n. 1, p. 306-14, Jan 2009. ISSN 1547-6278. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19568352> >.

MENKE, D. B.; KOUBOVA, J.; PAGE, D. C. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. **Dev Biol**, v. 262, n. 2, p. 303-12, Oct 2003. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14550793> >.

MERICSKAY, M.; KITAJEWSKI, J.; SASSOON, D. Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. **Development**, v. 131, n. 9, p. 2061-72, May 2004. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073149> >.

MERKEL, C. E.; KARNER, C. M.; CARROLL, T. J. Molecular regulation of kidney development: is the answer blowing in the Wnt? **Pediatr Nephrol**, v. 22, n. 11, p. 1825-38, Nov 2007. ISSN 0931-041X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17554566> >.

METE, O. et al. Protocol for the examination of specimens from patients with pheochromocytomas and extra-adrenal paragangliomas. **Arch Pathol Lab Med**, v. 138, n. 2, p. 182-8, Feb 2014. ISSN 1543-2165. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24476517> >.

MEYERS, E. N.; LEWANDOSKI, M.; MARTIN, G. R. An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. **Nat Genet**, v. 18, n. 2, p. 136-41, Feb 1998. ISSN 1061-4036. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9462741> >.

MICHALOGLOU, C. et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 720-4, Aug 2005. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079850> >.

MICHOS, O. et al. Kidney development in the absence of Gdnf and Spry1 requires Fgf10. **PLoS Genet**, v. 6, n. 1, p. e1000809, Jan 2010. ISSN 1553-7404. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20084103> >.

\_\_\_\_\_. Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. **Development**, v. 131, n. 14, p. 3401-10, Jul 2004. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15201225> >.

MILLER, C.; SASSOON, D. A. Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. **Development**, v. 125, n. 16, p. 3201-11, Aug 1998. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671592> >.

MILLIS, A. J. et al. Metalloproteinase and TIMP-1 gene expression during replicative senescence. **Exp Gerontol**, v. 27, n. 4, p. 425-8, 1992 Jul-Aug 1992. ISSN 0531-5565. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1459220> >.

MINOWADA, G. et al. Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. **Development**, v. 126, n. 20, p. 4465-75, Oct 1999. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10498682> >.

MISHINA, Y. et al. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. **Genes Dev**, v. 10, n. 20, p. 2577-87, Oct 1996. ISSN 0890-9369. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895659> >.

MIYAMOTO, N. et al. Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. **Development**, v. 124, n. 9, p. 1653-64, May 1997. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9165114> >.

MIYAZAKI, Y. et al. Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. **J Clin Invest**, v. 105, n. 7, p. 863-73, Apr 2000. ISSN 0021-9738. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10749566> >.

MONACO, C. et al. The RFG oligomerization domain mediates kinase activation and re-localization of the RET/PTC3 oncoprotein to the plasma membrane. **Oncogene**, v. 20, n. 5, p. 599-608, Feb 2001. ISSN 0950-9232. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11313992> >.

MONTAGUTELLI, X. Effect of the genetic background on the phenotype of mouse mutations. **J Am Soc Nephrol**, v. 11 Suppl 16, p. S101-5, Nov 2000. ISSN 1046-6673. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11065339> >.

MORIYAMA, A. et al. GFP transgenic mice reveal active canonical Wnt signal in neonatal brain and in adult liver and spleen. **Genesis**, v. 45, n. 2, p. 90-100, Feb 2007. ISSN 1526-954X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17245775> >.

MUGFORD, J. W. et al. Hoxd11 specifies a program of metanephric kidney development within the intermediate mesoderm of the mouse embryo. **Dev Biol**, v. 319, n. 2, p. 396-405, Jul 2008. ISSN 1095-564X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485340> >.

MULLIGAN, L. M. RET revisited: expanding the oncogenic portfolio. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 3, p. 173-86, Mar 2014. ISSN 1474-1768. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24561444> >.

MURATA, T. et al.  $\beta$ -Catenin<sup>C429S</sup> mice exhibit sterility consequent to spatiotemporally sustained Wnt signalling in the internal genitalia. **Sci Rep**, v. 4, p. 6959, Nov 2014. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25376241> >.

MURGA, M. et al. A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. **Nat Genet**, v. 41, n. 8, p. 891-8, Aug 2009. ISSN 1546-1718. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19620979> >.

MUSTEANU, M. et al. Stat3 is a negative regulator of intestinal tumor progression in Apc(Min) mice. **Gastroenterology**, v. 138, n. 3, p. 1003-11.e1-5, Mar 2010. ISSN 1528-0012. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19962983> >.

MUÑOZ-ESPÍN, D. et al. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. **Cell**, v. 155, n. 5, p. 1104-18, Nov 2013. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24238962> >.

MUÑOZ-ESPÍN, D.; SERRANO, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 7, p. 482-96, Jul 2014. ISSN 1471-0080. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954210> >.

MYERS, S. M. et al. Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. **Oncogene**, v. 11, n. 10, p. 2039-45, Nov 1995. ISSN 0950-9232. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7478523> >.

MÜNSTERBERG, A.; LOVELL-BADGE, R. Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. **Development**, v. 113, n. 2, p. 613-24, Oct 1991. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1782869> >.

NACHER, V. et al. The quail mesonephros: a new model for renal senescence? **J Vasc Res**, v. 43, n. 6, p. 581-6, 2006. ISSN 1018-1172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17028443> >.

NADEAU, R. J. et al. Regulation of Sprouty2 stability by mammalian Seven-in-Absentia homolog 2. **J Cell Biochem**, v. 100, n. 1, p. 151-60, Jan 2007. ISSN 0730-2312. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16888801> >.

NAKADE, K. et al. The tumor suppressor p53 inhibits Net, an effector of Ras/extracellular signal-regulated kinase signaling. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 3, p. 1132-42, Feb 2004. ISSN 0270-7306. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729959> >.

NEGRI, E. et al. Risk factors for medullary thyroid carcinoma: a pooled analysis. **Cancer Causes Control**, v. 13, n. 4, p. 365-72, May 2002. ISSN 0957-5243. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12074506> >.

NELSON, G. et al. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. **Aging Cell**, v. 11, n. 2, p. 345-9, Apr 2012. ISSN 1474-9726. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22321662> >.

NEUMANN, H. P. et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. **N Engl J Med**, v. 346, n. 19, p. 1459-66, May 2002. ISSN 1533-4406. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000816> >.

NICKOLOFF, B. J. et al. Tumor suppressor maspin is up-regulated during keratinocyte senescence, exerting a paracrine antiangiogenic activity. **Cancer Res**, v. 64, n. 9, p. 2956-61, May 2004. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126325> >.

NIE, X. et al. Six1 regulates Grem1 expression in the metanephric mesenchyme to initiate branching morphogenesis. **Dev Biol**, v. 352, n. 1, p. 141-51, Apr 2011. ISSN 1095-564X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281623> >.

NIELSEN, A. L. et al. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. **Mol Cell**, v. 7, n. 4, p. 729-39, Apr 2001. ISSN 1097-2765. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11336697> >.

NIKIFOROV, Y. E.; NIKIFOROVA, M. N. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. **Nat Rev Endocrinol**, v. 7, n. 10, p. 569-80, Aug 2011. ISSN 1759-5037. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21878896> >.

NISHIMURA, H. et al. Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. **Mol Cell**, v. 3, n. 1, p. 1-10, Jan 1999. ISSN 1097-2765. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10024874> >.

NISHINAKAMURA, R. et al. Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. **Development**, v. 128, n. 16, p. 3105-15, Aug 2001. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11688560> >.

NISHITA, M. et al. Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. **Mol Cell Biol**, v. 34, n. 16, p. 3096-105, Aug 2014. ISSN 1098-5549. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24891614> >.

NIX, P. A.; NICOLAIDES, A.; COATESWORTH, A. P. Thyroid cancer review 3: management of medullary and undifferentiated thyroid cancer. **Int J Clin Pract**, v. 60, n. 1, p. 80-4, Jan 2006. ISSN 1368-5031. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16409432> >.

NYENGAARD, J. R.; BENDTSEN, T. F. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. **Anat Rec**, v. 232, n. 2, p. 194-201, Feb 1992. ISSN 0003-276X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1546799> >.

OHNO, S. The Y-linked H-Y antigen locus and the X-linked Tfm locus as major regulatory genes of the mammalian sex determining mechanism. **J Steroid Biochem**, v. 8, n. 5, p. 585-92, May 1977. ISSN 0022-4731. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/599929> >.

OHTANI, N. et al. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. **J Med Invest**, v. 51, n. 3-4, p. 146-53, Aug 2004. ISSN 1343-1420. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15460900> >.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol**, v. 2, n. 3, p. REVIEWS3005, 2001. ISSN 1474-760X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11276432> >.

ORR-URTREGER, A. et al. Developmental expression of two murine fibroblast growth factor receptors, flg and bek. **Development**, v. 113, n. 4, p. 1419-34, Dec 1991. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1667382> >.

ORVIS, G. D.; BEHRINGER, R. R. Cellular mechanisms of Müllerian duct formation in the mouse. **Dev Biol**, v. 306, n. 2, p. 493-504, Jun 2007. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17467685> >.

OZAKI, K. et al. ERK pathway positively regulates the expression of Sprouty genes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 285, n. 5, p. 1084-8, Aug 2001. ISSN 0006-291X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11478764> >.

\_\_\_\_\_. Efficient suppression of FGF-2-induced ERK activation by the cooperative. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 24, p. 5861-71, Dec 15 2005a. ISSN 0021-9533 (Print)0021-9533 (Linking). Available at: < <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02711> >.

\_\_\_\_\_. Efficient suppression of FGF-2-induced ERK activation by the cooperative interaction among mammalian Sprouty isoforms. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 24, p. 5861-71, Dec 2005b. ISSN 0021-9533. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339969> >.



- PAPINI, E. et al. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 5, p. 1941-6, May 2002. ISSN 0021-972X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994321> >.
- PARK, J. S.; VALERIUS, M. T.; MCMAHON, A. P. Wnt/beta-catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. **Development**, v. 134, n. 13, p. 2533-9, Jul 2007. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17537789> >.
- PARR, B. A.; MCMAHON, A. P. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. **Nature**, v. 395, n. 6703, p. 707-10, Oct 1998. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9790192> >.
- PASSOS, J. F. et al. Cellular senescence: unravelling complexity. **Age (Dordr)**, v. 31, n. 4, p. 353-63, Dec 2009. ISSN 1574-4647. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19618294> >.
- PATEL, R. et al. Sprouty2, PTEN, and PP2A interact to regulate prostate cancer progression. **J Clin Invest**, v. 123, n. 3, p. 1157-75, Mar 2013. ISSN 1558-8238. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23434594> >.
- PECTASIDES, E. et al. Nuclear localization of signal transducer and activator of transcription 3 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with a better prognosis. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 8, p. 2427-34, Apr 2010. ISSN 1078-0432. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371693> >.
- PEPICELLI, C. V. et al. GDNF induces branching and increased cell proliferation in the ureter of the mouse. **Dev Biol**, v. 192, n. 1, p. 193-8, Dec 1997. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405108> >.
- PETERS, K. G. et al. Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. **Development**, v. 114, n. 1, p. 233-43, Jan 1992. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1315677> >.
- PETERSEN, C. I. et al. FGF signaling regulates the number of posterior taste papillae by controlling progenitor field size. **PLoS Genet**, v. 7, n. 6, p. e1002098, Jun 2011. ISSN 1553-7404. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21655085> >.
- PICHEL, J. G. et al. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. **Nature**, v. 382, n. 6586, p. 73-6, Jul 1996. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657307> >.
- PIERIDES, A. M. et al. A family with the branchio-oto-renal syndrome: clinical and genetic correlations. **Nephrol Dial Transplant**, v. 17, n. 6, p. 1014-8, Jun 2002. ISSN 0931-0509. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032190> >.
- PIEROTTI, M. A. et al. Rearrangements of TRK proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas. **J Endocrinol Invest**, v. 18, n. 2, p. 130-3, Feb 1995. ISSN 0391-4097. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7629380> >.
- PIETILÄ, I.; VAINIO, S. The embryonic aorta-gonad-mesonephros region as a generator of haematopoietic stem cells. **APMIS**, v. 113, n. 11-12, p. 804-12, 2005 Nov-Dec 2005. ISSN 0903-4641. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16480451> >.

PINCHOT, S. N. et al. Medullary thyroid carcinoma: targeted therapies and future directions. **J Oncol**, v. 2009, p. 183031, 2009. ISSN 1687-8469. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20069043> >.

PINI PRATO, A. et al. Hirschsprung disease and congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT): a novel syndromic association. **Medicine (Baltimore)**, v. 88, n. 2, p. 83-90, Mar 2009. ISSN 1536-5964. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19282698> >.

PODLASEK, C. A.; CLEMENS, J. Q.; BUSHMAN, W. Hoxa-13 gene mutation results in abnormal seminal vesicle and prostate development. **J Urol**, v. 161, n. 5, p. 1655-61, May 1999. ISSN 0022-5347. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10210434> >.

PODLASEK, C. A.; DUBOULE, D.; BUSHMAN, W. Male accessory sex organ morphogenesis is altered by loss of function of Hoxd-13. **Dev Dyn**, v. 208, n. 4, p. 454-65, Apr 1997. ISSN 1058-8388. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9097018> >.

PODLASEK, C. A. et al. Hoxa-10 deficient male mice exhibit abnormal development of the accessory sex organs. **Dev Dyn**, v. 214, n. 1, p. 1-12, Jan 1999. ISSN 1058-8388. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9915571> >.

PODSYPANINA, K. et al. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 4, p. 1563-8, Feb 16 1999. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

POINTIS, G.; LATREILLE, M. T.; CEDARD, L. Gonado-pituitary relationships in the fetal mouse at various times during sexual differentiation. **J Endocrinol**, v. 86, n. 3, p. 483-8, Sep 1980. ISSN 0022-0795. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7430908> >.

POLADIA, D. P. et al. Role of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the metanephric mesenchyme. **Dev Biol**, v. 291, n. 2, p. 325-39, Mar 2006. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16442091> >.

POLE, R. J.; QI, B. Q.; BEASLEY, S. W. Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. **J Urol**, v. 167, n. 1, p. 269-71, Jan 2002. ISSN 0022-5347. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11743336> >.

POLYTARCHOU, C. et al. Akt2 regulates all Akt isoforms and promotes resistance to hypoxia through induction of miR-21 upon oxygen deprivation. **Cancer Res**, v. 71, n. 13, p. 4720-31, Jul 2011. ISSN 1538-7445. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21555366> >.

POPPLETON, H. M. et al. Sprouty regulates cell migration by inhibiting the activation of Rac1 GTPase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 323, n. 1, p. 98-103, Oct 2004. ISSN 0006-291X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15351707> >.

POY, F. et al. Structure of a human Tcf4-beta-catenin complex. **Nat Struct Biol**, v. 8, n. 12, p. 1053-7, Dec 2001. ISSN 1072-8368. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11713476> >.

PRIEUR, A.; PEEPER, D. S. Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. **Curr Opin Cell Biol**, v. 20, n. 2, p. 150-5, Apr 2008. ISSN 0955-0674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18353625> >.

PURCELL, P. et al. Spry1 and spry2 are essential for development of the temporomandibular joint. **J Dent Res**, v. 91, n. 4, p. 387-93, Apr 2012. ISSN 1544-0591. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22328578> >.

RAATIKAINEN-AHOKAS, A. et al. BMP-4 affects the differentiation of metanephric mesenchyme and reveals an early anterior-posterior axis of the embryonic kidney. **Dev Dyn**, v. 217, n. 2, p. 146-58, Feb 2000. ISSN 1058-8388. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706139> >.

RAJAGOPALAN, S.; LONG, E. O. Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 50, p. 20596-601, Dec 2012. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23184984> >.

RAMEH, L. E. et al. A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. **Nature**, v. 390, n. 6656, p. 192-6, Nov 13 1997. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836 (Linking). Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/36621> >.

RAUSER, C. L.; MUELLER, L. D.; ROSE, M. R. The evolution of late life. **Ageing Res Rev**, v. 5, n. 1, p. 14-32, Feb 2006. ISSN 1568-1637. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16085467> >.

REBER, M.; CEREGHINI, S. Variant hepatocyte nuclear factor 1 expression in the mouse genital tract. **Mech Dev**, v. 100, n. 1, p. 75-8, Jan 2001. ISSN 0925-4773. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11118887> >.

REICH, A.; SAPIR, A.; SHILO, B. Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. **Development**, v. 126, n. 18, p. 4139-47, Sep 1999. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10457022> >.

REN, D. et al. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1390-3, Dec 2010. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21127253> >.

RESSLER, S. et al. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. **Ageing Cell**, v. 5, n. 5, p. 379-89, Oct 2006. ISSN 1474-9718. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16911562> >.

RICHARDSON, D. S. et al. Alternative splicing results in RET isoforms with distinct trafficking properties. **Mol Biol Cell**, v. 23, n. 19, p. 3838-50, Oct 2012. ISSN 1939-4586. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22875993> >.

RIESCO-EIZAGUIRRE, G.; SANTISTEBAN, P. Molecular biology of thyroid cancer initiation. **Clin Transl Oncol**, v. 9, n. 11, p. 686-93, Nov 2007. ISSN 1699-048X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18055323> >.

ROBERTS, L. M. et al. Paracrine-mediated apoptosis in reproductive tract development. **Dev Biol**, v. 208, n. 1, p. 110-22, Apr 1999. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075845> >.

ROBERTS, L. M.; VISSER, J. A.; INGRAHAM, H. A. Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development. **Development**, v. 129, n. 6, p. 1487-96, Mar 2002. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880357> >.

RODIER, F.; CAMPISI, J. Four faces of cellular senescence. **J Cell Biol**, v. 192, n. 4, p. 547-56, Feb 2011. ISSN 1540-8140. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21321098> >.

RODRIGUEZ, C. I. et al. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. **Nat Genet**, v. 25, n. 2, p. 139-40, Jun 2000. ISSN 1061-4036 (Print). Available at: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10835623](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10835623) >.

RODRÍGUEZ-RODERO, S. et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct thyroid cancer subtypes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 7, p. 2811-21, Jul 2013. ISSN 1945-7197. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23666970> >.

ROSS, A. J.; CAPEL, B. Signaling at the crossroads of gonad development. **Trends Endocrinol Metab**, v. 16, n. 1, p. 19-25, 2005 Jan-Feb 2005. ISSN 1043-2760. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620545> >.

ROSSELOT, C. et al. Non-cell-autonomous retinoid signaling is crucial for renal development. **Development**, v. 137, n. 2, p. 283-92, Jan 2010. ISSN 1477-9129. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20040494> >.

ROVILLAIN, E. et al. Activation of nuclear factor-kappa B signalling promotes cellular senescence. **Oncogene**, v. 30, n. 20, p. 2356-66, May 2011. ISSN 1476-5594. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21242976> >.

ROZEN, E. J. et al. Loss of Sprouty1 rescues renal agenesis caused by Ret mutation. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 2, p. 255-9, Feb 2009. ISSN 1533-3450. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056869> >.

RUBIN, C. et al. Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. In: (Ed.). **Curr Biol**. England, v.13, 2003. p.297-307. ISBN 0960-9822 (Print)0960-9822 (Linking).

\_\_\_\_\_. Phosphorylation of carboxyl-terminal tyrosines modulates the specificity of Sprouty-2 inhibition of different signaling pathways. **J Biol Chem**, v. 280, n. 10, p. 9735-44, Mar 2005. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637081> >.

RUNEBERG-ROOS, P.; SAARMA, M. Neurotrophic factor receptor RET: structure, cell biology, and inherited diseases. **Ann Med**, v. 39, n. 8, p. 572-80, 2007. ISSN 0785-3890. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934909> >.

RUZANKINA, Y. et al. Tissue regenerative delays and synthetic lethality in adult mice after combined deletion of Atr and Trp53. **Nat Genet**, v. 41, n. 10, p. 1144-9, Oct 2009. ISSN 1546-1718. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19718024> >.

SAINIO, K. et al. Differential regulation of two sets of mesonephric tubules by WT-1. **Development**, v. 124, n. 7, p. 1293-9, Apr 1997. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9118800> >.

SAJJAD, Y. Development of the genital ducts and external genitalia in the early human embryo. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 36, n. 5, p. 929-37, Oct 2010. ISSN 1447-0756. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846260> >.

SALAMA, R. et al. Cellular senescence and its effector programs. **Genes Dev**, v. 28, n. 2, p. 99-114, Jan 2014. ISSN 1549-5477. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24449267> >.

SALMINEN, A.; KAUPPINEN, A.; KAARNIRANTA, K. Emerging role of NF- $\kappa$ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). **Cell Signal**, v. 24, n. 4, p. 835-45, Apr 2012. ISSN 1873-3913. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22182507> >.

SANSAL, I.; SELLERS, W. R. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 14, p. 2954-63, Jul 2004. ISSN 0732-183X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15254063> >.

SANTORO, M.; CARLOMAGNO, F. Central role of RET in thyroid cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 12, p. a009233, Dec 2013. ISSN 1943-0264. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24296167> >.

SARBASSOV, D. D. et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1098-101, Feb 18 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Available at: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15718470](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15718470) >.

SARIN, S. et al.  $\beta$ -Catenin overexpression in the metanephric mesenchyme leads to renal dysplasia genesis via cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. **Am J Pathol**, v. 184, n. 5, p. 1395-410, May 2014. ISSN 1525-2191. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24637293> >.

SARIOLA, H.; SAARMA, M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 19, p. 3855-62, Oct 2003. ISSN 0021-9533. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12953054> >.

SASAKI, A. et al. Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. In: (Ed.). **Nat Cell Biol**. England, v.5, 2003. p.427-32. ISBN 1465-7392 (Print)1465-7392 (Linking).

\_\_\_\_\_. Identification of a dominant negative mutant of Sprouty that potentiates fibroblast growth factor- but not epidermal growth factor-induced ERK activation. **J Biol Chem**, v. 276, n. 39, p. 36804-8, Sep 2001. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11495895> >.

SAYED, D. et al. MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths. **Mol Biol Cell**, v. 19, n. 8, p. 3272-82, Aug 2008. ISSN 1939-4586. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508928> >.

SCHAAF, G. et al. Silencing of SPRY1 triggers complete regression of rhabdomyosarcoma tumors carrying a mutated RAS gene. **Cancer Res**, v. 70, n. 2, p. 762-71, Jan 2010. ISSN 1538-7445. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068162> >.

SCHINDLER, C.; DARNELL, J. E. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. **Annu Rev Biochem**, v. 64, p. 621-51, 1995. ISSN 0066-4154. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7574495> >.

SCHLESSINGER, K.; LEVY, D. E. Malignant transformation but not normal cell growth depends on signal transducer and activator of transcription 3. **Cancer Res**, v. 65, n. 13, p. 5828-34, Jul 2005. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994959> >.

SCHMAHL, J. et al. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. **Development**, v. 127, n. 1, p. 65-73, Jan 2000. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10654601> >.

SCHMID, K. W.; FARID, N. R. How to define follicular thyroid carcinoma? **Virchows Arch**, v. 448, n. 4, p. 385-93, Apr 2006. ISSN 0945-6317. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16506015> >.

SCHMITT, C. A. et al. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. **Cell**, v. 109, n. 3, p. 335-46, May 2002. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015983> >.

SCHNELLER, D. et al. p19(ARF) /p14(ARF) controls oncogenic functions of signal transducer and activator of transcription 3 in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 54, n. 1, p. 164-72, Jul 2011. ISSN 1527-3350. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21452288> >.

SCHUCHARDT, A. et al. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. **Nature**, v. 367, n. 6461, p. 380-3, Jan 1994. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8114940> >.

\_\_\_\_\_. Renal agenesis and hypodysplasia in ret-k- mutant mice result from defects in ureteric bud development. **Development**, v. 122, n. 6, p. 1919-29, Jun 1996. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674430> >.

SCHUTZMAN, J. L.; MARTIN, G. R. Sprouty genes function in suppression of prostate tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 49, p. 20023-8, Dec 2012. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150596> >.

SERRANO, M. et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. **Cell**, v. 88, n. 5, p. 593-602, Mar 1997. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054499> >.

SETTLE, S. et al. The BMP family member Gdf7 is required for seminal vesicle growth, branching morphogenesis, and cytodifferentiation. **Dev Biol**, v. 234, n. 1, p. 138-50, Jun 2001. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11356025> >.

SHAKYA, R.; WATANABE, T.; COSTANTINI, F. The role of GDNF/Ret signaling in ureteric bud cell fate and branching morphogenesis. **Dev Cell**, v. 8, n. 1, p. 65-74, Jan 2005. ISSN 1534-5807. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15621530> >.

SHAPIRO, E.; HUANG, H. Y.; WU, X. R. Uroplakin and androgen receptor expression in the human fetal genital tract: insights into the development of the vagina. **J Urol**, v. 164, n. 3 Pt 2, p. 1048-51, Sep 2000. ISSN 0022-5347. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10958738> >.

SHAW, A. T. et al. Sprouty-2 regulates oncogenic K-ras in lung development and tumorigenesis. **Genes Dev**, v. 21, n. 6, p. 694-707, Mar 2007. ISSN 0890-9369. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17369402> >.

SHAY, J. W.; RONINSON, I. B. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2919-33, Apr 2004. ISSN 0950-9232. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15077154> >.

SHIM, K. et al. Sprouty2, a mouse deafness gene, regulates cell fate decisions in the auditory sensory epithelium by antagonizing FGF signaling. **Dev Cell**, v. 8, n. 4, p. 553-64, Apr 2005. ISSN 1534-5807. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809037> >.

SHIMI, T. et al. The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. **Genes Dev**, v. 25, n. 24, p. 2579-93, Dec 2011. ISSN 1549-5477. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155925> >.

SHORT, K. M.; SMYTH, I. M. The contribution of branching morphogenesis to kidney development and disease. **Nat Rev Nephrol**, v. 12, n. 12, p. 754-767, Dec 2016. ISSN 1759-507X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27818506> >.

SHUKRI, N. M.; GREW, F.; SHIRE, J. G. Recessive mutation in a standard recombinant-inbred line of mice affects seminal vesicle shape. **Genet Res**, v. 52, n. 1, p. 27-32, Aug 1988. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3181757> >.

SIRIVATANAUKSORN, Y. et al. Differential expression of sprouty genes in hepatocellular carcinoma. **J Surg Oncol**, v. 105, n. 3, p. 273-6, Mar 2012. ISSN 1096-9098. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21932411> >.

SMITH, C.; MACKAY, S. Morphological development and fate of the mouse mesonephros. **J Anat**, v. 174, p. 171-84, Feb 1991. ISSN 0021-8782. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2032933> >.

SMITHGALL, T. E. et al. Control of myeloid differentiation and survival by Stats. **Oncogene**, v. 19, n. 21, p. 2612-8, May 2000. ISSN 0950-9232. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10851060> >.

SONG, K. et al. Prognostic significance and clinical relevance of Sprouty 2 protein expression in human hepatocellular carcinoma. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 11, n. 2, p. 177-84, Apr 2012. ISSN 1499-3872. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22484587> >.

SPARMANN, A.; BAR-SAGI, D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. **Cancer Cell**, v. 6, n. 5, p. 447-58, Nov 2004. ISSN 1535-6108. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15542429> >.

STARK, K. et al. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 679-83, Dec 1994. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7990960> >.

STENSTRÖM, G.; SVÄRDSUDD, K. Pheochromocytoma in Sweden 1958-1981. An analysis of the National Cancer Registry Data. **Acta Med Scand**, v. 220, n. 3, p. 225-32, 1986. ISSN 0001-6101. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3776697> >.

STORER, M. et al. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. **Cell**, v. 155, n. 5, p. 1119-30, Nov 2013. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24238961> >.

SUGIMURA, Y.; CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. **Biol Reprod**, v. 34, n. 5, p. 961-71, Jun 1986. ISSN 0006-3363. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3730488> >.

SUN, P. et al. PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. **Cell**, v. 128, n. 2, p. 295-308, Jan 2007. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17254968> >.

SUTTERLÜTY, H. et al. Down-regulation of Sprouty2 in non-small cell lung cancer contributes to tumor malignancy via extracellular signal-regulated kinase pathway-dependent and -independent

mechanisms. **Mol Cancer Res**, v. 5, n. 5, p. 509-20, May 2007. ISSN 1541-7786. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510316> >.

SÁNCHEZ, M. P. et al. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. **Nature**, v. 382, n. 6586, p. 70-3, Jul 1996. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657306> >.

SÁNCHEZ-FERRER, M. L. et al. Experimental contributions to the study of the embryology of the vagina. **Hum Reprod**, v. 21, n. 6, p. 1623-8, Jun 2006. ISSN 0268-1161. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476676> >.

TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 797-819, 1997. ISSN 0732-0582. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143707> >.

TAHIRA, T. et al. Characterization of ret proto-oncogene mRNAs encoding two isoforms of the protein product in a human neuroblastoma cell line. **Oncogene**, v. 5, n. 1, p. 97-102, Jan 1990. ISSN 0950-9232. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2181380> >.

TAKAHASHI, M. Structure and expression of the ret transforming gene. **IARC Sci Publ**, n. 92, p. 189-97, 1988. ISSN 0300-5038. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3069729> >.

\_\_\_\_\_. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 12, n. 4, p. 361-73, Dec 2001. ISSN 1359-6101. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544105> >.

TAKAHASHI, M.; RITZ, J.; COOPER, G. M. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. **Cell**, v. 42, n. 2, p. 581-8, Sep 1985. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2992805> >.

TAKETOMI, T. et al. Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 7, p. 855-7, Jul 2005. ISSN 1097-6256. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15937482> >.

TANIGUCHI, K. et al. Sprouty2 and Sprouty4 are essential for embryonic morphogenesis and regulation of FGF signaling. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 352, n. 4, p. 896-902, Jan 2007. ISSN 0006-291X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17156747> >.

TAYLOR, H. S.; VANDEN HEUVEL, G. B.; IGARASHI, P. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. **Biol Reprod**, v. 57, n. 6, p. 1338-45, Dec 1997. ISSN 0006-3363. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9408238> >.

TENNIS, M. A. et al. Sprouty-4 inhibits transformed cell growth, migration and invasion, and epithelial-mesenchymal transition, and is regulated by Wnt7A through PPARgamma in non-small cell lung cancer. **Mol Cancer Res**, v. 8, n. 6, p. 833-43, Jun 2010. ISSN 1557-3125. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20501643> >.

THOMSON, A. A.; CUNHA, G. R. Prostatic growth and development are regulated by FGF10. **Development**, v. 126, n. 16, p. 3693-701, Aug 1999. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10409514> >.



THOMSON, A. A.; FOSTER, B. A.; CUNHA, G. R. Analysis of growth factor and receptor mRNA levels during development of the rat seminal vesicle and prostate. **Development**, v. 124, n. 12, p. 2431-9, Jun 1997. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9199369> >.

THUM, T. et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. **Nature**, v. 456, n. 7224, p. 980-4, Dec 2008. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19043405> >.

TIRUPPATHI, C. et al. Role of NF-kappaB-dependent caveolin-1 expression in the mechanism of increased endothelial permeability induced by lipopolysaccharide. **J Biol Chem**, v. 283, n. 7, p. 4210-8, Feb 2008. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077459> >.

TORRES, M. et al. Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. **Development**, v. 121, n. 12, p. 4057-65, Dec 1995. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8575306> >.

TOSO, A. et al. Enhancing chemotherapy efficacy in Pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. **Cell Rep**, v. 9, n. 1, p. 75-89, Oct 2014. ISSN 2211-1247. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25263564> >.

TOWERS, P. R.; WOOLF, A. S.; HARDMAN, P. Glial cell line-derived neurotrophic factor stimulates ureteric bud outgrowth and enhances survival of ureteric bud cells in vitro. **Exp Nephrol**, v. 6, n. 4, p. 337-51, 1998 Jul-Aug 1998. ISSN 1018-7782. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9690097> >.

TRIPATHI, P. et al. Absence of canonical Smad signaling in ureteral and bladder mesenchyme causes ureteropelvic junction obstruction. **J Am Soc Nephrol**, v. 23, n. 4, p. 618-28, Apr 2012. ISSN 1533-3450. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22282597> >.

TROWE, M. O. et al. Canonical Wnt signaling regulates smooth muscle precursor development in the mouse ureter. **Development**, v. 139, n. 17, p. 3099-108, Sep 2012. ISSN 1477-9129. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22833126> >.

TSANG, T. E. et al. Lim1 activity is required for intermediate mesoderm differentiation in the mouse embryo. **Dev Biol**, v. 223, n. 1, p. 77-90, Jul 2000. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10864462> >.

TSUCHIDA, S. et al. Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. **J Clin Invest**, v. 101, n. 4, p. 755-60, Feb 1998. ISSN 0021-9738. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466969> >.

TUTTLE, R. M. et al. Estimating risk of recurrence in differentiated thyroid cancer after total thyroidectomy and radioactive iodine remnant ablation: using response to therapy variables to modify the initial risk estimates predicted by the new American Thyroid Association staging system. **Thyroid**, v. 20, n. 12, p. 1341-9, Dec 2010. ISSN 1557-9077. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21034228> >.

UETANI, N. et al. Maturation of ureter-bladder connection in mice is controlled by LAR family receptor protein tyrosine phosphatases. **J Clin Invest**, v. 119, n. 4, p. 924-35, Apr 2009. ISSN 1558-8238. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273906> >.

ULFELDER, H.; ROBBOY, S. J. The embryologic development of the human vagina. **Am J Obstet Gynecol**, v. 126, n. 7, p. 769-76, Dec 1976. ISSN 0002-9378. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1033667> >.

ULLAH, Z. et al. Developmentally programmed endoreduplication in animals. **Cell Cycle**, v. 8, n. 10, p. 1501-9, May 2009. ISSN 1551-4005. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19372757> >.

VAINIO, S. et al. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 405-9, Feb 1999. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9989404> >.

VALENTA, T.; HAUSMANN, G.; BASLER, K. The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. **EMBO J**, v. 31, n. 12, p. 2714-36, Jun 2012. ISSN 1460-2075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22617422> >.

VAN EERDE, A. M. et al. Vesico-ureteral reflux in children with prenatally detected hydronephrosis: a systematic review. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 29, n. 4, p. 463-9, Apr 2007. ISSN 0960-7692. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17390310> >.

VAN ESCH, H. et al. GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. **Nature**, v. 406, n. 6794, p. 419-22, Jul 2000. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10935639> >.

VAN WEERING, D. H. et al. Expression of the receptor tyrosine kinase Ret on the plasma membrane is dependent on calcium. **J Biol Chem**, v. 273, n. 20, p. 12077-81, May 1998. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9575150> >.

VARELA, I. et al. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. **Nature**, v. 437, n. 7058, p. 564-8, Sep 2005. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079796> >.

VASKO, V. et al. Papillary and follicular thyroid cancers in children. **Endocr Dev**, v. 10, p. 140-72, 2007. ISSN 1421-7082. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17684395> >.

VELASCO, A. et al. Promoter hypermethylation and expression of sprouty 2 in endometrial carcinoma. **Hum Pathol**, v. 42, n. 2, p. 185-93, Feb 2011. ISSN 1532-8392. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21111454> >.

VENTURA, A. et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. **Nature**, v. 445, n. 7128, p. 661-5, Feb 2007. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251932> >.

VETTER, M. R.; GIBLEY, C. W. Morphogenesis and histochemistry of the developing mouse kidney. **J Morphol**, v. 120, n. 2, p. 135-55, Oct 1966. ISSN 0362-2525. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6008029> >.

VIZIOLI, M. G. et al. IGFBP7: an oncosuppressor gene in thyroid carcinogenesis. **Oncogene**, v. 29, n. 26, p. 3835-44, Jul 2010. ISSN 1476-5594. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20440262> >.

VOLONTE, D. et al. Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 7, p. 2502-17, Jul 2002. ISSN 1059-1524. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12134086> >.

WAJAPYEYEE, N. et al. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 363-74, Feb 2008. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18267069> >.

WALKER, K. A. et al. Deletion of fibroblast growth factor receptor 2 from the peri-wolffian duct stroma leads to ureteric induction abnormalities and vesicoureteral reflux. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56062, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23409123> >.

WANG, C. et al. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. **Aging Cell**, v. 8, n. 3, p. 311-23, Jun 2009. ISSN 1474-9726. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19627270> >.

WANG, X. Structural studies of GDNF family ligands with their receptors-Insights into ligand recognition and activation of receptor tyrosine kinase RET. **Biochim Biophys Acta**, v. 1834, n. 10, p. 2205-12, Oct 2013. ISSN 0006-3002. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23085183> >.

WAROT, X. et al. Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts. **Development**, v. 124, n. 23, p. 4781-91, Dec 1997. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9428414> >.

WARTOFSKY, L. Increasing world incidence of thyroid cancer: increased detection or higher radiation exposure? **Hormones (Athens)**, v. 9, n. 2, p. 103-8, 2010 Apr-Jun 2010. ISSN 1109-3099. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20687393> >.

WEBER, M. M. et al. Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis. **Endocrinology**, v. 140, n. 4, p. 1537-43, Apr 1999. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10098485> >.

WEISSCHUH, N. et al. A novel mutation in the FOXC1 gene in a family with Axenfeld-Rieger syndrome and Peters' anomaly. **Clin Genet**, v. 74, n. 5, p. 476-80, Nov 2008. ISSN 1399-0004. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18498376> >.

WELLS, S. A.; SANTORO, M. Targeting the RET pathway in thyroid cancer. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 23, p. 7119-23, Dec 2009. ISSN 1078-0432. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19934298> >.

WILLECKE, R. et al. The tyrosine phosphatase Shp2 acts downstream of GDNF/Ret in branching morphogenesis of the developing mouse kidney. **Dev Biol**, v. 360, n. 2, p. 310-7, Dec 2011. ISSN 1095-564X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22015719> >.

WINN, R. A. et al. Restoration of Wnt-7a expression reverses non-small cell lung cancer cellular transformation through frizzled-9-mediated growth inhibition and promotion of cell differentiation. **J Biol Chem**, v. 280, n. 20, p. 19625-34, May 2005. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705594> >.

WITSCHI, E. Embryology of the uterus: normal and experimental. **Ann N Y Acad Sci**, v. 75, p. 412-35, Jan 1959. ISSN 0077-8923. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13845458> >.

WOLF, E. et al. Consequences of postnatally elevated insulin-like growth factor-II in transgenic mice: endocrine changes and effects on body and organ growth. **Endocrinology**, v. 135, n. 5, p. 1877-86, Nov 1994. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7525257> >.

WONG, E. S. et al. Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling. **EMBO J**, v. 21, n. 18, p. 4796-808, Sep 16 2002. ISSN 0261-4189 (Print)0261-4189 (Linking). Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

WORBY, C. A. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor signals through the RET receptor and activates mitogen-activated protein kinase. **J Biol Chem**, v. 271, n. 39, p. 23619-22, Sep 1996. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8798576> >.

WRIGHT, K. D. et al. Cooperative and independent functions of FGF and Wnt signaling during early inner ear development. **BMC Dev Biol**, v. 15, p. 33, Oct 2015. ISSN 1471-213X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26443994> >.

XING, M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 3, p. 184-99, Mar 2013. ISSN 1474-1768. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23429735> >.

XU, P. X. et al. Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. **Nat Genet**, v. 23, n. 1, p. 113-7, Sep 1999. ISSN 1061-4036. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471511> >.

XUE, W. et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. **Nature**, v. 445, n. 7128, p. 656-60, Feb 2007. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251933> >.

YE, X. et al. Genetic mosaic analysis reveals a major role for frizzled 4 and frizzled 8 in controlling ureteric growth in the developing kidney. **Development**, v. 138, n. 6, p. 1161-72, Mar 2011. ISSN 1477-9129. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21343368> >.

YEH, S. et al. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 21, p. 13498-503, Oct 2002. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12370412> >.

YIN, Y.; MA, L. Development of the mammalian female reproductive tract. **J Biochem**, v. 137, n. 6, p. 677-83, Jun 2005. ISSN 0021-924X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002989> >.

YOSYPIV, I. V. Renin-angiotensin system in ureteric bud branching morphogenesis: insights into the mechanisms. **Pediatr Nephrol**, v. 26, n. 9, p. 1499-512, Sep 2011. ISSN 1432-198X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21359618> >.

YOUNG, W. F. Clinical practice. The incidentally discovered adrenal mass. **N Engl J Med**, v. 356, n. 6, p. 601-10, Feb 2007. ISSN 1533-4406. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287480> >.

YU, J.; CARROLL, T. J.; MCMAHON, A. P. Sonic hedgehog regulates proliferation and differentiation of mesenchymal cells in the mouse metanephric kidney. **Development**, v. 129, n. 22, p. 5301-12, Nov 2002. ISSN 0950-1991. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399320> >.

YU, S. et al. Haploinsufficiencies of FOXF1 and FOXC2 genes associated with lethal alveolar capillary dysplasia and congenital heart disease. **Am J Med Genet A**, v. 152A, n. 5, p. 1257-62, May 2010. ISSN 1552-4833. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20425831> >.

YU, T. et al. Sprouty genes prevent excessive FGF signalling in multiple cell types throughout development of the cerebellum. **Development**, v. 138, n. 14, p. 2957-68, Jul 2011. ISSN 1477-9129. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21693512> >.

YUAN, H. T. et al. Angiopoietin correlates with glomerular capillary loss in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. **Kidney Int**, v. 61, n. 6, p. 2078-89, Jun 2002. ISSN 0085-2538. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12028448> >.

YUSOFF, P. et al. Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. **J Biol Chem**, v. 277, n. 5, p. 3195-201, Feb 2002. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698404> >.

ZAREMBA, A.; SCHMUECKER, U.; ESCHE, H. Sprouty is a cytoplasmic target of adenoviral E1A oncoproteins to regulate the receptor tyrosine kinase signalling pathway. **Virology**, v. 8, p. 192, Apr 2011. ISSN 1743-422X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518456> >.

ZHANG, R.; ADAMS, P. D. Heterochromatin and its relationship to cell senescence and cancer therapy. **Cell Cycle**, v. 6, n. 7, p. 784-9, Apr 2007. ISSN 1551-4005. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17377503> >.

ZHAO, H. et al. Role of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the ureteric bud. **Dev Biol**, v. 276, n. 2, p. 403-15, Dec 2004. ISSN 0012-1606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581874> >.

ZUBAIR, M. et al. Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 11, p. 4111-21, Jun 2006. ISSN 0270-7306. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16705164> >.

***Annex***





**Annex I.** Llista de citocines incloses en l'array d'anticossos

Symbol	Synonym	Detected? (Y/N)	Notes
Axl		N	
BLC		N	
CD30L	TNFSF8	N	
CD30		N	Detects soluble form
CD40		N	Detects soluble form
CRG-2	CXCL10	N	
CTACK		N	
CXCL16		Y	
CCL11	Eotaxin	N	
CCL24	Eotaxin-2	N	
FASLG	FasL, TNFSF6	N	
CX3CL1	Fractalkine	N	
G-CSF		N	
GM-CSF		Y	
IFN- $\gamma$		Y	
IGFBP3		N	
IGFBP5		N	
IGFBP6		N	
IL-1 $\alpha$		Y	
IL-1 $\beta$		N	
IL-2		Y	
IL-3		N	
IL-3 R3		N	
IL-4		N	
IL-5		N	
IL-6		Y	
IL-9		N	
IL-10		N	
IL-12 p40/p70		N	*
IL-12 p70		Y	Only detects p70 heterodimer
IL-13		N	
IL-17A		N	
KC	CXCL1, Gro- $\alpha$ (human)	Y	
Leptin R		N	
Leptin (OB)		N	
LIX		N	
SELL	L-Selectin	N	
XCL1	Lymphotactin	N	
MCP1	CCL2	Y	
MCP5	CCL12	N	



M-CSF		N	
MIG		N	
MIP-1 $\alpha$	CCL3	N	
MIP-1 $\gamma$		Y	
MIP-2	CXCL2	Y	
MIP-3 $\beta$		N	
MIP-3 $\alpha$		N	
PF4		N	
SELP	P-Selectin	Y	
RANTES	CCL5	Y	
SCF		N	
SDF-1 $\alpha$		N	
TARC		N	
TCA-3		N	
TECK		N	
TIMP1		Y	
TNF- $\alpha$		Y	
sTNFR1		Y	Detects soluble form
sTNFR2		Y	Detects soluble form
THPO		N	
VCAM1		N	
VEGF-A		Y	Detects VEGF(165 aa) & VEGF (121 aa)

\*Detects both IL-12 p40 (monomer & homodimer) and IL-12 p70 heterodimer.

## Annex II. Mostres de tumors de tiroide utilitzats en aquest estudi

ID	Tumor type	SEX	Tumor/ Metastasis	SIZE (cm)	% CELL	HRAS MUTATIONS		NRAS MUTATIONS		KRAS MUTATIONS	
						HRAS_e1	HRAS_e2	NRAS_e1	rs969273-	KRAS_e1	KRAS_e2
AC52	FTC	M	Tumor	4	80	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
AC53	MI FTC	F	Tumor	5	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
AC54	FTC	F	Tumor	8	90	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
AC56	FTC	F	Tumor	2	90	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
AC58	FA	M	Tumor	4,5	80	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
AC59	FA	M	Tumor	4	80	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
AC62	FA	M	Tumor	6	85	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
AC64	FA	F	Tumor	4,5	85	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
AC66	FA	F	Tumor	4	80	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
AC67	FA	F	Tumor	4	90	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
AC68	FA	F	Tumor	3,5	80	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
AC69	FA	F	Tumor	6	90	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
AC70	MI FTC	F	Tumor	3,2	80	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
AC73	FA	F	Tumor	4	85	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

FTC: follicular thyroid carcinoma

MI FTC: Minimally invasive follicular thyroid carcinoma

FA: follicular adenoma