





Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA, GINECOLOGÍA Y  
MEDICINA PREVENTIVA**

**Estudio del valor pronóstico de los receptores  
catecolaminérgicos en cáncer de endometrio:  
contribución a la progresión tumoral**

**M. Pia Español Lloret**

TESIS DOCTORAL  
Universidad Autònoma de Barcelona  
Septiembre 2022





Universitat Autònoma  
de Barcelona

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA, GINECOLOGÍA Y  
MEDICINA PREVENTIVA**

Declaración de los directores y tutora conforme **M. Pia Español Lloret** ha realizado bajo su dirección la memoria que presenta con el título '*Estudio del valor pronóstico de los receptores catecolaminérgicos en cáncer de endometrio: contribución a la progresión tumoral*' y que constituye la tesis para optar al grado de Doctora en Medicina reuniendo los requisitos para defenderla ante el tribunal elegido.

Directora y tutora

**Dra. Elisa Llurba Olivé**

Doctora en Medicina por la UAB

Directora del S. de Obstetricia y Ginecología del *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*

Directora

**Dra. María Virtudes Céspedes Navarro**

Doctora en CC. Biológicas por la UMH

Investigadora del *Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau*

Director

**Dr. Oriol Porta Roda**

Doctor en Medicina por la UAB

Director del S. de Obstetricia y Ginecología del *Hospital Universitari Mútua de Terrassa*

Barcelona, septiembre 2022.



## **Agradecimientos**

La realización de esta tesis doctoral representa el trabajo en equipo de múltiples personas sin las cuales no hubiera sido posible. Por lo que quería agradecer sinceramente;

A la Dra. María Virtudes Céspedes Navarro, por ser el pilar básico en la creación, realización y ejecución de esta tesis. Gracias por las infinitas horas de dedicación y comprensión para establecer un lenguaje común entre la biología y la clínica. Asimismo, a todo su equipo investigador que ha colaborado en los experimentos del trabajo.

A la Dra. Elisa Llurba Olivé por su asesoramiento y por aportar su experiencia científica en la realización de este proyecto, su impulso inicial fue clave para introducirme en la investigación. Al Dr. Oriol Porta Roda por ofrecerme su confianza, su constancia y sus mejores consejos en el campo profesional y personal.

Al Dr. Ramon Rovira Negre, por las oportunidades, por su interminable actitud docente y porqué me ha enseñado el valor de la perseverancia.

Al servicio de Anatomía Patológica, al Dr. Alberto Gallardo Alcañiz por participar activamente en la selección de muestras y en el trabajo, así como a Albert Boera Carnicero por estar siempre dispuesto a colaborar.

Al equipo del Institut de Recerca de Sant Pau, a la Dra. Esther Peña Sendra, a la Dra. Elena Serrano Carballal, a la Dra. Sandra Camino López y al Dr. Oriol Juan Babot, por su gran participación en la metodología y los resultados del trabajo.

A los compañeros del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, todos ellos ejemplo de profesionalidad y de humanidad, con los que me he formado y pasado muy buenos momentos. Especialmente a la Dra. Cristina Soler Moreno y a la Dra. Rocio Luna Guibourg por integrarme en un gran equipo, así como a la Dra. Marta Bailón Queiruga por compartir la motivación.

A mis nuevos compañeros y a los responsables del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitari Son Espases, el Dr. Octavi Córdoba Cardona y la Dra. Anna Torrent Colomer por apoyarme en la continuación y finalización del proyecto.

A las pacientes que a diario nos ayudan a aprender y ceden sus muestras para participar en proyectos de investigación como el presente.

Finalmente, a mi familia y a Tomàs que comparten el orgullo de esta experiencia dado que han sido el verdadero apoyo y la motivación del día a día.

A todos, muchas gracias.

# ÍNDICE GENERAL

Resumen	19
Resum	21
Summary	23
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>25</b>
<b>1. Cáncer de endometrio</b>	<b>26</b>
1.1. Epidemiología	26
1.2. Etiopatogenia y factores de riesgo	28
1.3. Clasificación histológica y molecular	31
1.4. Diagnóstico y estadificación	40
1.5. Factores pronósticos y tratamiento	43
<b>2. Sistema nervioso autónomo</b>	<b>51</b>
2.1. Generalidades	51
2.2. Componente neuronal en el microambiente tumoral	54
2.3. Antecedentes y estado actual de la contribución del SNA en la progresión del cáncer de endometrio	58
<b>3. Modelos animales y líneas celulares en cáncer de endometrio</b>	<b>62</b>
3.1. Modelos animales	62
3.2. Modelos xenógrafos a partir de líneas celulares de cáncer de endometrio	65
3.3. Modelos xenógrafos derivados de muestras de pacientes (PDX) en cáncer de endometrio	68
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>71</b>
Hipótesis	72
Objetivos	73
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>75</b>
<b>1. Expresión de receptores catecolaminérgicos en muestras de pacientes con cáncer de endometrio</b>	<b>76</b>



1.1. Población y diseño de estudio	76
1.2. Procesamiento de las muestras	77
1.3. Análisis estadístico	82
<b>2. Experimentación <i>in vivo</i> con modelos animales de cáncer de endometrio</b>	<b>83</b>
2.1. Desarrollo de modelos xenógrafos derivados de muestras de paciente (PDX)	84
2.2. Técnicas de implantación quirúrgica	86
2.3. Seguimiento <i>in vivo</i> del crecimiento del tumor	90
2.4. Necropsia	90
2.5. Procesamiento de las muestras	91
2.6. Análisis estadístico	92
<b>3. Experimentación <i>in vitro</i> con líneas celulares de cáncer de endometrio</b>	<b>92</b>
3.1. Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares HEC1A y AN3CA	92
3.2. Expresión de los receptores <i>ADRβ1,2,3</i> y <i>DRD1-D5</i> en las líneas celulares HEC1A y AN3CA	93
3.3. Evaluación del efecto de los neurotransmisores NA,A,DA sobre la proliferación de las líneas celulares HEC1A y AN3CA	93
3.4. Evaluación del efecto de la neuromodulación dopaminérgica selectiva sobre la proliferación de las líneas celulares HEC1A y AN3CA y del efecto de la combinación en la línea celular AN3CA	94
3.5. Análisis estadístico	94
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>95</b>
<b>1. Características de las pacientes incluidas en el estudio y evaluación de la asociación entre variables clínico-patológicas y la supervivencia</b>	<b>96</b>
1.1. Estadística descriptiva de las variables demográficas y clínico-patológicas	96
1.2. Estudio de la asociación de las variables clínico-patológicas y la supervivencia	98
<b>2. Estudio de la asociación entre los niveles de expresión de los receptores beta-adrenérgicos y las variables clínico-patológicas</b>	<b>100</b>
2.1. Comparativa de la expresión de receptores adrenérgicos en tejido endometrial sano y tumores de cáncer de endometrio	100
2.2. Estudio de la asociación entre la expresión de <i>ADRβ2</i> y las variables clínico-patológicas	104

2.3. Análisis de los niveles de expresión de ADR $\beta$ 2 y su asociación con la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global	105
<b>3. Estudio de la asociación entre los niveles de expresión de los receptores dopaminérgicos y las variables clínico-patológicas</b>	<b>105</b>
3.1. Comparativa de la expresión de receptores de dopamina en tejido endometrial sano y tumores de cáncer de endometrio	105
3.2. Estudio de la asociación entre la expresión de DRD1 y DRD2 y las variables clínico-patológicas	110
3.3. Análisis de los niveles de expresión de DRD1 y DRD2 y su asociación con la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global	114
3.4. Modelos multivariantes y valor pronóstico. Análisis de supervivencia global y libre de enfermedad	116
<b>4. Generación y caracterización de modelos xenógrafos ortotópicos derivados de muestras tumorales de pacientes con cáncer de endometrio (PDX)</b>	<b>117</b>
4.1. Estudio de la capacidad tumorigénica de los modelos xenógrafos END 17 y END 19	117
4.2. Evaluación de los niveles de expresión de los receptores catecolaminérgicos en los modelos xenógrafos END17 y END19	122
<b>5. Evaluación de la neuromodulación catecolaminérgica sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer de endometrio</b>	<b>128</b>
5.1. Efecto de la neuromodulación adrenérgica y dopaminérgica sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer de endometrio	128
5.2. Efecto de la activación e inhibición selectiva de la señalización dopaminérgica sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer de endometrio	130
5.3. Efecto sinérgico del agonismo de DRD1 y el antagonismo de DRD2 sobre la proliferación de la línea celular AN3CA.	131
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>133</b>
1. Estudio de las variables clínico-patológicas y su valor pronóstico de la serie de pacientes del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau	135
2. Señalización adrenérgica y su valor pronóstico en cáncer de endometrio	137
3. Señalización dopaminérgica y su valor pronóstico en cáncer de endometrio	141
4. Caracterización del sistema catecolaminérgico en modelos animales	147

5.	Estudio de la neuromodulación de DRD1 y DRD2 en la proliferación celular <i>in vitro</i>	150
6.	Limitaciones del estudio	153
7.	Aportaciones del estudio y líneas futuras	153
VI.	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>155</b>
VII.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>159</b>
VIII.	<b>ANEXOS</b>	<b>183</b>
1.	Aprobación del proyecto de experimentación animal por la Generalitat de Catalunya	184
2.	Protocolo de supervisión de experimentación animal	186
3.	Autorización del Comité de Experimentación e Investigación Clínica (CEIC) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau	188
4.	<i>Neural plasticity of the uterus: New targets for endometrial cancer?</i>	189
5.	<i>Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges</i>	190

# ÍNDICE de FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tasa estimada de incidencia estandarizada por edad de cáncer de endometrio en Europa por cada 100.000 mujeres en el año 2020.	27
<b>Figura 2.</b> Incidencia estandarizada de cáncer de endometrio y otros tipos de tumores por edad y tasa de mortalidad en España por cada 100.000 mujeres en el año 2020.	27
<b>Figura 3.</b> Modelo de progresión del cáncer de endometrio tipo endometriode y tipo seroso.	32
<b>Figura 4.</b> Imágenes macroscópicas y microscópicas de tumores de endometrio.	33
<b>Figura 5.</b> Algoritmo diagnóstico para la clasificación histomolecular integrada del cáncer de endometrio.	38
<b>Figura 6.</b> Combinación de la clasificación histológica y molecular (TCGA) en el cáncer de endometrio.	39
<b>Figura 7.</b> Esquema representativo de la inervación autónoma en el útero.	54
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de la implicación de la dopamina y los receptores DRD1 y DRD2 en las funciones de las células del microambiente tumoral.	57
<b>Figura 9.</b> Diálogo ( <i>crosstalk</i> ) activo entre la señalización autónoma y las células tumorales implicado en la progresión tumoral.	61
<b>Figura 10.</b> Descripción del proceso de implantación heterotópica y ortotópica en el ratón inmunodeprimido para generar los modelos xenógrafos.	64
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática de la metodología de la tinción inmunohistoquímica.	81
<b>Figura 12.</b> Comparativa de la anatomía de los genitales internos femeninos del humano y del ratón.	84
<b>Figura 13.</b> Procedimiento quirúrgico de la implantación subcutánea de un fragmento de tejido tumoral en ratón inmunodeprimido.	89
<b>Figura 14.</b> Procedimiento quirúrgico de la implantación ortotópica de un fragmento de tejido tumoral en ratón inmunodeprimido.	89
<b>Figura 15.</b> Imágenes de la necropsia y obtención del tumor primario y órganos.	91
<b>Figura 16.</b> Expresión de ARNm de los subtipos de ADR $\beta$ en muestras de tejido endometrial sano y tumoral.	101
<b>Figura 17.</b> Mapa de color ( <i>HeatMap</i> ) de la expresión génica de ADR $\beta$ 1, ADR $\beta$ 2 y ADR $\beta$ 3 en muestras de tejido endometrial sano y tumoral.	101
<b>Figura 18.</b> Imágenes microscópicas representativas de la tinción inmunohistoquímica de ADR $\beta$ 2 en las muestras tumorales.	102
<b>Figura 19.</b> Niveles de expresión de ADR $\beta$ 2 en muestras de tejido endometrial sano y tumoral.	103
<b>Figura 20.</b> Expresión de ARNm de los subtipos de receptores dopaminérgicos en muestras de tejido endometrial sano y tumoral.	106
<b>Figura 21.</b> Mapa de color ( <i>HeatMap</i> ) de la expresión génica de los receptores DRD1, DRD2 y DRD5 en muestras de tejido endometrial sano y tumoral.	106
<b>Figura 22.</b> Imágenes microscópicas representativas de la tinción inmunohistoquímica de DRD1 en tumores de CE.	107

<b>Figura 23.</b> Imágenes microscópicas representativas de la tinción inmunohistoquímica de DRD2 en tumores de CE.	108
<b>Figura 24.</b> Niveles de expresión de DRD1 en muestras de tejido endometrial sano y tumoral.	109
<b>Figura 25.</b> Niveles de expresión de DRD2 en muestras de tejido endometrial sano y tumoral.	110
<b>Figura 26.</b> Distribución de los niveles de expresión de DRD1 en los tumores por estadios según criterios FIGO.	111
<b>Figura 27.</b> Asociación entre la expresión de DRD2 y las variables clínico-patológicas.	113
<b>Figura 28.</b> Curvas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en la serie de pacientes del estudio en relación a la expresión de DRD2 cuantificada por Intensidad y por H-Score.	115
<b>Figura 29.</b> Progresión tumoral en los modelos PDX END17 y END19.	119
<b>Figura 30.</b> Comparativa de los valores de monitorización y diseminación tumoral en los modelos PDX END17 y END19.	120
<b>Figura 31.</b> Estudio histopatológico de los modelos xenógrafos END17 y END19 tras la necropsia, imágenes microscópicas representativas del tumor primario y focos de metástasis.	121
<b>Figura 32.</b> Gráfica de supervivencia global de los animales generados en el modelo PDX obtenido a partir de tumor de paciente END 17 en relación a la expresión de los receptores catecolaminérgicos.	124
<b>Figura 33.</b> Imágenes microscópicas representativas de la tinción inmunohistoquímica de ADR $\beta$ 2, DRD1, DRD2 en tejido endometrial sano y muestras tumorales en el modelo PDX END17.	126
<b>Figura 34.</b> Imágenes microscópicas representativas de la tinción inmunohistoquímica de los marcadores moleculares de uso en el diagnóstico clínico del CE en tumor de paciente y en tumor PDX de END 17 y END 19.	127
<b>Figura 35.</b> Expresión relativa de ARNm para los ADR $\beta$ y los subtipos de DR de la familia D1 y familia D2 en las líneas celulares de CE HEC1A y AN3CA.	128
<b>Figura 36.</b> Efecto sobre la proliferación celular de noradrenalina, adrenalina y dopamina en líneas celulares de CE.	129
<b>Figura 37.</b> Evaluación de la activación e inhibición dopaminérgica sobre la proliferación celular en líneas celulares de CE.	130
<b>Figura 38.</b> Evaluación de la sinergia de fenoldopam y domperidona sobre la proliferación celular en la línea celular AN3CA.	131

# ÍNDICE de TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Factores del riesgo y valores de riesgo relativo en cáncer de endometrio.	30
<b>Tabla 2.</b> Clasificación del cáncer de endometrio tipo I – tipo II según los criterios de Bokhman.	35
<b>Tabla 3.</b> Características identificativas de los distintos subgrupos de cáncer de endometrio según la clasificación molecular TCGA.	37
<b>Tabla 4.</b> Estadificación del cáncer de endometrio según criterios FIGO 2009.	42
<b>Tabla 5.</b> Grupos de riesgo según factores pronósticos en cáncer de endometrio.	44
<b>Tabla 6.</b> Tipos de ratones, deficiencias inmunológicas y características de los ratones inmunodeprimidos utilizados habitualmente para la generación de los modelos xenógrafos para uso en oncología experimental.	63
<b>Tabla 7.</b> Características de las líneas celulares más utilizadas en cáncer de endometrio.	67
<b>Tabla 8.</b> Descripción de las sondas utilizadas para la determinación de la expresión génica mediante el ensayo <i>Taqman Gene Expression Assays (TLDA)</i> de los receptores catecolaminérgicos.	79
<b>Tabla 9.</b> Condiciones de los anticuerpos utilizados en las tinciones de inmunohistoquímica.	80
<b>Tabla 10.</b> Características histológicas y moleculares de las muestras de tumor de paciente seleccionadas para la generación de los modelos PDX.	86
<b>Tabla 11.</b> Características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de endometrio.	97
<b>Tabla 12.</b> Resultados del análisis univariante de la asociación entre las variables clínico-patológicas y la supervivencia en las pacientes incluidas en el estudio.	99
<b>Tabla 13.</b> Valores de Intensidad y de H-Score para la expresión de ADR $\beta$ 2 en tejido endometrial sano y tejido tumoral evaluada por inmunohistoquímica.	103
<b>Tabla 14.</b> Análisis de la asociación entre las variables clínico-patológicas y los niveles de expresión de ADR $\beta$ 2.	104
<b>Tabla 15.</b> Valores de Intensidad y de H-Score para la expresión de DRD1 y DRD2 en tejido endometrial sano y tejido tumoral evaluada por inmunohistoquímica.	109
<b>Tabla 16.</b> Análisis de la asociación entre las variables clínico-patológicas y los niveles de expresión de DRD1.	111
<b>Tabla 17.</b> Análisis de la asociación entre las variables clínico-patológicas y los niveles de expresión de DRD2.	112
<b>Tabla 18.</b> Resultados del análisis univariante de supervivencia para la expresión de DRD1.	114
<b>Tabla 19.</b> Resultados del análisis univariante de supervivencia para la expresión de DRD2.	115
<b>Tabla 20.</b> Análisis multivariante de los factores pronósticos en supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.	116
<b>Tabla 21.</b> Resultados de la implantación y la capacidad tumorogénica de los modelos xenógrafos ortotópicos derivados de pacientes END 17 y END 19.	118
<b>Tabla 22.</b> Resultados de la comparativa de la expresión de los receptores catecolaminérgicos en el tejido endometrial sano y tumor derivados de pacientes END 17 y END 19.	123

**Tabla 23.** Comparativa de tinción inmunohistoquímica de los receptores catecolaminérgicos y de los marcadores moleculares en CE entre la muestra de tumor generada en el ratón y la muestra tumoral de la paciente.

125

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

A: Adrenalina  
ACh: Acetilcolina  
ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ADNc: ADN complementario  
ADR $\alpha$ : Receptores alfa adrenérgicos  
ADR $\beta$ : Receptores beta adrenérgicos  
AMPC: Adenosín monofosfato cíclico  
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  
ATP: Adenosín trifosfato  
BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*  
BLI: Bioluminiscencia  
BSGC: Biopsia selectiva del ganglio centinela  
CCC: Carcinoma de células claras  
CE: Cáncer de endometrio  
CEIC: Comité de experimentación e investigación clínica  
CHR: Receptores muscarínicos de acetilcolina  
COX 2: Ciclooxigenasa-2  
CT: *Threshold cycle*  
DA: Dopamina  
DE: Desviación estándar  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DOM: Domperidona  
DR: Receptores dopaminérgicos  
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético  
EMT: Transición epitelio-mesenquimal  
ENITEC: *European Network of Individual Treatment in Endometrial Cancer*  
FE: Fenolpodam  
FFPE: Fijación en formalina y parafina  
FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia  
FLI: Fluorescencia  
GEM: *Genetically engineered models*  
GFP: *Green fluorescent protein*  
HIF1 $\alpha$ : *Hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$*   
HR: *Hazard ratio*  
IC: Intervalo de confianza  
IELV: Invasión del espacio linfo-vascular  
IHQ: Inmunohistoquímica  
IL: Interleuquina



IMS: Inestabilidad de microsatélites  
ISGyP: *International Society of Gynecological Pathology*  
LE: LE 300  
MLH1: MutL homolog 1  
MMP: Metaloproteasas de la matriz extracelular  
MMR: *Mismatch repair genes*  
MSH2: MutS homolog 2  
MSH6: MutS homolog 6  
MTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero  
NA: Noradrenalina  
nAChRs: Receptores nicotínicos de acetilcolina  
NF: Factores neurotróficos  
NOD: *Nonobese diabetic mice*  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PARP: Poli (ADP-ribosa) polimerasa  
PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa  
PDX: *Patient-derived xenograft models*  
PER: Pergolide  
PET: Tomografía por emisión de positrones  
PIR3: Fosfoinositido 3-quinasa  
PKA: Proteína quinasa A  
POLE: *Polymerase epsilon exonuclease*  
PMS2: *Post-Meiotic Segregation Increased 2*  
RIQ: Rango intercuartílico  
ROI: Regiones de Interés  
RREE: Receptores estrógenos  
RRPP: Receptores progestágenos  
RT-qPCR: *Real-time polymerase chain reaction*  
SCID: *Severely compromised immune deficient mice*  
SEA: Servicio de Experimentación Animal  
SG: Supervivencia global  
SLE: Supervivencia libre de enfermedad  
SNA: Sistema nervioso autónomo  
SNPS: Sistema nervioso parasimpático  
SNS: Sistema nervioso simpático  
SPF: *Specific Pathogen Free*  
TAC: Tomografía axial computarizada  
TCGA: *The Cancer Genome Atlas*  
TLDA: *Taqman Gene Expression Assays*  
TRAIL: *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*  
VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*





## RESUMEN

El cáncer de endometrio es la neoplasia ginecológica más frecuente en nuestra población. La mayoría de pacientes son diagnosticadas en estadios tempranos y tienen pronósticos favorables. Aun así, un porcentaje de pacientes situado entre un 10% y un 20%, pueden presentar recidivas o diagnosticarse en fases más avanzadas de la neoplasia, por lo que la investigación en esta patología debe colaborar en el desarrollo de nuevas estrategias para precisar el pronóstico y las opciones terapéuticas. Las catecolaminas, que intervienen como neurotransmisores en respuesta al estrés físico o emocional, se han perfilado como uno de los principales mediadores de la relación entre el estrés crónico y la progresión del cáncer. Existen datos que sugieren que las células tumorales utilizan los neurotransmisores y sus neuroreceptores para activar los mecanismos de crecimiento tumoral y metástasis a través de vías neuroendocrinas y fibras nerviosas que forman parte del denominado microambiente tumoral.

El trabajo que se plantea en esta tesis doctoral surge de la investigación con muestras de pacientes, modelos *in vivo* y líneas celulares de cáncer de endometrio; con el objetivo de caracterizar el papel de los receptores catecolaminérgicos en la progresión de este tipo tumoral. El análisis de la expresión a nivel de ARNm para los distintos subtipos de receptores catecolaminérgicos, asociado a la revisión de resultados de la literatura, ha permitido escoger ADR $\beta$ 2, DRD1 y DRD2 como principales dianas a evaluar por la técnica inmunohistoquímica. Nuestros datos sugieren el receptor adrenérgico ADR $\beta$ 2 no determina el pronóstico de las pacientes evaluadas, a diferencia de lo que se ha descrito en otras neoplasias. Por su parte DRD1 presenta una expresión reducida en el tumor con respecto al tejido endometrial sano. El análisis de la asociación del receptor con las variables clínico-patológicas sugiere que su expresión podría tener una relación inversa en referencia al tamaño y al estadio tumoral. Finalmente, la sobreexpresión de DRD2 se asocia significativamente al tipo histológico de cáncer de endometrio no endometriode, a tumores de alto grado histológico y también a una peor supervivencia libre de enfermedad y global en la cohorte de pacientes estudiada.

Además, hemos establecido dos modelos xenógrafos derivados de muestras de paciente implantados a nivel ortotópico en ratón. Estos modelos presentan una mayor relevancia traslacional y clínica. Inicialmente se ha comprobado su viabilidad, así como la capacidad de implantación y diseminación tumoral. El modelo generado a partir del tumor END 17 presenta una progresión más rápida y un peso medio tumoral final superior al modelo END 19, a la vez que una supervivencia menor; definiéndose como potencial modelo de cáncer de endometrio agresivo.

Además, se ha confirmado en ambos modelos la conservación de las características del tumor original a partir del perfil inmunohistoquímico y del patrón de expresión de los receptores catecolaminérgicos en el tumor generado. Por otra parte, la experimentación *in vitro*, nos ha permitido evaluar el efecto de la neuromodulación de las vías de señalización adrenérgica y dopaminérgica en líneas celulares representativas de cáncer de endometrio, y su potencial utilización en terapia antitumoral. La combinación del agonismo de DRD1 y del antagonismo de DRD2 ha inducido una reducción significativamente mayor en la capacidad de proliferación celular de la línea AN3CA, comparado con su tratamiento en monoterapia, representando una novedosa estrategia terapéutica.

La información obtenida de este proyecto aporta a la comunidad científica nuevo conocimiento sobre el papel de los receptores catecolaminérgicos en cáncer de endometrio. Su aplicación a nivel pronóstico y/o terapéutico, podría contribuir a mejorar el manejo clínico de las pacientes. A partir de este punto, se pueden definir dos vías de actuación. En primer lugar, proseguir la experimentación para caracterizar más en detalle, la contribución nerviosa al microentorno tumoral y los mecanismos implicados en dicha contribución. En segundo lugar, evaluar la efectividad terapéutica de la combinación de agonistas y antagonistas dopaminérgicos en el ámbito preclínico y valorar el reposicionamiento de algunos fármacos ya aprobados que podrían tener nuevas aplicaciones a nivel oncológico.

## RESUM

El càncer d'endometri és la neoplàsia ginecològica més freqüent a la nostra població. La majoria de pacients són diagnosticades en estadis inicials i tenen pronòstics favorables. Tot i així, un percentatge de pacients situat entre un 10% i un 20%, poden presentar recidives o diagnosticar-se en fases més avançades de la neoplàsia, per tant, la investigació en aquesta patologia ha centrar-se en desenvolupar noves estratègies per precisar el pronòstic i millorar les opcions terapèutiques. Les catecolamines, que intervenen com a neurotransmissors en resposta a l'estrès físic o emocional, s'han perfilat com un dels principals mediadors de la relació entre l'estrès crònic i la progressió del càncer. Hi ha dades que suggereixen que les cèl·lules tumorals utilitzen els neurotransmissors i els seus neuroreceptors per activar els mecanismes de creixement tumoral i metàstasi a través de vies neuroendocrines i fibres nervioses que formen part de l'anomenat microambient tumoral.

El treball que es planteja en aquesta tesi doctoral sorgeix de la investigació amb mostres de pacients, amb models *in vivo* i amb línies cel·lulars de càncer d'endometri per tal de caracteritzar el paper dels receptors catecolaminèrgics en la progressió d'aquest tipus tumoral. L'anàlisi de l'expressió a nivell d'ARNm per als diferents subtipus de receptors catecolaminèrgics, associat a la revisió de resultats de la literatura, ha permès escollir ADR $\beta$ 2, DRD1 i DRD2 com a principals dianes a ser avaluades mitjançant la tècnica immunohistoquímica. Les nostres dades suggereixen que el receptor adrenèrgic ADR $\beta$ 2 no determina el pronòstic de les pacients avaluades, a diferència del que s'ha descrit en altres neoplàsies. Per la seva banda DRD1 presenta una expressió reduïda al tumor respecte al teixit endometrial sa. L'anàlisi de l'associació del receptor amb les variables clínico-patològiques suggereix que la seva expressió podria tenir una relació inversa en referència a la mida del tumor i a l'estadi tumoral. Finalment, la sobreexpressió de DRD2 s'associa significativament al tipus histològic de càncer d'endometri no endometriode, a tumors d'alt grau histològic i també a una pitjor supervivència lliure de malaltia i global en la cohort de pacients estudiada.

A més, hem establert dos models xenògrafs derivats de mostres de pacient implantats a nivell ortotòpic en ratolí. Aquests models presenten una major rellevància traslacional i clínica. Inicialment se n'ha comprovat la viabilitat, així com la capacitat d'implantació i disseminació tumoral. El model generat a partir del tumor END 17 presenta una progressió més ràpida i un pes mitjà tumoral final superior al model END 19, alhora que una supervivència menor; definint-se per tant com un potencial model de càncer d'endometri agressiu. A més, s'ha confirmat en tots dos models la conservació de les característiques del tumor original a partir del perfil immunohistoquímic i del patró d'expressió dels receptors catecolaminèrgics al tumor generat.

D'altra banda, l'experimentació *in vitro* ens ha permès avaluar l'efecte de la neuromodulació de les vies de senyalització adrenèrgica i dopaminèrgica en línies cel·lulars representatives de càncer d'endometri i la seva potencial utilització en teràpia antitumoral. La combinació de l'agonisme de DRD1 i de l'antagonisme de DRD2 ha induït una reducció significativament superior en la capacitat de proliferació cel·lular de la línia AN3CA, comparat amb el seu tractament en monoteràpia, representant una nova estratègia terapèutica.

La informació obtinguda en aquest projecte aporta a la comunitat científica coneixement innovador sobre el paper dels receptors catecolaminèrgics en càncer d'endometri. La seva aplicació a nivell pronòstic i/o terapèutic podria contribuir a millorar el maneig clínic de les pacients que el pateixen. A partir d'aquest punt, es poden definir dues vies d'actuació. En primer lloc, prosseguir l'experimentació per caracteritzar més detalladament la contribució nerviosa al microentorn tumoral així com els mecanismes implicats. En segon lloc, avaluar l'efectivitat terapèutica de la combinació d'agonistes i antagonistes dopaminèrgics en l'àmbit preclínic i valorar el reposicionament d'alguns fàrmacs ja aprovats i que podrien tenir noves aplicacions a nivell oncològic.

## SUMMARY

Endometrial cancer is the most common gynecologic malignancy in our population. Most patients are diagnosed in early stages and have favorable prognoses. However, somewhere between 10% and 20% of those patients may present recurrences or be diagnosed in more advanced stages. Therefore, researchers must make a concerted effort to develop new strategies to optimize the prognosis and offer new therapeutic options for this pathology. Catecholamines, which act as neurotransmitters in response to physical or emotional stress, have emerged as one of the main mediators of the relationship between chronic stress and cancer progression. There are data suggesting that tumor cells use neurotransmitters and their neuroreceptors to activate the mechanisms of tumor growth and metastasis via neuroendocrine pathways and nerve fibers that are part of the so-called tumor microenvironment.

The project proposed in this doctoral thesis arises from research based on patient samples, *in vivo* models and established cell lines of endometrial cancer to characterize the role of catecholaminergic receptors in the progression of this tumor. The analysis of the mRNA expression levels for the different subtypes of catecholaminergic receptors along with the results seen in a review of the literature, has made it possible to choose ADR $\beta$ 2, DRD1 and DRD2 as the main targets to be evaluated by means of the immunohistochemical technique. Our data suggest that ADR $\beta$ 2 does not determine the prognosis of the patients evaluated, unlike what has been described in other tumor types. On the other hand, DRD1 has a reduced expression in the tumor tissue compared to healthy endometrial tissue. The analysis of the association of the receptor with clinicopathological variables suggests that its expression may have an inverse relationship with tumor size and stage. Finally, DRD2 expression analysis is significantly associated with non-endometrioid endometrial cancer, high grade FIGO classification tumors and worse disease-free and overall survival in the cohort of patients studied.

In addition, we have established two patient-derived xenograft models from patient samples implanted orthotopically in mice. These models have greater translational and clinical relevance. Initially, its viability as well as its capacity for tumor implantation and dissemination have been verified. The model generated from the END 17 tumor shows a more rapid progression and a greater tumor weight as well as shorter survival than the END 19 model, thereby defining itself as a potential model of aggressive endometrial cancer. In addition, the conservation of the characteristics of the original tumor has been confirmed in both models based on the immunohistochemical profile and the expression pattern of the catecholaminergic receptors in the generated tumor.



In the end, *in vitro* experimentation has made it possible to evaluate the effect of neuromodulation of adrenergic and dopaminergic signaling pathways in cell lines representative of endometrial cancer and its potential use in antitumor therapy. The combination of DRD1 agonism and DRD2 antagonism induce a significantly greater reduction in the cell proliferation capacity of the AN3CA cell line, compared to its monotherapy treatment, representing a new therapeutic strategy.

The information obtained from this project provides new knowledge to the scientific community on the role of catecholaminergic receptors play in endometrial cancer. Its application as a prognostic and/or therapeutic tools may well contribute to improving the clinical management of affected patients. From this point, two courses of action can be defined. First, continued experimentation to further characterize the nervous contribution to the tumor microenvironment and the mechanisms involved in endometrial cancer is called for. Second, there is a need to evaluate the therapeutic effectiveness of the combination of dopaminergic agonists and antagonists at a preclinical level and to assess the repositioning of some drugs already approved that might have new applications for oncological treatment.

# I. INTRODUCCIÓN

## I.INTRODUCCIÓN

### 1. Cáncer de endometrio

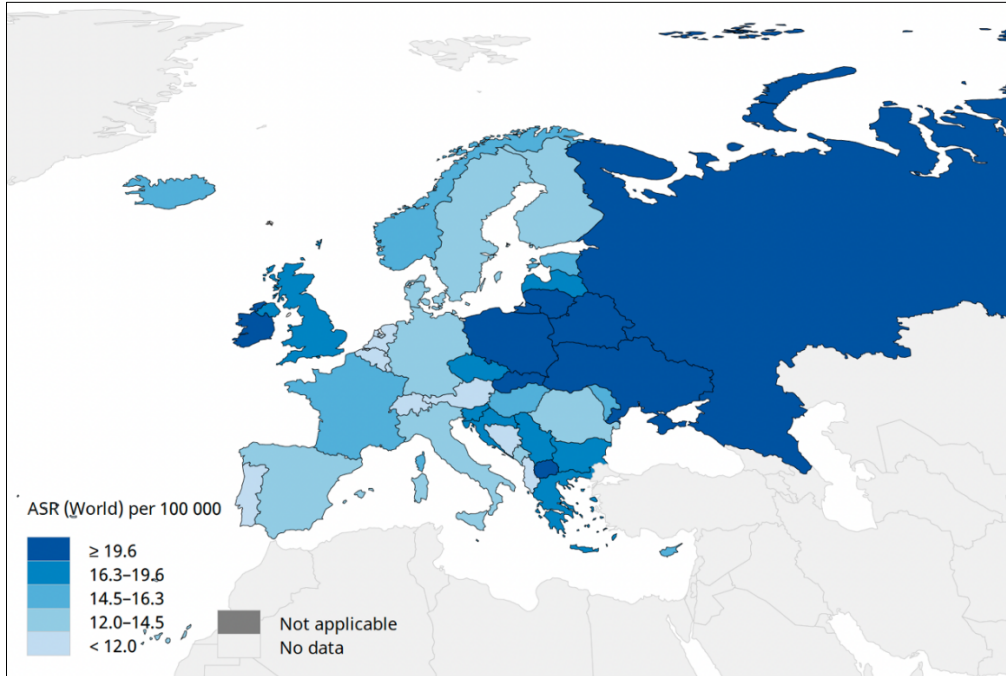
#### 1.1. Epidemiología

El cáncer de endometrio (CE) es el tumor maligno del tracto genital femenino más frecuente en Europa y el segundo en mortalidad, después del cáncer de ovario. En referencia a otras neoplasias, es el cuarto tumor más prevalente entre las mujeres tras el cáncer de mama, el cáncer de colon y el cáncer de pulmón (1) (**Figura 1**).

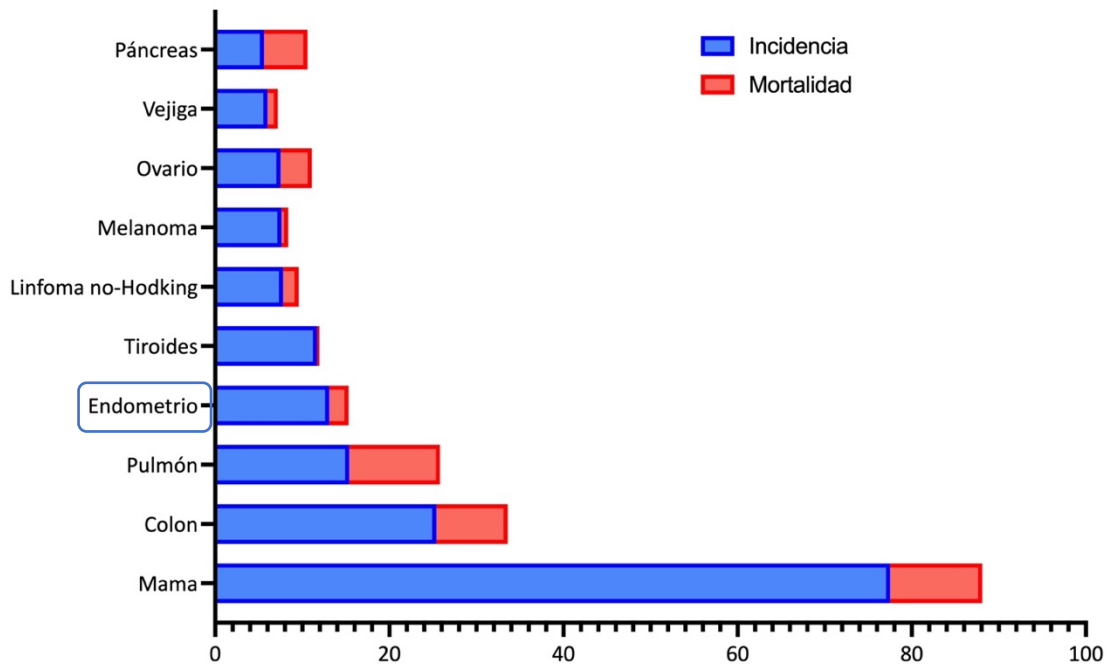
En los últimos años se ha identificado un aumento en el diagnóstico de la neoplasia de endometrio en una proporción del 1% anual (2). El incremento de la esperanza de vida de la población general así como la obesidad, son dos factores asociados a este incremento; y característicos de un cáncer con mayor incidencia en los países desarrollados. La mayoría de casos se presentan en pacientes postmenopáusicas, con una edad media de 63 años. Un menor porcentaje, del 5-6% de pacientes, se diagnosticarán entre los 35 y los 44 años y un 1,6% entre los 20 y los 34 años.

La incidencia estandarizada de cáncer de endometrio en la Unión Europea por edad en 2020 fue de 16,6 casos/100.000 personas. En España, en el mismo año, se diagnosticaron alrededor de 7000 casos de neoplasia de endometrio, correspondiente a una incidencia estandarizada por edad de 13,1 casos/100.000 personas (**Figura 2**). La tasa de mortalidad es de 2,2 muertes por cada 100.000 mujeres/año (1). La supervivencia global a los 5 años del diagnóstico es del 80%. En los estadios iniciales o localizados (I-II) se sitúa entorno a un 90%, aunque en casos de diseminación regional o a distancia disminuye hasta un 69% y 17% respectivamente (3).

## INTRODUCCIÓN



**Figura 1. Tasa estimada de incidencia estandarizada por edad de cáncer de endometrio en Europa por cada 100.000 mujeres en el año 2020. Adaptada de Globocan 2021 (1).**



**Figura 2. Incidencia estandarizada de cáncer de endometrio y otros tipos de tumores por edad y tasa de mortalidad en España por cada 100.000 mujeres en el año 2020. Adaptada de Globocan 2021(1).**

## 1.2. Etiopatogenia y factores de riesgo

Los factores de riesgo para el cáncer de endometrio son múltiples y pueden dividirse en modificables, como por ejemplo los hábitos de vida de cada paciente, o en no modificables como el riesgo familiar (**Tabla 1**).

El factor de riesgo más relevante, especialmente en el subtipo endometriode, es la exposición a estrógenos. La progesterona y los estrógenos actúan de forma contrapuesta manteniendo la homeostasis en el ciclo celular. La pérdida de este balance iniciaría el proceso de carcinogénesis. Se han descrito varios mecanismos que pueden influir en este efecto de los estrógenos sobre el endometrio (4). Cuando los estrógenos pierden su oposición por la progesterona, se origina una mayor actividad mitótica, lo que contribuye a la inestabilidad genómica y a la aparición de una mayor tasa de errores de replicación en el ADN y de mutaciones somáticas. Además, estas alteraciones moleculares pueden incrementar la actividad transcripcional del endometrio a través de una compleja red de factores de transcripción dando lugar a la hiperplasia de endometrio que representa la lesión precursora del cáncer de endometrio (5).

La exposición a estrógenos puede ser exógena o endógena. En el primer caso, la administración en forma de terapia estrogénica consiste en la toma diaria de bajas dosis de estrógenos para reducir la sintomatología de la menopausia. En pacientes con útero intacto debe asociarse en todos los casos a progesterona ya que su ausencia aumenta la incidencia de hiperplasia hasta el 50% (6). Por otra parte, el Tamoxifeno es un fármaco utilizado en el tratamiento del cáncer de mama con expresión de receptores de estrógenos. Es un modulador selectivo de estos receptores. Aunque a nivel de la mama presenta una acción de bloqueo, en el endometrio estimula la proliferación celular (7). En referencia a las fuentes endógenas de estrógenos, podemos destacar diferentes situaciones fisiológicas o patológicas que pueden promover su incremento. La menarquia precoz o la menopausia tardía aumentan el tiempo de exposición a estrógenos durante la vida reproductiva de la mujer y por tanto el riesgo de desarrollar cáncer de endometrio (8,9). Asimismo, la obesidad es un reconocido factor de riesgo independiente de la patología debido al incremento asociado de niveles estrogénicos, de hiperinsulinemia y del estado de inflamación crónica (10). Los tumores productores de estrógenos como los tumores de las células de la granulosa (11) y las condiciones que favorecen los ciclos anovulatorios como el síndrome de ovario poliquístico en los que destaca un déficit de progesterona, se traducen también en una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de endometrio (12). Por último, circunstancias como la nuliparidad y la esterilidad son factores que, por el hecho de disminuir el número de gestaciones, incrementan el número de ciclos menstruales de forma concordante.

## INTRODUCCIÓN

Además, los cambios hormonales durante el embarazo podrían explicar esta asociación, generalmente caracterizada por un cambio hacia una mayor producción de progesterona con efectos protectores sobre el endometrio.

Por otra parte, la edad correlaciona con el riesgo de presentar cáncer de endometrio, como en otros tipos de tumores (13).

La presencia de alteraciones metabólicas en las mujeres postmenopáusicas se asocia a cáncer de endometrio (14). La obesidad, la diabetes mellitus y la hipertensión arterial son factores que pueden coexistir en las pacientes afectadas. El sobrepeso o la obesidad es un factor de riesgo modificable que ha tomado relevancia en los últimos años dado su continuo incremento. Un modelo de regresión lineal a nivel de Estados Unidos prevé que en 2030 la incidencia de cáncer de endometrio habrá incrementado un 55% respecto al año 2010 (15). En referencia a la etiopatogenia, se conoce que el aumento de la adiposidad incrementa la actividad de la aromatasa, lo que conduce a la conversión de andrógenos en estrógenos, para promover directamente la transcripción de genes proliferativos y la progresión endometrial (16). Así también, la inflamación crónica asociada con la adiposidad visceral mediada por adipocinas proinflamatorias, conduce a la hiperinsulinemia, al aumento del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) y a la hiperglucemia, promoviendo la proliferación endometrial. La inflamación y el aumento de los metabolitos del estrógeno contribuyen aún más al daño del ADN y a la inestabilidad genómica. Finalmente, el tejido adiposo es una fuente de células madre mesenquimales, que pueden reclutarse para apoyar el crecimiento y la progresión del tumor (17).

El componente hereditario representa aproximadamente el 5% de los casos de cáncer de endometrio y está asociado con un mayor riesgo en mujeres jóvenes. Cuando la edad de diagnóstico es inferior a los 50 años, el porcentaje de cánceres ligados a la herencia genética aumenta hasta el 10% (18). El síndrome de Lynch, también denominado “cáncer colorrectal hereditario no polipósico” es una enfermedad autosómica dominante que se caracteriza por presentar una mutación en uno de los cuatro genes reparadores del ADN (*Mismatch repair genes* (MMR) *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*). Estos genes mantienen la estabilidad genómica eliminando los errores que pueden producirse durante la replicación del ADN, por lo que su disfunción da lugar a inestabilidad de microsatélites (IMS). Aunque la IMS también se encuentra presente en el 15-25% de los cánceres esporádicos, en los tumores asociados a Lynch se observa en más del 60% de los casos (19). Los tumores más frecuentemente asociados a este síndrome son el cáncer de colon y el de endometrio y en menor número el cáncer gástrico y el cáncer de ovario.

Las últimas recomendaciones de la *International Society of Gynecological Pathology* (ISGyP) sugieren determinar el estado de los genes MMR o testar la IMS en todas las muestras de cáncer de endometrio independientemente de la edad de la paciente. Esta información ofrece múltiples ventajas: 1) diagnóstica, dado que la deficiencia de MMR o la IMS se considera un marcador de tipo endometriode, 2) identificativa, de las pacientes con mayor riesgo de presentar síndrome de Lynch, 3) pronóstica, según lo identificado por *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, ver más adelante la clasificación molecular) y 4) predictiva de la posible respuesta a tratamientos con inmunoterapia (20).

**Tabla 1. Factores de riesgo y valores de riesgo relativo en cáncer de endometrio.** Adaptada de (5,21).

FACTORES DE RIESGO	Riesgo relativo
Exposición a estrógenos exógenos	10-20
Riesgo familiar o genético	5-20
Tamoxifeno	2-3
Obesidad	2-5
Edad avanzada	2-3
Nuliparidad	3
Menopausia tardía	2-3
Esterilidad	2-3
Diabetes mellitus	1,3-3
Hipertensión arterial	1,3-3
Menarquia precoz	1,5-2
Síndrome de ovario poliquístico	1,5

En las pacientes con síndrome de Lynch, el riesgo de la aparición de cáncer depende específicamente del tipo de mutación. Para el carcinoma de endometrio, las incidencias acumuladas a los 70 años son del 34%, 51%, 49% y 24% para mutaciones *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* respectivamente, y para el cáncer de ovario 11%, 15%, 0% y 0% respectivamente (22). Los criterios de Ámsterdam así como las guías clínicas determinan el manejo clínico que incluye el estudio, el seguimiento y el consejo genético que se debe ofrecer a estas pacientes (18,21).

## INTRODUCCIÓN

El síndrome de Cowden se caracteriza por asociarse a una mutación del gen supresor *PTEN* y conferir herencia autosómica dominante. Se trata de una enfermedad hereditaria poco prevalente que supone un riesgo de cáncer de endometrio asociado del 5-28%, entre otros tipos de cáncer (23). Por último, la mutación en los genes *BRCA 1* o *2* también se traduce en un riesgo aumentado de cáncer de endometrio del tipo seroso, de aproximadamente el 3-5% (24), así como el Síndrome de Li-Fraumeni asociado a mutaciones de *TP53*.

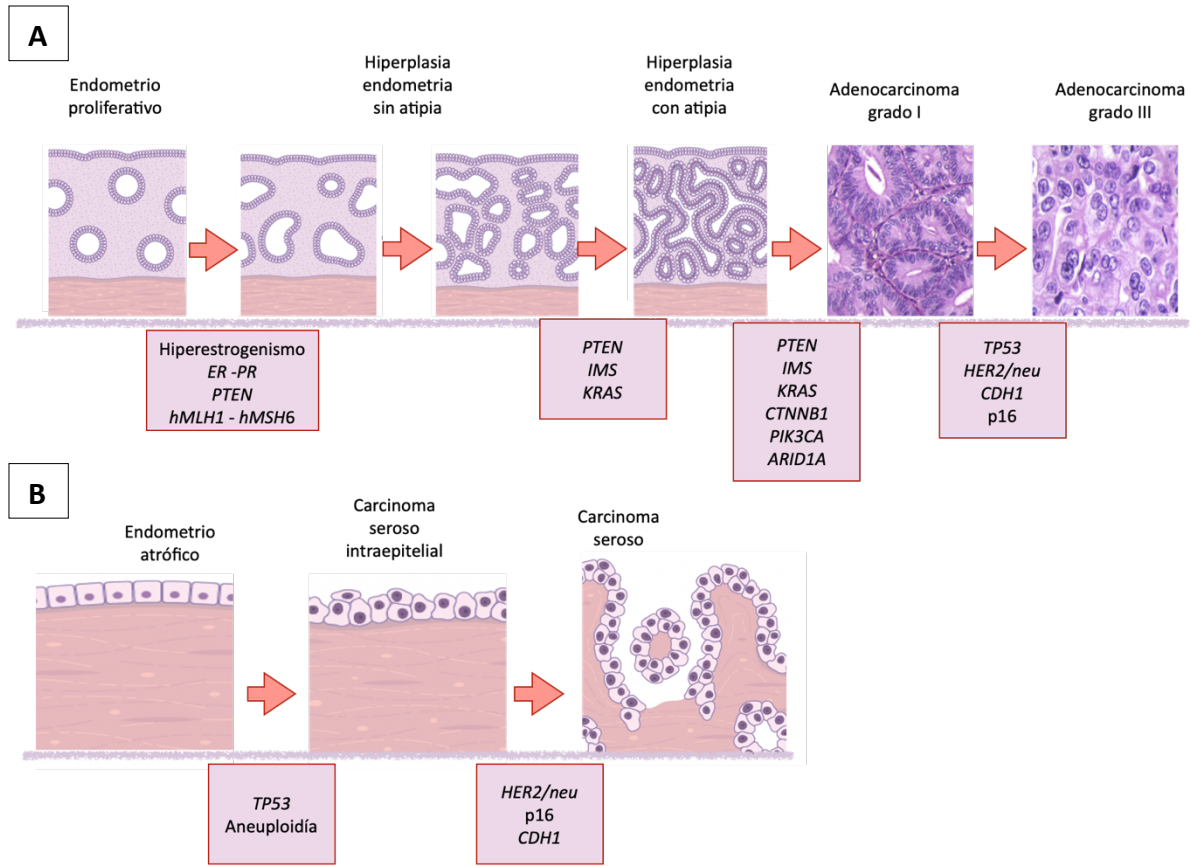
### 1.3. Clasificación histológica y molecular

#### 1.3.1. Lesiones precursoras

El endometrio puede presentar alteraciones en su estructura que determinen el origen de un cáncer de endometrio. Son las denominadas lesiones proliferativas o hiperplasia endometrial, normalmente asociadas a desequilibrios hormonales que se caracterizan por un incremento de la ratio glándula/estroma (25). Su etiología es el hiperestrogenismo originado en la anovulación provocada por la perimenopausia, la administración de estrógenos en monoterapia o bien la producción anómala de estrógenos por una fuente endógena. En el mecanismo de progresión de hiperplasia a neoplasia endometrial están implicadas múltiples mutaciones en los genes *PTEN*, *MLH1*, *MSI*, *KRAS*, *ARID1A*, *CTNNB1*, *PIK3CA*, entre otras y múltiples alteraciones celulares (**Figura 3**). La clasificación de la hiperplasia endometrial según la OMS se basa en la presencia o no de atipia celular (26).

En primer lugar, la hiperplasia endometrial sin atipia se define como una proliferación glandular, con un riesgo de cáncer de endometrio incrementado 3-4 veces. En un segundo escalón de complejidad, se halla la hiperplasia endometrial con atipia o neoplasia intraepitelial endometrial caracterizada por un marcado incremento del volumen glandular asociado a la alteración citológica que resulta significativa en relación con el endometrio adyacente. Esta lesión, que es clonal desde un punto de vista molecular, se asocia a una mayor incidencia en cáncer de endometrio (23-48%). Hasta el 30% de pacientes con el diagnóstico de hiperplasia con atipia en una biopsia, muestran algún foco de carcinoma endometriode en la pieza de histerectomía, aunque el tumor suele ser de bajo grado y escasamente invasor (27).





**Figura 3. Modelo de progresión del cáncer de endometrio tipo endometriode (A) y tipo seroso (B).** Esquema de los cambios a nivel histológico y de las alteraciones moleculares más frecuentes descritas en la transformación tumoral. Adaptada de (28).

### 1.3.2. Clasificación según tipos histológicos

Según la 5ª edición de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los tumores de tracto genital femenino, publicada en 2020, se definen los siguientes tipos histológicos epiteliales de cáncer de endometrio (26):

#### **Carcinoma endometriode (Figura 4)**

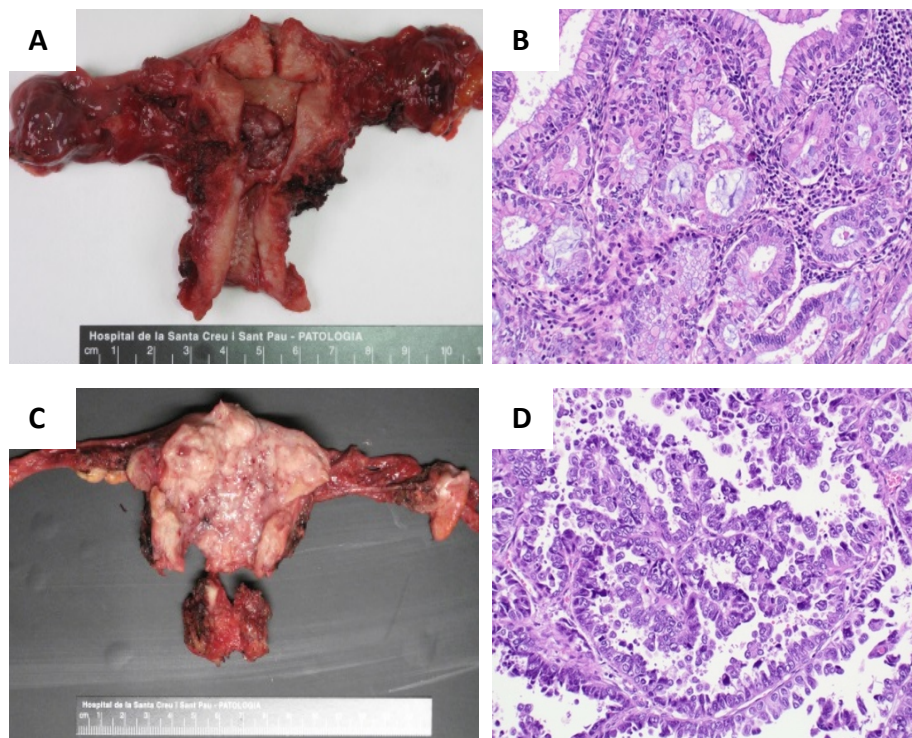
Es el carcinoma más frecuente de todos los tipos de cáncer de endometrio y representa un 80% del total de casos. Presenta un patrón glandular formado por un epitelio columnar estratificado que incluye células con citoplasma eosinofílico y granular y atipia nuclear leve-moderada. En ocasiones, puede presentar también un patrón de crecimiento papilar o villoglandular prominente. Su agresividad se mide según el grado histológico arquitectural, determinado por el porcentaje de tumor sólido según el sistema de clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO).

## INTRODUCCIÓN

El componente escamoso no se contabiliza como componente sólido. El G1 o bien diferenciado presenta un <5% de tumor sólido, el G2 o moderadamente diferenciado se delimita del 6-50% de tumor sólido y el G3 o poco diferenciado engloba a >50% de tumor sólido. Cuando la atipia citológica es desproporcionada en la complejidad arquitectónica, el grado se incrementa en un punto.

### Carcinoma seroso (Figura 4)

Es el carcinoma no endometriode más frecuente, representando un 10% del total de casos. Su perfil molecular muestra en la mayoría de los casos una mutación en el gen supresor de tumores *p53*. Presenta una estructura papilar, compleja, con células redondeadas y multinucleadas. Los cuerpos de Psammoma (colecciones de calcio microscópicas) se pueden identificar en el 30% de los casos. Los núcleos se caracterizan por ser grandes con nucléolos eosinófilos y con numerosas mitosis atípicas. Los carcinomas serosos se consideran de alto grado por definición, la mayoría se diagnostican con enfermedad extrauterina presente y se asocian a mal pronóstico.



**Figura 4. Imágenes macroscópicas y microscópicas de tumores de endometrio. A, B. Carcinoma endometriode. C, D. Carcinoma seroso.** Cedidas por el Dr. A. Gallardo, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

### **Carcinoma de células claras**

Constituye un 5% aproximadamente del total de cáncer de endometrio, afectando predominantemente mujeres en edad avanzada y con diagnóstico tardío. Su arquitectura está formada por células poligonales atípicas con citoplasma claro distribuidas en patrones papilares, túbulo-quísticos, sólidos o mixtos. Se le atribuye un índice mitótico alto con atipia nuclear y nucléolos irregulares agrandados por lo que se asocia a mal pronóstico. Este tipo de tumor se caracteriza por no presentar receptores de estrógenos, en cambio, destaca su positividad para Napsina A (proteinasas aspárticas) que puede diferenciarla por inmunohistoquímica de otros tumores.

### **Carcinoma mixto**

Los carcinomas mixtos se definen por al menos dos componentes histológicos distintos, en que cada uno representa el 5% del tumor o más. Habitualmente asocian carcinomas endometrioides y no endometrioides (seroso o de células claras), presentando subtipos moleculares similares con una expresión morfológica variable. Representan el 10% de los carcinomas de endometrio y son siempre de alto grado.

### **Carcinoma indiferenciado**

Los carcinomas indiferenciados se desarrollan a partir de carcinomas endometrioides de grado 1 o 2. No presentan diferenciación glandular ni escamosa. Se trata de un tumor que puede asociarse a inestabilidad de microsatélites y a síndrome de Lynch. Son lesiones de muy mal pronóstico.

### **Carcinosarcoma**

Representa menos de un 2% de los cánceres de endometrio. Previamente clasificado como tumor Mulleriano mixto maligno. Se caracteriza por ser un carcinoma bifásico, compuesto por un componente de sarcoma de alto grado asociado con un carcinoma endometriode de alto grado. Desde un punto de vista molecular, este cambio está apoyado por la expresión de genes involucrados en la transición epitelio-mesénquima (EMT), al igual que se ha evidenciado en carcinomas sarcomatoides en otras localizaciones.

### **Otros tipos de tumores de endometrio infrecuentes**

Constituyen una minoría de los cánceres de endometrio. En el grupo se encuentran los carcinomas escamosos (0,5% del total), compuestos por células con diferenciación escamosa y se relacionan con condiciones inflamatorias crónicas. Su agresividad depende del estadio. También se incluyen el adenocarcinoma mesonéfrico y el mesonéfrico-like del cuerpo uterino (1% del total) (29).

## INTRODUCCIÓN

Tienen un inmunofenotipo característico (proteína de unión a GATA 3 positivo, factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) positivo, receptor de estrógenos negativo) y se asocian con un comportamiento agresivo. Por último, el subtipo carcinoma mucinoso endometrial de tipo gastrointestinal es una entidad poco frecuente, con receptores hormonales negativos y con un patrón agresivo relevante (30).

### 1.3.3. Clasificación según criterios de Bokhman

En el año 1983, Bokhman realizó una clasificación dualista de los subtipos de carcinoma de endometrio basándose en características clínicas e histopatológicas que ha permanecido en la práctica clínica hasta la actualidad:

**Tabla 2. Clasificación del cáncer de endometrio tipo I – tipo II según los criterios de Bokhman.**  
Adaptada de (31).

Características	Tipo I	Tipo II
Proporción en la población	70-80%	20-30%
Patología endometrial subyacente	Hiperplasia endometrial	Atrofia endometrial
Expresión de receptores de estrógenos y/o progestágenos	Alta	Reducida
Asociación a obesidad, hiperlipidemia y diabetes mellitus	Sí	No
Grado histológico (FIGO)	Bajo (Grado 1-2)	Alto (Grado 3)
Alteraciones génicas asociadas	Inestabilidad de microsatélites, <i>PTEN</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>mTOR</i> , <i>KRAS</i> , <i>B-catenina</i> , <i>ARID1A</i> , <i>CTNNB1</i> .	<i>p53</i> <i>HER2</i> Pérdida de heterocigidad
Potencial de diseminación ganglionar linfática	Bajo	Alto
Pronóstico	Favorable	Desfavorable
Estadio al diagnóstico	Inicial (FIGO I-II)	Avanzado (FIGO III-IV)
Supervivencia a los 5 años	86%	59%

El **Carcinoma endometriode o también denominado tipo I** representa aproximadamente un 70-80% del total de cánceres de endometrio. Se diagnostica habitualmente en pacientes perimenopáusicas y se asocia a estados de hiperestrogenismo como la obesidad, la nuliparidad, la anovulación o la fuente exógena de estrógenos. A nivel histológico se caracteriza por la alta expresión de receptores de estrógenos y progesterona. Su lesión precursora es la hiperplasia endometrial y en la mayoría de los casos, dado su diagnóstico en fases iniciales, presenta un pronóstico favorable.

El **Carcinoma no endometriode o tipo II** es menos frecuente que el anterior y engloba tumores de alto grado tipo carcinoma seroso, células claras o carcinosarcoma. El origen se asocia a un endometrio atrófico no relacionado directamente con hiperestrogenismo. Su diagnóstico es mayoritariamente en estadios avanzados, en pacientes de mayor edad y presenta mal pronóstico.

En la **Tabla 2** se resumen las epidemiológicas, clínico-patológicas y moleculares de ambos tipos.

### 1.3.4. Clasificación molecular

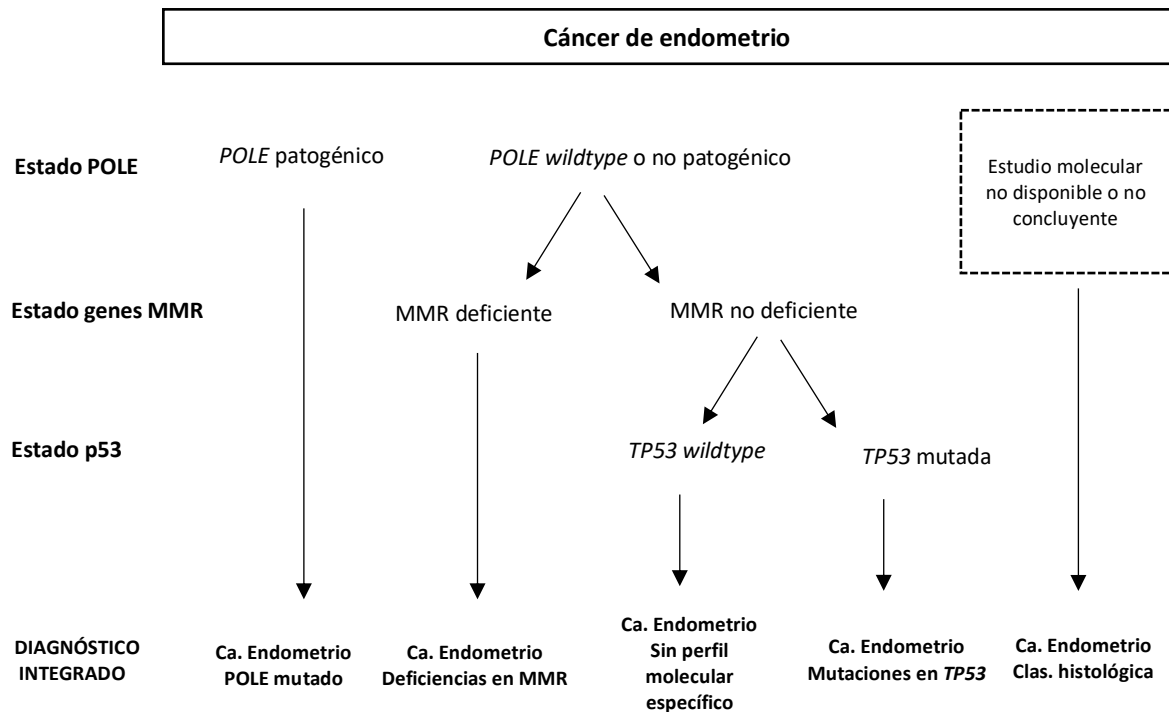
En los últimos años el estudio molecular emerge como una nueva herramienta para mejorar la clasificación de los tipos de cáncer de endometrio. A pesar de que la clasificación convencional según criterios de Bokhman (tipo I – tipo II) permanece como una herramienta relevante de estratificación tumoral e indicación de tratamiento adyuvante, presenta una variabilidad inter-observador no despreciable y un potencial limitado de predicción de recurrencia tumoral. La secuenciación de los exomas ha demostrado que el cáncer de endometrio es una patología heterogénea y que cada tipo de tumor presenta mutaciones en distintos genes que nos permiten una clasificación más precisa que la histológica (32). En el año 2013, el *Cancer Genome Atlas Study of endometrioid and serous carcinoma* (TCGA) realizó un análisis integrado de la genómica, la transcriptómica y la proteómica del cáncer de endometrio y describió cuatro variantes de tumores según su perfil molecular: *POLE (DNA polymerase epsilon)-ultramutated*, *Microsatellite instability-hypermuted*, *Copy number low* y *Copy number high* (33) (**Tabla 3**). Estudios posteriores han demostrado y validado la relevancia pronóstica de esta estratificación molecular (34,35).

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 3. Características identificativas de los distintos subgrupos de cáncer de endometrio según la clasificación molecular TCGA.** Adaptada de (21,36).

Características	<i>POLE</i> Ultramutado	Hipermutado con inestabilidad de microsatélites (IMS)	Bajo número de copias ( <i>TP53 wildtype</i> )	Alto número de copias. Mutaciones en <i>TP53 (Serous-like)</i>
Porcentaje del total de ca. endometrio	10%	25-30%	39%	23-26%
Mutaciones genéticas asociadas	<i>POLE</i> (100%) <i>PTEN</i> (94%) <i>PIK3CA</i> (71%) <i>PIK3R1</i> (65%) <i>FBXW7</i> (82%) <i>ARID1A</i> (76%) <i>KRAS</i> (53%) <i>ARID5B</i> (47%)	<i>PTEN</i> (88%) <i>RPL22</i> (37%) <i>KRAS</i> (35%) <i>PIK3CA</i> (54%) <i>PIK3R1</i> (40%) <i>ARID1A</i> (37%)	<i>PTEN</i> (77%) <i>CTNNB1</i> (52%) <i>PIK3CA</i> (53%) <i>PIK3R1</i> (33%) <i>ARID1A</i> (42%)	<i>TP53</i> (92%) <i>PPP2R1A</i> (22%) <i>PIK3CA</i> (47%)
Tasa de mutaciones	Muy alta	Alta	Baja	Baja
Tipo histológico asociado	Endometriode	Endometriode	Endometriode	Seroso, Células claras, Mixto, Endometriode
Grado histológico (FIGO)	2-3	2-3	1-2	3
Pronóstico	Favorable >96% supervivencia 5 años (37)	Intermedio	Intermedio	Desfavorable 50% supervivencia 5 años
Otras características	Pacientes jóvenes, estadios iniciales	Abundantes linfocitos infiltrantes en el tumor (TILs) Asociación al S. de Lynch	Pacientes jóvenes con IMC elevado e hiperestrogenismo	Pacientes mayores, delgadas, estadios avanzados

Además, se ha descrito que mediante la identificación de tan solo algunas alteraciones moleculares se puede reestructurar la clasificación histomolecular modificando la nomenclatura y diseñando un algoritmo diagnóstico aplicable en la práctica clínica diaria (**Figura 5**) (38). La comprensión de las alteraciones moleculares involucradas en el cáncer de endometrio brinda la oportunidad de mejorar el sistema de diagnóstico y clasificación histológica actual, de precisar la información pronóstica de cada paciente, de adecuar la indicación de los tratamientos adyuvantes y por último de valorar la incorporación de terapias dirigidas y pronosticar la respuesta a éstas.

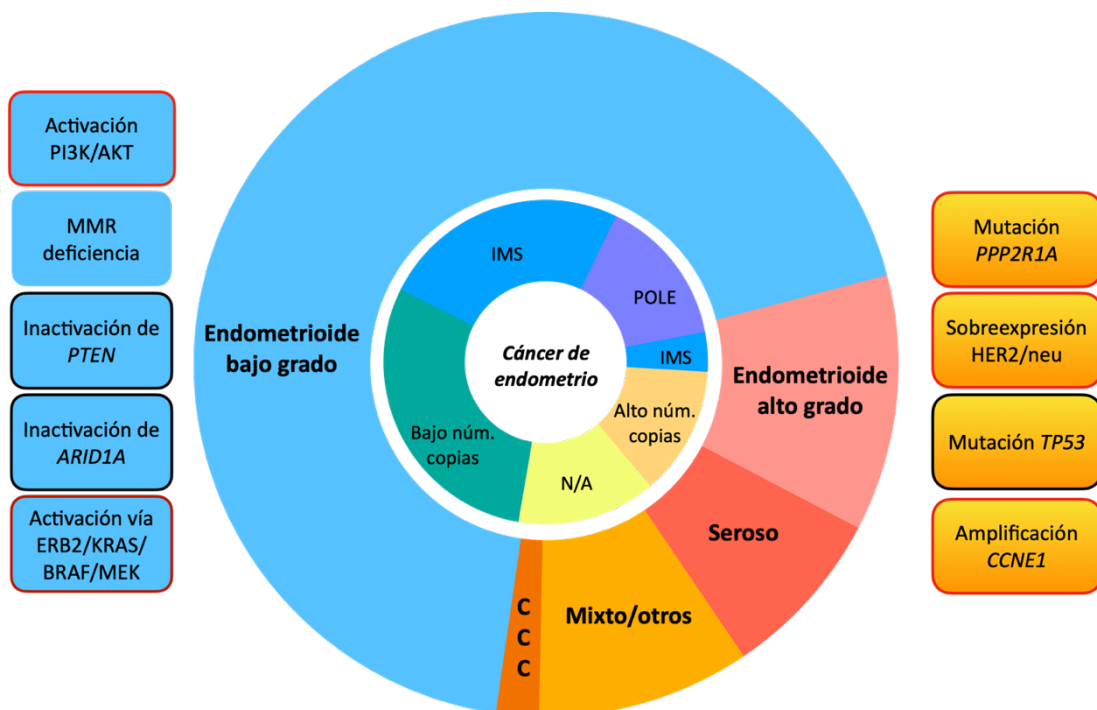


**Figura 5. Algoritmo diagnóstico para la clasificación histomolecular integrada del cáncer de endometrio.** Las deficiencias en MMR se definen por la pérdida de una o más proteínas de MMR (MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6). Abreviaturas: MMR: *mismatch repair*. *Wildtype*: nativa. Adaptada de (38).

Las nuevas guías de la ESGO/ESTRO/ESP para el manejo de las pacientes con carcinoma endometrial (36) proponen utilizar la nueva clasificación molecular en todos los tipos, especialmente en los tumores de alto grado. Actualmente, la indicación del tratamiento adyuvante depende del grupo de riesgo en que se encuentre la paciente y está compuesto por una combinación de factores de riesgo de recidiva asociados a la información histológica (**Tabla 5**).

## INTRODUCCIÓN

La inclusión de la información molecular probablemente producirá cambios como la desescalada del tratamiento adyuvante en casos con pronóstico favorable como los tumores POLE mutados; o a la inversa, considerará una escalada del tratamiento adyuvante a los de peor pronóstico como el grupo de *p53* mutado (38). Su aplicabilidad también se extenderá probablemente al campo de la preservación de la fertilidad, dado que puede ofrecer información sobre el pronóstico de pacientes jóvenes en edad reproductiva. Paralelamente, las características histológicas del tumor seguirán manteniendo su relevancia a la hora de optimizar la clasificación de riesgo. Un ejemplo son los datos sobre la infiltración linfocelular que aportan información pronóstica y que pueden determinar la necesidad de tratamiento adyuvante (37). En la **Figura 6** se muestra la combinación de ambas clasificaciones.



**Figura 6. Combinación de la clasificación histológica y molecular (TCGA) en el cáncer de endometrio.** El círculo externo muestra los diferentes tipos histológicos de cáncer de endometrio. El círculo interno muestra la clasificación molecular según los subgrupos de TCGA. Los cuadrados exteriores listan varias líneas de señalización molecular donde se ven implicados y alterados oncogenes y genes supresores de tumores en el cáncer de endometrio. Adaptada de (39).

Abreviaturas: MMR: Genes de reparación de errores en el apareamiento de bases del ADN durante la replicación. IMS: Inestabilidad de microsatélites. CCC: Carcinoma células claras. N/A: No aplicable o perfil molecular no específico. Línea negra: Genes supresores de tumores. Línea roja: Oncogenes.



Destacan dos líneas de investigación (*PORTEC* y *ProMiSe*) que han intentado diseñar un enfoque práctico y factible de la clasificación, dado que supone una gran cantidad de nueva información y no todos los centros tienen los recursos disponibles para realizar los test ni la experiencia para aplicarlos. En los dos casos se ha confirmado que la integración de los factores clínico-patológicos y los datos moleculares mejora el manejo de las pacientes con neoplasia de endometrio. En el caso de *ProMiSe* se comprobó que las características del análisis molecular prequirúrgico en la biopsia endometrial se correspondían con la muestra uterina final (34,40,41). El estudio *PORTEC4a* (*ClinicalTrials* NCT03469674, acceso julio 2022), que se encuentra actualmente en desarrollo, es el primer estudio prospectivo que testará la utilidad de la clasificación molecular en las decisiones de tratamiento adyuvante en pacientes estratificadas con riesgo intermedio-alto. Los resultados definitivos se prevé que estarán disponibles en 2023.

### 1.4. Diagnóstico y estadificación

#### 1.4.1. Métodos diagnósticos

En la población general no existe un cribado de cáncer de endometrio como en otros tumores tipo la mama, el cérvix o el colon. Tan sólo en las pacientes diagnosticadas de Síndrome de Lynch se realiza un seguimiento periódico con el objetivo de detectar de forma precoz el cáncer de endometrio y se recomienda la cirugía cuando éstas tengan el deseo genésico cumplido (36).

La mayoría de pacientes consultarán por la aparición de un primer síntoma en las urgencias hospitalarias o bien en los centros de salud. La clínica más prevalente es la metrorragia posmenopáusica o bien el sangrado vaginal anómalo en la perimenopausia (cambios en el patrón de sangrado, pérdidas intermenstruales, flujo vaginal alterado o maloliente, etc.). De forma menos frecuente y coincidiendo con estadios avanzados, puede presentarse como dolor abdominal, síndrome tóxico o cuadro de adenopatías generalizado.

Ante la presencia de síntomas y signos de sospecha se debe realizar una anamnesis dirigida con identificación de factores de riesgo familiares y personales, una valoración del estado general de la paciente, así como de las comorbilidades asociadas. Paralelamente, se realizará una exploración física ginecológica en búsqueda de signos de sospecha de neoplasia.

Las pruebas complementarias más utilizadas para el diagnóstico de neoplasia son (42):

## INTRODUCCIÓN

-La ecografía transvaginal: Prueba no invasiva que permite identificar patología orgánica uterina. Se recomienda la medida del grosor del endometrio en un corte longitudinal del útero. En caso de línea endometrial >3mm, debe realizarse una biopsia endometrial en la paciente sintomática (43). Además, una vez confirmado el diagnóstico histopatológico, se puede realizar por ecografía la valoración del tamaño tumoral, la infiltración miometrial, la infiltración del estroma cervical y la exploración de los anejos.

-Biopsia endometrial por aspiración: Consiste en la obtención de tejido endometrial para realizar un estudio anatómo-patológico. Es recomendable su realización ante la sospecha clínica y ecográfica de neoplasia. Existen diferentes dispositivos que permiten la obtención de la muestra como la cánula de Cornier o la cánula DABE, ambas con una sensibilidad del 80-90% y una especificidad del 98-100%. (44).

-Histeroscopia diagnóstica: Procedimiento mayoritariamente ambulatorio que a través de una cámara introducida por el cérvix uterino permite la visualización directa de la cavidad endometrial. Está recomendada si el material obtenido con las cánulas no es suficiente o si la sospecha diagnóstica es alta a pesar del resultado de la previa negativo. En este caso la biopsia del tejido endometrial es dirigida a la zona más sospechosa macroscópicamente, presentando una sensibilidad del 92-97% y especificidad del 98-100%.

La obtención de tejido tumoral permite la identificación del tipo de tumor, del grado histológico y su clasificación según la OMS (26). Una vez confirmado el diagnóstico, se realiza el panel de pruebas complementarias para determinar la expansión de la enfermedad (45):

-Analítica sanguínea: Estudio preoperatorio, de comorbilidades y determinación del marcador tumoral CA-125, aunque no se ha establecido un claro consenso para su utilización (46).

-Resonancia magnética pélvica: Valoración de la infiltración miometrial y cervical con un rendimiento diagnóstico similar a la ecografía ginecológica. Permite además explorar la presencia de adenopatías loco-regionales.

-TAC tóraco-abdomino-pélvico: Estudio de extensión a distancia, para la detección de diseminación loco-regional y de patología extrapélvica.

-PET – TAC: Presenta elevada especificidad para la evaluación de metástasis, se reserva en la práctica clínica para la sospecha de recidiva tumoral.

### 1.4.2. Estadificación

Los sistemas de estadificación en cáncer permiten definir el tamaño, la localización, la extensión local y la extensión a distancia del tumor. Tienen como objetivo principal clasificar a cada paciente en grupos pronósticos para adecuar la estrategia terapéutica, así como facilitar a los profesionales una terminología estandarizada para permitir la comparación de resultados. La estadificación del cáncer de endometrio es quirúrgica y actualmente se encuentra establecida a nivel internacional según las bases de la FIGO 2009 (47) (**Tabla 4**).

**Tabla 4. Estadificación del cáncer de endometrio según criterios FIGO 2009 (47).**

ESTADIFICACIÓN FIGO 2009	
Estadio I	Tumor confinado al cuerpo del útero
IA	Ausencia de invasión miometrial o invasión menor del 50% de la pared
IB	Invasión miometrial igual o mayor del 50% de la pared
Estadio II	Invasión del estroma cervical, limitado al útero
Estadio III	Extensión local y/o regional del tumor
IIIA	Tumor que invade la serosa del cuerpo uterino y/o anejos
IIIB	Afectación vaginal y/o parametrial
IIIC	Metástasis en ganglios pélvicos y/o para aórticos
IIIC1	Afectación de ganglios pélvicos
IIIC2	Afectación de ganglios paraaórticos
Estadio IV	Invasión de mucosa vesical y/o recto y/o metástasis a distancia
IVA	Invasión de mucosa vesical y/o rectal
IVB	Metástasis a distancia (incluidas intraabdominales y ganglios inguinales)

## INTRODUCCIÓN

### 1.5. Factores pronósticos y tratamiento

El planteamiento del tratamiento del cáncer de endometrio se recomienda que se lleve a cabo por un equipo multidisciplinar basado en el conocimiento del pronóstico de la enfermedad, los factores predictivos oncológicos, la morbilidad y la calidad de vida asociada a cada paciente. Se deben seguir las recomendaciones de las guías de práctica clínica actualizadas y basadas en nuestra población de referencia (21,36,46).

#### 1.5.1. Factores pronósticos y grupos de riesgo

La indicación de tratamiento adyuvante del cáncer de endometrio se define según la estadificación, la histología tumoral y los factores de riesgo adverso que se sintetizan en los grupos de riesgo de recurrencia enumerados en la **Tabla 5**.

Los factores de riesgo clínico-patológicos definidos son el subtipo histológico, el grado histológico, el estadio FIGO, la edad, la invasión miometrial y la presencia de invasión del espacio linfo-vascular. Las características descritas deben constar en el informe de Anatomía Patológica. Además, existe un alto grado de recomendación de la categorización de los tumores en referencia a la clasificación molecular dado la heterogeneidad en los subtipos de CE donde, por ejemplo, en el mismo grupo de carcinomas endometriales tienen cabida tumores POLE ultramutados con pronóstico favorable y tumores agresivos con p53 mutado (36).

**Tabla 5. Grupos de riesgo según factores pronósticos en cáncer de endometrio.** Adaptada de (21,36).

Grupo de riesgo	Según estadificación y otros factores	Asociado a clasificación molecular (Figura 6)
Bajo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estadio IA ca. endometriode + G1-2 + sin IELV.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estadio I-II POLEmut ca. endometriode sin enfermedad residual.</li> <li>Estadio IA MMRd/SPMS ca. endometriode G1-2 + sin IELV.</li> </ul>
Intermedio	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estadio IB G1-2 ca. endometriode + sin IELV.</li> <li>Estadio IA G3 ca. endometriode + sin IELV.</li> <li>Estadio IA ca. no endometriode sin invasión miometrial.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estadio IB MMRd/SPMS G1-2 ca. endometriode + sin IELV.</li> <li>Estadio IA MMRd/SPMS ca. endometriode G3+ sin IELV.</li> <li>Estadio IA p53mut y/o ca. no endometriode sin invasión miometrial.</li> </ul>
Intermedio-Alto	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estadio I ca. endometriode con IELV independientemente de la invasión miometrial y grado.</li> <li>Estadio IB G3 ca. endometriode, independientemente de la existencia de IELV.</li> <li>Estadio II.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estadio I MMRd/SPMS ca. endometriode con IELV.</li> <li>Estadio IB MMRd/SPMS ca. endometriode G3.</li> <li>Estadio II MMRd/SPMS ca. endometriode.</li> </ul>
Alto	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estadio III-IVA sin enfermedad residual.</li> <li>Estadio I-IVA no endometriode con invasión miometrial y sin enfermedad residual.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estadio III-IVA MMRd/SPMS ca. endometriode sin enfermedad residual.</li> <li>Estadio I-IVA p53mut ca. endometriode con invasión miometrial sin enfermedad residual.</li> <li>Estadio I-IVA MMRd/SPMS no endometriode con invasión miometrial.</li> </ul>
Avanzado - metastásico	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estadio III-IVA con enfermedad residual.</li> <li>Estadio IVB.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estadio III-IVA con enfermedad residual de cualquier tipo molecular.</li> <li>Estadio IVB de cualquier tipo molecular.</li> </ul>

Abreviaturas: IELV: Invasión del espacio linfo-vascular. POLEmut: POLE o polimerasa mutada. MMRd: Deficiencias en MMR (*mismatch repair*). SPMS: Sin perfil molecular específico. p53mut: p53 mutado

## INTRODUCCIÓN

### 1.5.2. Tratamiento quirúrgico

La cirugía es el tratamiento primario del cáncer de endometrio y la que definirá su estadio definitivo. Su extensión está determinada por el subtipo histológico, el grado histológico y por la sospecha de diseminación de la enfermedad por las pruebas de imagen resumida en los grupos pronósticos según las nuevas recomendaciones ESGO-ESTRO-ESP (36).

La cirugía estándar en los estadios iniciales de tumores de tipo endometriode grado 1-2 consiste en la histerectomía total con doble anexectomía. La evaluación de los ganglios linfáticos proporciona una información pronóstica y terapéutica clave y ha sido motivo de múltiples investigaciones en los últimos años. En este grupo de pacientes, la linfadenectomía sistemática no se recomienda dado que estudios randomizados han demostrado que la realización de la técnica no se asocia con la supervivencia global o libre de enfermedad (48–50). La biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC) ha demostrado alta sensibilidad en pacientes con estadios iniciales para valorar la presencia de metástasis ganglionares pélvicas (51). La posibilidad de aplicar la técnica del ultraestadiaje en el análisis anatómico-patológico permite identificar metástasis que no se habrían detectado en la linfadenectomía estándar, con consecuencias en la indicación del tratamiento adyuvante (52). Otra ventaja es la menor morbilidad quirúrgica que ofrece (53,54). En los grupos de riesgo intermedio-alto y alto el estadiaje de los ganglios linfáticos se debe realizar de forma sistemática asociando a la histerectomía total con doble anexectomía, la realización de linfadenectomía pélvica y paraaórtica. La BSGC en los estadios iniciales es una alternativa aceptable según la evidencia más reciente (55–57). Finalmente, en los tumores con histología de seroso, carcinosarcoma o indiferenciado está indicado practicar también una omentectomía infracólica.

La vía de abordaje mínimamente invasiva (laparoscópica o robótica) es la recomendada como primera elección para la cirugía de estadificación de la neoplasia de endometrio dado sus numerosas ventajas versus la laparotomía sin comprometer los resultados oncológicos (58,59). Siempre deben respetarse los principios oncológicos y evitarse la fragmentación de la pieza quirúrgica. En la misma guía de la ESGO/ESTRO/ESP (36), se facilita la información y referencias bibliográficas para el manejo de casos específicos como la preservación de la fertilidad o la aparición de neoplasias sincrónicas.

### 1.5.3. Tratamiento adyuvante

Las recomendaciones del tratamiento adyuvante para la neoplasia de endometrio dependen en gran medida del grupo de riesgo pronóstico (**Tabla 5**). Los últimos avances en la determinación del perfil molecular de cada tumor permiten una indicación más precisa del tratamiento, una predicción de la respuesta en cada paciente, así como la incorporación de nuevas terapias dirigidas (60,61). Los casos deben ser valorados en un Comité Multidisciplinar para ofrecer a la paciente el planteamiento terapéutico más adecuado en cada caso.

Opciones de tratamiento:

**-Radioterapia y/o braquiterapia:** Ambas tienen efecto sobre el control local y regional de la enfermedad. Su aplicación presenta impacto sobre el período libre de enfermedad, pero no sobre la supervivencia global en los estadios iniciales, además los datos afirman que las pacientes que reciben braquiterapia exclusivamente presentan menor toxicidad (62). Su utilización en los casos de bajo riesgo se recomienda restringirla en función de factores pronósticos para conservar una herramienta terapéutica efectiva en los casos de recidiva locoregional. Su aplicación debe iniciarse en cuanto la vagina esté cicatrizada, siempre intentando no posponerlo a después de 12 semanas post cirugía (36).

-Existe evidencia de que la **quimioterapia adyuvante** después de cirugía primaria aumenta la supervivencia respecto a la radioterapia como único tratamiento en cáncer de endometrio estadio III y IV (63,64). El esquema carboplatino-paclitaxel es el que ha demostrado un mejor balance eficacia/toxicidad siendo el más ampliamente utilizado en ciclos de cada 21 días (65).

A continuación, se resumen los tratamientos adyuvantes indicados según grupo de riesgo de recurrencia neoplásica:

-Riesgo bajo: No se recomienda tratamiento adyuvante (36,66).

-Riesgo intermedio: La aplicación de braquiterapia puede recomendarse para disminuir el riesgo de recurrencia vaginal. A pesar de eso, subanálisis en menores de 60 años determinaron que podría omitirse dado su menor riesgo de recaída y la no modificación de la supervivencia global aún y la presencia de recidiva (37,67)

## INTRODUCCIÓN

-Riesgo intermedio-alto: La braquiterapia está indicada en este grupo de pacientes si no presentan invasión del espacio linfo-vascular y/o estadio II con grado histológico 1 con el fin de evitar la recidiva local. En el caso de asociación de invasión del espacio linfo-vascular o estadio II se debe considerar la aplicación de radioterapia pélvica para reducir el riesgo de recidiva ganglionar. La quimioterapia adyuvante también debe ser valorada en grado histológico 3 y/o con presencia de invasión del espacio linfo-vascular, aunque los resultados del estudio *PORTEC-3* sugieren que los carcinomas con MMR deficiente no presentan beneficio del tratamiento con quimioterapia (63).

-Riesgo alto: Se recomienda aplicación de radioterapia asociada a quimioterapia. En algunos casos la quimioterapia en monoterapia podría ser una opción (68,69)

-Avanzado-metastásico: La cirugía de citorreducción incluyendo la linfadenectomía si se identifican ganglios aumentados de tamaño debe realizarse siempre y cuando sea factible la resección total con una morbilidad y una calidad de vida posterior aceptable para cada caso (70). Previamente a la cirugía la paciente debe pasar una valoración multidisciplinar para adaptar el tratamiento. El tratamiento sistémico inicial será una alternativa en caso de pacientes no candidatas a cirugía, la cual puede realizarse a posteriori si presentan respuesta a la terapia médica.

**La terapia hormonal** se reserva para pacientes con estadios iniciales de la enfermedad que cumplen criterios de preservación de la fertilidad (71) o bien para pacientes con tumores de lento crecimiento o cuando las condiciones de la paciente contraindiquen la quimioterapia. El tratamiento de elección son los progestágenos en monoterapia (acetato de megestrol o acetato de medroxiprogesterona) o bien asociados a tamoxifeno (46).

En la guía de la ESGO/ESTRO/ESP (36) se detallan las diferentes alternativas de tratamiento, así como opciones dependiendo de cada tipo de tumor, estadio u otras particularidades.

La alternativa de inclusión en ensayos clínicos resulta una opción a considerar en pacientes con recidiva o estadios avanzados y sin respuesta a los tratamientos convencionales. La **terapia molecular dirigida** ha demostrado resultados favorables en los últimos años y representa una opción muy prometedora en los cánceres ginecológicos (39,72). Las moléculas diana participan en los procesos de progresión del cáncer como la angiogénesis, la reparación del ADN, la apoptosis o el control del crecimiento tumoral. Además de como dianas terapéuticas, estas moléculas pueden utilizarse como marcadores diagnósticos (Por ejemplo, MMR) o bien como determinantes de la probabilidad de respuesta al tratamiento



(En el caso de tumores POLE hipermutados). A continuación, se describen las vías moleculares y dianas evaluadas descritas en la bibliografía.

**-HER2/Neu como diana terapéutica:** La amplificación del oncogén *ERBB2* y la sobreexpresión de sus proteínas codificadas como el factor de crecimiento epidérmico humano-2 (HER2 / neu) se asocian significativamente con el carcinoma seroso uterino y se consideran un indicador de mal pronóstico (73). Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra HER2 / neu se ha asociado con mejores respuestas en carcinomas serosos uterinos recurrentes, metastásicos o progresivos asociado a quimioterapia o radioterapia (74,75). Actualmente existen varios estudios en curso que se centran en precisar los algoritmos terapéuticos de las pacientes que presenten tumores con expresión de HER2 (*ClinicalTrials.gov* NCT04205630, NCT04482309).

**-Inhibidores del punto de control inmunológico:** Pembrolizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-PD-1 (*Programmed cell Death protein 1*), ha recibido la aprobación de la FDA para el tratamiento de tumores recurrentes con deficiencia de MMR o con alto índice de IMS basado en una respuesta favorable (76). La deficiencia de MMR y el estado hipermutado en IMS se asocian con un aumento de las mutaciones somáticas y mayores cargas de neoantígenos que conducen a una mayor infiltración tumoral por células T citotóxicas. También se espera que los tumores que albergan mutaciones POLE tengan respuestas favorables debido a la carga de hipermutación que les caracteriza, remarcando una vez la tendencia hacia la terapia personalizada desarrollada a partir de la caracterización molecular del tumor (77).

**-La vía PI3K-AKT-mTOR:** Las vías de señalización de la fosfoinositido 3-quinasa (PI3K) y la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR) se alteran habitualmente en los cánceres de endometrio provocando un aumento de la síntesis de proteínas y de la proliferación celular aberrante, así como un incremento de angiogénesis (78). Los inhibidores de mTOR como Everolimus, Temsirolimus y Ridaforolimus han demostrado una eficacia clínica modesta para el cáncer de endometrio y se siguen investigando en combinación con otros agentes antitumorales. Motivo de su relevancia es la revisión realizada por la Cochrane Library en 2019 (79). También se ha ensayado la combinación de fármacos con diferentes moléculas dianas con resultados de mejora en la supervivencia libre de progresión en cáncer de endometrio recurrente (80,81). La aplicación generalizada de estos agentes como tratamiento estándar para los cánceres de endometrio dependerá de la evaluación final de la toxicidad y la tolerancia. La terapia dirigida a poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) y PI3K podría llevar a enfoques terapéuticos individualizados en pacientes con cáncer de endometrio que presenten mutaciones en *PTEN* (82).

## INTRODUCCIÓN

**-Terapias dirigidas a tumores mutados *ARID1A*:** *ARID1A* es un gen supresor de tumor que codifica la proteína *AT-Rich Interacting Domain-containing protein 1A*, *ARID1A*, miembro del complejo de remodelación de la cromatina (SWI / SNF) (83). La inactivación de *ARID1A* se asocia con la progresión tumoral de hiperplasia atípica compleja a carcinoma de endometrioide y a menudo se pueden relacionar con IMS y con neoplasias de peor pronóstico (84). Su papel en la progresión tumoral hace de la mutación en *ARID1A* un potente biomarcador a nivel de biopsia endometrial en casos de hiperplasia atípica (85). Por último, la mutación en *AIRD1A* se ha relacionado con una mayor sensibilidad de las células neoplásicas a terapias con inhibidores de EZH2 (86) o de PARP (87). Estos hallazgos recientes se están evaluando en ensayos clínicos para determinar su beneficio clínico para las pacientes con carcinomas de endometrio (*ClinicalTrials.gov* NCT04065269).

**-Sobreexpresión de VEGF:** La angiogénesis es uno de los procesos fundamentales que conducen al crecimiento tumoral, a la invasión y a las metástasis en tumores sólidos. VEGF (*Vascular Endotelial Growth Factor*), es el factor de crecimiento más reconocido actualmente que actúa directamente sobre las células endoteliales vasculares y juega un papel fundamental en la progresión, invasión y metástasis en cáncer de endometrio confiriendo mal pronóstico (88,89). Por este motivo, la investigación centrada en la inhibición de la angiogénesis asociada a la inhibición de moléculas como anti-PD-1 (90) o a quimioterapia (91,92) es un punto de interés actual con resultados prometedores en pacientes con estadios avanzados o recurrencia.

### 1.5.4. Tratamiento de la recidiva

En las pacientes diagnosticadas de recidiva se indica el tratamiento teniendo en consideración su localización (local o a distancia), el intervalo libre de enfermedad, los tratamientos previos recibidos y el estado general de la paciente (36).

En los casos de recidiva sin irradiación previa y lesión localizada en la vagina, la primera opción recomendable según las guías es el rescate con radioterapia. Se puede valorar la opción de resección quirúrgica de la recidiva con asociación de tratamiento adyuvante, radioterapia y/o quimioterapia. Si la lesión no está localizada en la vagina y se encuentra a nivel pélvico, la indicación es realizar cirugía primaria seguida de radioterapia. En casos en que la lesión se prevea irreseccable por pruebas de imagen, se recomienda tratamiento radioterápico de entrada (72), asociado a quimioterapia en caso de extensión a nivel pélvico ganglionar (14).

Si la paciente que presenta la recidiva ha recibido previamente tratamiento con radioterapia, se recomienda la opción quirúrgica obteniendo márgenes libres de enfermedad en caso de lesión localizada (73). Si la recidiva es a nivel pélvico, la indicación es la citoreducción quirúrgica siempre y cuando se pueda realizar una resección completa de la enfermedad macroscópica teniendo en cuenta la morbilidad del procedimiento. En casos de no resección completa o esta no sea factible, se valorará reirradiar el área o bien asociar quimioterapia.

En referencia a las recidivas extra pélvicas, si son localizadas o únicas y se valoran como resecables, puede ofrecerse tratamiento quirúrgico seguido de quimioterapia. Si no se consideran candidatas de cirugía, se recomienda tratamiento sistémico quimioterápico como en los casos de recidiva en forma de metástasis múltiples a distancia. La alternativa de inclusión en ensayos clínicos resulta una opción a considerar, con especial interés en el análisis del papel de la inmunoterapia en esta patología (72).

## INTRODUCCIÓN

### 2. Sistema nervioso autónomo

#### 2.1. Generalidades

##### 2.1.1. Sistema nervioso simpático y parasimpático en el útero

El sistema nervioso autónomo (SNA) es la división del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) que se encarga de la regulación de las funciones involuntarias del organismo, del mantenimiento de la homeostasis interna y de las respuestas de adaptación ante las variaciones del medio externo e interno. Clásicamente se divide en sistema nervioso simpático, formado por las fibras nerviosas simpáticas (SNS) y en sistema nervioso parasimpático, formado por las fibras parasimpáticas (PSNS). Dependiendo de la naturaleza de los estímulos transmitidos, la inervación autónoma tiene componentes tanto aferentes como eferentes. El componente aferente conduce estímulos sensoriales somáticos y viscerales desde la periferia al sistema nervioso central, mientras que el componente eferente envía impulsos para activar el músculo liso, el músculo cardíaco y las glándulas (93).

Las neuronas preganglionares simpáticas que inervan el útero se encuentran en la columna intermediolateral de la médula espinal a nivel de T10-L2. Sus fibras preganglionares recorren la cadena simpática, emergen por los nervios lumbares y hacen sinapsis con las neuronas postganglionares dentro del ganglio mesentérico inferior. Posteriormente, las fibras simpáticas se introducen en la pelvis como ramas principales de los nervios hipogástricos derecho e izquierdo desde el plexo hipogástrico superior. Las fibras postganglionares de estas neuronas pasan a través del plexo hipogástrico inferior; interactúan con fibras del PSNS y continúan hasta el plexo uterovaginal para inervar la vagina y el útero. Además, distintos ganglios inervan selectivamente áreas restringidas del útero, lo que revela el control específico de la actividad uterina en cada región (94). Finalmente, algunas fibras preganglionares de los segmentos espinales L1-L2 descienden directamente por la cadena simpática y hacen sinapsis con neuronas postganglionares en el plexo hipogástrico (**Figura 7**).

En referencia a los neurotransmisores, las fibras preganglionares liberan el neurotransmisor acetilcolina (ACh), que actúa sobre los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) de las células postganglionares, mientras que estas células liberan principalmente noradrenalina (NA) en los terminales simpáticos. El SNS en el útero constituye un sistema complejo que involucra varios tipos de cotransmisiones que implican una amplia gama de moléculas que conforman las vesículas sinápticas.

Por ejemplo, NA junto con adrenalina (A), adenosín trifosfato (ATP), cromogranina, hidroxilasa y otras moléculas con efectos oxitócicos y tocolíticos se liberan de las neuronas simpáticas mediante exocitosis. Cabe mencionar la gran variabilidad de receptores que actúan en el útero ya sea a nivel de expresión, de sensibilidad o de regulación de distintas vías intracelulares, dependiendo del *status* hormonal, especialmente en la gestación (95). Los efectos de A y NA, dos de los neurotransmisores mejor estudiados, además de ser también hormonas, están mediados por interacciones con receptores alfa adrenérgicos ( $ADR\alpha$ ) y beta adrenérgicos ( $ADR\beta$ ). Se trata de receptores 7-transmembrana acoplados a la proteína G (96) que se expresan ampliamente en la mayoría de tejidos (97), entre ellos en el miometrio o en el endometrio. Las células del músculo liso uterino pertenecientes a las fibras circulares situadas en la zona cervico-ístmica, expresan especialmente receptores adrenérgicos de tipo  $\alpha 1A$  ( $\alpha 1AR$ ) y su activación genera un efecto contráctil; mientras que las células musculares de las fibras longitudinales localizadas en el cuerpo uterino poseen principalmente receptores adrenérgicos  $\beta 2$  ( $\beta 2AR$ ) que inducen tocolisis o relajación muscular. También se ha descrito la expresión de los receptores  $\beta 1AR$  y  $\beta 3AR$  en las mismas células, ambos con efecto tocolítico (98). Hasta la fecha, existe información limitada sobre la presencia y la función endometrial de neurotransmisores y neuroreceptores del sistema nervioso autónomo en endometrio sano. Se conoce la expresión de  $\beta 1AR$ ,  $\beta 2AR$ ,  $\beta 3AR$ , a nivel de las células endometriales, siendo  $\beta 2AR$  el que parece más relevante funcionalmente (99–102).

En la zona periuterina se han identificado también fibras nerviosas adrenérgicas que secretan dopamina (DA). La actividad de la dopamina está mediada por su unión al receptor de dopamina (DR). Hasta el momento se han descrito cinco receptores, los cuales se dividen según su efecto sobre el adenilato ciclasa. Los receptores de tipo D1 (DRD1 y DRD5) generalmente se asocian con la subunidad  $G_{\alpha s/olf}$  y, en consecuencia, activan la enzima adenilato ciclasa. Por el contrario, los receptores tipo D2 (receptores DRD2, DRD3 y DRD4) generalmente se acoplan a la subunidad  $G_{\alpha i/o}$  e inhiben la actividad de la adenilato ciclasa (103). Existe evidencia de la expresión del DRD2 en tejido endometrial (104) y también en tejido placentario en un modelo animal murino (105).

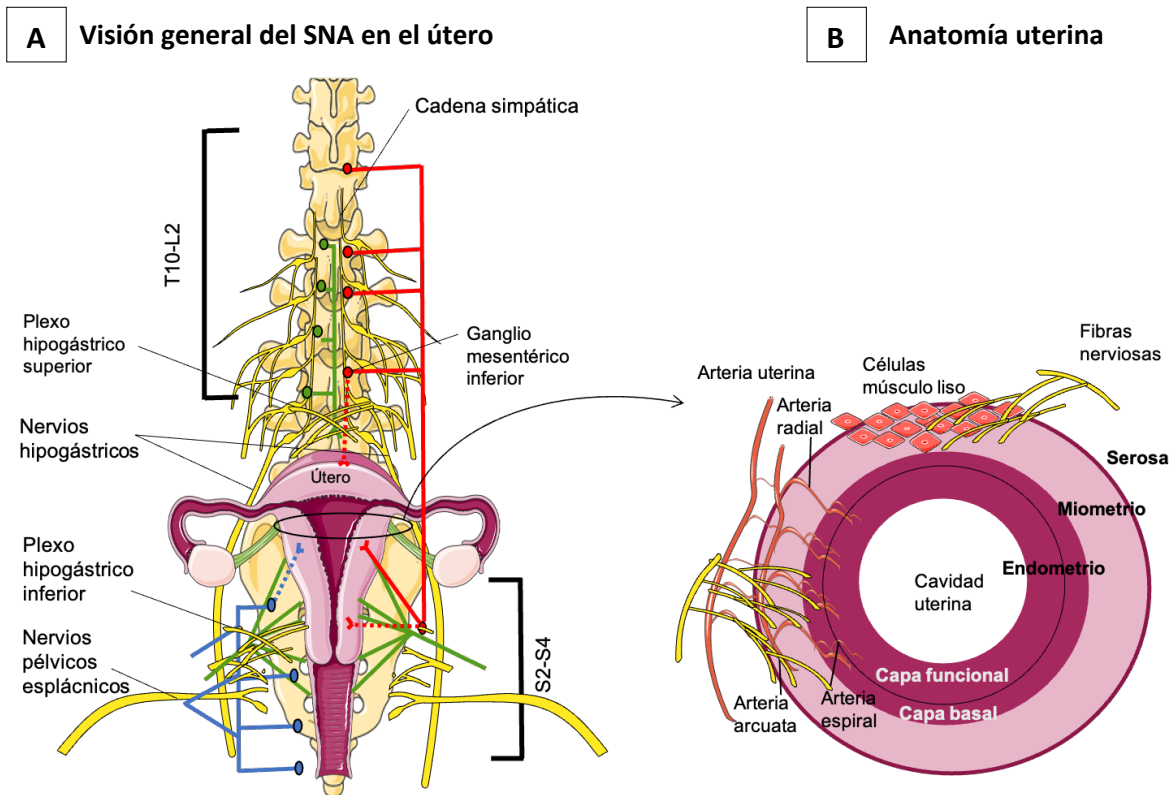
Por otra parte, las neuronas preganglionares parasimpáticas que inervan el tracto genital femenino y el útero se localizan en la columna de células intermediolaterales de la médula espinal sacra a nivel de S2-S4. Las fibras parasimpáticas emergen de las raíces ventrales y viajan a través de los nervios pélvicos esplácnicos hasta el plexo hipogástrico inferior, donde se interrelacionan con fibras del SNS y se extienden para inervar el tejido uterino (**Figura 7**). El neurotransmisor principal del SNPS es la ACh, la cual se almacena en las vesículas de las terminaciones colinérgicas junto a ATP y proteoglicanos (106).

## INTRODUCCIÓN

La ACh estimula los receptores muscarínicos de acetilcolina (CHR) expresados en las células miometriales uterinas. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G y se han identificado cinco genes que codifican para cinco subtipos de receptores: CHRM1, CHRM2, CHRM3, CHRM4 y CHRM5. CHRM3 ha sido descrito como el más expresado en el útero, tanto a nivel miometrial mediando las contracciones uterinas, como a nivel endometrial, estando implicado en procesos patológicos (107).

Topográficamente, las fibras nerviosas autónomas se distribuyen heterogéneamente en el útero, siendo más numerosas en el extremo tubárico del cuerno uterino y en el cuello uterino (99). La densidad nerviosa en los órganos reproductores es variable en las diferentes especies estudiadas (108). En humanos, la organización de fibras del SNA en el útero es centrípeta desde la serosa hasta el endometrio (109); presentando una alta densidad alrededor de las arterias arcuatas y radiales que se interponen entre las dos capas de músculo liso (99,100). La inervación en el endometrio no patológico no ha sido estudiada en profundidad, pero la capa más interna del útero podría estar escasamente inervada por fibras del SNA, ubicándose éstas alrededor de los vasos en caso de existir (109). La información más interesante proviene de la investigación sobre situaciones patológicas como la endometriosis. La presencia de nervios en muestras de tejido de endometriosis se ha confirmado en humanos y en modelos murinos en los que los implantes de endometrio ectópico desarrollan fibras nerviosas simpáticas, parasimpáticas y sensoriales en la totalidad de las capas (110,111). Sin embargo, en pacientes sin patología, tan solo se observaron fibras nerviosas en la capa basal del endometrio y no en la capa funcional (112) (**Figura 7**).

Un aspecto importante de la inervación uterina es la capacidad de remodelar su estructura en respuesta a las oscilaciones de las hormonas sexuales (estrógeno y progesterona) durante la pubertad, el ciclo menstrual y el embarazo (113). Las variaciones cíclicas en los niveles circulantes de estrógeno y progesterona influyen fuertemente en la densidad y tipo de inervación uterina. Por una parte, se ha descrito que el estrógeno modula el metabolismo y la liberación de NA de los terminales nerviosos (114). Paralelamente, varios estudios con modelos animales han demostrado que la administración de estrógenos modifica la densidad de fibras simpáticas (115). La interrelación entre ambos factores presenta un comportamiento inverso; el estrógeno provoca una rápida degeneración de los axones terminales simpáticos en el miometrio y, estos se regeneran en condiciones limitadas de estrógeno (116). Los nervios simpáticos son, por tanto, los más susceptibles, mientras que los nervios parasimpáticos y sensoriales no muestran cambios significativos en la exposición hormonal. La dinámica en la interacción fisiológica entre las hormonas sexuales y las fibras nerviosas podría ser relevante y debería tenerse en cuenta en el estudio del órgano reproductor y sus patologías subyacentes (108).



**Figura 7. Esquema representativo de la inervación autónoma en el útero.**

**A:** Visión general de la inervación del sistema nervioso autónomo incluyendo el recorrido de las fibras nerviosas y las principales estructuras. Sistema nervioso simpático (rojo), sistema nervioso parasimpático (azul), fibras nerviosas aferentes viscerales (verde), línea continua: fibras preganglionares, línea discontinua: fibras postganglionares.

**B:** Corte transversal a nivel de tercio medio del útero que permite la identificación de la anatomía uterina compuesta por tres capas (serosa, miometrio y endometrio) junto a la red vascular y las fibras del sistema nervioso autónomo. Obtenida de (117).

## 2.2. Componente neuronal en el microambiente tumoral

El microambiente tumoral está compuesto por células tumorales y no tumorales, por factores de crecimiento y por proteínas que favorecen una compleja interacción molecular relacionada con el crecimiento del tumor. Todos ellos son componentes críticos que influyen en el proceso inicial, en la progresión y en la metástasis (118). En las últimas décadas se han publicado numerosos artículos sobre la relación bidireccional entre el tumor y el sistema nervioso autónomo (119). En la progresión tumoral, las acciones de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático son complementarias, a diferencia de la relación opuesta conocida y aceptada en la fisiología humana.

## INTRODUCCIÓN

Aunque los dos sistemas están implicados en cáncer, existe más información acerca de la contribución de la señalización simpática, principalmente la  $\beta$ -adrenérgica (**Figura 9**) (120). Existe evidencia que apoya la hipótesis basada en que el estrés crónico puede afectar la iniciación y progresión del tumor (121,122). Las catecolaminas, incluyendo DA, NA y A, son conocidas como las neurohormonas del estrés dado que sus niveles circulantes incrementan durante el estrés psicológico (123). Los estudios *in vitro* han mostrado que estas moléculas ejercen un efecto sobre la proliferación y viabilidad celular, la migración y la invasión de la célula tumoral a partir de la interacción autocrina o paracrina con los otros elementos del microambiente tumoral (124–127). El diálogo (*crosstalk*) activo entre la señalización autónoma y las células tumorales se demostró por primera vez en cáncer de próstata (128) y cáncer gástrico (129) y posteriormente se ha extendido a otros tipos tumorales (130,131).

Similar al proceso de angiogénesis, existe evidencia de la formación *de novo* de nuevas terminaciones nerviosas en el tumor, un fenómeno denominado neurogénesis (132,133). La liberación de neurotransmisores de las fibras nerviosas del microambiente tumoral activa las células tumorales a través de neuroreceptores específicos, al igual que otras células como las inmunitarias o las endoteliales que expresan neuroreceptores (134). Los macrófagos, por ejemplo, expresan neuroreceptores que median la respuesta de liberación de citoquinas e interleuquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8) que actúan sobre la célula tumoral. Este proceso, regulado en algunos escenarios mediante la señalización  $\beta$ -adrenérgica, induce la transición epitelio-mesénquima en la célula tumoral y la expresión de metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP) promoviendo las metástasis (135). Además, se ha descrito otro mecanismo, la axonogénesis, que consiste en la elongación y el direccionamiento de axones localizados en la vecindad del tumor. Se conoce que la densidad de nervios que infiltran el microambiente tumoral es superior en los tumores de próstata, colorrectal y mama comparado con el tejido sano correspondiente (136). Su presencia se ha asociado con la agresividad tumoral, mal pronóstico y disminución de la supervivencia de los pacientes (137–139). Otro fenómeno donde se ha involucrado al SNP es la invasión perineural, considerada como la cuarta ruta de metástasis, por la cual las células tumorales diseminan por el espacio perineural (140).

El proceso de iniciación tumoral requiere la presencia de varias mutaciones para el mantenimiento de las divisiones de las células tumorales y la adquisición de resistencia a la apoptosis. Numerosas líneas celulares humanas de cáncer de mama exhiben alteraciones en el ADN después de ser sometidas a un exceso de señal  $\beta$ -adrenérgica y estimulación con glucocorticoides (141). En modelos *in vivo* de cáncer de páncreas (142) y de próstata (128), se ha observado un incremento de la carcinogénesis con la estimulación de la vía  $\beta$ 2AR y una inhibición del mismo proceso en la denervación del SNS.



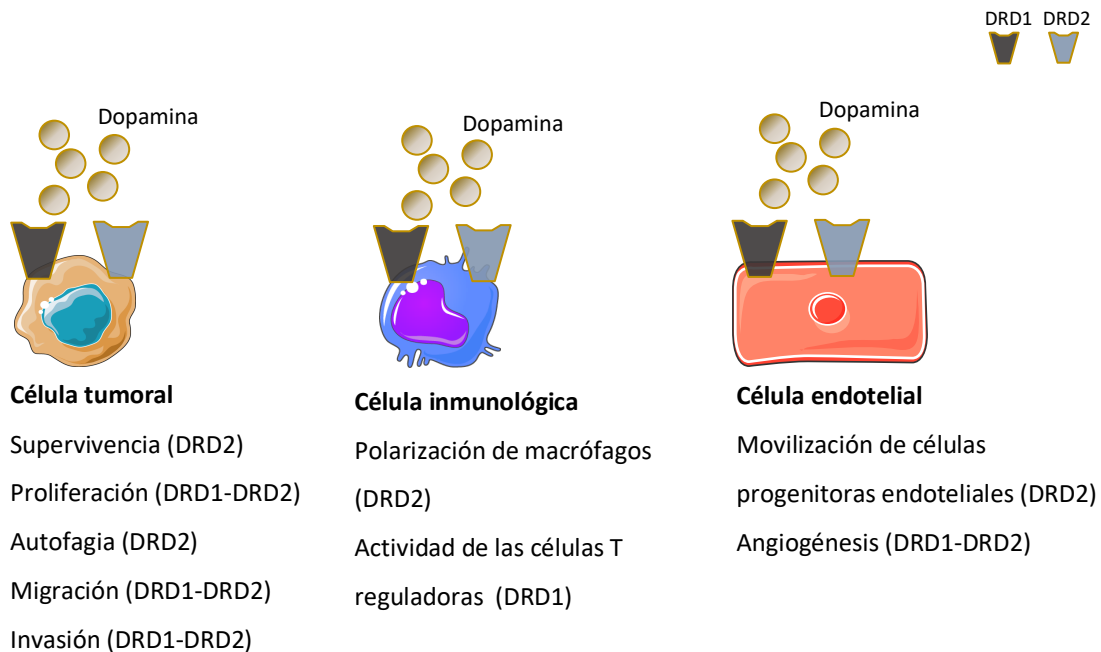
Paralelamente, la implicación de VEGF en la angiogénesis tumoral promovida por la señalización adrenérgica ha sido demostrada en modelos xenógrafos con implantación ortotópica de carcinoma de ovario humano, donde se ha evidenciado que la estimulación de la vía de señalización  $\beta$ 2AR/AMP cíclico (AMPC)/proteína quinasa A (PKA) incrementa la expresión de VEGF asociada a un aumento de la vascularización peritumoral y al crecimiento tumoral (143). Resultados similares han sido identificados en modelos *in vivo* de cáncer colorrectal y cáncer de mama (144,145).

Otro mediador importante del sistema catecolaminérgico es la dopamina. Juega un papel importante en la modulación inmunológica y en la carcinogénesis como precursora de la adrenalina y la noradrenalina, pero también como neurotransmisor del SNS y como hormona circulante (**Figura 8**). La vía de señalización dopaminérgica ha surgido como una nueva diana terapéutica debido a su efecto antiproliferativo en varias líneas tumorales humanas (146). A pesar de eso, el papel de los receptores dopaminérgicos no está claro y podría ser tumor-específico debido a la variabilidad de efectos que se han descrito para esta molécula (147). Varios artículos reportan diferentes patrones de expresión de ARNm y de proteína relacionadas con la señalización dopaminérgica en tumores como la mama, el páncreas, el endometrio o el glioblastoma (148–151). Su acción más estudiada es la mediada a través de los receptores de la familia DRD2 y la vía cAMP/PKA en cáncer de colon (152), su papel en la supresión de la invasión y migración de células de cáncer gástrico a través de la inhibición de la vía EGFR/AKT/MMP-13 (153) y su efecto sobre la angiogénesis a través de la regulación de VEGF en cáncer ovárico (154,155). Un estudio reciente determinó que DRD2 puede contribuir a la progresión de tumores malignos inducidos por estrés psicológico a través de la activación de la vía HIF1 $\alpha$  independiente de la presencia de oxígeno (156).

Otras investigaciones se han dirigido, sin embargo, al estudio de la implicación de DRD1. Trabajos recientes han confirmado que la expresión de DRD1 correlaciona con la progresión tumoral y la formación de las metástasis en cáncer de mama (157,158). En otros tipos tumorales como el hepatocarcinoma, los resultados son divergentes (159,160). La implicación de la dopamina en la comunicación neuro-inmunológica es también un ítem en constante investigación. Los hallazgos de un estudio reciente muestran que las células T CD8<sup>+</sup> expresan DRD1 y DRD2 y además producen altos niveles de DA intracelular (161). Estas células son cruciales para que el tumor escape del sistema inmunitario del huésped, por lo que la capacidad de la dopamina para inhibir su función respalda esta señalización como determinante en la progresión tumoral.

## INTRODUCCIÓN

Con los datos disponibles en la literatura, no existe una consistencia de efecto en general, pero es necesario remarcar que existen multitud de vías de actuación posibles de esta catecolamina a través de los diferentes subtipos de receptores (162). Queda pendiente realizar más experimentación para determinar específicamente su papel en cada tipo de cáncer.



**Figura 8. Representación esquemática de la implicación de la dopamina y los receptores DRD1 y DRD2 en las funciones de las células del microambiente tumoral.** Se detalla la implicación del DRD descrita. Adaptada de (147).

Al igual que ocurre con el SNS, el papel del SNPS en el desarrollo tumoral es contradictorio hasta el momento. Existen estudios que describen ambos efectos (inhibitorio o inductor) sobre la progresión tumoral (163). El neurotransmisor clásico del SNPS es la ACh y su efecto está mediado a través de los receptores nicotínicos y muscarínicos expresados por las células tumorales y células inmunes. Por ejemplo, la expresión de  $\alpha 7$ nAChRs en una línea celular de cáncer de colon promueve la carcinogénesis mediante señalización paracrina (164); paralelamente,  $\alpha 9$ nAChR ha sido identificado como un marcador de progresión tumoral en cáncer de mama, correlacionándose su expresión con una mayor progresión (165). Las distintas vías de activación a nivel intracelular, los diferentes perfiles inmunes presentes en el microambiente tumoral o los niveles de ACh en las terminaciones nerviosas pueden ser importantes para diferenciar el efecto del SNPS en cada tipo tumoral. Además, la relación con el propio SNS también puede contribuir al efecto final (166). Por lo tanto, son necesarios más estudios para dilucidar la complejidad del SNPS en el cáncer.

Adicionalmente a la relevancia pronóstica del SNA, las implicaciones terapéuticas del control nervioso emergen como un nuevo paradigma en el tratamiento del cáncer. Para este fin es necesario conocer los mecanismos precisos de cómo éste contribuye al crecimiento tumoral. Se han utilizado modelos animales para evaluar el efecto tanto de la denervación quirúrgica como la intervención farmacológica, así como para detectar los neuroreceptores mayormente implicados en estas vías moleculares (129,167).

Las dianas terapéuticas en el SNA son múltiples. Fármacos ya existentes como los beta-bloqueantes, podrían utilizarse como terapia adyuvante junto con otros tratamientos oncológicos dado que estudios retrospectivos han sugerido un impacto sobre la supervivencia de pacientes con cáncer de próstata, mama u ovario (168–170) que tomaban este tipo de fármacos con otra indicación médica. Actualmente existen algunos ensayos clínicos, entre ellos NCT02944201 y NCT04493489, en cáncer de próstata y vejiga respectivamente; diseñados para evaluar la eficacia terapéutica de antagonistas de los receptores adrenérgicos. El más utilizado es el propranolol, un antagonista beta-adrenérgico no selectivo (171). Es importante señalar que las respuestas al estrés, mediada en parte por el sistema adrenérgico y las respuestas pro-inflamatorias a menudo se entrelazan, dado que tanto los  $ADR\beta$  como las prostaglandinas activan el mismo inmunosupresor intracelular y los mismos mecanismos protumorogénicos (señalización cAMP-PKA). Por lo tanto, una opción interesante es el bloqueo simultáneo de la actividad de  $ADR\beta$  y COX2 ya ensayado en algunos estudios preclínicos en cáncer de colon (172,173).

Hay evidencia que sugiere que la activación de la señalización dopaminérgica puede inhibir la progresión tumoral en cáncer de mama, estómago, ovario, pulmón, páncreas o próstata (174). En consecuencia, el uso de fármacos dirigidos a los receptores de dopamina, parece ser una herramienta prometedora como terapia complementaria (158,175).

### **2.3. Antecedentes y estado actual de la contribución del SNA en la progresión del cáncer de endometrio**

En cáncer de endometrio, la evidencia científica sobre la contribución del SNA en la progresión tumoral es limitada, por tanto, su implicación clínica está aún pendiente de estudio. A continuación se describen los datos disponibles hasta el momento.

## INTRODUCCIÓN

En el año 2007 se realizó un estudio para determinar la expresión a nivel de proteína de los ADR $\beta$  en diversos tipos tumorales en comparación con tejidos controles. Los resultados mostraron una expresión significativa para el subtipo ADR $\beta$ 2 con un valor inmunohistoquímico de 0,0 vs 1,1 (p valor 0,01) en tejido no tumoral en comparación al tumoral de cáncer de endometrio. Contrariamente, los receptores ADR $\beta$ 3 y ADR $\beta$ 1 no mostraron diferencias, pero sí se detectaron con expresión baja-moderada en las muestras tumorales (176). Con respecto a ADR $\beta$ 3, se conoce que es abundante en el tejido no tumoral como el tejido adiposo marrón y desempeña un papel importante en la lipólisis y la termogénesis (177). ADR $\beta$ 3 se ha relacionado con el síndrome metabólico, un factor de riesgo conocido para el cáncer de endometrio (178). En otro estudio se demostró que la prevalencia del alelo del polimorfismo Trp64Arg en el gen del receptor ADR $\beta$ 3 podría contribuir a una mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer de endometrio entre las personas obesas (144). Por otra parte y en referencia al proceso de la angiogénesis, la liberación de catecolaminas inducida por estrés puede activar los ADR $\beta$  en las células tumorales y desencadenar una mayor expresión de moléculas proangiogénicas como VEGF (179–181). Específicamente en cáncer de endometrio, un trabajo publicado recientemente ha revelado que los niveles séricos de VEGF se asocian a factores de riesgo de recidiva (182).

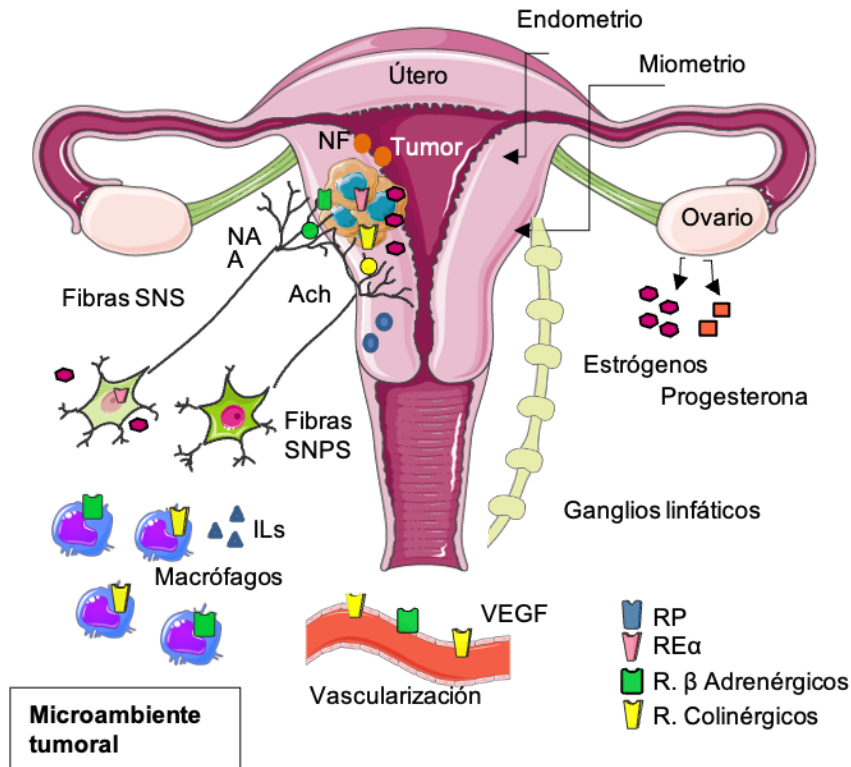
La presencia de inervación colinérgica se ha detectado también en los tumores endometriales. Un estudio que evaluó la expresión inmunohistoquímica de CHRM3 en 257 pacientes con carcinoma endometrial, mostró que el receptor muscarínico se expresa en gran medida en el carcinoma endometrial avanzado y está estrechamente correlacionado con el estadio FIGO, la invasión vascular y la metástasis linfática. Este hallazgo, representa un posible modelo pronóstico y podría tener un valor clínico significativo en terapia dirigida para pacientes con carcinoma de endometrio (107).

Asimismo, la implicación de la señalización dopaminérgica se ha descrito en el cáncer de endometrio. Un estudio reciente expone que el receptor DRD2 presenta una mayor expresión en subtipos serosos y que se asocia con el grado, el estadio y con una menor supervivencia global (183). Relacionado con el mismo receptor, la molécula ONC201 podría representar una interesante terapia dirigida en este tipo tumoral. Se define como un antagonista selectivo de DRD2 y DRD3 y su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la proliferación celular aumentando el estrés celular e induciendo apoptosis (184). Según hallazgos experimentales en líneas celulares establecidas, ONC201 tiene la capacidad de estimular la expresión del ligando de muerte llamado *Ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral* (TRAIL) de una forma independiente de p53 (185).

En consecuencia, esta molécula podría representar un agente neuroterapéutico novedoso dirigido particularmente a las formas más agresivas, motivo por el cual algunos ensayos clínicos ya se encuentran en desarrollo (NCT03485729). Paralelamente también se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* con otra molécula análoga a ONC201, la denominada ONC206. Este compuesto antitumoral induce una reprogramación metabólica de las células de cáncer de endometrio seroso que expresan DRD2 convirtiéndose también en un prometedor agente terapéutico (186).

Como último punto de los conocimientos sobre la relación del SNA y el cáncer de endometrio, cabe destacar que la dependencia hormonal de la inervación uterina es una característica importante de la fisiología del útero que podría influir en los procesos patológicos asociados. Se ha observado que los niveles de estrógeno circulante influyen en la inervación simpática uterina, mayoritariamente a través de receptores de estrógenos tipo  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) (**Figura 9**) (116,187). La generación y regeneración de los axones terminales simpáticos se lleva a cabo mediante la producción de proteínas que repelen los axones en presencia de la hormona esteroide (108,188). Además, el estrógeno también afecta la expresión de receptores de neurotrofina en las neuronas simpáticas, lo que favorece la degeneración del tejido diana, asociado a su poder de modulación de la liberación de NA (113). En el mismo microambiente tumoral, las hormonas estrógeno y progesterona podrían influir en los terminales nerviosos (116,189). A partir de esta información se abre una ventana a la investigación para determinar la implicación clínica de la relación entre la inervación y las hormonas sexuales en diferentes etapas del cáncer de endometrio. El conocimiento de los mecanismos de interacción entre el SNA y las hormonas con la célula tumoral podría contribuir al diseño de fármacos dirigidos a dianas específicas en las vías neuroendocrinas.

## INTRODUCCIÓN



**Figura 9. Diálogo (*crossstalk*) activo entre la señalización autónoma y las células tumorales implicado en la progresión tumoral.** Las células tumorales pueden atraer fibras nerviosas y estimular el crecimiento nervioso mediante la secreción paracrina de factores neurotróficos (NF) en un proceso llamado axonogénesis y neuroneogénesis, respectivamente. Por el contrario, las fibras nerviosas secretan neurotransmisores (NA, A, ACh) que se unen a los neuroreceptores expresados en las células tumorales y células del estroma como células endoteliales e inmunitarias, para estimular el crecimiento tumoral. Los macrófagos asociados al tumor expresan neuroreceptores y también juegan un papel importante al secretar citoquinas proinflamatorias (ILs) que ayudan al tumor a eludir las respuestas antitumorales. Además, el estrógeno tiene dos efectos, la inducción del crecimiento tumoral al aumentar la señalización de estrógeno junto a la transcripción de genes proliferativos en las células tumorales y la modificación de las fibras simpáticas (SNS), lo que podría dar prevalencia a la señalización parasimpática (SNPS) en algunas etapas de progresión tumoral. Adaptada de (117).

### 3. Modelos animales y líneas celulares en cáncer de endometrio

#### 3.1. Modelos animales

El diseño de modelos de experimentación que permitan reproducir el comportamiento tumoral y ensayar fármacos es uno de los pilares de la investigación en cáncer. Los modelos de ratón son los más utilizados en investigación oncológica, principalmente por su fácil manipulación y mantenimiento, su bajo coste económico, su capacidad para generar tumores, así como la disposición de numerosa información dado su amplia utilización a nivel experimental. El objetivo del modelo animal es que se asemeje al máximo a la patología en el ser humano. Esto permite el estudio del desarrollo de la enfermedad y su utilización en ensayos preclínicos con alto valor predictivo para poder transferir el significado de los resultados a la práctica clínica habitual.

Las particularidades del modelo animal oncológico ideal son:

- Preservar de características histopatológicas del tumor humano primario.
- Mantener las mismas vías y alteraciones génicas de invasión y progresión tumoral.
- Presentar una progresión clínica análoga al ser humano.
- Mostrar una respuesta similar a la terapia que en la práctica clínica habitual con pacientes.

Fue en los años 60 cuando se publicaron los primeros datos de experimentación *in vivo* sobre células tumorales leucémicas en modelos murinos (190). Desde entonces, los modelos animales han ido evolucionando, existiendo diferentes opciones entre las que destacan:

-Modelos transgénicos (GEM: *Genetically engineered models*): Se trata de ratones a los que se ha modificado su material genético, habitualmente alterando genes implicados en la carcinogénesis tumoral como *PTEN*, *TP53* o *MIG-6* (191). Es posible introducir un gen adicional (*knock-in*) o contrariamente suprimir un gen (*knock-out*). Aportan ventajas, como su utilización para el ensayo con fármacos conociendo la mutación en concreto, pero también limitaciones como el desconocimiento del número de copias incorporadas, el lugar exacto de la inserción o la falta de heterogeneidad tumoral, presentando diferencias importantes respecto a los pacientes. Algunos ejemplos son los ratones transgénicos knock-out para *PTEN* (192,193).

## INTRODUCCIÓN

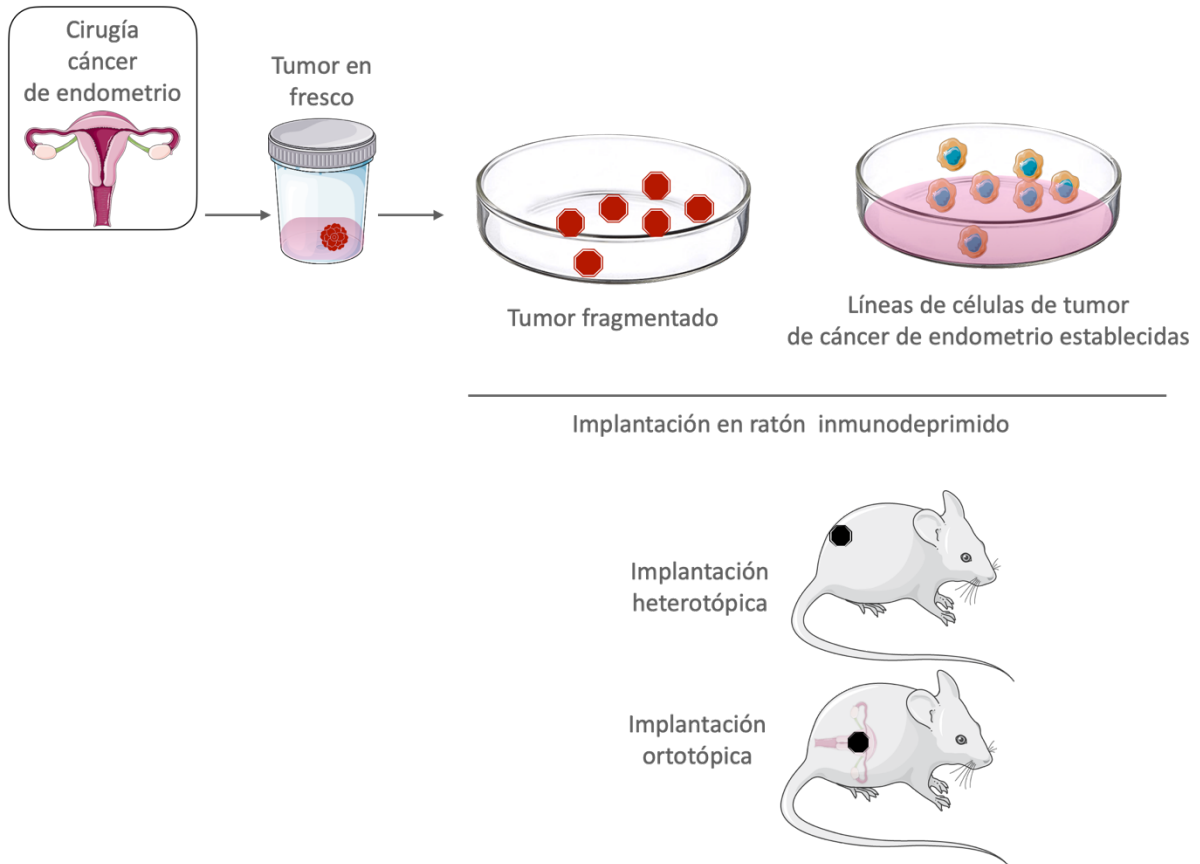
-Modelos xenógrafos: Se generan a partir de ratones inmunodeprimidos para que la inoculación de células tumorales de otra especie (humano) no produzca rechazo del tejido. Los modelos xenógrafos pueden ser derivados de tumor de paciente (*Patient-derived xenograft models-PDX*) o bien derivados de líneas celulares tumorales establecidas y comerciales. Existen varias cepas de ratones inmunodeprimidos con distinto grado de inmunodepresión (Tabla 6).

**Tabla 6. Tipos de ratones, deficiencias inmunológicas y características de los ratones inmunodeprimidos utilizados habitualmente para la generación de los modelos xenógrafos para uso en oncología experimental.** Adaptada de (194).

Cepa	Deficiencia inmunológica	Características
<b>Swiss Nude</b>	Células T no funcionales	<ul style="list-style-type: none"> <li>Desarrollo defectivo del epitelio tímico que confiere la inmunodeficiencia.</li> <li>Bien caracterizados, amplia experiencia en su uso.</li> <li>Tasa de implantación elevada.</li> <li>Nivel de inmunosupresión moderado.</li> <li>Crecimiento de pelo anormal y elevada incidencia de vascularización corneal.</li> </ul>
<b>SCID</b> ( <i>Severely compromised immune deficient mice</i> )	Células T y B no funcionales	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mayor tasa de implantación de injerto de células y tejidos tumorales por un nivel de inmunosupresión mayor.</li> <li>Costes económicos superiores.</li> </ul>
<b>NOD-SCID</b> ( <i>Non obese diabetic SCID mice</i> )	Células T y B no funcionales Células <i>natural Killer</i> (NK) alteradas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nivel de inmunosupresión elevado.</li> <li>Adecuados para líneas celulares de cáncer hematopoyético.</li> </ul>
<b>NSG</b> o NOD. Cg -Prkdc <sup>Scid</sup> Il2rg <sup>tm1Wjl</sup> /SzJ	Células T, B y NK no funcionales	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mutación en el gen del receptor de interleucina 2, deficiencia en múltiples vías de señalización y disfunción de inmunidad innata.</li> <li>Adecuados para líneas celulares de cáncer hematopoyético.</li> <li>Adecuado para el análisis de metástasis y células madre de cáncer humano.</li> </ul>



Existen básicamente dos tipos de modelos xenógrafos dependiendo de la localización de la implantación tumoral (**Figura 10**).



**Figura 10. Descripción del proceso de implantación heterotópica y ortotópica en el ratón inmunodeprimido para generar los modelos xenógrafos.** Se ilustra la implantación de fragmentos de tumor derivados de paciente y de líneas celulares tumorales establecidas. Adaptada de (194).

-Implantación heterotópica: El fragmento de tumor o las células se implantan en un área del ratón no relacionada con el órgano de origen del tumor. Generalmente se realiza por vía subcutánea en la región interescapular, en la grasa mamaria o en la cápsula renal (195). En la implantación subcutánea es habitual la necrosis tumoral central dado el limitado aporte vascular subcutáneo y se trata de un modelo con una limitada diseminación metastásica.

-Implantación ortotópica: El tejido tumoral o las células del paciente se coloca en el órgano anatómico correspondiente al origen del tumor. En el caso del tumor de endometrio en el útero. Esta localización favorece la creación de un microambiente tumoral óptimo para la invasión local y la progresión a distancia.

## INTRODUCCIÓN

A partir de la implantación del injerto del tejido tumoral del paciente en el ratón inmunodeprimido (ratón nodriza), y tras su crecimiento, se realiza la extracción y se reimplanta un fragmento en nuevos ratones (ratón experimental). La tasa de injerto depende de múltiples factores que a la vez son motivo de estudio, como por ejemplo la cepa de ratón, las características tumorales, el método de implantación o la aplicación de matrices extracelulares (matrigel etc.) (196).

Los métodos de seguimiento o monitorización del crecimiento del tumor son diferentes según el objetivo y los recursos disponibles (197). Los tumores heterotópicos o subcutáneos ofrecen ventajas en este sentido, dado que su evolución puede seguirse en forma de inspección visual o palpación. Sin embargo, el seguimiento de los modelos ortotópicos requiere la utilización de técnicas de imagen, aunque también es posible realizar la palpación tumoral en estadios más avanzados. Como herramientas de seguimiento destacan la resonancia magnética, la ecografía, la tomografía computarizada o la tomografía con emisión de positrones.

La imagen óptica mediante fluorescencia (FLI) o bioluminiscencia (BLI) es una técnica no invasiva ampliamente utilizada en la monitorización tumoral de modelos murinos experimentales. Para su realización, precisa de la introducción en la célula tumoral de un gen que exprese una proteína fluorescente como GFP (*Green fluorescent protein*) para la detección de fluorescencia, o el gen de la luciferasa, para la detección de la bioluminiscencia. En este último caso, la reacción química producida bajo la presencia del substrato (D-Luciferina) produce una emisión de luz que permite la integración de la señal luminosa con la localización de las células tumorales. Su utilidad es la monitorización del tumor primario y de las lesiones metastásicas en su progresión o bien bajo la aplicación de tratamientos farmacológicos a tiempo real (198).

### 3.2. Modelos xenógrafos a partir de líneas celulares de cáncer de endometrio

Las líneas celulares de cáncer establecidas son una herramienta fundamental tanto en la investigación de los mecanismos moleculares de carcinogénesis *in vitro* e *in vivo* como en el campo del desarrollo de fármacos antitumorales (199). Estas líneas tumorales permiten una fácil manipulación en el laboratorio y suponen un coste económico moderado comparado con otros procedimientos. Además, pueden ser manipuladas genéticamente, existiendo la posibilidad de introducir material genético exógeno para aportar la ganancia o la pérdida de la expresión de algunos genes.

Como limitaciones destacan la imposibilidad de mantener la heterogeneidad intratumoral, la capacidad de experimentar cambios epigenéticos durante su crecimiento o la pérdida del microambiente tumoral formado por la interacción con otras células del estroma, inhibiéndose la expresión de proteínas importantes en el desarrollo tumoral. Por este motivo su relevancia clínica es menor que los modelos creados a partir de tejido tumoral obtenido de paciente; a pesar de eso, tienen un papel relevante en la investigación en medicina traslacional en ginecología (200).

En el caso del cáncer de endometrio, existen más de quince líneas de células establecidas representativas de diferentes subtipos tumorales (201,202). Varios análisis han demostrado que las características moleculares, como la alteración en la vía *PI3K/Akt*, se mantienen en las células *in vitro* sin cambios respecto el tumor original del paciente, dato relevante para la traslación clínica de los experimentos (82,203). Las líneas celulares más frecuentemente utilizadas en experimentación en cáncer de endometrio son HEC1A, HEC1B, Ishikawa, AN3CA, ARK1 y KLE las características de las cuales se describen en la **Tabla 7**.

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 7. Características de las líneas celulares más utilizadas en cáncer de endometrio.** Adaptada de (200,201,204,205).

Línea Celular	HEC1A / HEC1B	Ishikawa	AN3CA	ARK1	KLE
Descripción inicial	Kuramoto H 1972	Nishida 1985	Dawe CJ 1964	Información no identificada	Richardson 1984
Tipo de tumor	Adenocarcinoma endometrio	Adenocarcinoma endometrio	Neoplasia uterina asociada a acantosis nigricans obtenida de un ganglio linfático	Adenocarcinoma endometrio	Metástasis de colon de adenocarcinoma endometrioide
Expresión RREE	Baja	Alta	Baja	Alta	Baja
Expresión RRPP	Baja	Alta	Baja	Baja	Baja
<i>PTEN</i>	WT	Delección	Delección	WT	WT
<i>p53</i>	Mutación de cambio de sentido	Mutación de cambio de sentido	Mutación de cambio de sentido	Información no disponible	Mutación de cambio de sentido
IMS	HEC1A Alta HEC1B Baja	Alta	Alta	Información no disponible	Baja
Grado histológico	2	1	Metástasis	3	Metástasis
Tipo (Clas. Bokhman)	I / II Discordancia en la bibliografía conocida (201).	I	I	II	I

Abreviaturas: RREE: receptores estrógenos; RRPP: receptores progestágenos; IMS: Inestabilidad de microsatélites, WT: *wildtype*, nativa.

### 3.3. Modelos xenógrafos derivados de muestra de pacientes (PDX) en cáncer de endometrio

Los PDX o *Patient-derived xenograft models* se generan a partir de la implantación de una muestra de tejido tumoral de paciente directamente en ratones inmunodeprimidos. Representan un modelo óptimo para la investigación traslacional dado que preservan las características genéticas, histológicas y fenotípicas del tumor primario con una tasa de implantación del 60-80% (206).

Específicamente en cáncer de endometrio, existe experiencia en la creación de modelos PDX desde hace una década (207). Cabrera y *et al.* fue la primera en describir el desarrollo de modelos PDX ortotópicos a partir de tejido de cáncer de endometrio de paciente (208). En este estudio se experimenta con dos vías de implantación ortotópica: la transmiometrial, con una tasa de injerto elevada, y la transvaginal, menos invasiva, pero con resultados limitados en cuanto a la implantación del tejido. Con varios experimentos, demostró que las características histológicas y moleculares del tumor primario, así como su capacidad de diseminación se mantenían respecto al tumor original del paciente. Posteriormente otros autores como Haldorsen *et al.* (197) o Depreeuw *et al.* (209) publicaron varios experimentos incluyendo los ensayos con células en suspensión en lugar de tejido tumoral, favoreciendo la presencia de células madre tumorales o bien, desarrollando modelos subcutáneos que demostraron la conservación de las características biológicas del tumor primario. Unno y *et al.* por su parte estableció un modelo PDX de cuatro subtipos histológicos de cáncer de endometrio implantados en la cápsula renal reportando que en esta localización las células tumorales se encontraban en un ambiente susceptible de invasión y metástasis (210).

Una colaboración europea llevada a cabo por la *European Network of Individual Treatment in Endometrial Cancer* (ENITEC) resultó en la generación y caracterización de modelos PDX de 124 tumores endometriales primarios y metastásicos representando los distintos subtipos histológicos en prácticamente todas las etapas y grados. Este tipo de trabajos genera un recurso valioso para futuros ensayos preclínicos y una red de colaboración con las habilidades y la experiencia adecuadas para llevar a cabo un ensayo clínico multicéntrico (206). El empleo de los modelos PDX tiene un papel relevante en la evaluación de nuevas terapias para los diferentes subtipos de cáncer de endometrio, así como en la selección de grupos de pacientes que puedan representar una diana más óptima para cada tratamiento. Las mutaciones en las vías implicadas en la progresión tumoral son la diana de agentes como el Palbociclib en modelos PDX *PTEN* mutados (211) o como NVP-BE0235 y AZD6244 en modelos PDX de cáncer endometriode recurrente de alto grado asociado a mutaciones de *PTEN*, *PIK3CA* y *KRAS* (209,212).

## INTRODUCCIÓN

Las ventajas de los modelos xenógrafos derivados de paciente son 1) la preservación del perfil genético del tumor primario y su estabilidad en la transición de tumor en varios animales 2) la conservación inicial de las principales características histológicas y fenotípicas del tumor, su arquitectura tisular, los componentes del estroma y de las células madre tumorales, las interacciones entre células y su distribución espacial 3) la ampliación de la masa o cantidad tumoral que facilita el análisis de la biología y la caracterización tumoral y 4) la generación de una cohorte de ratones con el mismo tumor que puede usarse como modelo preclínico para ensayos con fármacos antitumorales.

Como limitaciones de los modelos xenógrafos derivados de paciente destaca el hecho que los ratones sean inmunodeprimidos. Esta característica es necesaria para no producir un rechazo del tumor, pero, en consecuencia, en los modelos PDX no es posible valorar todos los factores inmunológicos que afectan al crecimiento neoplásico. Como se ha descrito previamente, se conoce que el microambiente tumoral está formado por una compleja red de células tumorales y células estromales y es clave en la invasión y progresión tumoral (213) (**Figura 9**). Como segunda limitación, a pesar de que las características histológicas y moleculares del tumor inicial se mantienen, incluyendo la heterogeneidad tumoral, tan solo una reducida muestra de tumor es implantada. Por este motivo, puede existir una pérdida de información histológica o molecular del paciente que no sea inoculada en el ratón. Un estudio monitorizó las alteraciones en el número de copias somáticas de numerosos modelos PDX evidenciando evoluciones distintas (pérdidas y adquisiciones) entre el tumor primario y el tumor del modelo; no obstante, la mayoría de los cambios no ocurrían en los genes oncogénicos (214). Por último, se debe tener en cuenta que, aunque los modelos reproduzcan la evolución del tumor inicial, en este proceso se pueden adquirir particularidades propias del ratón como la restitución del estroma humano por el murino (209). La solución o alternativa a estas limitaciones relacionadas con la interacción de la célula tumoral e inmunitaria son los ‘ratones humanizados’. Las cepas de ‘ratón humanizado’ se basan en ratones severamente inmunodeficientes que toleran el injerto de un sistema inmunológico humano funcional y permiten el análisis específico de la biología y funciones inmunes humanas (215). Hasta el momento no se conocen estudios en este tipo de modelos en cáncer de endometrio.



## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



### II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 1. HIPÓTESIS

La investigación en cáncer de endometrio en los últimos años ha evolucionado hacia un diagnóstico más preciso del tipo histológico y molecular y hacia una mejor predicción del pronóstico de cada paciente. Sin embargo, el tratamiento del cáncer de endometrio en estadios avanzados supone un gran desafío biomédico debido a la impredecible tasa de respuesta de las pacientes y a los efectos secundarios asociados a los tratamientos administrados. El sistema nervioso ejerce un papel importante en la fisiopatología de múltiples tipos de cáncer. Las catecolaminas se han perfilado como uno de los principales mediadores de la relación entre el estrés crónico y la progresión del cáncer.

Por tanto, creemos que la expresión de los receptores catecolaminérgicos puede asociarse con variables clínico-patológicas proporcionando información pronóstica relevante en el manejo clínico del cáncer de endometrio. Además, la posibilidad de desarrollar modelos xenógrafos *in vivo* a partir de tumores derivados de pacientes, permitirá caracterizar el patrón de expresión de los mismos neuroreceptores para la validación futura de resultados clínicos. Al mismo tiempo, la experimentación *in vitro* a partir de líneas celulares establecidas de cáncer de endometrio nos permitirá validar el efecto de la neuromodulación catecolaminérgica como base para la estrategia terapéutica.

La integración de diferentes modelos preclínicos asociados a datos clínicos permitirá definir la implicación pronóstica y terapéutica de los receptores catecolaminérgicos en la fisiopatología específica de la neoplasia.

### 2. OBJETIVOS

#### Objetivo principal

Identificar y caracterizar el papel de los receptores catecolaminérgicos en el cáncer de endometrio, mediante la asociación de la expresión de los receptores con las variables clínico-patológicas pronósticas y mediante el desarrollo de modelos preclínicos derivados de muestras de pacientes y la neuromodulación de líneas celulares establecidas de cáncer de endometrio.

#### Objetivos específicos

1. Evaluar el patrón de expresión de los receptores adrenérgicos a nivel de ARNm y de proteína en muestras de carcinoma de endometrio y estudiar su asociación con las variables clínico-patológicas.
2. Evaluar el patrón de expresión de los receptores dopaminérgicos a nivel de ARNm y de proteína en muestras de carcinoma de endometrio y estudiar su asociación con las variables clínico-patológicas.
3. Generar modelos xenógrafos ortotópicos derivados de muestras de pacientes que reflejen las características clínico-patológicas de la enfermedad en estadio avanzado y caracterizar la expresión de los receptores catecolaminérgicos en el tumor generado.
4. Estudiar *in vitro* el efecto de la neuromodulación adrenérgica y dopaminérgica sobre la proliferación en las líneas celulares HEC1A y AN3CA.
5. Evaluar la capacidad sinérgica de la activación y/o inhibición combinada de DRD1 y DRD2 sobre la proliferación en la línea celular AN3CA.



# III. MATERIAL Y MÉTODOS

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **1. Expresión de receptores catecolaminérgicos en muestras de pacientes con cáncer de endometrio**

##### **1.1. Población y diseño de estudio**

Se trata de un estudio descriptivo retrospectivo que incluye muestras parafinadas de tejido tumoral originario de la pieza final de pacientes intervenidas por cáncer de endometrio en el Servicio de Ginecología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau entre los años 2009-2018.

Los criterios de inclusión fueron la confirmación del diagnóstico por parte de un patólogo especializado en ginecología y disponer de material suficiente y en condiciones óptimas para realizar el experimento. Con el fin de disponer de una representación de la práctica clínica habitual, se incluyeron muestras de diferentes subtipos y estadios de cáncer de endometrio. Además, se obtuvieron diez muestras de tejido endometrial sano para utilizarlas como controles.

Se realizó una revisión de las historias clínicas informatizadas recogiendo los datos clínicos de las pacientes mediante el aplicativo Clinapsis (Versión 1, Servicio Epidemiología Clínica y Servicios Sanitarios del IIB Sant Pau) el cual disponía de una base de datos creada específicamente por la Unidad de Ginecología Oncológica. Posteriormente se extrajo la información en formato Excel para analizarla. La identificación conjunta de la muestra y los datos de la paciente se realizó a partir del número de biopsia. Todas las pacientes fueron evaluadas por el Comité de Ginecología Oncológica del centro hospitalario y la decisión terapéutica incluyendo el tratamiento adyuvante y el seguimiento se basó en los protocolos institucionales actualizados en el momento para el manejo del cáncer de endometrio.

El estudio fue aprobado por el Comité de Experimentación e Investigación Clínica (CEIC) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Ref: IIBSP-CEN-2020-14. Todos los datos se han mantenido en el anonimato sin relacionar información que pueda identificar a las pacientes y la investigación cumplió con los principios descritos en la Declaración de Helsinki. Debido a la naturaleza retrospectiva del estudio, no se consideró necesario el consentimiento informado específico para el estudio de los datos de las pacientes.

A continuación, se exponen las variables clínicas recogidas, la unidad de medida, así como la definición si es precisa:

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Edad al diagnóstico (Años cumplidos a fecha del diagnóstico)
  - Fecha del diagnóstico (Fecha de la primera visita en la Unidad (Día/mes/año))
  - Histología del tumor (Según la clasificación de la OMS)
  - Grado histológico (Según la clasificación FIGO en G1,G2,G3)
  - Tamaño del tumor (cm)
  - Estadio (Según la clasificación FIGO)
  - Realización de tratamiento adyuvante (Sí/No)
  - Fecha fin del tratamiento adyuvante (Día/mes/año)
  - Recidiva (Sí/No)
  - Último control realizado (Día/mes/año)
  - Estado de la paciente en el último control (Viva/Muerta)
  - Estado de la enfermedad en el último control (Libre/Afectada)
  - Causa de la muerte (Por la neoplasia de endometrio/Por otra enfermedad)
- Recidiva: Detección de nuevas lesiones después de un periodo sin enfermedad superior a seis meses, confirmada por anatomía patológica.
- Supervivencia libre de enfermedad (SLE). Tiempo en meses comprendido entre la fecha del diagnóstico de la neoplasia hasta la fecha de la recidiva.
- Supervivencia global (SG). Tiempo en meses comprendido entre la fecha del diagnóstico de la neoplasia hasta la fecha de muerte de la paciente.

### 1.2. Procesamiento de las muestras

#### 1.2.1. Tinción de hematoxilina-eosina de muestras FFPE

A partir de las muestras tumorales fijadas y parafinadas (FFPE) de archivo, obtenidas en el Servicio de Anatomía Patológica, se cortaron secciones de 4  $\mu\text{m}$  empleando un microtomo. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en una estufa durante 1 hora a 60°C y rehidratadas mediante incubaciones de 10 min: dos incubaciones en xileno 100%, dos incubaciones en etanol 100% y una incubación en etanol 96%, 80% y 50%. A continuación, los portaobjetos se incubaron durante 5 min en agua destilada, para ser teñidos con tres ciclos de hematoxilina de Mayer de 3 min cada uno. Posteriormente fueron lavados durante 10 min con agua destilada e introducidos en eosina al 2%, aislada de la luz durante 3 min. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas con soluciones de alcohol crecientes y montadas utilizando medio de montaje DPX (Merck).

### 1.2.2. Extracción del ARN a partir de muestras parafinadas

Para la extracción de ARN de las muestras parafinadas, se utilizó el kit RNeasy FFPE de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se cortaron secciones de 10  $\mu\text{m}$  de espesor y se desparafinaron mediante el tratamiento con una solución de desparafinación incluida en el kit. Posteriormente, se realizó la digestión de las muestras, incubándose con tampón de lisis y proteinasa K, para liberar el ARN. Finalmente, las muestras digeridas se transfirieron al equipo QIAcube (QIAGEN) para la extracción y purificación automática de ARN. El ARN purificado se conservó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior.

### 1.2.3. Expresión génica de los receptores catecolaminérgicos por RT-qPCR con el sistema TaqMan Low Density Arrays (TLDA)

#### 1.2.3.1. Síntesis de ADNc

La síntesis de la cadena de ADN complementaria (ADNc) consiste en la retrotranscripción enzimática del ARN para obtener nuevamente ADN que será complementario al ARN presente en cada muestra. El ADN es más estable y permite trabajar a temperaturas elevadas sin producirse una degradación significativa de las moléculas. La síntesis se realizó a partir de 1200ng de ARN usando el kit High Sensitivity cDNA synthesis kit (ThermoFisher Sci.) que permite hacer retrotranscripción de hasta 2 $\mu\text{g}$  de ARN. El protocolo seguido fue el indicado por la casa comercial usando un termociclador Veriti (Applied Biosystems). Las muestras de ADNc se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### 1.2.3.2. Determinación de la expresión génica con TLDA

El análisis de la expresión génica de las muestras de tejido tumoral y tejido endometrial sano se realizó por *Real-time polymerase chain reaction* a partir de ADNc (RT-qPCR) utilizando sondas TaqMan específicas para cada gen a analizar. Una vez seleccionadas las sondas y los cebadores para los genes de interés, se utilizó como soporte el formato TaqMan Low Density Arrays (TLDA) (ThermoFisher Sci.). Este formato permite el análisis simultáneo de 384 pocillos de forma sencilla. Cada tarjeta fue configurada para la evaluación de 8 genes implicados correspondientes a los receptores catecolaminérgicos (**Tabla 8**). Cada TLDA consta de 8 puertos de carga donde se introducen 50 $\mu\text{l}$  de master-mix para qPCR (SensiFAST TM ProbeHi-ROX kit (Meridian Biosciences)) y 50 $\mu\text{l}$  de ADNc equivalente a 1020 ng de ARN total. Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un equipo de PCR cuantitativa ABI PRISM 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las carreras de qPCR se realizaron siguiendo las instrucciones de la casa comercial para los TLDA y ajustando temperaturas y tiempos de reacción a la Master utilizada (10 minutos 95°C, 10 segundos 95°C, 30 segundos 59,7°C). Se establecieron 42 ciclos de PCR, aunque los datos sólo se analizaron para las muestras que amplificaban antes del ciclo 38. La señal de fluorescencia aumenta, en cada ciclo de amplificación, de forma exponencial hasta alcanzar un valor umbral determinado para cada gen a analizar, este valor es el que se toma como referencia para la medida cuantitativa. Este ciclo se denomina ciclo umbral o threshold cycle (Ct) y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de secuencia a amplificar. El Ct se calculó con el software RQ de Thermo Fisher Connect TM (Versión 1.1) (Thermo Fisher Sci). Los valores crudos de Ct fueron normalizados empleando un factor calculado en base a un método de normalización global, que consiste en encontrar los ensayos comunes para cada muestra y usar la mediana de Ct de esos ensayos como factor de normalización. No se ha podido hacer una normalización usando los genes endógenos (*House Keeping genes*) incluidos en los TLDA ya que no se detectó expresión en todas las muestras, lo que impide usarlos para calcular un factor de normalización.

**Tabla 8. Descripción de las sondas utilizadas para la determinación de la expresión génica mediante el ensayo *Taqman Gene Expression Assays* (TLDA) de los receptores catecolaminérgicos.**

Señalización (SNA)	Tipo de señalización	Gen	Descripción	Código identificativo de las sondas
Sistema adrenérgico	$\beta$ -adrenérgica	<i>ADR<math>\beta</math>1</i>	Receptor Adrenérgico Beta1	Hs02330048_s1
		<i>ADR<math>\beta</math>2</i>	Receptor Adrenérgico Beta2	Hs00240532_s1
		<i>ADR<math>\beta</math>3</i>	Receptor Adrenérgico Beta3	Hs00609046_m1
Sistema dopaminérgico	D1-like	<i>DRD1</i>	Receptor dopamina D1	Hs00265245_s1
		<i>DRD5</i>	Receptor dopamina D5	Hs00361234_s1
	D2-like	<i>DRD2</i>	Receptor dopamina D2	Hs00241436_m1
		<i>DRD3</i>	Receptor dopamina D3	Hs00364455_m1
		<i>DRD4</i>	Receptor dopamina D4	Hs00609526_m1



#### 1.2.4. Expresión de ADR $\beta$ 2, DRD1 y DRD2 mediante tinción inmunohistoquímica

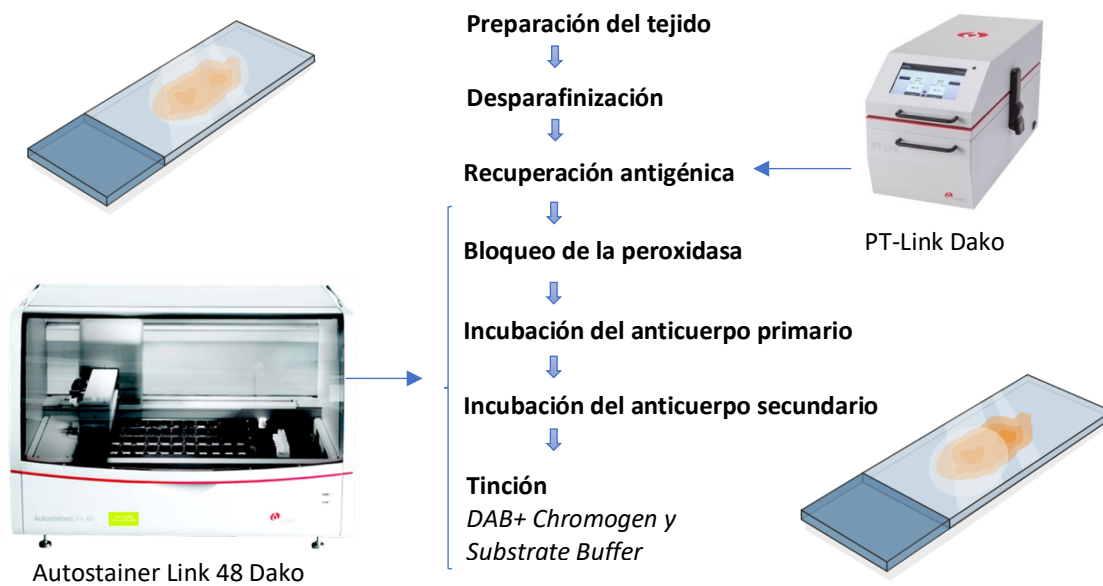
La tinción inmunohistoquímica se realizó para evaluar la expresión proteica de los receptores ADR $\beta$ 2, DRD1 y DRD2 en tejido tumoral y en tejido endometrial sano. Inicialmente, con muestras de tejido control (glándula adrenal, arteria, cerebro, amígdalas y cornea), se determinaron los parámetros de dilución, los tiempos de incubación y el revelado de los anticuerpos para monitorear la calidad de la tinción inmunohistoquímica (**Tabla 9**).

Las secciones cortadas de 4  $\mu$ m se colocaron sobre portas cargados positivamente para evitar la pérdida del tejido en el proceso de inmunohistoquímica (FLEX IHC Microscope Slides, Dako). Como en el apartado anterior, las muestras fueron incubadas en estufa durante 1 hora a 60°C y se realizó la recuperación antigénica utilizando el sistema PT Link (Dako), programando una incubación a 95°C durante 10 min y posteriormente 45 min a 65°C en tampón TRIS/EDTA pH 9.0 (pH alto, Dako). La inmunotinción se realizó mediante el sistema automatizado Autostainer Link 48 (Dako), empleando los reactivos del kit EnVision Flex, High pH (Dako) (**Figura 11**).

**Tabla 9. Condiciones de los anticuerpos utilizados en las tinciones inmunohistoquímicas.**

Anticuerpo primario	Recuperación antigénica	Dilución	Anticuerpo secundario	Casa comercial y referencia
ADR $\beta$ 2	Tampón Tris/EDTA pH 9.0	1:200	Conejo	<i>Abbiotech (251604)</i>
DRD1	Tampón Tris/EDTA pH 9.0	1:200	Ratón	<i>Bio-technie (R&amp;D system)</i>
DRD2	Tampón Tris/EDTA pH 9.0	1:200	Ratón	<i>Santa Cruz Biotechnology, INC (sc-5303)</i>

## MATERIAL Y MÉTODOS



**Figura 11. Representación esquemática de la metodología de la tinción inmunohistoquímica.** Las incubaciones que se realizaron fueron las siguientes: 1 min de lavado con tampón, 5 min de bloqueo con solución de peroxidasa endógena 3%, 1 min de lavado en tampón, incubación con el anticuerpo primario correspondiente diluido en tampón *Rinse* (Dako), lavado con tampón durante 1 min, incubación durante 20 min con peroxidasa de rábano EnVision/HRP, lavado con tampón durante 1 min, incubación con la solución cromogénica para el revelado (DAB+ *Chromogen* y *Substrate Buffer*), lavado con tampón 1 min, contratinción con hematoxilina durante 5 min y lavado final con tampón durante 1 min.

### 1.2.5. Análisis y cuantificación de la expresión de los neuroreceptores

Las imágenes de las muestras de tejido tumoral y tejido endometrial sano fueron adquiridas con el microscopio Olympus modelo BX51, utilizando la cámara DP72 a 100 ó 200 aumentos y con el software Observation System BX2N-SDO. De cada muestra se captaron dos imágenes representativas de la zona a analizar, que posteriormente fueron cuantificadas con el programa de procesamiento de imagen digital *Image J* Versión 1.50i. El procedimiento se llevó a cabo por un patólogo especializado que desconocía los datos clínicos de las pacientes. Una vez introducida en el programa *Image J*, la imagen se desgregó en los tres canales de color (comando *Split Channels*) seleccionando el canal *Blue* para realizar la cuantificación. A partir del área total de la imagen y con la herramienta *threshold* se seleccionó la zona teñida por el anticuerpo correspondiente y se calculó el porcentaje de tinción y el valor medio de marcaje con la opción del programa *Analyze*.

La intensidad de la señal se calculó multiplicando el valor *count* de cada imagen por la media de marcaje. El índice H-Score se calculó multiplicando el área de tinción por la intensidad. Finalmente se realizaron las medias de los datos de las dos imágenes representativas de cada muestra obteniendo los valores finales.

### 1.3. Análisis estadístico

Los cálculos estadísticos llevados a cabo con los datos de expresión génica, se realizaron con los programas GraphPad Prism8 Versión 8.0.2, StatView v5.0.1, u otros específicos para determinados procesos, especificados en cada caso.

Los valores de expresión de ARNm obtenidos a partir de las qPCRs de los TLDA se transformaron en log<sub>2</sub> para posibilitar que siguieran una distribución normal y se eliminaron los valores *outlayer* detectados (método ROUT, Q=0.5%). Los valores de expresión normalizados se han representado usando un *HeatMap*. De esta forma se pueden identificar agrupaciones de pacientes con patrones similares de expresión de los diferentes receptores. Las muestras se asociaron a perfiles de similitud de expresión (dendograma) calculados a partir de la distancia euclídea y usando el método de '*average linkage*' para su agrupación. Para estos cálculos se han utilizado paquetes del programa estadístico R a través de una aplicación web ([heatmapper.ca](http://heatmapper.ca)) (216). La comparación de la expresión de los genes en tejido endometrial sano y tumores se analizó usando ANOVA para determinar su significación estadística. En todos los análisis se han considerado valores significativos a partir de  $p < 0.05$ .

La Plataforma Científico-técnica del Institut de Recerca de Sant Pau realizó el análisis estadístico completo para determinar las diferentes asociaciones del patrón de expresión proteico de los receptores ADR $\beta$ 2, DRD1 y DRD2. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico R (R Versión 4.1.3 (2022), Copyright © 2022 *The R Foundation for Statistical Computing*) junto con los paquetes predeterminados *base*, *stats*, *graphics*, *utils*, *datasets* y *methods* (217), asociado a los paquetes *ggplot2* (218), *rcompanion* (219) y *vtable* (220). La significación estadística de la relación entre la expresión de los distintos marcadores histológicos y las variables clínicas se evaluó utilizando métodos de estadística robusta, basados en las funciones WRS de Wilcox, empleando para ello el paquete *WRS2* (221). La expresión se describió como la mediana y su correspondiente medida de dispersión o rango intercuartílico (RIQ) que es la diferencia entre el percentil 25 y 75.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio de la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad se analizó mediante regresión de Cox, utilizando los paquetes *survival* (222) y *survminer* (223). Se calcularon las variables de censura adecuadas a cada una de las supervivencias y se realizaron los análisis estudiando inicialmente las variables de forma univariante. Las variables que fueron significativas en este primer análisis fueron elegidas para introducirlas en el modelo multivariante. El p valor calculado por el método del *Likelihood ratio* fue el tenido en cuenta para valorar la bondad del modelo. Los resultados se han expresado como HR (*Hazard Ratio* o tasa de riesgo) más su intervalo de confianza al 95% y el p-valor. En el caso de los estudios de supervivencia realizados con los datos de la cuantificación de las imágenes de las inmunohistoquímicas, las expresiones se evaluaron como variables continuas y, en el análisis adicional, se detectó el punto de corte óptimo para categorizarlas, usando la función *surv\_cutpoint* del paquete *survminer* (223). A partir de esta categorización se realizaron los estudios univariantes para tenerlas en cuenta o no en el modelo multivariante. En los estudios de supervivencia se incluyeron todas las pacientes, independientemente de su tiempo de seguimiento dentro del estudio. El asterisco indica que los valores son significativamente diferentes (\*) p valor < 0,05; (\*\*) p valor ≤ 0,01; (\*\*\*) p valor ≤ 0,001.

## 2. Experimentación *in vivo* con modelos animales de cáncer de endometrio

La experimentación *in vivo* con modelos xenógrafos de CE se realizó en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) del Institut de Recerca de Sant Pau. El SEA tiene la certificación ISO 9001:2015 y garantiza el cumplimiento de las normas legales y éticas vinculadas con el uso de animales para la experimentación y para otras finalidades científicas, por lo que está oficialmente registrado como centro de cría, suministrador y usuario de animales de experimentación (B9900067 y REGA ES080190036528).

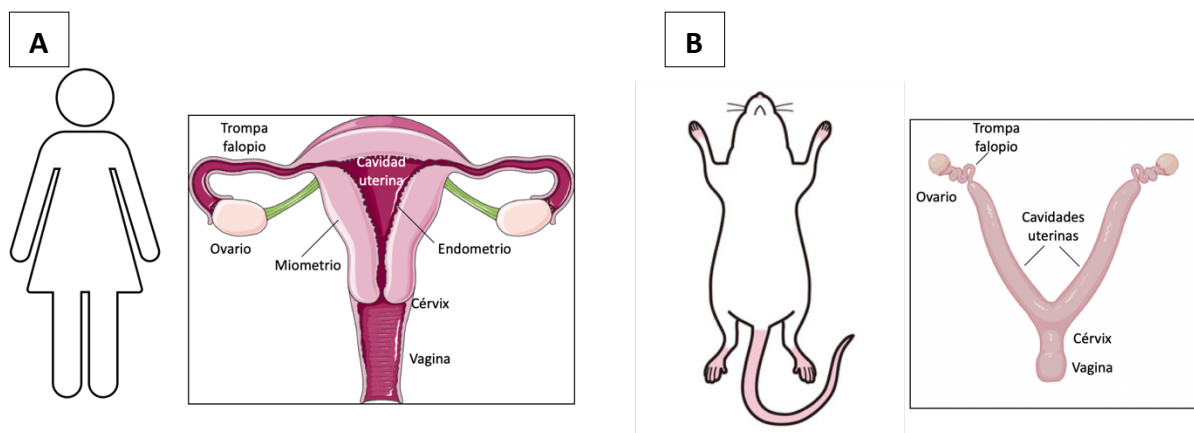
Los procedimientos a los que fueron sometidos los animales fueron revisados previamente por el Comité Ético del Instituto de Investigación del *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* y aprobados por el departamento de Territorio y Sostenibilidad la Generalidad de Cataluña. Referencia del proyecto de experimentación: 10234.

## 2.1. Desarrollo de modelos animales xenógrafos derivados de muestras de paciente (PDX)

### 2.1.1. Características de la cepa de ratón

Los ratones utilizados para la generación de los modelos xenógrafos fueron hembras de 4-5 semanas de edad de la cepa *Swiss Nude* obtenidas de INOTIV (Envigo, España) cuyas características se detallan en la **Tabla 6**.

En el ratón, la anatomía y funcionalidad del sistema reproductor difiere del humano (**Figura 12**). En los humanos, el útero es un órgano de una sola luz ubicado en el espacio central de la pelvis. Los dos oviductos, también conocidos como trompas de Falopio, sobresalen de ambos lados del útero y están conectados funcionalmente con los ovarios a través del infundíbulo y las fimbrias. La cavidad uterina se encuentra revestida por el endometrio, la capa más interna del útero. En los ratones, el útero está situado a nivel pélvico y consta de dos cuernos con sus respectivas cavidades que se fusionan caudalmente en el cuerpo uterino que es de reducido tamaño. La gestación tiene lugar dentro de los cuernos uterinos. Los oviductos se enrollan debajo de los ovarios de forma bilateral, pasando a veces desapercibidos. El ciclo reproductivo en el humano tiene una duración de 28 días, a diferencia del ciclo del ratón que dura entre 4-5 días comprendiendo los períodos de proestro, estro, metaestro y diestro.



**Figura 12.** Comparativa de la anatomía de los genitales internos femeninos del humano (A) y del ratón (B).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los ratones se mantuvieron en condiciones SPF (*Specific Pathogen Free*), en un rack con ventilación individualizada y controlada, a una temperatura de  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa de  $45 \pm 15\%$  y un ciclo de luz de 12 horas. Se administró comida y agua *ad libitum*. Durante los procedimientos quirúrgicos se mantuvieron las normas de asepsia establecidas según protocolo del SEA.

### 2.1.2. Protocolo de recogida de muestra de tumor de paciente

Las muestras de tumor se obtuvieron a partir de las piezas quirúrgicas (útero) afectas de cáncer de endometrio en las cirugías realizadas por el equipo de Ginecología Oncológica del Servicio de Ginecología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau durante el año 2018-2019. En la comprensión y firma del consentimiento informado para la intervención quirúrgica, las pacientes consintieron la utilización de material biológico excedente para la investigación científica. Ninguna paciente había realizado tratamiento médico previo a la cirugía.

El proceso de diagnóstico e identificación del fragmento tumoral fue realizado por un patólogo especializado. Posteriormente, la muestra se sumergió en medio DMEM +1% FBS estéril y se transportó en condiciones de esterilidad, al laboratorio del Institut de Recerca de Sant Pau donde se criopreservó hasta su implantación en ratón. El protocolo de criopreservación incluía la disgregación de la muestra en fragmentos aproximadamente de 10mm, la inmersión de la muestra en una solución de FBS y 10% DMSO y un enfriamiento progresivo utilizando un *cooler* (frosty) hasta  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Del total de muestras obtenidas, se realizó una tanda de implantación subcutánea de 5 tumores en diferentes ratones para evaluar la tasa de injerto y su progresión tumoral. Finalmente, las muestras END 17 y END 19 fueron las seleccionadas para generar los modelos PDX (**Tabla 10**).

**Tabla 10. Características histológicas y moleculares de las muestras de tumor de paciente seleccionadas para la generación de los modelos PDX.**

Muestra	END 17	END 19
Paciente	Mujer 81 años	Mujer de 54 años
Obtención	Septiembre 2018	Septiembre 2018
Tipo de tumor	Carcinoma endometrioide, tipo I (Clasificación de Bokhman)	Carcinoma seroso, tipo II (Clasificación de Bokhman)
Grado histológico (FIGO)	Alto (G3)	Alto (G3)
Estadio (FIGO)	I B	I B
Receptores estrógenos	Positivos (40%)	Negativos
Receptores progestágenos	Positivos (80%)	Negativos
Estado del gen <i>p53</i>	No mutado	Mutado
Inmunohistoquímica $\beta$ -catenina	Positividad nuclear	ne
Inmunohistoquímica MMR	MLH1 - PMS2: Negativos (Anormal) MSH6 - MSH2: Positividad nuclear (Normal)	ne
Estado de POLE (Exones 9,10,11,12,13,14)	No mutado	ne

Abreviaturas: ne: no evaluado.

## 2.2. Técnicas de implantación quirúrgica

A continuación, se describen las dos técnicas de implantación quirúrgica en ratón más utilizadas en la bibliografía y aplicadas en el trabajo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.2.1. Técnica de implantación subcutánea

La implantación subcutánea se utilizó para la selección inicial de la muestra de tumor de la paciente (Apartado 2.1.2.) y la expansión del tejido tumoral para la posterior implantación ortotópica en el ratón. Previamente a la implantación subcutánea, los ratones se anestesiaron por vía inhalatoria con isoflurano al 3-4% (IsoFlo, Ecuphar) con un flujo de oxígeno a 1 l/min. Después de la comprobación de la desaparición del reflejo plantar, se procedió a la desinfección local de la piel dorsal del ratón con povidona iodada y a realizar una incisión de 0,3-0,5mm en la parte dorsal media del animal, a través de la cual, se implantaron en dos flancos (anterior y posterior) del ratón. La implantación de tejido tumoral (fragmentos de 1 mm<sup>3</sup>) se realizó mediante el sistema trocar y no fue necesaria la sutura de la incisión realizada dada su reducida longitud. Todas las intervenciones se realizaron bajo medidas de asepsia en una campana de flujo laminar (Nuair) (**Figura 13**).

### 2.2.2. Técnica de implantación ortotópica

La implantación ortotópica es más compleja que la subcutánea y en este caso se utilizó una anestesia vía intraperitoneal con una solución de 100 mg/kg de ketamina (Ketolar, Pfizer) y 10 mg/kg de xilacina (Rompun, Bayer). Posteriormente a la comprobación de la desaparición del reflejo plantar, se realizó el procedimiento quirúrgico en la campana de flujo laminar (Nuair).

El material biológico a implantar fue:

-Tejido tumoral procedente de paciente (END 17 y END 19) de tamaño 1 mm<sup>3</sup> por fragmento generado a partir de ratones nodriza implantadas subcutáneamente.

En la implantación ortotópica se incluyeron dos técnicas diferentes (**Figura 14**):

- A) Vía transmiometrial: Previa anestesia y asepsia, se practicó una incisión longitudinal media de 1 cm en la cara ventral del ratón y se expuso el cuerno uterino izquierdo. Se realizó la implantación del tejido tumoral mediante la fijación transmiometrial del fragmento tumoral con sutura no absorbible Prolene 7/0 (Braun) (224). Finalmente se recolocó el útero en su situación fisiológica y se suturó la pared muscular abdominal con puntos simples con sutura no absorbible Prolene 6/0 (Braun) y la piel con grapas de 7mm (Braun) y se aplicó povidona yodada para la desinfección de la zona. El procedimiento tuvo una duración aproximada de 5 minutos por animal.

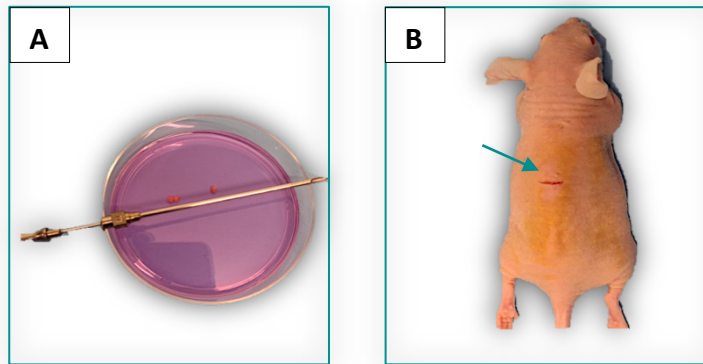


El despertar de la anestesia se realizó bajo observación de las posibles complicaciones y posteriormente se devolvieron a las jaulas. La retirada de las grapas se hizo a los 10-15 días cuando la herida se encontraba cicatrizada correctamente.

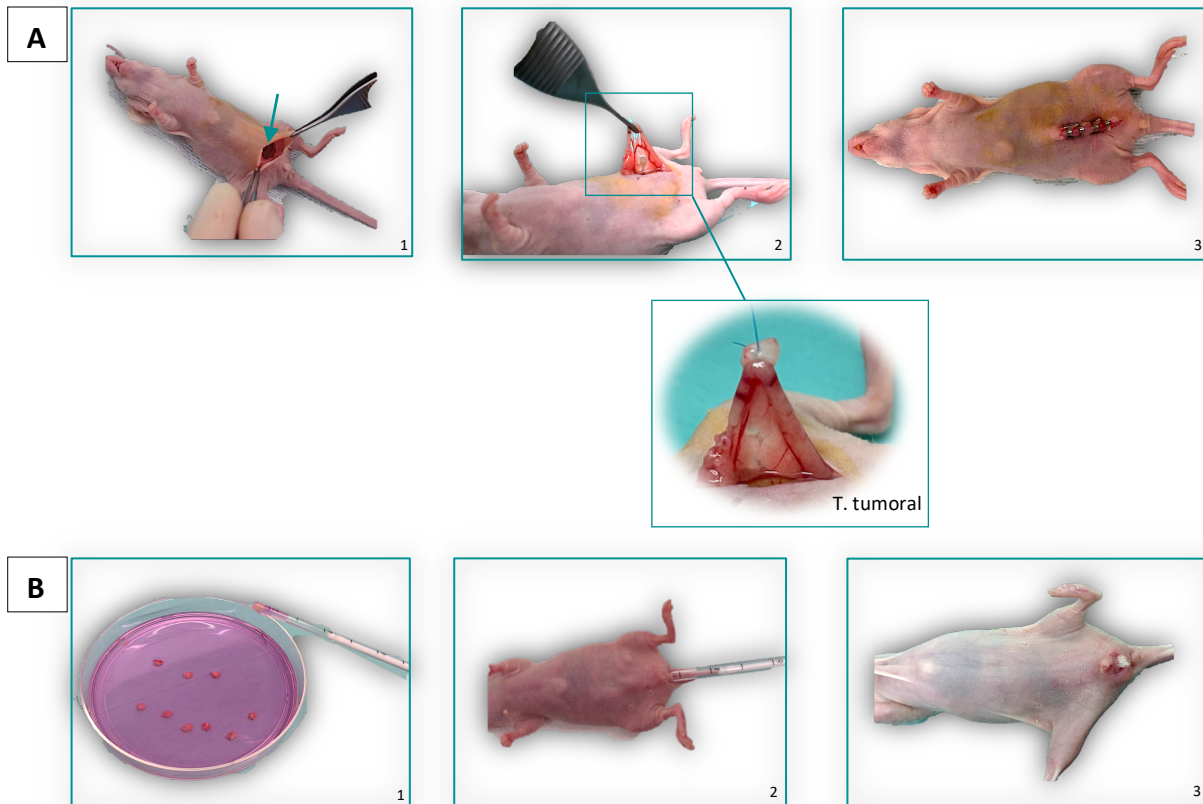
- B) Vía transvaginal: En esta vía de inoculación, no fue necesario realizar una incisión, siendo por tanto menos invasiva. Con el animal anestesiado y colocado en decúbito supino, se introdujo la muestra de tejido tumoral, vía vaginal, con una cánula (3mm diámetro, dh material médico ref. 400129826). En los tres primeros ratones se realizó una laparotomía con exposición del útero para comprobar la correcta localización de la muestra, evidenciando una distensión de la cavidad uterina.

Para mejorar la técnica descrita por Cabrera *et al.* (208) en la que obtuvo una baja tasa de implantación por la vía transvaginal se colocó un tapón de material estéril y reabsorbible del diámetro de la vagina del ratón para evitar la pérdida del implante.

## MATERIAL Y MÉTODOS



**Figura 13. Procedimiento quirúrgico de la implantación subcutánea de un fragmento de tejido tumoral en ratón inmunodeprimido. A:** Preparación del fragmento tumoral ( $1 \text{ mm}^3$ ). **B:** Ratón con incisión en el dorso para realizar la implantación (flecha).



**Figura 14. Procedimiento quirúrgico de implantación ortotópica de un fragmento de tejido tumoral en ratón inmunodeprimido. A:** Implantación quirúrgica transmiometrial, donde se identifica la incisión abdominal (flecha) (1), la exposición del cuerno uterino donde se realiza la implantación (2) y el resultado final (3). En la fase de implantación, se detalla la implantación de tejido tumoral. **B:** Implantación quirúrgica transvaginal, donde se observa la preparación inicial (1), la inoculación de la muestra de tejido con la cánula (2) y el resultado final con el tapón insertado en la vagina (3).

### 2.3. Seguimiento *in vivo* del crecimiento del tumor

La ventaja de la implantación subcutánea es que permite un seguimiento del crecimiento local mediante la visualización macroscópica y la medida de los ejes mayor y menor con un pie de rey, calculando el volumen tumoral aplicando la fórmula del volumen de un elipsoide (Volumen tumoral (mm<sup>3</sup>)= (Diámetro menor (d) x Diámetro mayor (D))<sup>2</sup> / 2 ). En el caso de la implantación ortotópica, también se mantuvo un control estimado mediante palpación abdominal estableciendo un criterio previamente puesto a punto en el laboratorio (0= no crecimiento; 1=crecimiento tumoral estimado de 0,5 cm; 2=crecimiento tumoral estimado 1cm; 3=crecimiento tumoral estimado de 2 cm).

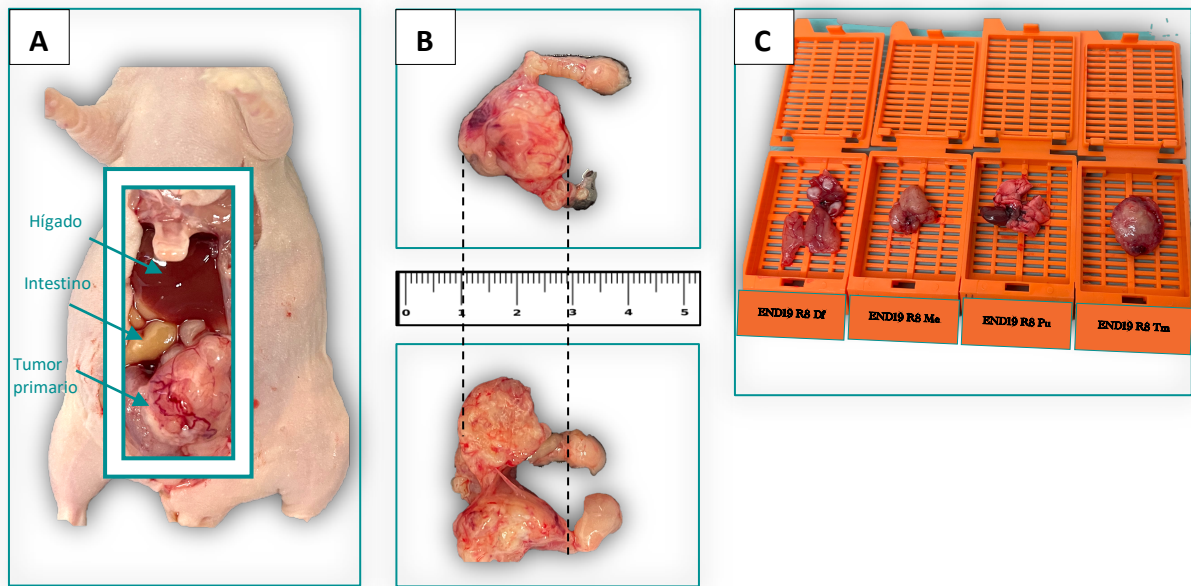
Paralelamente al seguimiento del crecimiento tumoral se realizó la comprobación del estado físico del ratón, así como la determinación del peso corporal semanalmente.

### 2.4. Necropsia

Cuando el tumor generado alcanzó una medida estimada de 2 cm o los ratones presentaron síntomas de enfermedad diseminada (pérdida de peso >20% de la inicial, distensión abdominal, ascitis) y antes de un deterioro físico (dificultad en el movimiento, automutilaciones según el protocolo de supervisión (Ver anexo), se realizó la eutanasia del ratón mediante la técnica de dislocación cervical.

En la necropsia se obtuvo el tumor, útero y ovarios, además de todos los órganos que podían ser diana de metástasis a distancia (biopsia peritoneal, ganglios linfáticos mesentéricos, pélvicos y paraaórticos, bazo y páncreas, hígado, riñones, pulmones y diafragma). Seguidamente, se guardaron todas las muestras en *cassettes* identificados y se introdujeron en una solución de formaldehído al 3,7% en agua para su fijación y posterior procesamiento (Figura 15).

## MATERIAL Y MÉTODOS



**Figura 15. Imágenes de la necropsia y obtención del tumor primario y órganos. A:** Apertura de cavidad abdominal para realización de la necropsia. Se identifica tumor primario, superficie hepática e intestino. **B:** Detalle del útero del modelo con tumor primario de 2 cm. **C:** Imagen de los *cassettes* donde se almacenaron las muestras clasificadas por tumor primario y órganos diana de las posibles metástasis.

### 2.5. Procesamiento de las muestras

#### 2.5.1. Tinciones de hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica

Las muestras recogidas en la necropsia fueron fijadas durante 48h en paraformaldehido al 3,7%, parafinadas y cortadas en secciones de 4  $\mu\text{m}$  para realizar las tinciones con hematoxilina eosina. La inmunohistoquímica de los distintos neuroreceptores se realizó de forma similar a las muestras de pacientes según la metodología del apartado 1.2.4.

#### 2.5.2. Análisis y cuantificación de la expresión de los neuroreceptores

Finalmente se realizó en análisis de la expresión de los neuroreceptores en los tumores de los ratones con el programa *Image J* de forma análoga al tejido tumoral de las muestras de pacientes descrita en el apartado 1.2.5.

## 2.6. Análisis estadístico

Los valores de las variables cuantitativas de los modelos animales se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Se realizó la prueba de Mann-Whitney para la comparación estadística utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0 con una p valor  $<0.05$ . Antes de analizar los datos con la prueba respectiva, se realizó un estudio de normalidad con el test de Shapiro-Wilk. Para analizar la probabilidad de la existencia de diferencias entre dos grupos en relación a una variable categórica (por ejemplo, número de ratones con presencia o ausencia de metástasis pulmonares en dos grupos), se realizaron tablas de contingencia y se aplicó el test de Fisher.

Las diferentes asociaciones del patrón de expresión de los receptores catecolaminérgicos  $ADR\beta_2$ ,  $DRD1$  y  $DRD2$  en los tumores generados y su asociación con las variables histopatológicas y supervivencia se realizaron según la metodológica referida en el apartado 1.3. El asterisco indica que los valores son significativamente diferentes (\*) p valor  $< 0,05$ ; (\*\*) p valor  $\leq 0,01$ ; (\*\*\*) p valor  $\leq 0,001$ .

## 3. Experimentación *in vitro* con líneas celulares de cáncer de endometrio

### 3.1. Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares HEC1A y AN3CA

En la experimentación *in vitro*, se seleccionaron dos líneas celulares comerciales y representativas de cáncer de endometrio cuyas características se resumen en la **Tabla 7**.

La línea tumoral HEC1A se cultivó en medio que contenía DMEM 1 g/L de glucosa. AN3CA se cultivó en medio DMEM 1g/L glucosa y F12 (50v:50v). Todos los medios de cultivo se suplementaron con 10% FBS (gibco; 10270-106), 1% (Penicilina/Streptomicina) (gibco; 15140-122), 1% Glutamina (gibco; 25030-024) y 0,2% Anfotericina (gibco; 15290-026). Todas las líneas tumorales se mantuvieron en cultivo en un incubador a 37°C de temperatura y a un 95% y 5% de presión parcial de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente.

Las dos líneas tumorales son células de crecimiento en adhesión, por lo que, para manipularlas (ampliar su cultivo a un nuevo flascón, sembrarlas para los experimentos o congelarlas) se retiró el medio, se realizó un lavado con PBS atemperado y se añadieron, en flascos de 75 cm<sup>2</sup>, 3 ml de tripsina (0,05% Trypsin-EDTA, Life Technologies).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las células fueron incubadas a 37°C durante 2-7 min dependiendo de la línea, tras los cuales se desprendieron y fueron resuspendidas en medio completo. Luego, se centrifugaron durante 5 min a 400 g y el pellet se resuspendió homogéneamente en medio completo para su siembra o pase, o bien en 1 ml de una solución de FBS con 10% de dimetildulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) para su congelación en criotubos a -80°C o en tanques de nitrógeno líquido.

Para usar células congeladas, los criotubos fueron introducidos en un baño a 37°C para su descongelación rápida. Una vez descongeladas, fueron homogeneizadas mediante pipeteos suaves (1 min), resuspendidas en medio completo específico de cada línea y sembradas en un flascón de 75 cm<sup>2</sup> de superficie.

Para el conteo de células en suspensión estas se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 min y el pellet obtenido se reconstituyó en 1 ml de medio. Se mezclaron 12,5 µl de solución celular con la misma cantidad de una solución de Tripán Blue 0,4% y una alícuota (12,5 µl) de la mezcla se añadió a una "counting slide" (BIORAD). Seguidamente, se hizo la lectura en el equipo TC Automated Cell Counter 2.058 (BIORAD), obteniendo el número de células viables (células vivas).

### **3.2. Expresión de los receptores ADR $\beta$ 1,2,3 y DRD1-5 en las líneas celulares HEC1A y AN3CA**

Los niveles de expresión de los distintos receptores se cuantificaron y analizaron utilizando el mismo procedimiento que se describe en el apartado 1.2.3. Excepto que la expresión de cada gen se normalizó mediante el valor de la expresión endógena constitutiva del gen *GADPH* mediante el método  $\Delta$ Ct.

### **3.3. Evaluación del efecto de los neurotransmisores NA, A, DA sobre la proliferación de las líneas celulares HEC1A y AN3CA**

En estas líneas tumorales se evaluó, inicialmente, el efecto de los principales neurotransmisores del SNS (NA, A, DA) sobre la capacidad de proliferación celular.

Para realizar el ensayo, las células se levantaron, se contaron y se sembraron mediante una pipeta multicanal en una placa de 96 pocillos y a una concentración final de 5000 células/ml. Tras 24h de incubación, se expusieron a distintas concentraciones de neurotransmisores (0-100µM) durante 48h. Los neurotransmisores se prepararon a una concentración de 10mM en agua y se guardaron a -20°C para su utilización en los distintos experimentos.

La proliferación celular se midió utilizando el kit comercial *Cell Proliferation Kit II* (XTT, 11465007001 Roche). Se añadieron 50 µl de reactivo XTT por pocillo. Este reactivo se preparó combinando dos soluciones que contenía el kit, la “*XTT labeling reagent*” y la “*Electron Coupling Reagent*” en una proporción de 5:0,1 ml respectivamente. Tras echar el reactivo, la placa se dejó en el incubador a 37°C durante 4 horas. Pasado este tiempo, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas (Infinite M200 PRO, TECAN).

### **3.4. Evaluación del efecto de la neuromodulación dopaminérgica selectiva sobre la proliferación de las líneas celulares HEC1A y AN3CA y del efecto de la combinación en la línea celular AN3CA**

El estudio del efecto de los agonistas y antagonistas selectivos para DRD1 y DRD2 sobre la proliferación celular en las células HEC1A y AN3CA se evaluó utilizando el mismo ensayo que en el apartado anterior. Las células se levantaron, contaron y sembraron a una concentración final de 5000 células/ml. Tras 24h de incubación, se expusieron a distintas concentraciones (0-100µM) de dos agonistas selectivos: Fenoldopam (DRD1) y Pergolide (DRD2) y de dos antagonistas: LE 311 (DRD1) y Domperidona (DRD2) durante 48h. En un ensayo independiente, se evaluó, además, el efecto combinado del agonismo sobre DRD1 (fenoldopam) y el antagonismo sobre DRD2 (domperidona) respecto al tratamiento único en la línea tumoral AN3CA. Los agonistas y antagonistas se prepararon a una concentración de 10mM en agua y/o DMSO y se guardaron a -20°C para su utilización posterior. La proliferación celular se midió utilizando la XTT a las 4 horas desde la adición del reactivo y se leyó la absorbancia a 450 nm en el lector de placas.

### **3.5. Análisis estadístico**

El análisis de las diferencias entre grupos se realizó evaluando, en primer lugar, la normalidad de la muestra mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En el caso de normalidad de los datos se utilizó la prueba paramétrica de la t de Student (para dos grupos) o ANOVA (más de dos grupos). Cuando la distribución no fue normal, se emplearon los tests no paramétricos: la prueba de Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney para comparar las medias de los valores de más de dos grupos o dos grupos, respectivamente. Las diferencias se consideraron significativas para una p valor < 0,05. El asterisco indica que los valores son significativamente diferentes (\*) p valor < 0,05; (\*\*) p valor ≤ 0,01; (\*\*\*) p valor ≤ 0,001.

## IV. RESULTADOS



## IV. RESULTADOS

### 1. Características de las pacientes incluidas en el estudio y evaluación de la asociación entre las variables clínico-patológicas y la supervivencia

#### 1.1. Estadística descriptiva de las variables demográficas y clínico-patológicas

Inicialmente se recopilaban un total de 120 muestras de pacientes. De todas ellas, 4 fueron excluidas del estudio por pérdida de seguimiento y falta de datos clínicos de la paciente y 5 por no presentar condiciones óptimas para el análisis. La serie final de casos seleccionados con las respectivas muestras histológicas incluyó un total de 109 pacientes con diagnóstico de CE. En la **tabla 11** se muestra la estadística descriptiva de las variables demográficas y clínico-patológicas evaluadas en el estudio.

En la población de estudio, la edad media al diagnóstico fue de 68,9 años, con un rango de 37 a 94 años. Desde el punto de vista histológico, un 73,4% de pacientes, presentaron un carcinoma de tipo endometriode, mientras que un 26,6% fueron diagnosticadas de un carcinoma no endometriode. Específicamente, 14 pacientes presentaron un tumor seroso, 7 pacientes un tumor de células claras y 8 pacientes un adenocarcinoma de tipo mixto. En cuanto al grado histológico y siguiendo criterios de la FIGO, se identificaron un 44,9% de tumores de tipo 1-2 y un 55,1% de tumores de grado 3. El tamaño medio del tumor de la serie fue de 3,77 cm con un rango entre 0,1 cm y 10 cm en su dimensión máxima. Agrupándolos, 24 casos (22%) fueron menores o iguales de 2cm y 85 casos (78%) mayores de 2 cm. Según la clasificación FIGO, la mayor parte de los casos diagnosticados (77,9% de pacientes) correspondían a un estadio inicial; entre ellos 81 pacientes con un estadio I y 4 pacientes con un estadio II. El resto de las pacientes de la serie (22,1%) presentaron un estadio avanzado con 20 pacientes diagnosticadas en estadio III y 4 pacientes en estadio IV.

En relación a las variables de seguimiento, la media de seguimiento de la serie fue de  $48 \pm 30$  meses. Un total de 22,9% de pacientes (25 casos) presentaron recidiva y un 33,9% de pacientes (37 casos) fallecieron durante el periodo de seguimiento. Entre las pacientes fallecidas, la causa de muerte debido a la enfermedad incluyó el 20,2 %, mientras que en el restante 13,7 % de casos, la muerte se asoció a otras causas siendo la más frecuente la de origen cardiovascular. La SLE media de la población de estudio fue 91,4 meses (valor mínimo-máximo: 6,9-123 meses) y la SG media fue de 86,6 meses (valor mínimo-máximo: 2-124 meses).

## RESULTADOS

**Tabla 11. Características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de endometrio.**

Características	Resultados
<b>Edad (años) (media) (SD; min-max)</b>	68,9 (12,3; 37-94)
<b>Histología (N,%)</b>	
Carcinoma endometrioide	80 (73,4)
Carcinoma no endometrioide	29 (26,6)
Carcinoma seroso	14
Carcinoma de células claras	7
Carcinoma mixto	8
<b>Grado histológico (N,%)</b>	
1-2	49 (44,9)
1	28
2	21
3	60 (55,1)
<b>Tamaño tumor (cm) (media) (SD; min-max)</b>	3,77 (2,2; 0,1-10)
<b>Estadio (FIGO) (N,%)</b>	
Inicial I-II	85 (77,9)
I	81
II	4
Avanzado III-IV	24 (22,1)
III	20
IV	4
<b>Recurrencia (N,%)</b>	
Sí	25 (22,9)
No	84 (77,1)
<b>Mortalidad (N,%)</b>	37 (33,9)
Por cáncer de endometrio	22 (20,2)
Por otras causas	15 (13,7)
<b>Supervivencia libre de enfermedad (meses) (media) (SD; min-max)</b>	91,4 (5,02; 6,9-123)
<b>Supervivencia global (meses) (media) (SD; min-max)</b>	86,6 (4,91; 2-124)

## 1.2. Estudio de la asociación entre las variables clínico-patológicas y la supervivencia

A fin de conocer la relación entre las variables clínico-patológicas evaluadas y la supervivencia de la serie de pacientes se realizó un análisis univariante. En la **tabla 12** se muestran los resultados obtenidos respecto a la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global (SG) en las 109 pacientes incluidas en la serie.

En el estudio de la SLE, el tipo y grado histológico y el estadio presentaron significación estadística y por tanto se asociaron con un valor pronóstico. En el tipo histológico se identificó un aumento de riesgo de recidiva del subtipo no endometriode respecto al endometriode (HR 5,21, IC 95% 2,22-12,23). De forma similar, en el grado histológico se observó que el grupo de tumores con grado 3 presentaban menor SLE que los tumores de grado 1-2, con valores de HR 6,39, IC 95% 1,89-21,63. Por último, el estadio IV también mostró un aumento significativo del riesgo en referencia a las pacientes en estadio I (HR 15,16, IC 95% 4,82-47,63).

En relación con la SG, la variable edad mostró un mayor riesgo (HR 1,06, IC 95% 1,02-1,09), al igual que la histología, en la que se observó un incremento en la mortalidad en el subtipo no endometriode (HR 3,69, IC 95% 1,93-7,03) frente al endometriode y de forma análoga a lo que ocurrió con el grado histológico; donde los tumores con grado 3 presentaron un aumento del riesgo (HR 3,16, IC 95% 1,49- 6,71) frente al grado 1-2. La variable tamaño tumoral fue estudiada tanto de forma continua como estratificada por el límite de 2 cm. En este caso solo se identificaron diferencias significativas en el primer análisis (HR 1,18, IC 95% 1,01-1,38). Por último, los factores estadio IV respecto el estadio I (HR 13,95, IC 95% 4,60-42,27) y la presencia de recidiva (HR 5,11, IC 95% 2,63-9,91) se asociaron significativamente a menores SG en nuestra serie de pacientes.

En el caso de la variable edad, se evaluó inicialmente como variable continua y a posteriori, se intentó encontrar un punto de corte óptimo para categorizarla que resultó 73 años tanto para la SLE (HR 5,07 IC 95% 1,03-2,48; p valor <0,0001) como para SG (HR 2,31 IC 95% 0,98-5,41; p valor 0,0539).

## RESULTADOS

**Tabla 12. Resultados del análisis univariante de la asociación entre las variables clínico-patológicas y la supervivencia en las pacientes incluidas en el estudio.**

Variable clínica	Supervivencia Libre de Enfermedad		Supervivencia Global	
	HR (IC 95%)	p valor	HR (IC 95%)	p valor
<b>Edad</b>	1,02 (0,98-1,08)	0,216	1,06 (1,02-1,09)	0,000211*
<b>Histología</b> C. Endometriode C. No endometriode	5,21 (2,22-12,23)	0,000147*	3,69 (1,93 -7,03)	0,0000741*
<b>Grado histológico</b> Grado 1-2 Grado 3	6,39 (1,89-21,63)	0,00285*	3,16 (1,49- 6,71)	0,00265*
<b>Tamaño tumor</b>	1,17 (0,97-1,42)	0,993	1,18 (1,01-1,38)	0,029*
<b>Tamaño tumor</b> ≤2cm >2cm	0,49 (0,14-1,61)	0,257	0,56 (0,23- 1,36)	0,204
<b>Estadio</b> Estadio I Estadio II Estadio III Estadio IV	15,16 (4,82-47,63)	0,00000324*	13,95 (4,60 -42,27)	0,00000316*
<b>Recidiva</b> No Sí	-	-	5,11 (2,63- 9,91)	0,00000132*

Abreviaturas: [HR]: "hazard ratio" o tasa de riesgo de muerte o recidiva; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; (\*) diferencias estadísticamente significativas tras aplicar el modelo univariante.

## 2. Estudio de la asociación entre los niveles de expresión de los receptores beta-adrenérgicos y las variables clínico-patológicas

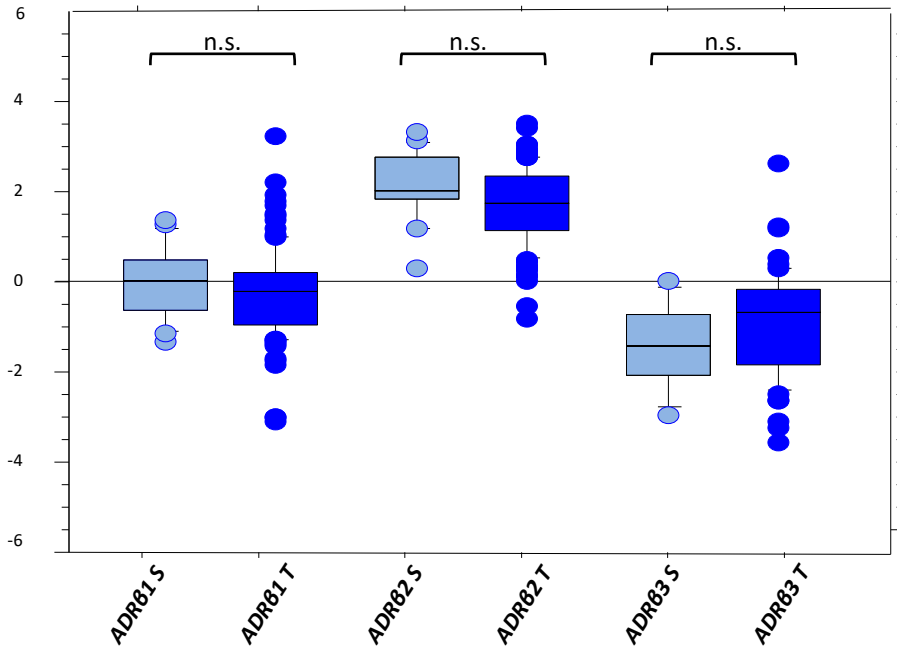
### 2.1. Comparativa de la expresión de receptores adrenérgicos en tejido endometrial sano y tumores de cáncer de endometrio

#### 2.1.1. Expresión génica de los subtipos de receptores adrenérgicos $\beta_1$ , $\beta_2$ , $\beta_3$

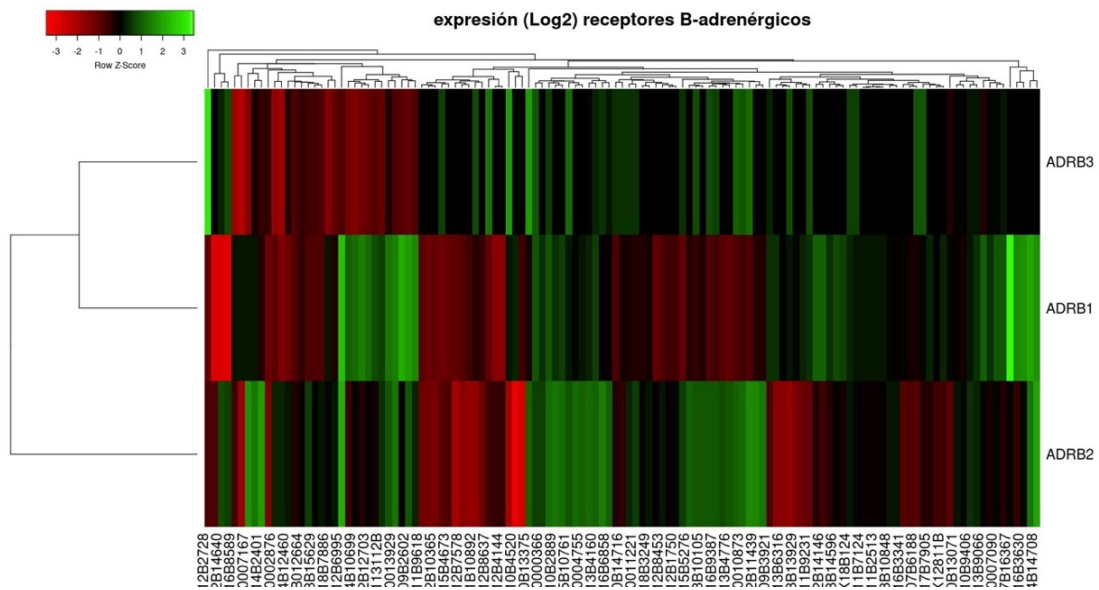
Para determinar la presencia y expresión de los receptores beta adrenérgicos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , evaluamos los niveles de ARNm de los distintos subtipos por RT-qPCR mediante el sistema *Taqman Gene Expression Assay* (TLDA). Los tres subtipos se detectaron en la mayoría de las muestras tumorales. El receptor *ADRB1* se expresó en el 97,2% de las pacientes mientras que *ADRB3* se detectó en el 54,12% del total. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las muestras de tejido endometrial sano y tejido tumoral para ninguno de los dos receptores (*ADRB1* T:  $0,81 \pm 2,20$ , S:  $0,96 \pm 1,83$ ; p valor 0,388) (*ADRB3* T:  $0,48 \pm 2,48$ , S:  $0,33 \pm 2,10$ ; p valor 0,188). En el caso del receptor *ADRB2*, se expresó en la totalidad (100 %) de las muestras tumorales de las pacientes evaluadas. La media de expresión en tejido tumoral fue  $3,62 \pm 1,91$  frente a  $4,65 \pm 1,92$  en tejido endometrial sano, no mostrando, diferencias estadísticamente significativas (p valor 0,244) entre estos grupos al igual que ocurría con *ADRB1* y *ADRB3* (**Figura 16**).

Para la visualización de la expresión génica se realizó un *HeatMap* basado en un análisis no supervisado de *cluster* o agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) agrupando las muestras de tejido endometrial sano y las muestras de tumores endometriales por el perfil de expresión de los  $ADR\beta$  (*ADRB1*, *ADRB2* y *ADRB3*). Este tipo de matriz 2D usa la expresión de cada gen para cada muestra alineándolo a un rango de colores para mostrar el nivel de los diferentes genes transcritos (localizados en las filas) en relación con las columnas o muestras estudiadas. En la **figura 17** podemos observar dos tipos de patrones de expresión significativamente diferentes, el primero formado por los genes *ADRB1* y *ADRB3* y de forma separada el gen *ADRB2*.

## RESULTADOS



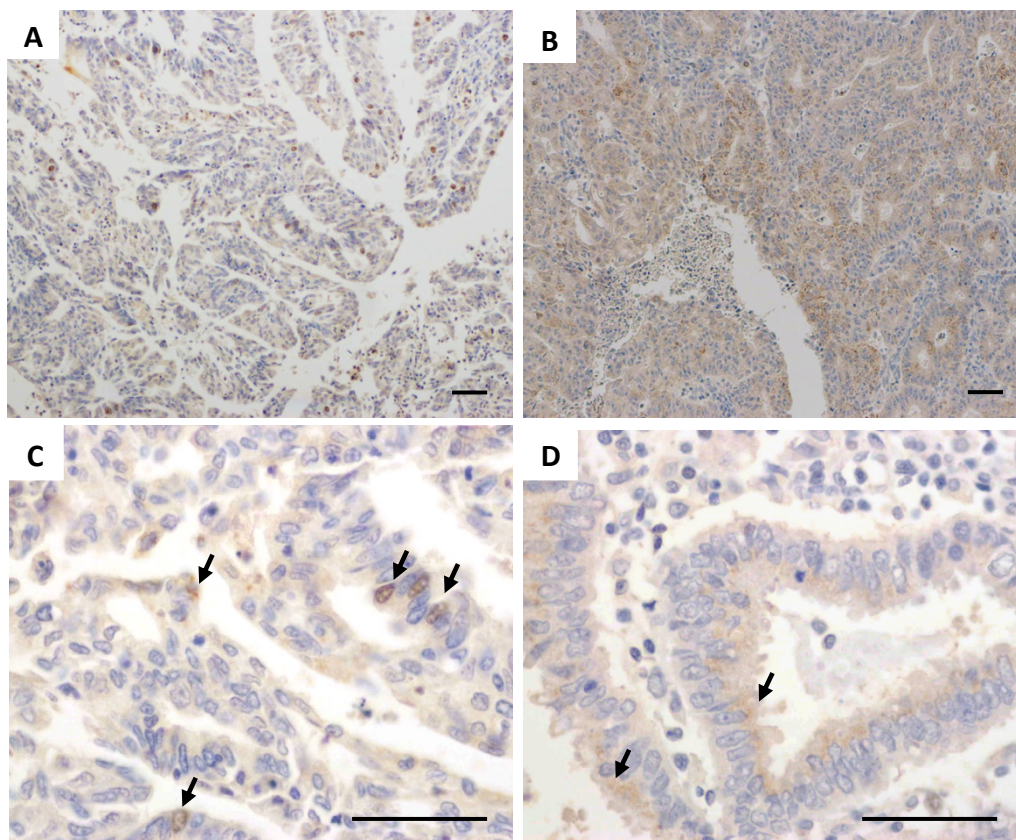
**Figura 16.** Expresión de ARNm de los subtipos de ADR $\beta$  en muestras de tejido endometrial sano y tumoral. Valores expresados en escala logarítmica. Test estadístico: ANOVA. Abreviaturas: n.s.: no significancia estadística; (S): Tejido endometrial sano; (T): Tejido tumoral.



**Figura 17.** Mapa de color (*HeatMap*) de la expresión génica de ADR $\beta$ 1, ADR $\beta$ 2 y ADR $\beta$ 3 en muestras de tejido endometrial sano y tumoral. Valores expresados en escala logarítmica y agrupados jerárquicamente en *cluster*.

### 2.1.2. Expresión de los niveles de ADR $\beta$ 2 por inmunohistoquímica

Evaluamos mediante inmunohistoquímica (IHQ) la expresión proteica del receptor ADR $\beta$ 2 en tejido endometrial sano y en muestras tumorales de CE obtenidos de las pacientes seleccionadas para este estudio. A partir de la cuantificación de la Intensidad y del porcentaje de área de tinción en cada muestra se calculó el parámetro H-Score; índice que informa del valor de expresión global del receptor. El patrón de expresión celular de ADR $\beta$ 2 fue predominantemente de membrana plasmática, aunque también se identificó tinción a nivel del citoplasma celular (**Figura 18**). El análisis comparativo de los niveles de expresión de ADR $\beta$ 2 entre tejido sano y tejido tumoral mostró diferencias estadísticamente significativas tanto en el parámetro Intensidad (p valor 0,0484) como en H-Score (p valor 0,0206) a favor de una reducción de la expresión en tejido tumoral frente al tejido endometrial sano (**Tabla 13, Figura 19**).



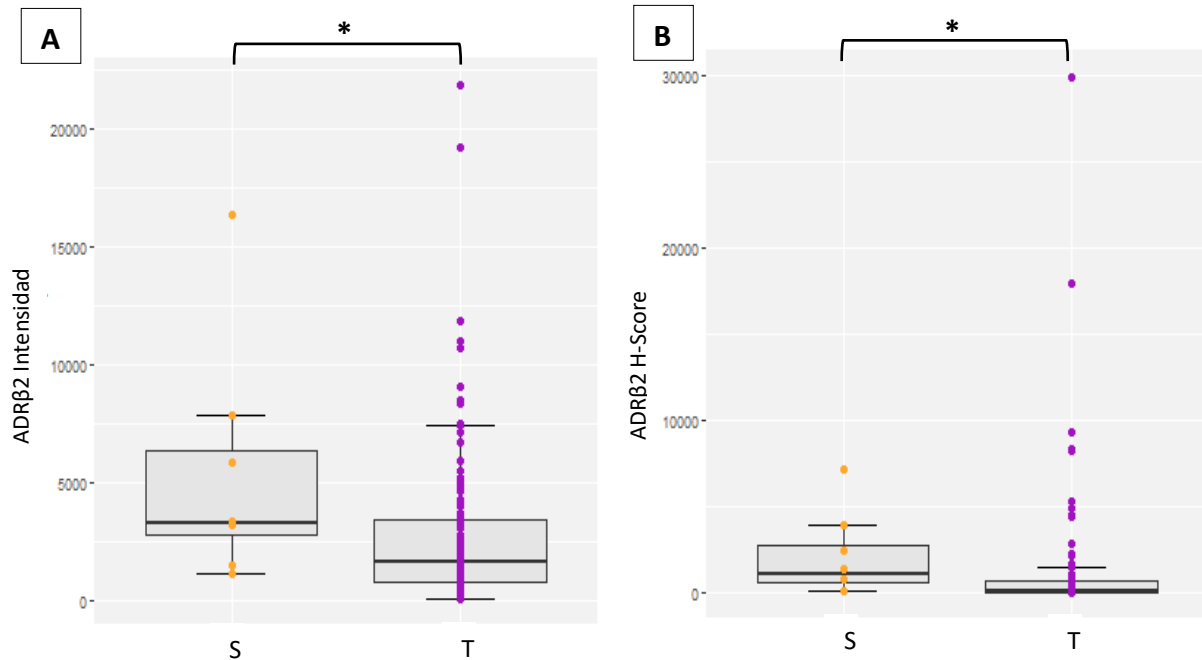
**Figura 18.** Imágenes microscópicas representativas de la tinción inmunohistoquímica de ADR $\beta$ 2 en las muestras tumorales. Inmunotinción A,C. Moderada y B,D. Alta. Barra: 100  $\mu$ m. Flechas: Patrón de expresión celular.

## RESULTADOS

**Tabla 13. Valores de Intensidad y de H-Score para la expresión de ADR $\beta$ 2 en tejido endometrial sano y tejido tumoral evaluada por inmunohistoquímica.**

Receptor	Intensidad			H-Score		
ADR $\beta$ 2	Mediana	RIQ	p valor	Mediana	RIQ	p valor
Tejido endometrial sano	3304,8	3572,1	0,0484*	1080,4	2199,4	0,0206*
Tejido tumoral	1682,4	2655,1		121,0	662,1	

Abreviaturas: RIQ: Rango intercuartílico; (\*) diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 19. Niveles de expresión de ADR $\beta$ 2 en muestras de tejido endometrial sano y tumoral. Valores de A: Intensidad. B: H-Score. Abreviaturas: (S): Tejido endometrial sano; (T): Tejido tumoral; (\*): p < 0,05.**



## 2.2. Estudio de la asociación entre la expresión de ADR $\beta$ 2 y las variables clínico-patológicas

A continuación, estudiamos la relación entre la expresión de ADR $\beta$ 2 y los factores clínico-patológicos más relevantes en cáncer de endometrio. En la **tabla 14** se muestra los resultados obtenidos. La expresión de estos receptores se cuantificó en términos de Intensidad y de H-Score expresando el valor de la mediana y RIQ para cada variable.

Los niveles de expresión de ADR $\beta$ 2 no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos subtipos histológicos de cáncer de endometrio, entre el grado histológico, el tamaño tumoral ni el estadio inicial versus avanzado.

**Tabla 14. Análisis de la asociación entre las variables clínico-patológicas y los niveles de expresión de ADR $\beta$ 2.**

ADR $\beta$ 2	Intensidad			H-Score		
Variable clínica	Mediana	RIQ	p valor	Mediana	RIQ	p valor
<b>Histología</b>	1835,8	2713,3	0,4344	204,6	582,4	0,358
C. Endometriode C. No endometriode	1596,8	2611,3		88,7	690,6	
<b>Grado histológico</b>	2012,1	2313,2	0,463	217,1	408,5	0,3656
Grado 1-2 Grado 3	1621,0	3212,3		92,3	737,8	
<b>Tamaño tumor</b>	2505,9	3478,3	0,3438	369,9	995,6	0,3912
$\leq$ 2cm >2cm	1645,2	2523,4		107,9	380,4	
<b>Estadio</b>	1730,5	2655,1	0,783	192,1	662,1	0,4752
Estadio I-II Estadio III-IV	1638,1	2649,8		93,2	577,9	

Abreviaturas: RIQ: rango intercuartílico.

## RESULTADOS

### 2.3. Análisis de los niveles de expresión de ADR $\beta$ 2 y su asociación con la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global

Se realizó un análisis estadístico univariante para determinar si la expresión de ADR $\beta$ 2 estaba asociada a la SLE o a la SG en la serie de pacientes analizada. Inicialmente se estableció un punto de corte óptimo para categorizar la variable Intensidad, resultando 3723,9 y 233,2 para la SLE y la SG respectivamente. De la misma forma también se estableció para el parámetro H-Score, siendo 888,4 y 23,2 para la SLE y SG respectivamente. Tras el análisis, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas por lo que se determinó que ADR $\beta$ 2 no presenta valor pronóstico en la serie de pacientes evaluada.

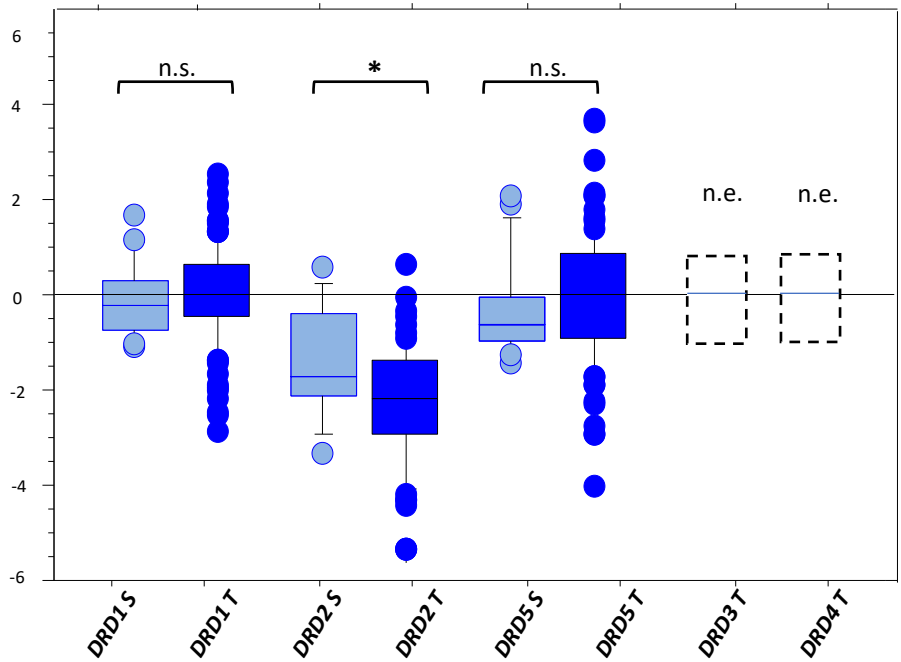
### 3. Estudio de la asociación entre los niveles de expresión de los receptores dopaminérgicos y las variables clínico-patológicas

#### 3.1. Comparativa de la expresión de receptores de dopamina en tejido endometrial sano y tumores de cáncer de endometrio

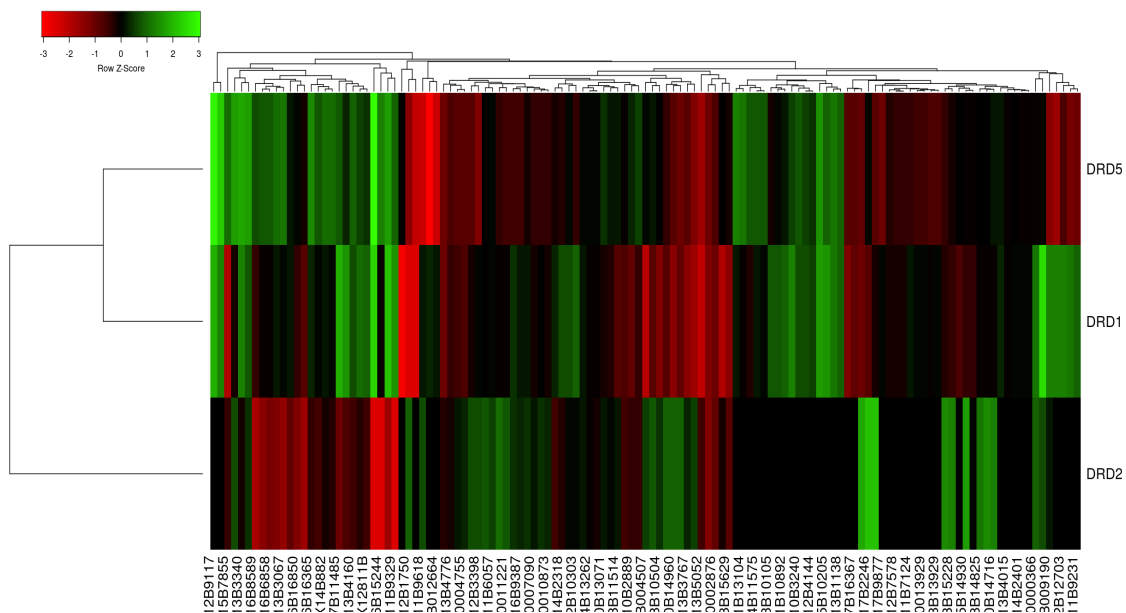
##### 3.1.1. Expresión génica de los subtipos de receptores de dopamina DRD1-DRD5

Evaluamos la expresión génica, a nivel de ARNm, de los distintos subtipos de receptores de dopamina *DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *DRD4* y *DRD5*, mediante TLDA (**Figura 20**).

Mientras que se observó expresión de los subtipos *DRD1*, *DRD2* y *DRD5*; los subtipos *DRD3* y *DRD4* no se expresaron en ninguna de las muestras analizadas. La expresión de *DRD1* se identificó en el 98,15% de muestras tumorales y en el 100% de las muestras de tejido sano. La media de expresión de ARNm para *DRD1* no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p valor 0,565), siendo los valores en tumor de  $1,08 \pm 2,17$  y de  $0,87 \pm 1,62$ , en tejido endometrial sano. En relación al subtipo *DRD5*, se detectó en prácticamente la totalidad de las muestras tumorales (92,59%). Al igual que *DRD1*, los niveles de expresión no mostraron diferencias significativas (p valor 0,709) entre ambos grupos, siendo la media de expresión en tejido tumoral y tejido endometrial de  $0,61 \pm 2,72$  y  $0,18 \pm 2,11$  respectivamente. Respecto a *DRD2*, se observó presencia de ARNm en el 62,96% de las muestras de tumor. La media de expresión de ARNm fue significativamente menor (p valor 0,0298) en tumor ( $0,17 \pm 2,62$ ) respecto a tejido endometrial sano ( $0,33 \pm 2,42$ ).



**Figura 20. Expresión de ARNm de los subtipos de receptores dopaminérgicos en muestras de tejido endometrial sano y tumoral.** Valores expresados en escala logarítmica. Test estadístico: ANOVA. Abreviaturas: n.s.: no significancia estadística; n.e.: no expresión; (S): Tejido endometrial sano, (T): Tejido tumoral; (\*) Diferencias estadísticamente significativas  $p < 0,05$ .



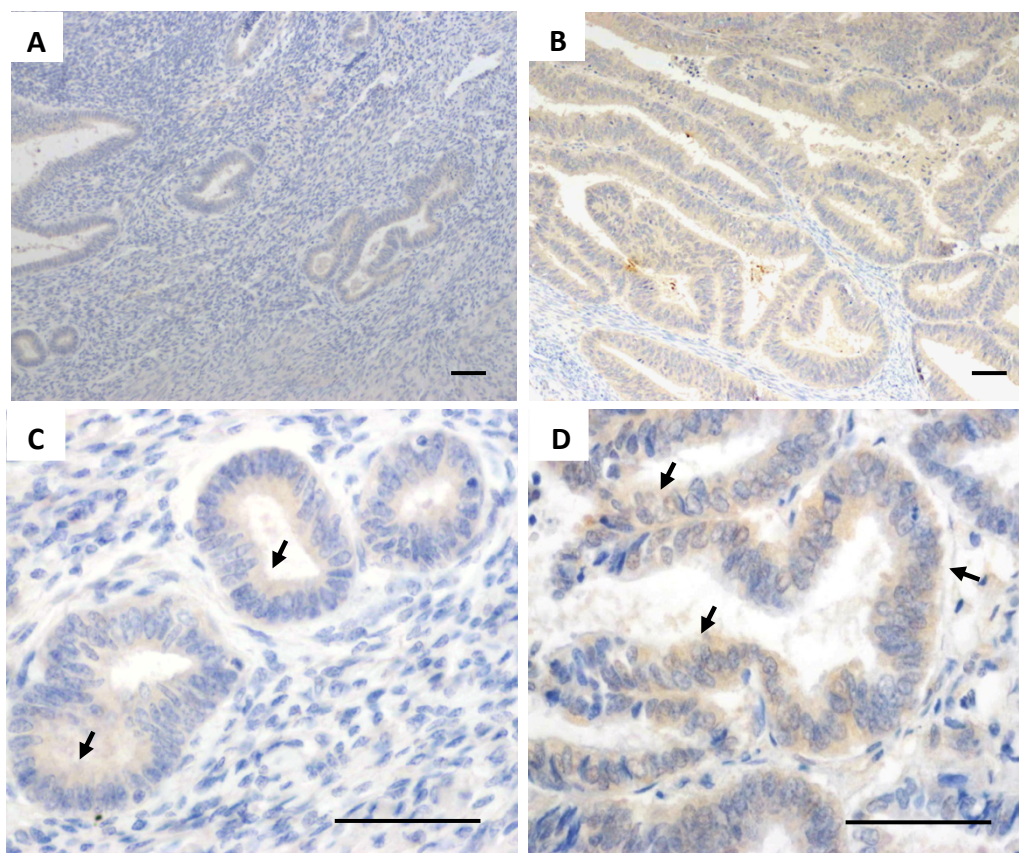
**Figura 21. Mapa de color (HeatMap) de la expresión génica de los receptores DRD1, DRD2 y DRD5 en muestras en muestras de tejido endometrial sano y tumoral.** Valores de expresión en escala logarítmica y agrupados jerárquicamente en *cluster*.

## RESULTADOS

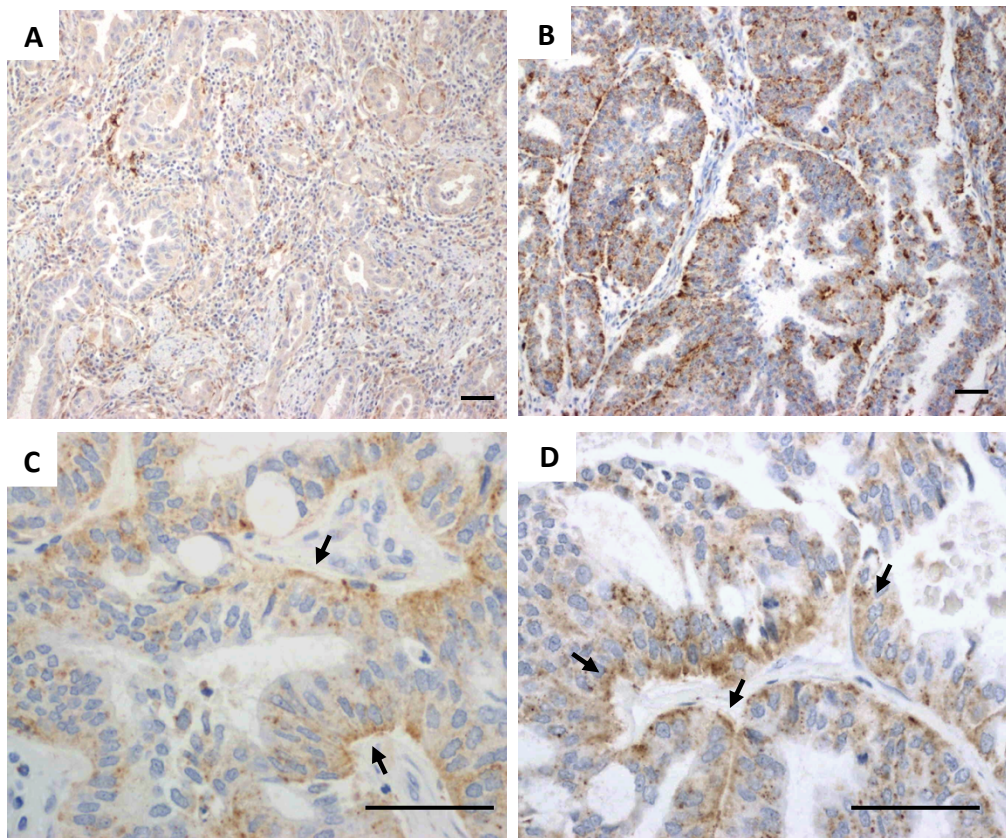
De forma similar a los ADR $\beta$  se realizó un *HeatMap* basado en un análisis no supervisado de *cluster* o agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) alineando las muestras de tejido endometrial sano y los tumores endometriales por el perfil de expresión de los receptores dopaminérgicos (*DRD1*, *DRD2* y *DRD5*). Las muestras se agruparon en dos *subclusters* distintos dependiendo de la similitud entre perfiles. Tal y como se observa en la **figura 21**, *DRD1* y *DRD5*, pertenecientes a la subfamilia D1 muestran un patrón de expresión muy similar y sin diferencias significativas entre ellos, mientras que *DRD2* presenta un patrón de expresión diferente significativamente a los primeros.

### 3.1.2. Expresión de los niveles de *DRD1* y *DRD2* por inmunohistoquímica

A continuación, se realizó una evaluación por parte de un patólogo experto, de la expresión de los receptores *DRD1* y *DRD2*, mediante tinción inmunohistoquímica, en las muestras tumorales de CE y en las muestras de tejido endometrial sano (**Figura 22 y 23**).



**Figura 22.** Imágenes microscópicas representativas de la tinción inmunohistoquímica de *DRD1* en tumores de CE. Inmunotinción A, C. Moderada y B,D. Alta. Barra: 100  $\mu$ m. Flechas: Patrón de expresión celular.



**Figura 23.** Imágenes microscópicas representativas de la tinción inmunohistoquímica de DRD2 en tumores de CE. Inmunotinción. A,C. Moderada y B,D. Alta. Barra: 100  $\mu$ m. Flechas: Patrón de expresión celular.

La expresión proteica de DRD1 mostró una reducción estadísticamente significativa tanto en el valor de Intensidad (p valor 0,0002) como de H-Score (p valor 0,0002) en el tejido tumoral (**Tabla 15, Figura 24**). El patrón de tinción celular de DRD1 fue de membrana plasmática y citoplasma, siendo homogénea en toda el área celular y tumoral.

El análisis de la expresión de DRD2 en muestras de tejido tumoral y de tejido endometrial sano no mostró diferencias significativas en ninguno de los parámetros de expresión calculados, a pesar de que en tejido tumoral los valores de la mediana están incrementados con respecto al tejido sano (**Tabla 15, Figura 25**). La tinción positiva se localizó en la membrana plasmática de las células tumorales y en un porcentaje menor en el citoplasma, teniendo un patrón muy focalizado a modo de *clusters*.

## RESULTADOS

Tabla 15. Valores de Intensidad y de H-score para la expresión de DRD1 y DRD2 en tejido endometrial sano y tejido tumoral evaluada por inmunohistoquímica.

Receptor	Intensidad			H-Score		
	Mediana	RIQ	p valor	Mediana	RIQ	p valor
<b>DRD1</b>						
Tejido endometrial sano	42459,3	11143,007	0,0002*	526378,5	695190,254	0,0002*
Tejido tumoral	2299,1	17517,107		253,2	23212,66	
<b>DRD2</b>						
Tejido endometrial sano	5504,1	7590,1	0,6108	1873,4	2816,32	0,1272
Tejido tumoral	6529,3	13937,6		5839,7	53899,339	

Abreviaturas: RIQ: rango intercuartílico; (\*) Diferencias estadísticamente significativas  $p < 0,05$ .

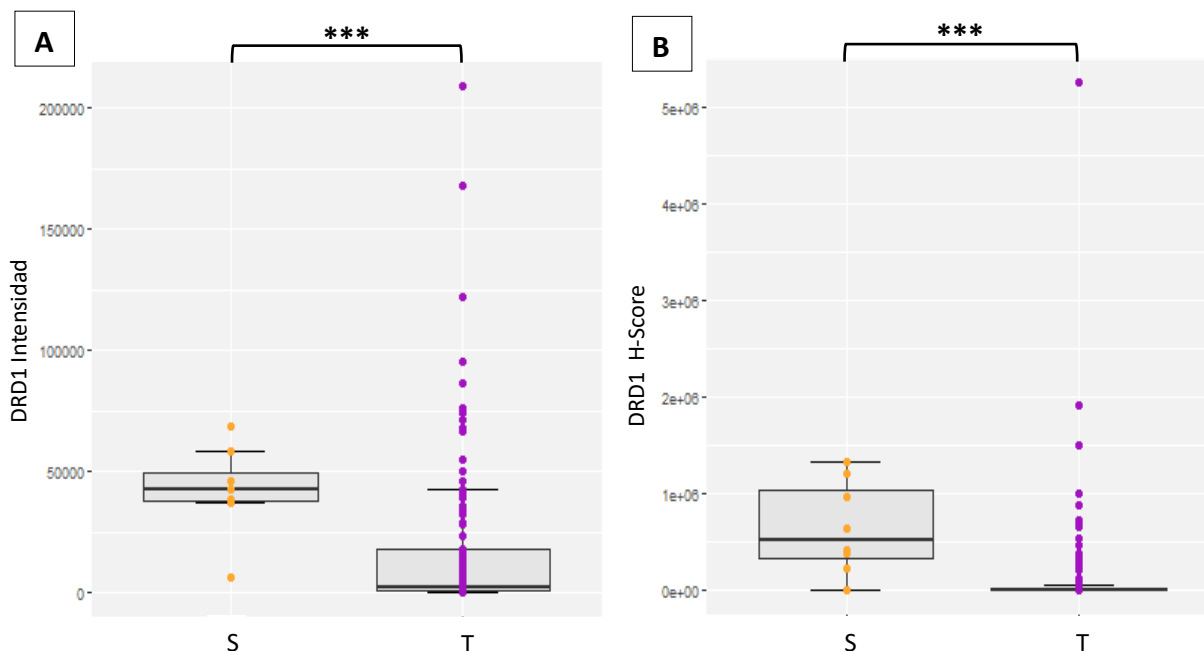
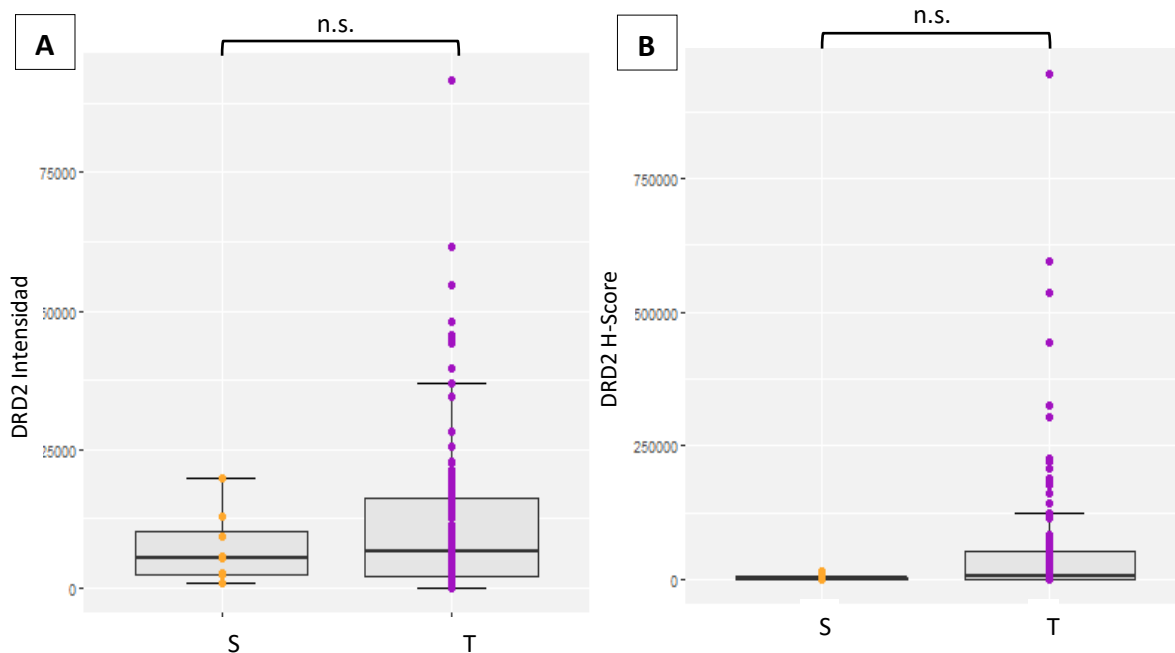


Figura 24. Niveles de expresión de DRD1 en muestras de tejido endometrial sano y tumoral. Valores de A: Intensidad. B: H-Score. Abreviaturas: (S): Tejido endometrial sano; (T): Tejido tumoral; (\*\*\*) :  $p \leq 0,001$ .



**Figura 25. Niveles de expresión de DRD2 en muestras de tejido endometrial sano y tumoral.** Valores de **A**: Intensidad. **B**: H-Score. Abreviaturas: n.s.: no significancia estadística; (S): Tejido endometrial sano; (T): Tejido tumoral.

### 3.2. Estudio de la asociación entre la expresión de DRD1 y DRD2 y las variables clínico-patológicas

A continuación, quisimos estudiar la asociación de la expresión de DRD1 y DRD2 con los factores clínico-patológicos más relevantes en cáncer de endometrio. En la **tabla 16** se muestra los resultados del análisis realizado.

El análisis de la asociación de los niveles de expresión de DRD1 mostró diferencias estadísticamente significativas en el valor de Intensidad (p valor 0,0412 ) y de H-Score (p valor de 0,0284) en la variable tamaño del tumor estratificada ( $\leq 2$ cm vs  $> 2$  cm), asociándose menor expresión de DRD1 en aquellos tumores de mayor tamaño. El resto de variables clínicas evaluadas, en las que se incluían tipo de histología, grado histológico y estadio agrupado, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en nuestra serie de pacientes. Adicionalmente, realizamos un subanálisis de la variable *estadio* dividida en los distintos subgrupos (I-II-III-IV), según los criterios FIGO. Se observó significativamente una menor expresión de DRD1 tanto en Intensidad (p valor de 0,0028) como en H-Score (p valor de 0,0006) en las muestras de pacientes con estadios más avanzados (estadio IV) respecto a los estadios iniciales (estadio I) (**Figura 26**).

## RESULTADOS

Tabla 16. Análisis de la asociación entre las variables clínico-patológicas y los niveles de expresión de DRD1.

DRD1	Intensidad			H-Score		
Variable clínica	Mediana	RIQ	p valor	Mediana	RIQ	p valor
<b>Histología</b> C. Endometriode C. No endometriode	2068,5	24958,9	0,3314	168,7	28735,7	0,2454
	6989,2	13269,6		2268,7	17434,3	
<b>Grado histológico</b> Grado 1-2 Grado 3	3201,1	31595,4	0,825	253,2	35188,7	0,9088
	2071,1	13977,4		324,5	17534,4	
<b>Tamaño tumor</b> ≤2cm >2cm	8106,1	13826,2	0,0412*	2589,1	11072,7	0,0284*
	1883,8	27366,8		146,4	32807,6	
<b>Estadio</b> Estadio I-II Estadio III-IV	4725,2	31726,3	0,0684	1596,4	40328,3	0,0836
	1279,2	6446,1		78,88	2789,1	

Abreviaturas: RIQ: rango intercuartílico; (\*) Diferencias estadísticamente significativas  $p < 0,05$ .

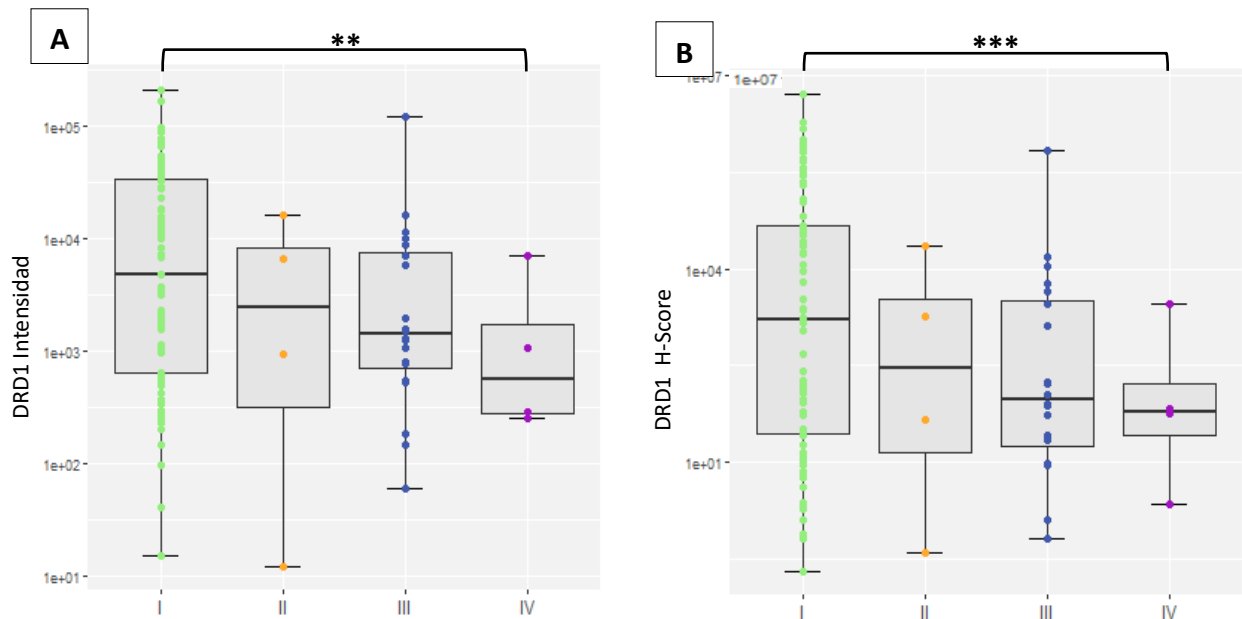


Figura 26. Distribución de los niveles de expresión de DRD1 en los tumores por estadios según criterios FIGO. Valores de A: Intensidad. B: H-Score. (\*\*):  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*):  $p \leq 0,001$ .



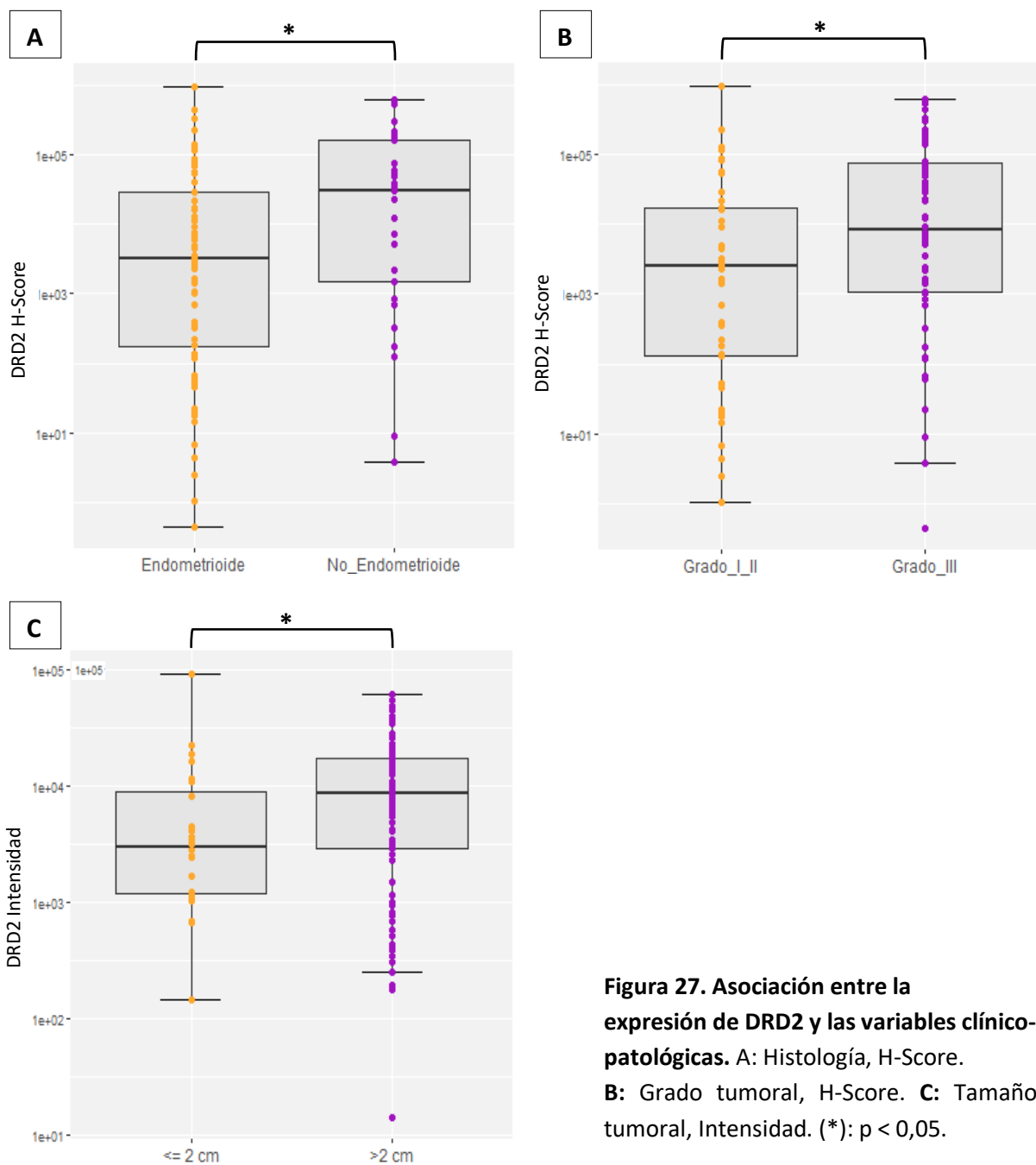
En la **tabla 17** se muestran los resultados de los datos clínico-patológicos asociados a la expresión del receptor dopaminérgico DRD2. En la variable histología, determinada por la mediana de H-Score, se observó un incremento significativo de la expresión de DRD2 en el subtipo no endometriode frente al subtipo endometriode (p valor 0,0488). De forma similar, se observó un aumento significativo de la expresión del receptor en el grado histológico 3 en comparación con el grado 1 y el grado 2 (p valor 0,0384). El tamaño tumoral categorizado con el límite de 2cm, también presentó diferencias, en Intensidad, asociándose el mayor tamaño tumoral a una sobreexpresión del receptor (p valor 0,0126) (**Figura 27**). Por último, en el análisis de la relación del receptor DRD2 con los diferentes estadios tumorales propuestos por la FIGO, no se identificó asociación ni en los valores de Intensidad ni de H-Score.

**Tabla 17. Análisis de la asociación entre las variables clínico-patológicas y los niveles de expresión de DRD2.**

DRD2	Intensidad			H-Score		
Variable clínica	Mediana	RIQ	p valor	Mediana	RIQ	p valor
<b>Histología</b>	5906,8	13165,6	0,1270	3135,1	28181,0	0,0488*
C. Endometriode						
C. No endometriode	10682,8	15171,7		29799,3	159152,7	
<b>Grado histológico</b>	4098,2	9726,6	0,0674	2543,5	17196,4	0,0384*
Grado 1-2						
Grado 3	8710,5	15098,1		8378,4	72127,7	
<b>Tamaño tumor</b>	2959,9	7649,0	0,0126*	1226,3	12554,6	0,0522
≤2cm						
>2cm	8531,8	14216,3		7190,8	67996,7	
<b>Estadio</b>	6540,7	13812,1	0,8542	4572,2	56182,4	0,5996
Estadio I-II						
Estadio III-IV	6382,3	14300,1		6875,5	34617,5	

Abreviaturas: RIQ: rango intercuartílico; (\*) Diferencias estadísticamente significativas p< 0,05.

## RESULTADOS



**Figura 27. Asociación entre la expresión de DRD2 y las variables clínico-patológicas. A: Histología, H-Score. B: Grado tumoral, H-Score. C: Tamaño tumoral, Intensidad. (\*):  $p < 0,05$ .**

### 3.3. Análisis de los niveles de expresión de DRD1 y DRD2 y su asociación con la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global

Para el análisis de la supervivencia, se determinó el punto de corte en la expresión de los receptores para el valor de ‘alta expresión’ mediante un algoritmo estadístico. En SLE el valor límite a partir del cual se determinó alta expresión de DRD1 correspondió a 38954,7 en Intensidad y a 139,2 en el H-Score. En referencia a SG, el valor fue de 247,1 para la Intensidad y 1,9 para el H-Score. En ninguno de los análisis se observaron diferencias estadísticamente significativas que asociaran la expresión del receptor DRD1 con la supervivencia de las pacientes de la serie estudiada (**Tabla 18**).

**Tabla 18. Resultados del análisis univariante de supervivencia para la expresión de DRD1.**

Receptor	Supervivencia Libre de Enfermedad			Supervivencia Global		
	Punto de corte óptimo	HR (IC 95%)	p valor	Punto de corte óptimo	HR (IC 95%)	p valor
DRD1 Intensidad	Baja vs Alta expresión	0,01 (0,02-0,8)	0,997	Baja vs Alta expresión	2,89 (0,69-12,01)	0,147
DRD1 H-Score	Baja vs Alta expresión	0,59 (0,25-1,36)	0,219	Baja vs Alta expresión	5,01 (0,68-36,60)	0,112

Abreviaturas: [HR]: “hazard ratio” o tasa de riesgo de muerte o recidiva; IC 95%: intervalo de confianza al 95%.

Los resultados del análisis univariante de la supervivencia según el punto de corte óptimo de la expresión de DRD2 se muestra en la **tabla 19**. En la SLE, el valor límite a partir del cual se determina alta expresión correspondió a 17076,8 en el parámetro Intensidad y a 160642,9 en el parámetro H-Score. En referencia a la SG, el valor de expresión se definió en 18270,9 para la Intensidad y en 141625,9 para el H-Score. En el análisis de SLE se establecieron diferencias significativas en el H-Score mostrando un incremento del riesgo de recidiva con la sobreexpresión de DRD2 (p valor 0,00946). El análisis de la SG presentó una asociación significativa en el parámetro Intensidad (p valor 0,0257) entre la sobreexpresión de DRD2 y la mortalidad, al igual que en H-Score (p valor 0,00454) en la serie de pacientes estudiada (**Figura 28**).

## RESULTADOS

Tabla 19. Resultados del análisis univariante de supervivencia para la expresión de DRD2.

Receptor	Supervivencia Libre de Enfermedad			Supervivencia Global		
	Punto de corte óptimo	HR (IC 95%)	p valor	Punto de corte óptimo	HR (IC 95%)	p valor
DRD2 Intensidad	Baja vs Alta expresión	2,21 (0,92-5,28)	0,0729	Baja vs Alta expresión	2,29 (1,10-4,77)	0,0257*
DRD2 H-Score	Baja vs Alta expresión	3,47 (1,35-8,88)	0,00946*	Baja vs Alta expresión	2,98 (1,40-6,34)	0,00454*

Abreviaturas: [HR]: “hazard ratio” o tasa de riesgo de muerte o recidiva; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; (\*) diferencias estadísticamente significativas tras aplicar el modelo univariante.

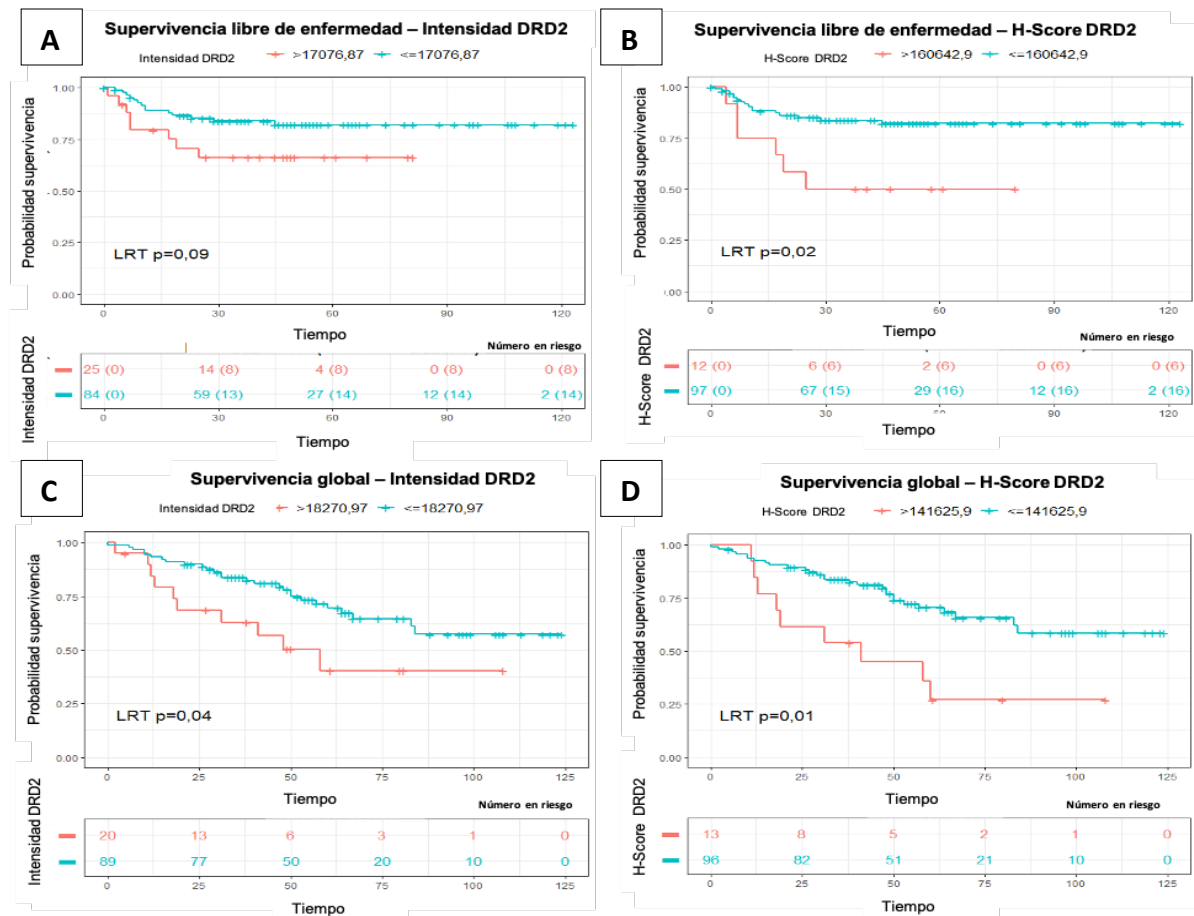


Figura 28. Curvas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en la serie de pacientes del estudio con relación a la expresión de DRD2 cuantificada por Intensidad (A,C) y por H-Score (B,D). Línea roja: alta expresión, Línea azul: baja expresión. p valor obtenido utilizando Likelihood ratio test.

### 3.4. Modelos multivariantes y valor pronóstico. Análisis de supervivencia global y libre de enfermedad

Por último, se realizó un análisis multivariante de los factores clínicos pronósticos obtenidos del análisis de supervivencia univariante. En los análisis se incluyó la edad, el tipo de histología, el grado histológico, el tamaño tumoral, el estadio y los valores de expresión de DRD2.

**Tabla 20. Análisis multivariante de los factores pronósticos en supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.**

Factores	Supervivencia Libre de Enfermedad		Supervivencia Global	
	HR (95% CI)	p valor	HR (95% CI)	p valor
<b>Edad</b> ≤ 73 años >73 años	1,29 (0,45-3,65)	0,62446	3,21 (1,40-7,33)	0,005660*
<b>Histología</b> C. Endometrioide C. No endometrioide	2,03 (0,66-6,17)	0,19157	1,88 (0,77 -4,63)	0,164311
<b>Grado histológico</b> Grado 1-2 Grado 3	2,00 (0,00-0,00)	0,99779	1,34 (0,32- 5,55)	0,677720
<b>Tamaño tumor</b> ≤2cm >2cm	2,2 (0,88-5,64)	0,08682	2,70 (1,20-6,09)	0,016289*
<b>Estadio</b> Estadio I-II Estadio III-IV	8,70 (2,35-32,19)	0,00118*	3,86 (1,06- 14,04)	0,040364*
<b>Recidiva</b> No Sí			3,92 (1,75-8,78)	0,000896*
<b>DRD2 H-Score</b> Baja expresión Alta expresión	2,37 (0,80-6,98)	0,11488	1,84 (1,1-4,43)	0,043434*

Abreviaturas: [HR]: “hazard ratio” o tasa de riesgo de muerte o recidiva; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; (\*) diferencias estadísticamente significativas tras aplicar el modelo univariante.

## RESULTADOS

En la **tabla 20** se muestran en primer lugar los resultados del análisis multivariante de la serie de pacientes estudiada referente a SLE. El valor del *Likelihood ratio* del modelo final fue de 0,00001. El cálculo mostró como único factor de riesgo independiente el estadio avanzado de la FIGO frente al estadio inicial, con un valor de HR 8,70, IC 95% 2,35-32,19 y una p valor 0,00118.

En cambio, los factores de riesgo independientes en el modelo diseñado para evaluar la SG con un *Likelihood ratio* de  $4 \times 10^{-8}$ , fueron la edad superior a 73 años, el tamaño tumoral, el estadio avanzado de la FIGO frente al estadio inicial, la presencia de recidiva y la alta expresión de D2.

### **4. Generación y caracterización de modelos xenógrafos ortotópicos derivados de muestras tumorales de pacientes con cáncer de endometrio (PDX)**

Otro de los objetivos que nos planteamos fue la generación de modelos xenógrafos ortotópicos derivados de muestras tumorales de pacientes con CE intervenidas en la Unidad de Ginecología Oncológica del Servicio de Ginecología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. En este proyecto se seleccionaron dos tumores, crecidos en ratones inmunodeprimidos *Swiss nude*, con características diferentes. En primer lugar, se utilizó la muestra tumoral END 17, un tumor descrito como carcinoma endometriode grado 3 con receptores hormonales positivos procedente de una paciente de 81 años con un estadio IB de la FIGO. Como particularidad, presentaba una alteración en los genes de la reparación del ADN que se tradujo en una ausencia nuclear de las proteínas codificantes MLH1 y PMS2. En segundo lugar, la muestra tumoral END 19, presentaba un patrón histológico correspondiente a un carcinoma seroso con *p53* mutado.

Ambos tumores fueron implantados de forma ortotópica en ratón inmunodeprimido por vía transmiometrial y vía transvaginal.

#### **4.1. Estudio de la capacidad tumorigénica de los modelos xenógrafos END17 y END19**

##### **4.1.1. Monitorización de la progresión tumoral y peso corporal de los ratones**

Desde su implantación y hasta su eutanasia, se controló el peso corporal de los ratones por semana.

Todos los animales se recuperaron satisfactoriamente de la intervención y su peso fue incrementando progresivamente en los diferentes grupos; los correspondientes a END 17 presentaron un peso medio final de  $27,5 \pm 1,3$  g mientras que en el caso de END 19 alcanzaron de media  $26,7 \pm 2$  g.

La comparativa de las técnicas quirúrgicas utilizadas junto a la tasa de injerto y el patrón de diseminación metastásica de los PDX derivados de END 17 y END 19 se muestra en la **tabla 21**. Ambos tipos de tumores implantados por vía transmiometrial presentaron una tasa de injerto satisfactoria; traduciéndose en un 100% en el caso de END 17 y en un 70% para el modelo de END 19. Cabe remarcar que la inoculación por vía transvaginal del fragmento de tumor procedente de paciente no resultó en una implantación en ninguno de los dos grupos, siendo la tasa de injerto global del 0%; y consecuentemente presentando un patrón de diseminación nulo.

**Tabla 21. Resultados de la implantación y la capacidad tumorogénica de los modelos xenógrafos ortotópicos derivados de pacientes END 17 y END 19.**

Modelos PDX						
	Tipo de implantación	Tasa de injerto (ratón-%)	Número de <i>foci</i> (media $\pm$ DE)	Mets. Linfática [na/nt(%)]	Mets. Abdominal-Carcinomatosis [na/nt(%)]	Mets. Hematógena [na/nt(%)]
END 17	IQT TM	10/10 (100)	$1,20 \pm 0,38$	6/10 (60)	4/10 (40)	1/10 (10)
	IQT TV	0 (0)	0	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)
END 19	IQT TM	7/10 (70)	$0,7 \pm 1,16$	3/7 (43)	0/7 (0)	2/7 (29)
	IQT TV	0 (0)	0	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)

Abreviaturas: Mets: metástasis; [na/nt(%)] : [na: número de ratones afectados en el grupo/nt: número de ratones positivos totales en el grupo (porcentaje de ratones afectados)]; IQT TM: Implantación quirúrgica de tejido ( $1\text{mm}^3$ ) vía transmiometrial; TV: vía transvaginal; DE: desviación estándar.

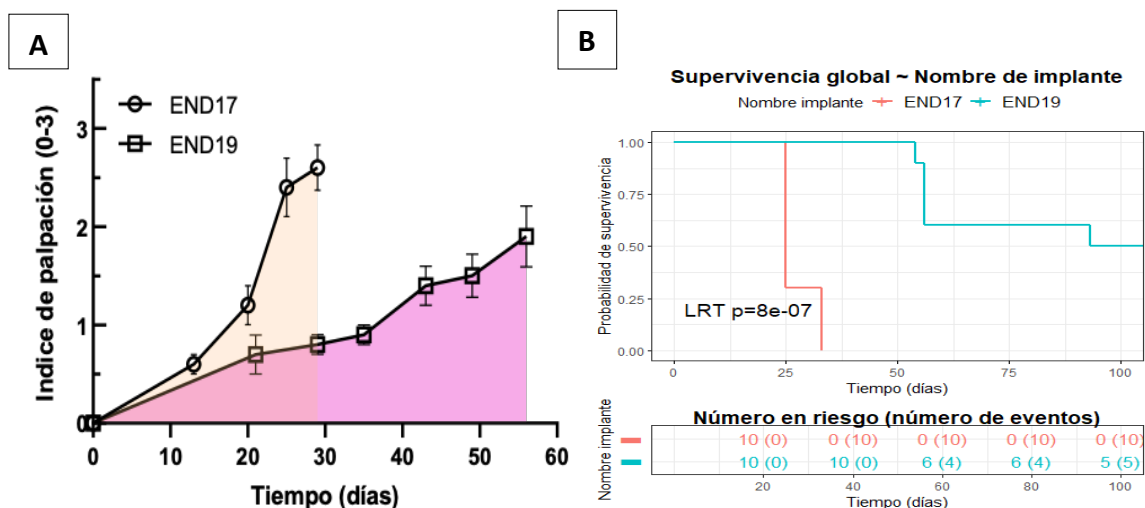
Tal y como se muestra en la **figura 29A**, en el caso de los animales con implantación de END 17, el crecimiento tumoral estimado mediante la palpación fue más rápido en comparación con END 19 que mantuvo un crecimiento tumoral más lento y gradual en el tiempo.

## RESULTADOS

Tras la necropsia de los animales, se registró el peso tumoral final y el número de *foci* macroscópicos en los tejido diana de metástasis. El peso medio del tumor obtenido fue superior significativamente (p valor 0,02) en el modelo de END 17 ( $2,41 \pm 0,61$  g) en comparación con el peso del tumor procedente del modelo END 19 ( $1,28 \pm 0,70$  g) (**Figura 30A**).

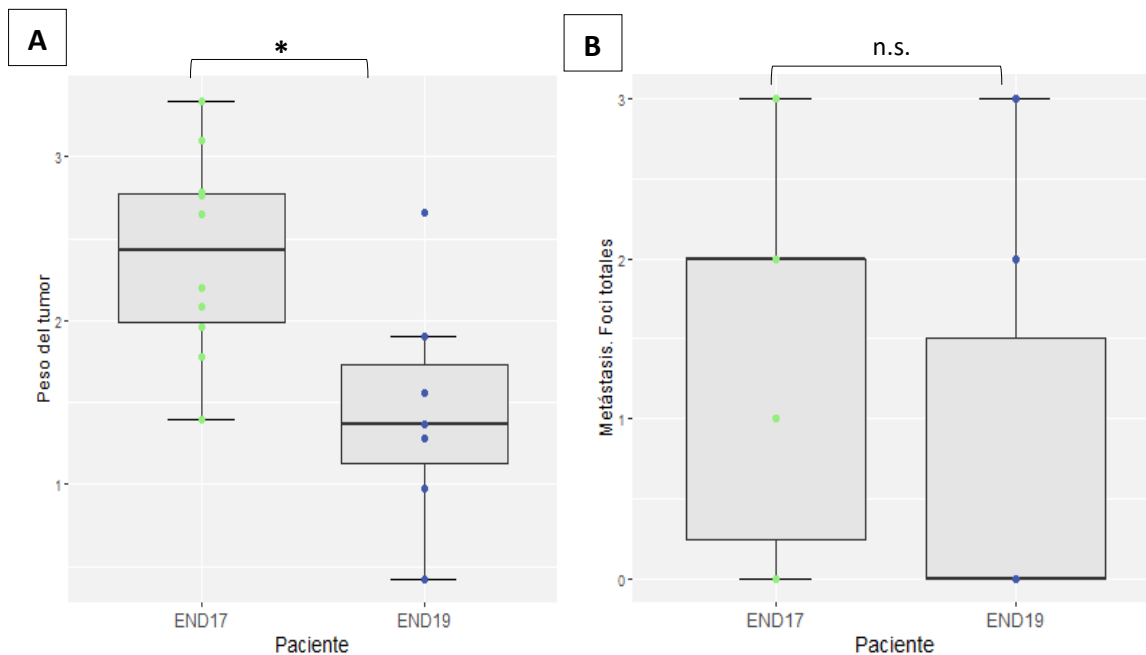
La diseminación tumoral se calculó mediante el conteaje del número de *foci* metastásicos totales por cada modelo animal. El valor fue mayor pero no estadísticamente significativo (p valor 0,1387) en el modelo END 17 respecto al modelo END 19 (**Figura 30B**). Por otra parte, la utilización de la muestra derivada de paciente END 17 generó un patrón más agresivo, con un número mayor de metástasis linfáticas y transcelómicas (carcinomatosis peritoneal) comparado con el modelo END 19, el cual presentó únicamente un número superior de animales con metástasis hematógenas (pulmón), aunque las diferencias no fueron significativas entre modelos (**Tabla 21 y Figura 31**).

En la **figura 29B** se compara de la supervivencia de los animales implantados con END17 y END19. Se observó una supervivencia significativamente menor en el grupo con implantación de END 17, con un tiempo de vida de  $27 \pm 4$  días en referencia a la implantación de END 19 que resultó  $81 \pm 25$  días.



**Figura 29. Progresión tumoral en los modelos PDX END17 y END19. A:** Crecimiento tumoral estimado a partir del índice de palpación. **B:** Comparación de la supervivencia de los diferentes xenógrafos generados.



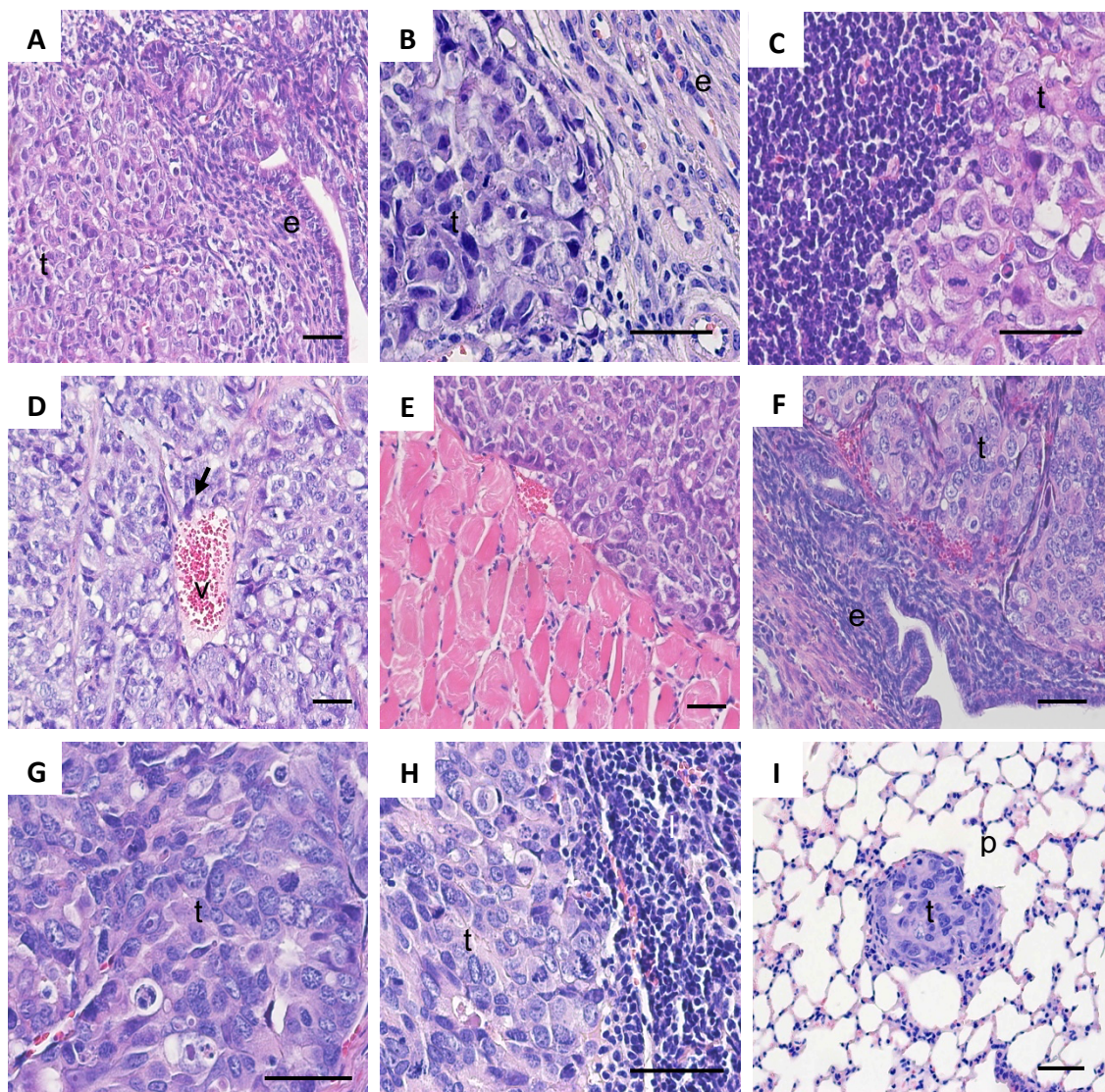


**Figura 30. Comparativa de los valores de monitorización y diseminación tumoral en los modelos PDX END17 y END19. A:** Peso del tumor a tiempo final. **B:** Cuantificación del número de *foci* metastásicos. Abreviaturas: n.s.: no significancia estadística; (\*) Diferencias estadísticamente significativas  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2. Descripción de las características histopatológicas

Tras el procesamiento de las muestras se realizó un análisis histopatológico a partir de las preparaciones teñidas con HE. Con la colaboración de un patólogo experto, se comprobó la preservación del patrón histológico del tumor obtenido del modelo animal en referencia al tumor originario del paciente, descrito en la **tabla 10**. Además, se diagnosticaron los focos de crecimiento tumoral en los órganos diana de metástasis.

## RESULTADOS



**Figura 31. Estudio histopatológico de los modelos xenógrafos END17 y END19 tras la necropsia, imágenes microscópicas representativas del tumor primario y focos de metástasis.**

**A, B:** Tumor primario de END 17. **C:** Metástasis linfática en END 17. **D:** Célula tumoral intravascular en END 17 (flecha). **E:** Foco de carcinomatosis a nivel diafragmático en END 17. **F, G:** Tumor primario de END 19. **H:** Metástasis linfática en END 19. **I:** Metástasis pulmonar en END 19. Barra: 200  $\mu\text{m}$ . Abreviaturas: e: endometrio; t: tumor; v: vaso sanguíneo; p: parénquima pulmonar.

## 4.2. Evaluación de los niveles de expresión de los receptores catecolaminérgicos en los modelos xenógrafos END 17 y END 19

En una segunda fase de la experimentación *in vivo* se realizó la evaluación de los niveles de expresión de los distintos receptores catecolaminérgicos (ADR $\beta$ 2, DRD1 y DRD2) mediante tinción inmunohistoquímica en las muestras de tumor generado en los modelos animales de una forma similar al estudio de la serie de pacientes realizado previamente.

### 4.2.1. Comparativa de la expresión de receptores catecolaminérgicos en tejido endometrial sano y tumor de cáncer de endometrio generados en ratón

El análisis de la expresión de los receptores evaluados ADR $\beta$ 2, DRD1 y DRD2 en tejido endometrial sano y los tumores generados se muestra en la **tabla 22**.

En el modelo END 17 se identifican diferencias estadísticamente significativas a nivel de expresión del receptor adrenérgico ADR $\beta$ 2 a favor de una sobreexpresión en el tumor vs el tejido endometrial sano (p valor 0,0027). En referencia a los receptores dopaminérgicos, la expresión del receptor DRD1 no se vio alterada en la comparación de los dos tejidos (p valor 0,9136), a diferencia de DRD2 que sí mostró significación estadística con una mayor expresión en tumor (p valor 0,0060).

Los resultados en el modelo END 19 difieren del caso anterior; el receptor ADR $\beta$ 2 presenta una reducida expresión en el tejido tumoral en comparación con el tejido endometrial sano, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (p valor 0,0010). La expresión de DRD1 muestra un patrón similar al receptor adrenérgico, con niveles de expresión significativamente más bajos en el tejido tumoral (p valor 0,001). Contrariamente, la expresión de DRD2 no varió en el análisis de ambos tejidos (p valor 0,6208).

## RESULTADOS

**Tabla 22. Resultados de la comparativa de la expresión de los receptores catecolaminérgicos en tejido endometrial sano y tumor derivados de pacientes END 17 y END 19.**

Expresión de receptores catecolaminérgicos en modelos PDX							
		ADR $\beta$ 2		DRD1		DRD2	
	Tipo de implantación	H-Score (mediana, RIQ)	p valor	H-Score (mediana, RIQ)	p valor	H-Score (mediana, RIQ)	p valor
END 17	Tejido endometrial sano	5907,4 (22813,7)	0,0027*	1107044,1 (892355,1)	0,9136	112742,5 (149505,5)	0,0060*
	Tumor	123614,4 (69913,2)		1092060,6 (1706763,1)		616021,6 (74160,4)	
END 19	Tejido endometrial sano	172898,5 (235521,4)	0,0010*	285118,2 (213571,1)	0,001*	45840,8 (29584,8)	0,6208
	Tumor	31209,3 (38981,1)		71892,4 (63996,1)		33786,9 (48335,1)	

Abreviaturas: RIQ: rango intercuartílico.

### 4.2.2. Análisis univariante de la expresión de receptores catecolaminérgicos y relación con supervivencia

De los dos modelos analizados, se escogió END 17 por su tasa de implantación superior, por su patrón de diseminación más agresivo y por su similitud en cuanto a niveles de expresión de los receptores dopaminérgicos con lo observado en pacientes. En este modelo se realizó un subanálisis para estudiar la asociación de la expresión de los receptores catecolaminérgicos y la supervivencia de los ratones. Se estableció un punto de corte óptimo de la expresión de los receptores catecolaminérgicos para dividir los valores en baja vs alta expresión mediante un algoritmo estadístico de manera análoga al análisis que se hizo en el estudio en pacientes. El análisis no mostró diferencias significativas para ningún neuroreceptor. Posiblemente sería necesario aumentar el número de animales para confirmar su valor pronóstico en el modelo *in vivo* (**Figura 32**).

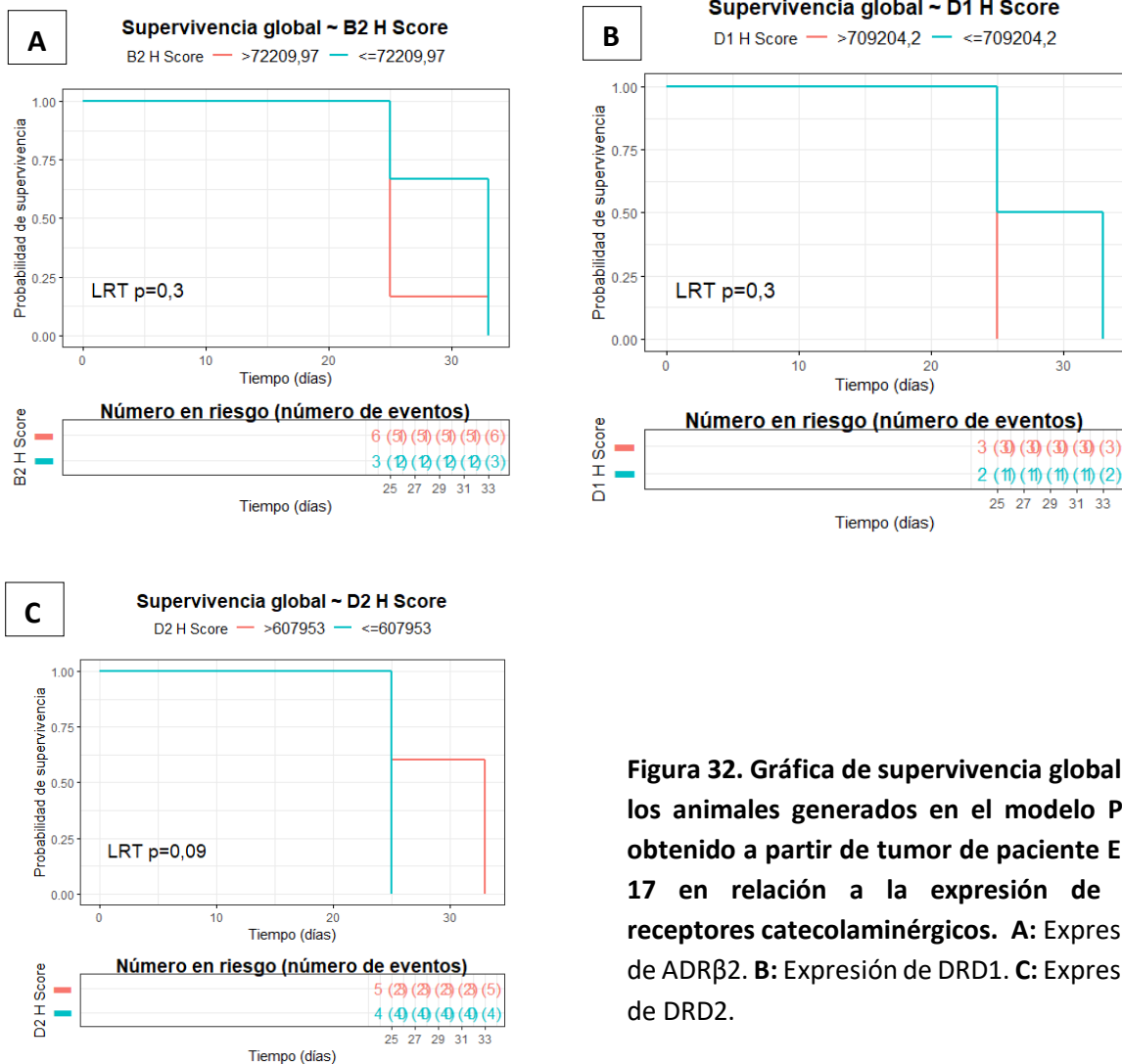


Figura 32. Gráfica de supervivencia global de los animales generados en el modelo PDX obtenido a partir de tumor de paciente END 17 en relación a la expresión de los receptores catecolaminérgicos. A: Expresión de ADRβ2. B: Expresión de DRD1. C: Expresión de DRD2.

### 4.2.3. Comparativa de las características del tumor generado en ratón y el tumor original de paciente

Para determinar la utilidad del modelo para ensayos *in vivo*, comprobamos la preservación por inmunohistoquímica de las características histopatológicas de ambos modelos PDX en referencia al tumor original de la paciente (Tabla 23).

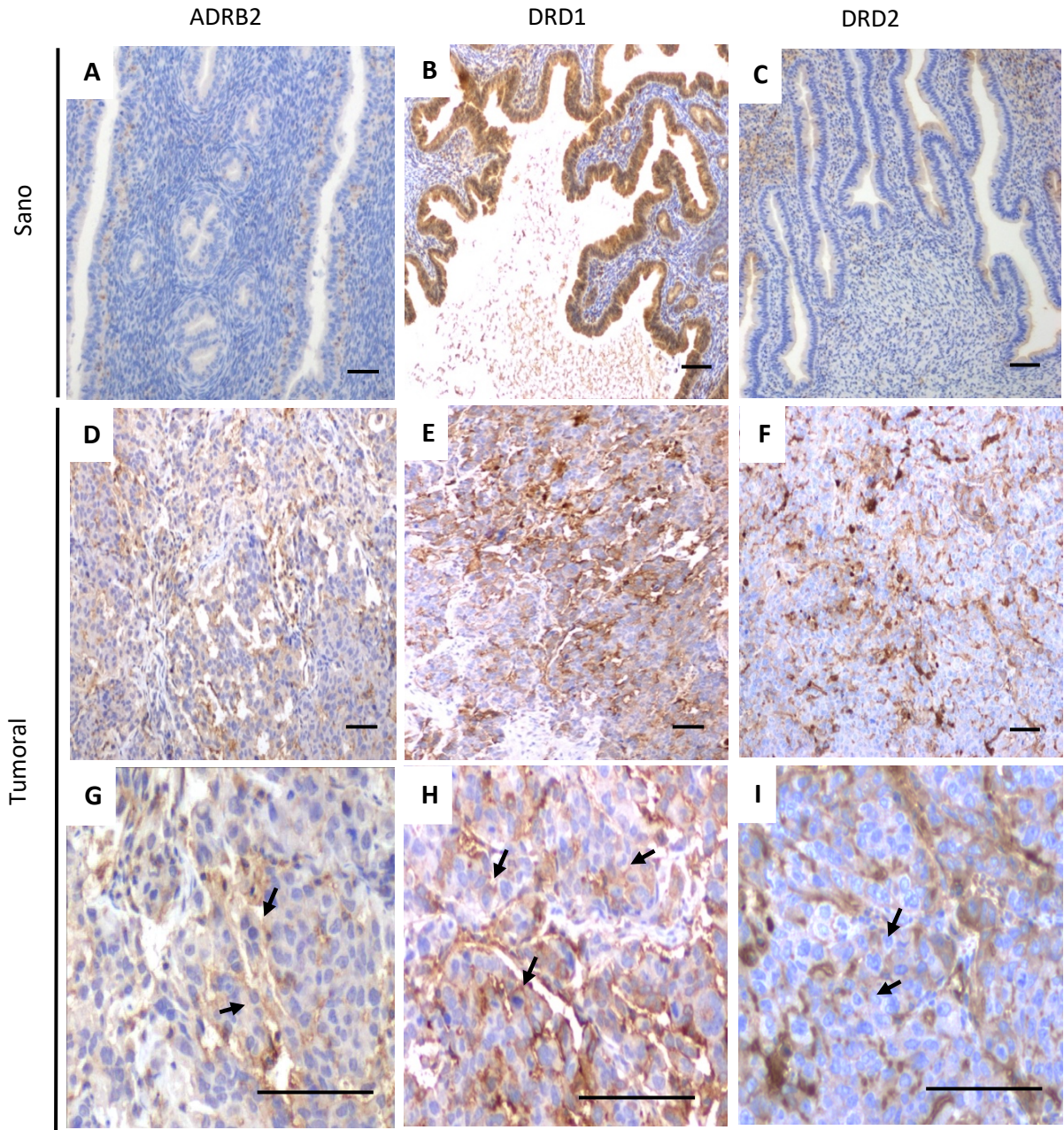
## RESULTADOS

Se realizó la comparativa a nivel de tinción inmunohistoquímica de ADR $\beta$ 2, DRD1, DRD2 entre la muestra de tumor generado en el ratón y la muestra tumoral de la paciente identificando valores similares de expresión respecto a su correspondiente expresión en tejido sano (**Figura 33**). Ambos modelos conservaron el patrón de expresión celular a nivel de membrana y citoplasma que se observó en el tumor de la paciente. Además, se analizaron marcadores moleculares utilizados en el diagnóstico clínico del cáncer de endometrio. En el caso de END 17, se han preservado las alteraciones identificadas en la muestra original del paciente, que son las alteraciones en los genes reparadores del ADN MLH1 y PMS2, así como de la expresión de los receptores hormonales. En referencia a END 19, se ha comprobado por IHQ la expresión de p53 en el tumor murino al igual que en la muestra original del paciente (**Figura 34**). Ambos tumores (ratón y paciente) presentan un patrón de tinción nuclear positiva por la acumulación de la proteína p53 que ocurre en un estado mutacional del gen *p53* que codifica la proteína. Estos resultados han sido validados por un patólogo especializado.

**Tabla 23. Comparativa de tinción inmunohistoquímica de los receptores catecolaminérgicos y de los marcadores moleculares en CE entre la muestra de tumor generado en ratón y la muestra tumoral de la paciente.**

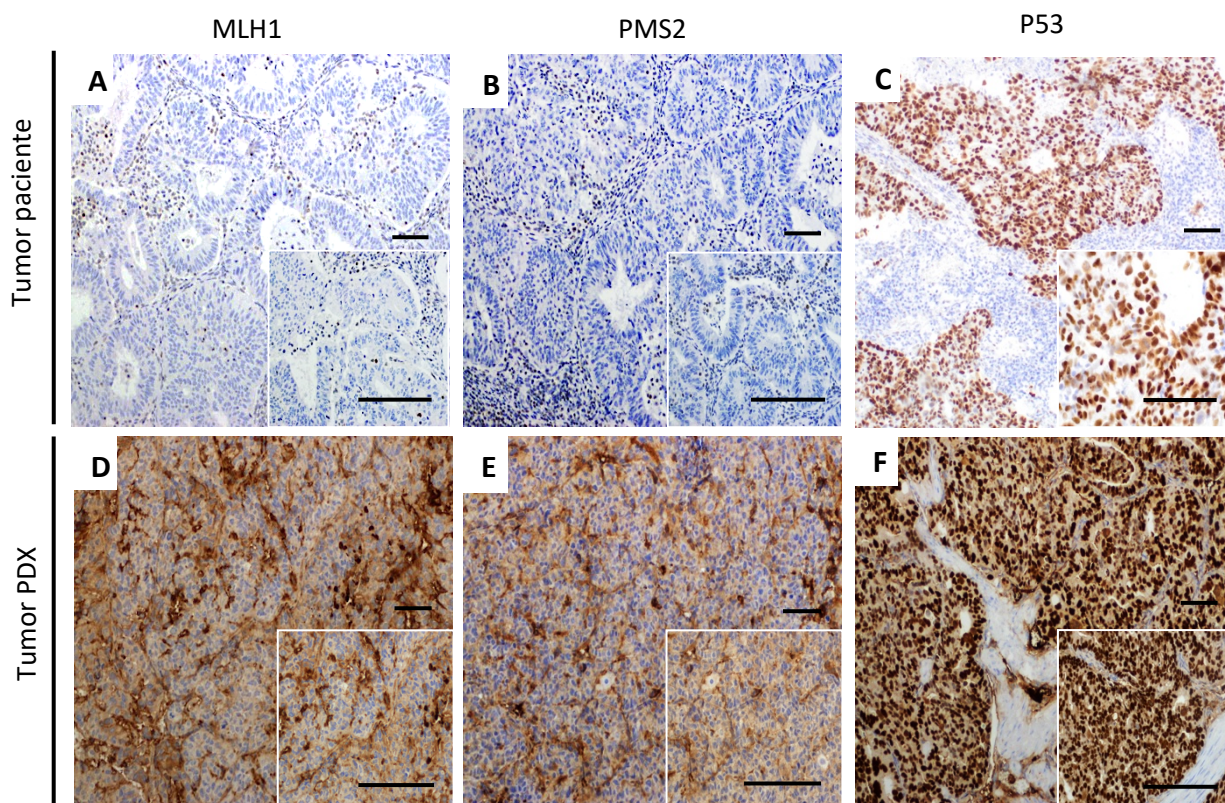
Comparativa características paciente – tumor modelo PDX (IHC)								
		Receptores catecolaminérgicos			IHC Proteínas de genes reparadores del ADN		IHC Receptores hormonales	IHC p53
		ADR $\beta$ 2	DRD1	DRD2	MLH1 PMS2	MSH2 MSH6	RREE RRPP	p53
END 17	Tumor Paciente	Positividad	Positividad	Positividad	Negativo (Anormal)	Positividad nuclear (Normal)	+++/ +++	Negativo
	Tumor PDX	Positividad	Positividad	Positividad	Negativo (Anormal)	Positividad nuclear (Normal)	+++/ +++	Negativo
END 19	Tumor Paciente	Positividad	Positividad	Positividad	ne	ne	ne	Positividad nuclear (Anormal)
	Tumor PDX	Positividad	Positividad	Positividad	ne	ne	ne	Positividad nuclear (Anormal)

Abreviaturas: ne: no evaluado; RREE: receptores estrógenos; RRPP: receptores progestágenos; MLH1: MutL homolog 1; MSH2: MutS homolog 2; MSH6: MutS homolog 6; PMS2: Post-Meiotic Segregation Increased 2.



**Figura 33.** Imágenes microscópicas representativas de la tinción inmunohistoquímica de ADR $\beta$ 2, DRD1, DRD2 en tejido endometrial sano y muestras tumorales en el modelo PDX END17. Inmunotinción: A,D,G: ADR $\beta$ 2; B,E,H: DRD1; C,F,I: DRD2. Barra: 100  $\mu$ m. Flechas: Patrón de expresión celular.

## RESULTADOS



**Figura 34.** Imágenes microscópicas representativas de la tinción inmunohistoquímica de los marcadores moleculares de uso en el diagnóstico clínico del CE en tumor de paciente y en tumor PDX de END 17 y END 19. **A.** Inmunotinción: **A,D:** MLH1 (END 17); **B,E:** PMS2 (END 17); **C,F:** p53 (END 19). En las imágenes de MLH1 y PMS2 se puede observar cómo no existe positividad nuclear en ninguna de las muestras. Barra: 100  $\mu$ m.



## 5. Evaluación de la neuromodulación catecolaminérgica sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer de endometrio

### 5.1. Efecto de la neuromodulación adrenérgica y dopaminérgica sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer de endometrio

Las líneas celulares de cáncer de endometrio utilizadas para la experimentación *in vitro* fueron HEC1A y AN3CA. En el caso de HEC1A, es una línea derivada de un adenocarcinoma endometrioide grado 2 (225). Presenta receptores de estrógenos y progestágenos mayoritariamente negativos, mutaciones heterocigotas para *KRAS* y homocigotas para *p53*. Ha sido considerada CE tanto de tipo I como de tipo II, aunque sus características corresponden más probablemente al CE tipo II (201). En referencia a AN3CA, se trata de una línea establecida a partir de una metástasis linfática producida por un adenocarcinoma endometrial (226). Presenta alta IMS, mutaciones heterocigotas en *MAPK3*, *PIK3R1* y *TP53* y homocigotas para *PTEN*.

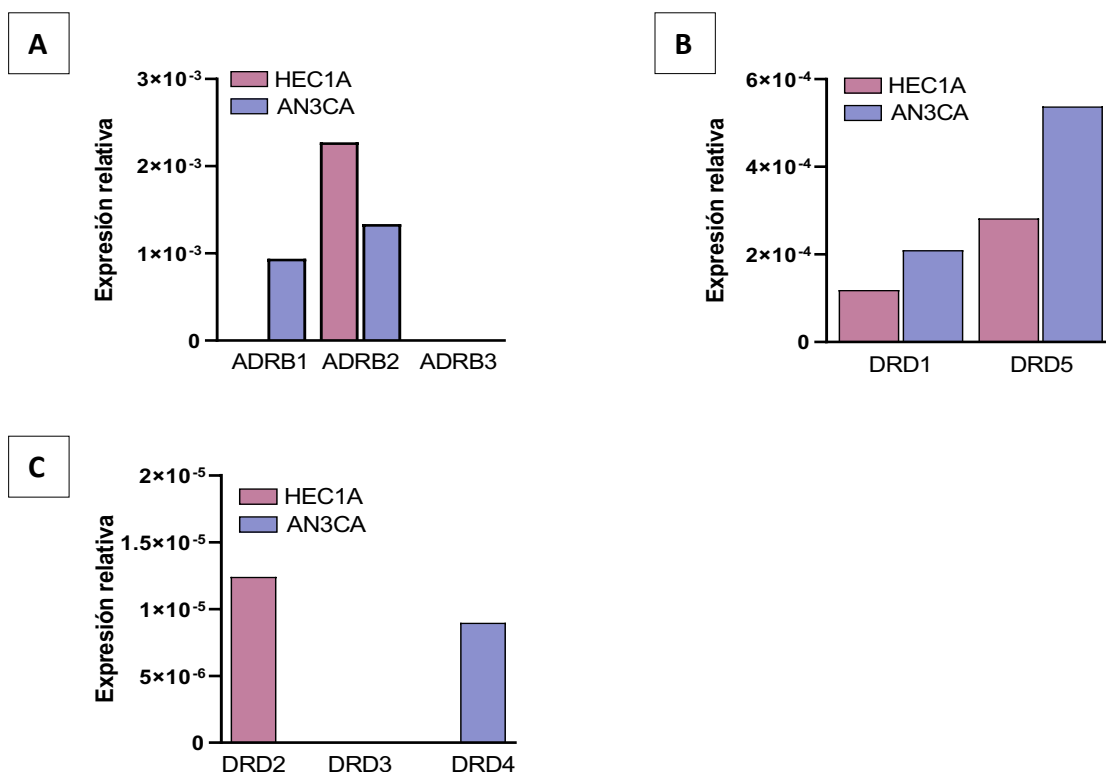


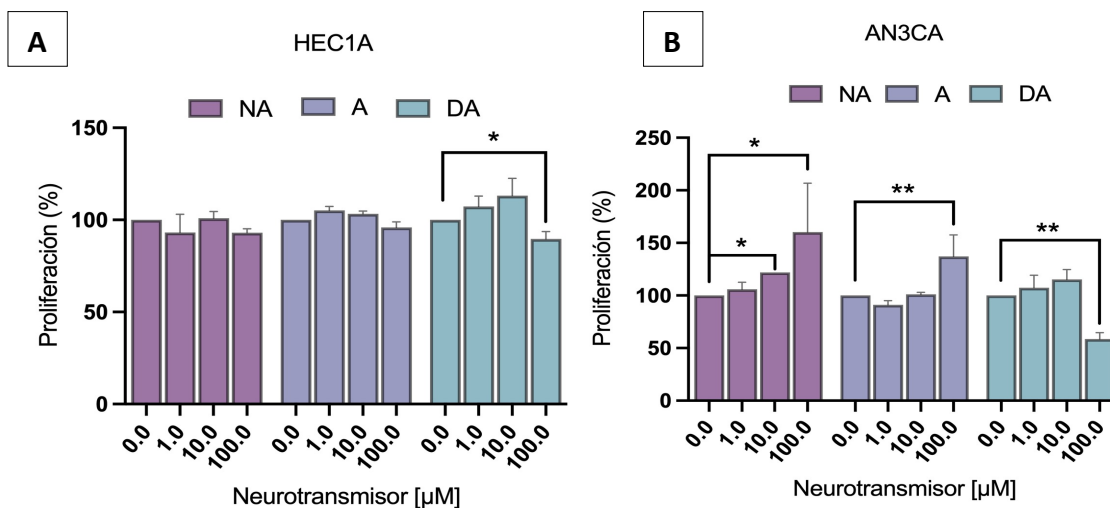
Figura 35. Expresión relativa de ARNm para los ADR $\beta$  (A) y los subtipos de DR de la familia D1 (B) y familia D2 (C) en las líneas celulares de CE HEC1A y AN3CA.

## RESULTADOS

Inicialmente se determinó, mediante qRT-PCR, la expresión de los receptores en cada línea celular (**Figura 35**). La línea tumoral HEC1A presentó expresión del receptor *ADRβ2*, mientras que AN3CA expresó *ADRβ1* y *ADRβ2*. Ninguna de las dos líneas mostró expresión de *ADRβ3*. Con respecto a los receptores dopaminérgicos, en células HEC1A se detectaron niveles de ARNm correspondiente a *DRD1*, *DRD5* y *DRD2*, mientras que en células AN3CA se identificaron los receptores *DRD1*, *DRD5* y *DRD4*. *DRD3* no se expresó en ninguna de las dos líneas tumorales.

En referencia a la neuromodulación en las células HEC1A, la exposición a los neurotransmisores adrenérgicos (NA y A) no modificaron la capacidad de proliferación comparado con el control (ausencia de neurotransmisor) en todo el rango de concentraciones estudiada (entre 0,1 - 100  $\mu$ M) (**Figura 36A**). Por el contrario, en las células AN3CA, los neurotransmisores NA y A indujeron un aumento significativo en la tasa de proliferación, a concentración de 100  $\mu$ M con respecto al control (ausencia de activación) (p valor <0,05 para NA y p valor <0,001 para A) (**Figura 36B**).

Por su parte, DA a la concentración ensayada de 100  $\mu$ M indujo una reducción tanto en el número de células HEC1A (p valor <0,05) como en AN3CA (p valor  $\leq$  0,001) con respecto al control sin neurotransmisor (**Figura 36 A, B**).



**Figura 36. Efecto sobre la proliferación celular de noradrenalina (NE), adrenalina (A) y dopamina (DA) en líneas celulares de CE. A. HEC1A. B. AN3CA. (\*): p < 0,05, (\*\*): p  $\leq$  0,001.**

## 5.2. Efecto de la activación e inhibición selectiva de la señalización dopaminérgica sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer de endometrio

En células HEC1A, fenoldopam (FE), un agonista de los receptores de DA de la familia 1, redujo significativamente la proliferación celular ( $p$  valor  $<0,05$ ) a la concentración máxima estudiada (100  $\mu$ M). En cambio, no se evidenció variación en la capacidad de proliferación con el agonista del receptor DRD2 pergolide (PER) ni con el antagonista de DRD1, LE 300 (LE). Resultados similares se observaron con la línea AN3CA donde la exposición a fenoldopam, a concentración de 100  $\mu$ M redujo significativamente ( $p$  valor  $\leq 0,001$ ) el número de células respecto al control y las concentraciones menores ensayadas.

La variación más destacable en HEC1A se observó con la exposición a domperidona (DOM), un antagonista selectivo de los receptores de DA de la familia 2, que redujo significativamente ( $p$  valor  $\leq 0,001$ ) la proliferación celular a 100  $\mu$ M respecto a la ausencia de la molécula. Este mismo efecto se observó en la línea AN3CA ( $p$  valor  $\leq 0,001$ ) (Figura 37).

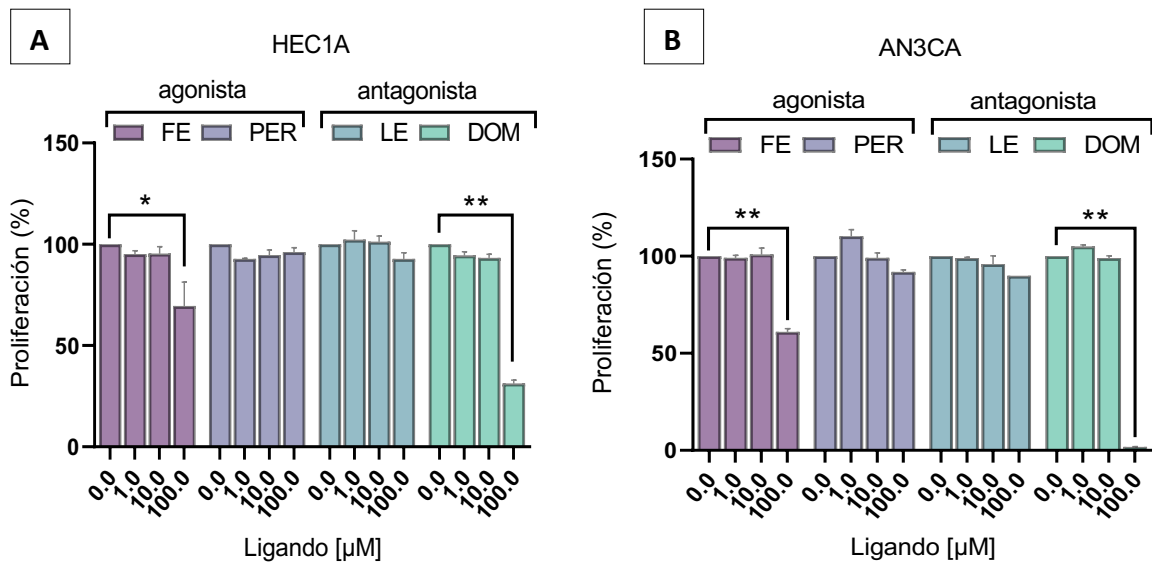
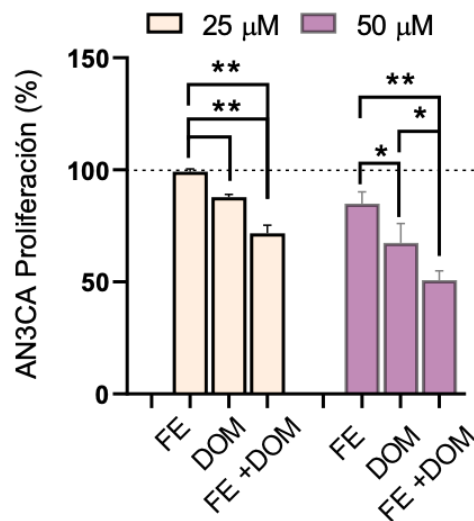


Figura 37. Evaluación de la activación e inhibición dopaminérgica sobre la proliferación celular en líneas celulares de CE. A: HEC1A. B: AN3CA. (\*):  $p < 0,05$ ; (\*\*):  $p \leq 0,001$ .

## RESULTADOS

### 5.3. Efecto sinérgico del agonismo de DRD1 y el antagonismo de DRD2 sobre la proliferación de la línea celular AN3CA

Para determinar el posible efecto terapéutico de la combinación del agonismo de DRD1 y el antagonismo de DRD2, se realizó un ensayo independiente específicamente con la línea tumoral AN3CA (**Figura 38**). Previamente, hemos observado que AN3CA presenta mayor expresión de los receptores dopaminérgicos y un efecto dopaminérgico mayor que la línea tumoral HEC1A. La reducción en la proliferación celular inducida, de forma independiente, por el agonismo de DRD1 o el antagonismo de DRD2 mostró un comportamiento dosis-dependiente, siendo el efecto significativamente mayor a 50  $\mu\text{M}$  que a 25  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) y con la exposición a DOM comparado con FEN ( $p$  valor  $< 0,05$ ). El tratamiento de las células en combinación con FE y DOM, ensayados tanto a 25 o 50  $\mu\text{M}$  redujo significativamente la capacidad de proliferación de las células AN3CA ( $p$  valor  $\leq 0,001$ ) en relación a su efecto en monoterapia.



**Figura 38.** Evaluación de la sinergia de fenoldopam y domperidona sobre la proliferación celular en la línea celular AN3CA. (\*):  $p < 0,05$ ; (\*\*):  $p \leq 0,001$ .



## V. DISCUSIÓN

## V. DISCUSIÓN

El cáncer de endometrio es la patología maligna ginecológica más frecuente en nuestra población. La mayoría de pacientes presentan un pronóstico favorable, con una supervivencia entorno del 90% a los 5 años si se diagnostican en estadios iniciales (46). A pesar de ello, las pacientes con estadio avanzado o recurrencia presentan menos probabilidades de curación con la cirugía y la terapia adyuvante convencional, con tasas de respuesta situadas entre el 10% y el 18% (183). Se trata de una enfermedad genotípica y fenotípicamente heterogénea; por tanto, debemos concentrar los esfuerzos en encontrar herramientas que ayuden a mejorar el pronóstico y el tratamiento de todas las pacientes afectadas por esta neoplasia.

Este trabajo se ha centrado en el estudio de la influencia de la señalización nerviosa en el comportamiento de las células tumorales y la evolución en el cáncer de endometrio. Los neurotransmisores y neuroreceptores pueden influir en el comportamiento de las células tumorales a través de mecanismos implicados en la progresión tumoral. Entre ellos, se encuentran el aumento de la proliferación celular, la regulación de la viabilidad celular, la contribución a la migración y a la invasión tumoral (147). Actualmente existen numerosos artículos en diferentes neoplasias que describen una asociación entre el sistema catecolaminérgico y la progresión tumoral con alto poder pronóstico y potencial terapéutico (122,127,158,167,181,227). Específicamente en cáncer de endometrio, no se han identificado estudios que valoren la relevancia pronóstica de los receptores adrenérgicos; mientras que en el caso de los receptores dopaminérgicos, en los últimos 5 años, se han publicado resultados interesantes de su capacidad pronóstica y terapéutica en referencia al subtipo de CE seroso.

En esta tesis doctoral, se presenta una visión global de la implicación de los receptores catecolaminérgicos en CE que se obtiene a partir del análisis de muestras de pacientes, de modelos animales derivados de tumor de paciente y de experimentación *in vitro*. El enfoque desde distintos modos de investigación, permite asociar información y mejorar la comprensión de los mecanismos involucrados específicamente en cáncer de endometrio. Además, el estudio de la interacción entre el sistema nervioso y el cáncer proporciona nuevos biomarcadores y posibilidades de desarrollarlos como dianas alternativas para uso en terapia dirigida (136).

## DISCUSIÓN

### 1. Estudio de las variables clínico-patológicas y su valor pronóstico de la serie de pacientes del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Inicialmente, realizamos un estudio estadístico descriptivo en nuestra serie de pacientes para realizar una valoración global y evaluar su representatividad de la población general de pacientes con cáncer de endometrio. La media de edad al diagnóstico en nuestra serie fue de 68,9 años, valor superior a otras poblaciones estudiadas en la bibliografía como por ejemplo la media de una serie multicéntrica del estado español o la media en global según datos de Estados Unidos, con valores de 65 años y 63 años respectivamente (228,229). El motivo es el mayor porcentaje de ancianos en el área de referencia del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, hecho a tener en cuenta en el manejo general de la patología. Un estudio reciente predice que en los próximos años habrá un incremento de la incidencia del CE en mujeres con edades entre 64 y 74 años en la población de referencia (230). Las posibles explicaciones se basan en un incremento de la prevalencia de la obesidad y la diabetes y una disminución de la paridad, todos establecidos como factores de riesgo en CE. Además, se conoce que el CE en pacientes de mayor edad es diagnosticado más frecuentemente en estadios avanzados y asociado a histologías de peor pronóstico (231).

En referencia a la histología, nuestra serie es similar a otros estudios y se divide básicamente entre un 73% de carcinoma endometriode o tipo I y un 26,6% de carcinoma no endometriode o tipo II. Cabe subrayar que en la distribución del grado histológico de la muestra de tumores, se identificó un porcentaje del 55,1% de grado histológico 3, superior a lo descrito en la literatura, versus un 44,9% de grado histológico en conjunto 1 y 2 (229). El estadio tumoral al diagnóstico según la FIGO se distribuye entre un 77,9% de pacientes con estadio inicial (I-II) y un 22,1% de pacientes con estadio avanzado (III-IV), siguiendo la representación de la población con este tipo tumoral (21).

Un total de 25 pacientes, 22,9%, sufrió recaída durante el periodo de seguimiento. La tasa de recaída del CE después de un tratamiento primario completo en la literatura oscila alrededor del 13%, con la edad, el grado histológico, la actividad mitótica, la invasión miometrial, la invasión linfovascular y la afectación ganglionar como principales factores pronósticos (232). Por tanto, el porcentaje de la serie es superior, siendo probables motivos la edad avanzada de las pacientes, el número superior de tumores grado histológico 3 y la presencia de tumores de tamaño elevado (media de 3,77 cm) de acuerdo con la bibliografía (233). La localización de la recidiva es relevante en referencia al pronóstico, aunque en nuestra serie no disponemos de la información, la bibliografía describe peores resultados en caso de localización pélvica frente a la recidiva a nivel vaginal (234).



Por otro lado, 33,9% de las pacientes fallecieron durante el seguimiento. Entre las causas cabe destacar que 22 muertes fueron debidas al CE mientras que 15 muertes presentaron otras causas diferentes a la enfermedad. En la literatura está descrito que dado las comorbilidades y la edad media de la población afectada por CE, una de las razones de mortalidad distintas a la propia neoplasia más frecuente es la de origen cardiovascular, sobre todo en los estadios iniciales (235).

En el análisis de supervivencia univariante de las variables clínico-patológicas de la serie estudiada; se asociaron con una menor supervivencia libre de enfermedad la histología no endometriode, el grado histológico 3 y el estadio avanzado. Estos factores también se identificaron como pronósticos sumados a la edad, el tamaño tumoral y la presencia de recidiva en el caso de la supervivencia global. Específicamente en el tamaño tumoral, se identificó una asociación en el caso de la variable estudiada de forma continua contrariamente a su estratificación con el límite de 2 cm. Todos los factores identificados en nuestro estudio han sido descritos en la bibliografía previamente como factores de riesgo asociados a la recidiva o a la muerte en CE (236,237).

Las variables significativas en el estudio univariante se trasladaron al modelo multivariante; donde destacó como factor independiente de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global el estadio tumoral avanzado. Está ampliamente descrito que los estadios avanzados al diagnóstico contribuyen de una forma fundamental en la recidiva y la muerte relacionadas con el CE (234). Además, en el caso de la SG también se identificó la asociación con la edad, con el tamaño del tumor superior a 2cm y con la presencia de recidiva. En las mujeres que inicialmente se presentan con enfermedad en estadios iniciales, pero experimentan una recurrencia, su supervivencia depende de la localización de la enfermedad según la bibliografía. La supervivencia general a los cinco años se reduce al 55 % para las recurrencias pélvicas y al 17 % para las recurrencias extrapélvicas (238). Otros factores pronósticos importantes en el CE son la presencia de invasión del espacio linfocascular (239) y la proporción de invasión del miometrio (240), que en el presente estudio no se exponen dado que no se recogieron los datos para ninguna de las dos variables.

Una serie de mayor tamaño y duración permitiría realizar una representación de la evolución tanto de la supervivencia libre de enfermedad como de la supervivencia global más precisa. Finalmente, en los próximos años, la introducción de marcadores moleculares en CE se implementará en el diagnóstico y clasificación del CE constituyéndose como nuevos factores pronósticos y desplazando probablemente a factores como el grado histológico que tienen una variabilidad interobservador no despreciable (241,242).

## DISCUSIÓN

Si bien, la última clasificación de la OMS (243) incluye en combinación características morfológicas, inmunohistoquímicas y moleculares de los tumores para evitar discrepancias, hoy en día ya se recomienda que la clasificación molecular se describa sistemáticamente en los informes de anatomía patológica (36). En nuestro centro hospitalario se están realizando esfuerzos para identificar la mejor combinación de marcadores moleculares que se utilizarán en un panel diagnóstico y pronóstico para describir el impacto clínico de la incorporación de la clasificación molecular en los informes de patología de rutina (6/550 *Genomic signatures for the prediction of recurrence and metastasis in Endometrial Cancers*, proyecto financiado por Fundació La Marató de TV3 del Grupo de Oncología Ginecológica y Peritoneal en el IIB-Sant Pau).

### 2. Señalización adrenérgica y su valor pronóstico en cáncer de endometrio

Existen numerosos trabajos que describen que la señalización adrenérgica, a través de sus neurotransmisores y los distintos subtipos de receptores adrenérgicos ejercen un papel importante en la iniciación y progresión en tumores sólidos como el cáncer de mama, de próstata, gástrico, melanoma o de colon, entre otros (180,244–247). Los valores de expresión a nivel de proteína de los receptores ADR $\beta$  se han reportado en diversos cánceres en un estudio de Rains *et al.* (176). Mecanismos como la angiogénesis, la inflamación, la supresión de la inmunidad adaptativa, la inhibición de la apoptosis y la resistencia a varios fármacos están regulados mayoritariamente por el subtipo ADR $\beta$ 2, pudiendo activar varias vías moleculares carcinogénicas como las que afectan a *MAPK*, *NFKB*, *Akt*, *HIF1 $\alpha$*  y *Stat3* (135). Adicionalmente, la posible regulación de ADR $\beta$ 2 por parte de las hormonas estrógeno y progesterona (248) también descrita en cáncer de mama hormono dependiente (249) hace de este receptor una diana interesante de estudio en los cánceres ginecológicos. En cáncer de endometrio, no hemos encontrado estudios, a día de hoy, que valoren la relevancia pronóstica de los receptores adrenérgicos.

La selección de la metodología utilizada para el estudio de la expresión de los receptores es relevante; dado que puede determinar los resultados y es un punto clave para la comparación con otras series publicadas. Las muestras fijadas en formol e incluidas en parafina representan una ventaja dado que permiten obtener información de la expresión y localización de la proteína de estudio y permiten, además, que sean analizadas a largo plazo cuando se pueden obtener datos de seguimiento y evolución de las pacientes. A pesar de eso, la obtención de ARN y su preservación en muestras parafinadas es una limitación que cabe tener en cuenta.

El análisis de expresión de ARNm evaluado por RT-qPCR es un método que permite la cuantificación masiva de genes con la extracción de ARN. Probablemente por este motivo, ha sido una herramienta utilizada frecuentemente para la investigación oncológica (250–252). Contamos con factores como la normalización con genes de referencia que permiten compensar las diferencias del material de las muestras. Su elección para el proceso de normalización es de alta relevancia para poder comparar los niveles de expresión de cada ARNm. En nuestro caso dado que no se detectó la expresión de los genes endógenos en todas las muestras parafinadas, se optó por un método alterativo que fue la normalización global, asimismo óptimo para esta técnica.

En nuestro estudio, en el análisis realizado a partir de la expresión de ARNm de los ADR $\beta$  se detectaron los subtipos de receptor ADR $\beta$ 1, ADR $\beta$ 2 y ADR $\beta$ 3 en la mayoría muestras analizadas, aunque a diferentes niveles de expresión y porcentaje entre ellos. ADR $\beta$ 2 fue el único que se expresó en la totalidad de las muestras evaluadas (100%). Por la demostrada implicación que tiene en la progresión de distintos tipos de cáncer, quisimos cuantificar ADR $\beta$ 2 a nivel de proteína y evaluar su capacidad pronóstica en las pacientes con cáncer de endometrio.

En la literatura existe cierta controversia sobre qué parámetro escoger para la cuantificación de la expresión de los receptores catecolaminérgicos por inmunohistoquímica, como hemos constatado realizando una amplia revisión de la bibliografía. No existe un consenso en los diversos artículos. La gran mayoría de estudios utilizan métodos semicuantitativos para medir la intensidad de la tinción. En algunas ocasiones de evalúa la propia intensidad de la tinción, mientras que en otras se mide el porcentaje de área teñida (244,253). Por ejemplo, Liu *et al.* (124) en carcinoma escamoso de lengua establece un '*immunoreactive score*' semicuantitativo valorado por tres patólogos de forma independiente, que se basa en una puntuación de intensidad (0-3) multiplicado por una puntuación de proporción de expresión (0-4). A partir de la puntuación final (0-12), escoge el valor 4 como el punto de corte para dividir entre expresión baja y expresión alta. En el resto de los trabajos, el punto de corte a partir de cuanto se define infraexpresión, expresión positiva o sobreexpresión, tampoco está estandarizado. Al mismo tiempo, la cuantificación digital, como la que hemos utilizado en este estudio, es ampliamente utilizada en la bibliografía (254). A pesar de ello, no existe un patrón definido, ni unos parámetros de cuantificación establecidos de ayuda a la estandarización (255,256). Dong *et al.* (257) utiliza la media de la densidad óptima obtenida de cinco campos de la preparación con el programa *Image J*; y marca como punto de corte la mediana de los valores obtenidos para definir alta y baja expresión. En nuestro estudio se ha utilizado el análisis digital cuantificando la señal inmunohistoquímica con el programa *Image J*, utilizado por un patólogo experto.

## DISCUSIÓN

Utilizando esta metodología, el primer análisis consistió en evaluar la expresión del receptor ADR $\beta$ 2 en nuestra serie de muestras tumorales y tejido endometrial sano. Los resultados mostraron una reducción significativa de la expresión de ADR $\beta$ 2 tanto para Intensidad como H-Score en tumor. Estos resultados fueron consistentes a los obtenidos en el estudio inicial realizado cuantificando la expresión por ARNm. El patrón de expresión celular de ADR $\beta$ 2 fue predominantemente de membrana plasmática, aunque también se identificó en el citoplasma. Contrariamente, Rains *et al.* (176) reportaron datos de expresión más elevada en muestras tumorales endometriales que en tejido sano a nivel de expresión proteica. Una posible explicación a las diferencias podría deberse a una expresión diferencial de ADR $\beta$ 2 según el subtipo histológico de cáncer de endometrio, el cual no se especifica en su estudio. Hasta lo que sabemos no existen otros estudios, que realicen esta comparación específicamente en cáncer de endometrio.

En la literatura se dispone de numerosos trabajos, en otros tipos tumorales, que valoran la expresión del receptor adrenérgico y lo relacionan con aspectos clínicos y su capacidad pronóstica. La pregunta principal es si la activación de la señalización  $\beta$ -adrenérgica sobre el cáncer representa un fenómeno general o es específica de ciertos tipos tumorales. En algunos estudios se asocia la expresión de ADR $\beta$ 2 a un peor pronóstico (124,244,249,258–260). Por ejemplo, Ogawa *et al.* (246) publicó recientemente en cáncer colorrectal, un análisis de 147 pacientes donde la expresión por inmunohistoquímica de ADR $\beta$ 2 representó un factor de riesgo significativo e independiente para la recidiva y la mortalidad. A destacar en su estudio, que los controles evaluados, así como las muestras de casos diagnosticados en estadios iniciales y adenomas no presentaron expresión del receptor adrenérgico. En nuestro estudio, observamos expresión en tejido endometrial sano, tal y como también se ha descrito en otros trabajos que evalúan ADR $\beta$ 2 (102). Nuestros resultados difieren de Ogawa *et al.* (246) en cuanto a la relación del receptor en su expresión en tejido tumoral vs no tumoral y en cuanto a la determinación como factor pronóstico, si bien el tipo tumoral es diferente y posiblemente determinante.

Por otra parte, existen estudios que asocian la expresión de ADR $\beta$ 2 a resultados favorables (261,262). Recientemente, en un artículo publicado en 2022 en cáncer de mama, en el marco de un análisis post-hoc de un ensayo clínico (261), se han encontrado diferencias en la expresión génica de ADR $\beta$ 2, específicamente en el subtipo tumoral HER2 positivo. En este estudio se incluyeron 944 pacientes con alta expresión de ADR $\beta$ 2 y 338 con baja expresión del receptor. La alta expresión se asoció a mayor supervivencia libre de enfermedad y además se identificó que la adición de trastuzumab a la quimioterapia mejoró esta supervivencia solo en aquellas pacientes con tumores que presentaban una alta expresión de ADR $\beta$ 2.

Se ha descrito que las hormonas sexuales pueden modular la vía adrenérgica (117) y tanto el cáncer de mama como el de endometrio tienen una clara influencia hormonal. Este hecho plantea la posibilidad de que las variaciones hormonales (niveles de estrógenos y progestágenos) que el organismo de las pacientes sufre previamente y posteriormente a la extirpación ovárica en la cirugía de CE, pueda contribuir a la modificación de la señalización adrenérgica implicadas en la progresión tumoral (117). La descripción de la interrelación inversa entre los estrógenos y remodelación de las fibras nerviosas del SNS (116); representa un campo de investigación en el que continuaremos trabajando.

La revisión de la bibliografía determinó las variables clínicas a analizar en referencia a su asociación con la expresión de ADRB2. Por ejemplo, Bae *et al.* publicó que una expresión menor de ADR $\beta$  se relaciona con un patrón más agresivo en cáncer gástrico, asociándose con un mayor grado histológico y estadio tumoral y también con un número superior de metástasis linfáticas (253). En nuestro estudio, no se ha evidenciado ninguna asociación entre la expresión de ADR $\beta$ 2 y los parámetros clínicos evaluados. Asimismo, se realizó un análisis de la asociación entre la SLE y la SG con la expresión del receptor adrenérgico sin obtener datos concluyentes ni significativos.

Por tanto, en la serie de pacientes analizada, el estudio de la expresión de AR $\beta$ 2 no presenta asociación con las variables clínicas estudiadas en cáncer de endometrio, a diferencia de otros tipos tumorales.

Sin embargo, la investigación debería proseguir en esta línea a varios niveles. Sería necesario confirmar estos resultados con estudios a mayor escala y determinar, por otra parte, la posible neuroplasticidad de la inervación simpática inherente al útero y su implicación en la progresión tumoral en CE. Lo cual estaría justificado dado que existen múltiples tratamientos  $\beta$ -bloqueantes ya validados para otras patologías, que han mostrado efectos favorables en la supervivencia en otros cánceres ginecológicos como el cáncer de ovario (169). A nivel de ensayos clínicos, el propranolol es el fármaco más utilizado para experimentar en este ámbito (143). Aunque por el momento, en cáncer de endometrio, los resultados utilizando  $\beta$ -bloqueantes no parecen tener un efecto protector como expone Roque *et al.* (263) en un estudio retrospectivo de 1964 pacientes diagnosticadas de EC. Hasta nuestro conocimiento, este es el único autor que lo ha analizado. La complejidad de la respuesta de los tumores a los  $\beta$ -bloqueantes en el cáncer permanece como un escenario variable, receptor-específico, tumor-específico y con un nivel de evidencia disponible limitado, por este motivo aún no se pueden extraer conclusiones (264). La realización de ensayos clínicos randomizados puede determinar su beneficio terapéutico de una forma más precisa.

### 3. Señalización dopaminérgica y su valor pronóstico en cáncer de endometrio

En los últimos años y a nivel experimental, la dopamina está mostrando un papel relevante en el cáncer (265). Los receptores dopaminérgicos, que median su respuesta, se expresan de forma diferencial en distintos tumores y cada tipo de cáncer parece tener su propio patrón de expresión. Al igual que noradrenalina y adrenalina, la dopamina, forma parte de las catecolaminas liberadas en respuesta a la activación del sistema nervioso simpático en contextos de estrés relacionados con la progresión tumoral (266). DRD2 se ha identificado como sobreexpresado en tumores sensibles a estrés e incluso se ha descrito recientemente su implicación a nivel nuclear en la activación de la vía HIF1 $\alpha$  por el cual media la progresión tumoral (156). DRD2 está implicado, además, en la angiogénesis relacionada con VEGF (227,267) por lo que es un candidato a convertirse en una potencial diana terapéutica en oncología. Por su parte, DRD1 ha mostrado también un papel en la evolución del cáncer (162). Ha sido estudiado principalmente en la neoplasia de hígado y de mama. Su implicación es controvertida dado que puede actuar como marcador pronóstico desfavorable relacionándose su sobreexpresión con una menor supervivencia, pero a la vez también podría actuar de forma inversa como un supresor de tumores en el caso específico del hepatocarcinoma (158,159,268).

La participación de los DR en la progresión tumoral fue apoyada inicialmente por el hallazgo de que pacientes que consumieron fármacos antipsicóticos simultáneamente a su tratamiento antineoplásico mostraron una mejor respuesta clínica que aquellos que no los tomaban (174,269). A partir de aquí y sumado a resultados obtenidos a nivel experimental y el interés por una medicina personalizada y una terapia dirigida, la señalización dopaminérgica se ha convertido en una oportunidad en la terapia contra el cáncer debido a su papel documentado sobre su implicación en la progresión tumoral (270). Dado que existe evidencia divergente en la influencia de la activación de los receptores dopaminérgicos, se ha sugerido que su papel podría ser tumor específico (147), de forma similar a los receptores adrenérgicos. El reciente trabajo de Wang *et al.* (162) demuestra la variedad de polimorfismos y la diversidad de niveles de expresión de los DR en diferentes cánceres. Además, la interacción entre los DR se complica por las diferencias en la afinidad del ligando dentro de los miembros de las distintas subfamilias (271) y por el hecho, además, de que cada receptor tiene propiedades farmacológicas diferentes (174,272). De aquí la relevancia de estudiarlo de forma particular en cada tipo tumoral.

En nuestro trabajo, la posibilidad de determinar la expresión de ARNm de los distintos subtipos de receptores dopaminérgicos en tejido endometrial sano y tumoral, permitió describir un patrón de expresión diferencial en los tumores de la población analizada.

En la mayoría de las muestras se detectaron niveles de ARNm para los receptores de la subfamilia D1 con un porcentaje de 98% y 92% para DRD1 y DRD5, respectivamente. Su perfil de expresión, que fue similar entre ambos, queda plasmado en el *HeatMap*. En el caso de DRD2, que hasta el momento y según la bibliografía representa el DR con más potencial pronóstico y terapéutico (265), se expresó en el 62% de las muestras analizadas. DRD3 y DRD4 no presentaron expresión en las muestras tumorales, si bien, en la bibliografía se reporta una sobreexpresión en glioblastoma y en leucemia mieloide aguda, respectivamente (270) y hasta lo que sabemos, no se ha descrito expresión en tumores sólidos a nivel periférico.

Dado la relevancia de DRD2 y el posible papel que se entrevé de DRD1, se escogieron estos receptores para evaluar por inmunohistoquímica su expresión proteica y su capacidad pronóstica. En el estudio inicial en nuestra serie de pacientes, los resultados de la evaluación IHQ mostraron una reducción significativa de la expresión de DRD1 en tejido tumoral, en comparación con el tejido sano. Estos resultados son consistentes con otros tipos tumorales, tal y como se reporta en el trabajo publicado recientemente por Rosas-Cruz *et al.*, 2022, en el que se describe la infraexpresión génica de DRD1 en muestras de tejido tumoral de cáncer de mama, pulmón, glioblastoma, hepatocarcinoma y colorrectal comparado con su correspondiente tejido sano obtenido de bases de datos públicas (TCGA) (270). En este artículo no se dispone de información para CE. En nuestra serie de pacientes, los niveles de expresión proteica de DRD2 no mostraron diferencias entre tejido tumoral y tejido sano, a pesar de que existe una tendencia a una mayor expresión en la muestra tumoral, tal y como se describe en la bibliografía (186). En referencia al patrón de expresión celular de DRD2, se ha identificado a nivel de membrana plasmática y de citoplasma, similar a lo descrito en la bibliografía para otros tipos de cáncer (162), aunque en algunos estudios DRD2 también ha sido identificado en el núcleo en células de CE (156). La importancia de describir el patrón y el nivel de expresión son clave para la eficacia de los agonistas o antagonistas de los DR. El nivel de expresión de DR parece depender no solo del subtipo tumoral sino también de la etapa de desarrollo tumoral y es un factor determinante para la respuesta terapéutica (162).

Igual que en el caso de ADR $\beta$ 2, realizamos el análisis de la asociación entre la expresión de los DR y los parámetros clínico-patológicos. En referencia a DRD1, se evaluaron la histología, el grado histológico, el tamaño del tumor y el estadio por haberse hallado previamente algunas relaciones en la bibliografía (158), sin embargo, tan solo se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño tumoral. El tamaño tumoral como factor pronóstico está en discusión en la literatura (273), motivo por el cual también se decidió introducirlo en el análisis. En nuestro estudio, los tumores con un tamaño menor o igual de dos centímetros presentaron una mayor expresión del receptor dopaminérgico.

## DISCUSIÓN

A continuación, realizamos un subanálisis frente a la variable estadio dividida en los distintos grupos según la clasificación FIGO. Los resultados, mostraron de nuevo que las pacientes con un estadio inicial de la enfermedad presentaban tumores con sobreexpresión del receptor DRD1 en comparación con las pacientes en estadio IV o avanzado.

En la literatura el papel de DRD1 en cáncer es controvertido y cada vez más las opiniones se dirigen a favor de un amplio espectro de vías de actuación cáncer dependiente igual que ocurre para otros DR como DRD2. Los estudios del papel de DRD1 se han centrado sobre todo en cáncer de mama y en cáncer de hígado (158,268). Hasta nuestro conocimiento, no existe información específica de su patrón de expresión en cáncer de endometrio y nuestros resultados son los primeros aportados en este sentido. En el cáncer de mama, la sobreexpresión de DRD1 correlaciona con la ausencia de receptores hormonales, tumores HER2 positivos, mayor grado histológico, mayor estadio tumoral y con una menor supervivencia libre en enfermedad y baja supervivencia global (160). Se han realizado múltiples estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar el efecto de agonistas del receptor DRD1 como fenoldopam en monoterapia o en combinación con otros fármacos como sunitinib (157,158,160). En hepatocarcinoma se ha descrito un papel relevante de DRD1 asociado a un incremento en la síntesis y liberación de dopamina actuando a nivel de crecimiento tumoral y la formación de metástasis mediante la regulación de la vía cAMP/PI3K/AKT/CREB en un estudio en líneas establecidas de este tipo de neoplasia; reportando asimismo un peor pronóstico en los pacientes con sobreexpresión del receptor (268). Contrariamente Wang *et al.* (159) ha publicado resultados en otro sentido en este mismo tipo tumoral, acerca de una expresión menor de DRD1 en muestras de hepatocarcinoma vs tejido sano asociado con un pronóstico desfavorable. Similar a los obtenidos en nuestra serie de pacientes en referencia a la asociación con parámetros clínico-patológicos como el tamaño tumoral o el estadio. En resumen, a pesar de que DRD1 puede representar un marcador o una diana interesante en algunos tipos tumorales, su papel queda pendiente de definir dado que actualmente los datos disponibles son limitados.

Por otra parte, la asociación entre la expresión de DRD2 y los parámetros clínico-patológicos muestra una relación diferente a la observada para DRD1. Equiparable a lo descrito por otros autores (183); la histología del carcinoma no endometriode así como los tumores con grado histológico 3 presentaron una expresión superior de DRD2 en comparación a sus categorías contiguas, que fue estadísticamente significativa, mostrando una asociación positiva entre la expresión de DRD2 y las variables relacionadas con peor pronóstico. En el parámetro Intensidad, también se observó esta asociación con el tamaño del tumor.



La definición de un punto de corte óptimo de la expresión de los receptores catecolaminérgicos no consta como consensuado en la bibliografía. Así, se estableció un posible valor de expresión que indicara un pronóstico significativo en la población estudiada a partir de un algoritmo estadístico. El análisis univariante de supervivencia libre de enfermedad y global para la expresión de DRD1 no estableció ninguna conclusión a destacar. Sin embargo, DRD2, mostró una posible asociación entre la sobreexpresión del receptor en tejido tumoral y una menor supervivencia tanto libre de enfermedad como global. Este es un dato relevante a nivel clínico y que además va en concordancia con la asociación de DRD2 a las variables clínico-patológicas descritas previamente por otros autores (183).

La obtención de factores clínicos pronósticos y de resultados relevantes en la expresión de DRD2 en el análisis univariante ofreció la posibilidad de diseñar un modelo multivariante para determinar si alguno de estos factores constaba de independencia como factor pronóstico. Además de las variables clínico-patológicas de la serie de pacientes analizadas, debemos destacar que la sobreexpresión de DRD2 también se mostró como un factor pronóstico independiente en nuestra serie analizada.

Dado que DRD2 ha sido más ampliamente estudiado en otros tipos tumorales, hemos revisado su papel para comprender su implicación en el CE. Los estudios actuales han demostrado funciones contrarias de DRD2 en varios tumores sólidos. Uno de los mecanismos principales del efecto tumor-supresor de la dopamina se ha asociado con una disminución de la angiogénesis, el cual se ha evaluado en modelos animales de cáncer de colon y de mama (227,267). En el mismo contexto, se ha descrito expresión de DRD2 en las células endoteliales de tumores humanos (274). Por otro lado, en modelos xenógrafos de cáncer de páncreas, se ha demostrado una inhibición del crecimiento tumoral utilizando antagonistas de DRD2 (149). La sobreexpresión de DRD2 en cáncer de mama, de esófago y urotelial se ha asociado a progresión de la enfermedad (275–277). En cambio, la existencia de polimorfismos responsables de la expresión reducida de DRD2 se ha asociado al desarrollo de cáncer colorrectal y a la recurrencia de los adenomas (278,279). Otros estudios también describen una reducción de la proliferación, mediante la inhibición de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B en relación al efecto de la dopamina a través de los receptores DRD2 en cáncer de pulmón de células pequeñas en modelos *in vitro* e *in vivo* (280). En global, existe múltiple información específicamente de DRD2 que confirma que su vía de acción y su modulación es tumor dependiente y posiblemente también pueda ser influenciada por otros factores sistémicos.

## DISCUSIÓN

Los estudios a nivel terapéutico en CE con moléculas dirigidas a los receptores dopaminérgicos se han centrado por el momento en el subtipo de carcinoma de tipo seroso, dado su particular agresividad. Recientemente, se han publicado resultados tanto experimentales como clínicos (183,184,186,281–283) (NCT03485729; NCT03394027), utilizando las moléculas ONC201 y ONC206 descritas como antagonistas de DRD2, con resultados prometedores tanto si son administrados en monoterapia como asociados a otros agentes citotóxicos como paclitaxel.

Fang *et al.* (184) define que la molécula ONC201 exhibe actividad antitumoral en células de cáncer de endometrio seroso humanas mediante la inhibición de la proliferación celular, así como la inducción de apoptosis independiente de *p53*. A nivel molecular, el tratamiento con ONC201 se asoció con la inhibición de las vías AKT/mTOR y MAPK y la activación de TRAIL/DR5/caspasa 8 y caspasa 9/3 así como de vías apoptóticas mediadas por PARP en células de CE tipo seroso. Los experimentos *in vitro* mostraron que la molécula ONC201 es un antagonista competitivo directo de DRD2 y DRD3 (185), que median el efecto de la dopamina a través de la subunidad  $G_{\alpha i/o}$  y el control de las vías críticas de señalización de estrés y pro-supervivencia celular que están mayoritariamente desreguladas en los tumores (284).

El reciente estudio de Prabhu *et al.* (281) investiga la expresión de los receptores DRD2 y DRD5 en cáncer en general y su influencia en la sensibilidad de la célula tumoral para ONC201. Entre sus resultados, incluye muestras de CE (n=32) sometidas a análisis inmunohistoquímico con detección del porcentaje de área teñida, además de una comparación con datos de TCGA. En varios tipos tumorales observa que los niveles elevados de DRD2 presentan una supervivencia global relativamente inferior, destacando entre ellos el CE. Por tanto, estos resultados irían en concordancia con el estudio de supervivencia realizado con nuestra serie de pacientes.

El trabajo de Pierce *et al.* (183), publicado en 2021, es el estudio más reciente sobre el papel de DRD2 como diana terapéutica específicamente en CE. Este estudio salió a la luz durante el análisis de resultados de esta tesis doctoral y se basa en el análisis del efecto antitumoral del compuesto ONC201 en células de CE y en un modelo animal transgénico de CE. Su uso demuestra beneficios experimentales tanto a nivel de CE seroso como endometriode. La cohorte estudiada incluyó 118 pacientes con subtipos endometriode y seroso de CE, que es muy similar a la de nuestro trabajo (n=109). Mediante la evaluación inmunohistoquímica y el análisis H-Score en muestras tumorales, concluye que el aumento de la expresión de DRD2 se asocia significativamente con el grado del tumor, el estadio y la histología serosa. Además, la expresión de la proteína DRD2 se asoció significativamente con la SLE y la SG.

En el mismo trabajo, se utilizó la base de datos TCGA (N = 371 tumores endometriales) para obtener información adicional. La expresión de DRD2, a nivel de ARNm, fue mayor en el tipo seroso que en el endometriode y en el subtipo de alto número de copias en comparación con los otros subtipos de la nueva clasificación molecular (35). El subtipo molecular con alto número de copias incluye un 25% de tumores endometrioides de alto grado además de los subtipos histológicos serosos. La relación descrita en este artículo con la expresión de DRD2 y su posible implicación en tumores de comportamiento agresivo, representaría una estrategia terapéutica relevante. Pierce *et al.* pasó a ser el primer estudio que ha demostrado la correlación entre los niveles de expresión de DRD2 y las variables clínicas y patológicas en tumores humanos de CE. Estos resultados, se asemejan a los nuestros, pudiendo concluir de nuevo que la sobreexpresión de DRD2 se asocia significativamente al subtipo seroso de CE, al grado tumoral 3 y a una peor supervivencia global y libre de enfermedad.

Hu *et al.* (186) , publicó en 2020 un estudio acerca del efecto de Imipridona ONC206 en el tratamiento del cáncer de endometrio tipo seroso como alternativa para los tumores ONC201-resistentes. La experimentación englobó datos de pacientes, ensayos *in vitro* de líneas establecidas de células de CE y de modelos xenógrafos generados partir de la línea celular ARK1. En el análisis de datos de TCGA ARN-seq define que la expresión de ARN de DRD2 es significativamente mayor en el subtipo seroso que en el endometriode tal y como muestra nuestro análisis en la tabla de factores clínico-patológicos. Además, realiza una determinación de los niveles de ARNm de DRD2 en su propia cohorte de pacientes viendo una sobreexpresión significativa del receptor dopaminérgico en las muestras del subtipo serosos en comparación con el subtipo endometriode e incluso en tejido endometrial sano. Por último, la alta expresión de DRD2 se asoció significativamente con una menor supervivencia de las pacientes con CE del tipo seroso sugiriendo a DRD2 como un factor pronóstico.

A pesar de la extensa literatura que demuestra la implicación de la señalización dopaminérgica en la progresión tumoral a nivel clínico, la escasa información sobre los mecanismos moleculares implicados en el efecto es una limitación. Por este motivo creemos en una metodología de trabajo transversal basada en la medicina traslacional; en la cual se analicen paralelamente los datos clínicos de las pacientes en combinación con experimentación *in vitro* e *in vivo* para investigar cuestiones aún pendientes en la fisiopatología del CE. Los esfuerzos deben ir dirigidos a identificar aquellas pacientes con mayor riesgo de presentar cáncer, específicamente con un patrón agresivo y saber cuáles son lo que responderán a una posible terapia dirigida.

### 4. Caracterización del sistema catecolaminérgico en modelos animales

Existen una gran variedad de modelos preclínicos de cáncer de endometrio disponibles (207), particularmente los modelos animales murinos se han establecido en esta neoplasia tanto a nivel del estudio de la progresión tumoral como de ensayos terapéuticos (204). Destacan entre ellos los modelos xenógrafos derivados de pacientes o PDX dado su capacidad para traducir la complejidad del tumor original (206). Sus características los hacen un modelo óptimo para la investigación traslacional en cáncer y para la experimentación de hipótesis como la estudiada en este trabajo.

Nuestros modelos denominados END 17 y END 19 se generaron en la cepa *Swiss Nude*, que es adecuada para investigación en CE (208,285), a partir de la inoculación ortotópica de fragmentos de tumor de dos pacientes diferentes.

En referencia al sitio de implantación tumoral, la localización más común en la bibliografía es a nivel subcutáneo. Aún y así, cabe destacar que la implantación ortotópica, en el caso del CE en el útero, reproduce de forma más precisa el tumor original ya que crece en un microentorno fisiológico favoreciendo la aparición de lesiones metastásicas (206). En la bibliografía, se ha descrito una tasa de implantación subcutánea alrededor del 60-80% mientras que a nivel ortotópico oscila entre 75-90% (206). En nuestros resultados, la tasa de implantación en la inoculación transmiometrial ha sido la esperada; alcanzando un 85% de media entre el modelo END 17 y el modelo END 19. Cabrera *et al.* (208), describió resultados poco óptimos en la técnica de inoculación vía vaginal con tasas de implantación endometrial bajas, de alrededor del 20% en comparación con la vía transmiometrial que fue del 90% en el modelo derivado de tejido tumoral. En este trabajo intentamos mejorarlo colocando un tapón vaginal de material estéril para mantener el fragmento tumoral un tiempo suficiente hasta la implantación, dadas las ventajas que suponía este tipo de implantación por ser una vía menos invasiva y rápida. A pesar de eso, la tasa de implantación no fue exitosa en ningún animal, motivo por el cual podríamos concluir que con nuestro procedimiento tampoco hemos conseguido una implantación tumoral óptima. Esto puede ser debido a que se requiera otro tipo de abordaje o instrumental para traspasar el cérvix y depositar el fragmento más profundamente dentro del endometrio.

Las muestras de tumor extraídas de pacientes se criopreservaron previamente a la implantación, la cual se realizó un día diferente al de su obtención. A pesar de que la bibliografía describe mejores tasas de implantación en muestras en fresco, estudios recientes como el de Bonazzi *et al.* y Shin *et al.* (285,286) utiliza este tipo de aproximación, al igual que en nuestro estudio, con resultados óptimos.

Por otra parte, es conocido que varios factores como la histología, el tamaño del fragmento o el tipo de implantación pueden afectar la ratio de implantación (287). Por ejemplo, en un estudio reciente, se reporta una implantación exitosa en tumores con grado histológico 2 o 3 en detrimento de tumores con grado histológico 1 (286). Esta información también se confirma por Shin *et al.* (285) que define que la tasa de implantación depende del grado tumoral (285). Los tumores END 17 y END 19 presentaban ambas características histológicas acorde a un patrón agresivo, tratándose de un CE endometriode grado 3 y un CE seroso definido clásicamente también como grado 3. Esta puede ser la razón de la óptima tasa de implantación. Su selección como muestras para el experimento se debió a que representan tipos histológicos prevalentes en la población y que sus características hacían predecir que originarían un patrón de diseminación metastásica adecuado para el estudio.

La monitorización de los modelos animales supone un reto mayor y además un factor interesante a nivel de descripción de la historia natural de la patología y el uso de estos modelos en la evaluación de compuestos antitumorales en ensayos preclínicos. En el caso de los PDX ortotópicos los métodos de seguimiento más utilizados son el índice de palpación o bien la técnica de imagen. Entre ellas, destacan por ejemplo la Resonancia Magnética, un método adecuado para la evaluación *in vivo* del volumen y localización tumoral, aunque es una técnica que requiere una gran infraestructura y es costosa. La Ecografía Transabdominal por su parte, no es invasiva y es de fácil manejo, aunque no existe una buena correlación entre el diámetro tumoral por imagen y el tamaño final real (208). Existen otras técnicas más complejas como la descrita por Haldorsen *et al.* (197) basada en una imagen multimodal asociando PET y TAC. En nuestro caso, se ha utilizado el índice de palpación dado que no se trataba de un ensayo a nivel farmacológico y para los objetivos del trabajo era un método apropiado.

El tiempo de crecimiento, estimado indirectamente por el índice de palpación y el peso final del tumor tras la necropsia presentó valores superiores en el modelo generado a partir de END 17. Concretamente, a los 30 días de la implantación, el modelo END 17 alcanzó prácticamente el valor máximo del índice de palpación, definido como 3. En la red ENITEC, que comparte una cohorte de modelos PDX de EC originados de 124 pacientes, se describe un rango de crecimiento del tumor entre 2-5 meses hasta disponer de un tumor palpable y transferible, aunque se analizan implantaciones tanto heterotópicas como ortotópicas (206). El patrón de diseminación tumoral del modelo END 17 fue principalmente por vía linfática, presentando focos tumorales a nivel pélvico y paraaórtico ganglionar, al igual que se observa en pacientes (288). También se detectó carcinomatosis peritoneal en el 40% de los animales positivos en tumor primario, probablemente determinado por el patrón histológico que lo caracteriza.

## DISCUSIÓN

En menor porcentaje observamos diseminación hematógena, principalmente pulmonar, en los dos tipos de modelos ortotópicos, muy similar a lo descrito en la bibliografía para otros PDX de CE (208). Como dato de correlación con una serie de pacientes, la metástasis a nivel pulmonar es la diseminación a distancia más común en CE (289). Entre los dos modelos estudiados, END17 representó la patología a nivel local y mostró una mayor carga tumoral diseminada asociada a una supervivencia menor reproduciendo las fases de desarrollo tumoral por completo.

La validación para demostrar el paralelismo entre el tumor del paciente y el tumor obtenido del modelo animal se realizó mediante histología e inmunohistoquímica, como en la mayoría de los estudios con modelos PDX (287). Otros autores, sin embargo, utilizan la expresión génica de las mutaciones presentes en los tumores del paciente y los tumores generados en los modelos PDX (195,209). En nuestro estudio, se pudo comprobar la persistencia de las características del tumor primario original a partir de la expresión inmunohistoquímica de marcadores moleculares relacionados con el CE que se determinan habitualmente en la práctica clínica, los genes reparadores del ADN (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2* y *MSH6*), los receptores hormonales y la expresión de *p53* (99,100). En un estudio interesante publicado en 2022, Bonazzi *et al.* generó modelos representativos de los cuatro subtipos moleculares de EC (33,286), lo que posibilita testar y evaluar la respuesta de múltiples tratamientos biológicos *in vivo*.

Nuestro estudio, hasta nuestro conocimiento, es el primero que determina la expresión de receptores catecolaminérgicos en modelos PDX de CE. Se ha seguido el esquema del análisis en las muestras de la serie de paciente con CE. En primer lugar, en la comparación entre el tejido endometrial sano y el tumor, se ha evidenciado un patrón destacadamente variable entre los dos modelos y los propios receptores. En concordancia con los datos de la serie de pacientes, DRD1 se expresa de forma superior en el tejido endometrial sano en comparación con el tejido tumoral en END 19 y en END 17. Cabe destacar el hecho de la expresión elevada de ADR $\beta$ 2 en muestra tumoral con respecto a los datos clínicos de pacientes en el caso de END 17. Se ha descrito que los niveles en el estrógeno circulante pueden influir en la inervación simpática uterina provocando una rápida degeneración de los axones terminales simpáticos en el útero y variando los niveles de NA (116,187). El control de los niveles hormonales y el estudio de esta neuroplasticidad en el modelo END17 sería fundamental para entender los resultados obtenidos. En referencia a DRD2 destacó su expresión superior a nivel tumoral en el mismo modelo. Paralelamente, se ha identificado una menor supervivencia del modelo generado a partir de END 17, por lo que se ha completando el análisis del mismo parámetro según la expresión de cada receptor.

Como en el caso de la serie de pacientes, se ha determinado un posible punto de corte pronóstico que permite dividir los animales en dos grupos; aún y así no se ha podido definir una asociación de la sobreexpresión de ningún receptor valorado con la supervivencia del modelo END 17. Finalmente, se ha demostrado la persistencia de las mismas características de expresión de los receptores catecolaminérgicos del tumor primario en el tumor originado en los dos modelos PDX. Este hallazgo es relevante dado que reafirma la representatividad de estos modelos para poder proseguir la investigación de las posibles vías moleculares afectadas en CE y ensayar terapias dirigidas a los receptores catecolaminérgicos.

En el estudio, nos hemos centrado en la expresión a nivel tumoral pero la interacción de las células tumorales con el sistema inmune es un campo a investigar en el CE (118). Además, se han descrito receptores catecolaminérgicos en las células inmunológicas y del estroma tumoral (147). El impedimento con los modelos PDX, inmunodeprimidos por definición, es conocido; por tanto, una posible solución para poder estudiar la interacción entre las diferentes células del microambiente tumoral es la utilización de ratones humanizados (290).

Dado que los modelos PDX necesitan unas condiciones de optimización y conllevan una gran cantidad de recursos y tiempo de ejecución (291), la opción de formar parte de redes colaborativas nacionales o internacionales permitirá compartir conocimiento y modelos ya generados, como los nuestros y avanzar de una forma óptima en la investigación traslacional en oncología.

### **5. Estudio de la neuromodulación de DRD1 y DRD2 en la proliferación celular *in vitro***

Paralelamente a la valoración de la serie de pacientes y a la experimentación *in vivo*; hemos estudiado el efecto de la exposición a los neurotransmisores sobre la proliferación celular en las líneas tumorales de CE, así como el efecto de la neuromodulación con agonistas y antagonistas dopaminérgicos selectivos.

Las líneas celulares derivadas de paciente establecidas en cultivo y comerciales, permiten la estandarización de las condiciones de trabajo y han sido utilizadas ampliamente en experimentación en cáncer de endometrio (201). HEC1A y AN3CA han sido escogidas en nuestro estudio por ser líneas tumorales representativas de CE y por disponer de numerosa información en literatura. Aún y así, permanecen cuestiones no resueltas como la clasificación de la línea HEC1A como CE tipo I o tipo II.

## DISCUSIÓN

Descritas como ambos tipos en la bibliografía (201), este es un problema que puede quedar obsoleto dado la confirmada tendencia al cambio de la clasificación de esta neoplasia (35). El hecho de que las líneas celulares HEC1A y HEC1B presenten diferentes fenotipos de IMS (Alta y baja respectivamente) y que las dos fueran aisladas del mismo paciente, demuestra que la información relacionada con la heterogeneidad intratumoral no puede ser mantenida *in vitro* estableciendo tan solo una línea celular del tumor (204). A pesar de eso, se conoce que se mantienen algunas de las alteraciones moleculares más relevantes en la oncogénesis como las localizadas en *PI3K/Akt*, *PTEN* o *KRAS* según las investigaciones de Weigelt *et al.* y de Oda *et al.* (203,292).

En la bibliografía, la noradrenalina y la adrenalina se relacionan con la proliferación de las células tumorales (293). En los últimos años, la investigación ha aclarado los mecanismos moleculares responsables para los efectos activadores de NA y A dentro del microambiente tumoral sobre la tumorigénesis y la formación de metástasis. Mayoritariamente a través de los ADR $\beta$ , que se expresan tanto en las células tumorales como en las células del estroma tumoral (122,135). Sin embargo, cabe señalar que el efecto de NA y A en los procesos relacionados con la proliferación no es general en todo tipo de cánceres.

Especialmente en el cáncer de mama, el efecto pro-proliferativo o anti-proliferativo parece depender del modelo experimental de cáncer utilizado y el subtipo de receptor adrenérgico implicado (294,295).

En el ensayo *in vitro*, inicialmente se evaluó la expresión génica de los neuroreceptores de las líneas celulares. Entre los receptores catecolaminérgicos analizados, ADR $\beta$ 2, DRD1 y DRD5 presentaron expresión génica en HEC1A y AN3CA, mientras que DRD2 tan solo se detectó en HEC1A. Por otra parte, AN3CA expresó DRD4. En la bibliografía, la expresión de DR está descrita en diferentes líneas tumorales de CE (183). En nuestros ensayos, ambas catecolaminas mostraron un efecto proliferativo dosis-dependiente en la línea tumoral AN3CA, siendo menos efectiva en la línea HEC1A. Contrariamente, la exposición a dopamina resultó en una reducción de la proliferación en ambas líneas celulares tal y como está descrito en la bibliografía en varios tipos tumorales (270).

La disponibilidad de múltiples fármacos moduladores de dopamina dirigidos a los diferentes DR, ha hecho que, aún y desconociendo el preciso funcionamiento de los mecanismos implicados en las vías de señalización en cáncer, múltiples agentes hayan sido aplicados en experimentación para identificar sus efectos. En el *review* publicado en 2022 por Grant *et al.* se recogen los mecanismos descritos hasta el momento por parte de diferentes componentes dirigidos a DRD1 y a DRD2 en modelos preclínicos y ensayos clínicos en diferentes tipos de cáncer (265). A pesar de que en el artículo no constan datos referentes a



CE, se obtiene información clave como que las vía de señalización por la cual el efecto antitumoral incide más frecuentemente incluyen cAMP/PI3K/AKT y MAPK/ERK (296). La complejidad asociada entre un efecto tejido-dependiente que comprende múltiples dianas o receptores, que a la vez son dinámicos, hace que se requieran más estudios experimentales para describir el papel de la modulación de dopamina aplicable en terapia oncológica. En este sentido, por ejemplo, existen progresos a nivel de metodología para precisar la relación funcional entre los heterodímeros formados por DRD1 y DRD2 y su respuesta a diferentes niveles fisiológicos de dopamina (297).

En nuestro estudio, el resultado más destacable de los ensayos con agonistas y antagonistas dopaminérgicos proviene del antagonista de DRD2 domperidona, que redujo un 90% la proliferación en ambas líneas celulares y del agonista de DRD1 fenoldopam que mostró una reducción del 40%. El hecho de mostrar de forma independiente y opuesta una inhibición sobre la proliferación celular en las líneas HEC1A y AN3CA, nos permitió evaluar una novedosa estrategia terapéutica. Ésta consistió en la combinación de ambos efectos, agonismo DRD1 y antagonismo DRD2, que resultó en una mayor reducción de la proliferación celular obteniendo por tanto resultados muy favorables en la línea AN3CA, que es la que presenta mayores niveles de expresión de los receptores dopaminérgicos. En la revisión bibliográfica realizada, no se han identificado estudios en CE que apliquen la alternativa terapéutica basada en la sinergia entre dos compuestos en experimentación *in vitro*.

Fenoldopam inhibe la proliferación celular, reduce la activación de AKT/IGF-1 en las células tumorales y anula el crecimiento de las células de músculo liso endotelial inducido por IGF-1, decisivo para la angiogénesis, en experimentación *in vitro* (298). Por su parte, domperidona, ha sido estudiada como terapia combinada con otros agentes en la inducción de la muerte de células tumorales (299). La nueva estrategia terapéutica basada en la combinación de moléculas, permite abordar simultáneamente dos posibles dianas claves en la progresión tumoral, tratándose de una planteamiento atractivo a la vez que desafiante. Además, la terapia sinérgica está descrita como una herramienta para disminuir la resistencia a fármacos (300). Por último, cabe destacar que tanto fenoldopam como domperidona están establecidos a nivel clínico con indicaciones diferentes a la terapia antitumoral. El desarrollo de fármacos es un proceso que consume tiempo, dinero y recursos sin garantía de éxito, incluso con moléculas en etapa tardía. Por tanto, una forma elegante de eludir algunos de los obstáculos mencionados es la reutilización de medicamentos fuera de su indicación inicialmente prevista. El análisis de la implicación clínica de las biomoléculas permite aplicar los conocimientos en el diseño de sinergias terapéuticas aplicables en oncología como ha quedado ejemplificado en este trabajo.

### 6. Limitaciones del estudio

Las limitaciones de este trabajo son en primer lugar, el tamaño de la muestra de la población de estudio, la naturaleza retrospectiva de la serie y la obtención de muestras de pacientes en diferentes años, lo que conlleva diferentes períodos de seguimiento en cada paciente. Probablemente una cohorte de estudio más homogénea en el tiempo, de mayor volumen y con una determinación de la mortalidad específica por neoplasia habría permitido tener unas características clínico-patológicas más representativas de la población general.

A nivel técnico, el uso de material parafinado para evaluar la expresión del ARNm por TLDA puede condicionar los resultados. El método de aislamiento de ARN podría verse afectado por su degradación en muestra antiguas, aunque el proceso de normalización aplicado en el estudio compensa la limitación.

Como limitación general al uso de los modelos xenógrafos derivados de paciente podría ocurrir que a pesar de que las características histológicas y moleculares del tumor inicial se mantienen, incluyendo la heterogeneidad tumoral, al implantar una reducida muestra de tumor podría existir una pérdida de información histológica o molecular del paciente que no sea inoculada en el ratón.

Otra limitación del estudio y sobretodo con el posible uso del modelo END17 para el estudio de la implicación adrenérgica en la progresión tumoral, es el hecho de que se ha descrito que los niveles en el estrógeno circulante influyen en la inervación simpática uterina. El control de los niveles hormonales sería fundamental para el estudio de esta señalización en este tipo de modelos PDX.

### 7. Aportaciones del estudio y líneas futuras

En primer lugar, el estudio ha permitido definir la implicación específica de los receptores catecolaminérgicos ADR $\beta$ 2, DRD1 y DRD2 en la evolución clínica de una serie de pacientes con cáncer de endometrio. Los resultados no han sido concluyentes para ADR $\beta$ 2 a nivel pronóstico, mientras que DRD1 ha sugerido una posible relación inversa con dos factores clínico-patológicos asociados a mal pronóstico. En referencia al receptor dopaminérgico DRD2, se ha identificado como factor pronóstico independiente en la serie analizada. Cabe destacar que cumple las características con las que los factores pronósticos deben basarse; se trata de un biomarcador asequible, de disponibilidad universal y reproducible.

La corroboración en este estudio de su doble papel pronóstico y como diana terapéutica permitiría dividir los pacientes desescalando el tratamiento o adaptando el seguimiento en aquellos con menor riesgo de recurrencia y por el contrario, intensificando la terapia dirigida en los pacientes de alto riesgo. Por otra parte, el desarrollo de un modelo xenógrafo derivado de paciente que reproduce la progresión tumoral y la diseminación metastásica propia de las pacientes con CE; asociado por primera vez según nuestro conocimiento, a la caracterización del patrón de expresión de los receptores catecolaminérgicos, ha generado un modelo experimental que se puede utilizar en la validación futura de resultados clínicos. Por último, la interacción de DRD1 con DRD2 ha evidenciado en la experimentación *in vitro* un posible efecto antiproliferativo sinérgico entre los dos tipos de familias de receptores de dopamina que representa una estrategia terapéutica a seguir evaluando.

Desde la información extraída del presente trabajo, creemos que las líneas de investigación futuras deberían basarse en varios objetivos:

-Explorar los patrones de expresión de DRD1 y DRD2 en diferentes etapas del desarrollo de la enfermedad y diferentes subtipos de tumor definidos por la nueva clasificación molecular.

-Estudiar la capacidad antitumoral y las vías de señalización implicadas en el agonismo DRD1, el antagonismo DRD2 y su combinación en ensayos *in vitro*. Evaluar, además, la capacidad antitumoral y antimetastásica de los distintos tratamientos en modelos preclínicos de CE así como los mecanismos moleculares subyacentes para poder plantear el reposicionamiento de fármacos en esta patología.

-Definir con precisión el patrón de expresión específico de DRD1 y DRD2 en diferentes subpoblaciones de células tumorales, como las células madre tumorales y su neuromodulación poder dirigir opciones terapéuticas de forma más precisa a esta población tumoral.

-Estudiar el patrón de expresión específico de DRD1 y DRD2 en diferentes subpoblaciones de células estromales, como las células del sistema inmune y su neuromodulación para poder crear nuevas estrategias terapéuticas que incluyan todo el microambiente tumoral.

## VI. CONCLUSIONES

## VI. CONCLUSIONES

1. AR $\beta$ 1, AR $\beta$ 2 y AR $\beta$ 3 se expresaron a nivel de ARNm en la mayoría de las muestras tumorales, siendo AR $\beta$ 2 el que se detectó en el 100% de los casos. El estudio de la expresión proteica de AR $\beta$ 2 en muestras tumorales no presentó asociación con las variables clínico-patológicas estudiadas en la serie de pacientes afectadas de CE, a diferencia de otros tipos tumorales.
2. Entre los receptores dopaminérgicos, se identificó expresión génica del subtipo DRD1, DRD2 y DRD5 en las muestras tumorales, a diferencia de DRD3 y DRD4.
3. El receptor DRD1 mostró una mayor expresión proteica significativa en tumores de menor tamaño ( $\leq 2$ cm) y en el estadio inicial de la enfermedad frente al estadio IV en nuestra serie de pacientes, no asociándose con la supervivencia libre de enfermedad ni con la supervivencia global.
4. La sobreexpresión proteica de DRD2 en tejido tumoral se asoció significativamente con el subtipo no endometriode de CE, con tumores de alto grado y con una peor supervivencia libre de enfermedad y global. DRD2 es un marcador de mal pronóstico en la serie de pacientes analizada.
5. Es posible generar un modelo ortotópico de cáncer de endometrio a partir de tejido derivado de paciente mediante inoculación ortotópica vía transmiometrial presentando un patrón de diseminación similar al descrito en las pacientes. Se preservan las características histológicas, moleculares y de expresión de los receptores AR $\beta$ 2, DRD1 y DRD2 en el tumor generado.
6. La activación adrenérgica por las catecolaminas NA y A indujo un efecto proliferativo dosis-dependiente en las células tumorales de CE AN3CA, mientras que la activación de la señalización dopaminérgica, por DA, redujo en un 40% la capacidad de proliferación de las líneas celulares HEC1A y AN3CA.
7. La exposición a domperidona, un antagonista selectivo de la familia del receptor DRD2 o a fenoldopam, un agonista de la familia de receptores DRD1, redujo en un 90% y 40% la capacidad de proliferación de las células HEC1A y AN3CA, respectivamente.

## CONCLUSIONES

8. El tratamiento combinado de fenoldopam y domperidona indujo una reducción significativamente mayor en la capacidad de proliferación celular de la línea AN3CA, comparado con su tratamiento en monoterapia, demostrando un efecto sinérgico en CE.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



**VII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Ca Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
2. Lortet-Tieulent J, Ferlay J, Bray F, Jemal A. International Patterns and Trends in Endometrial Cancer Incidence, 1978–2013. *Jnci J National Cancer Inst.* 2017;110(4):354–61.
3. Surveillance T, Epidemiology, (SEER) and ER. Cancer statistics. Uterine Cancer. [Internet]. Cancer Stat Facts: Uterine Cancer. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/corp.html>
4. Kamal A, Tempest N, Parkes C, Alnafakh R, Makrydima S, Adishesh M, et al. Hormones and endometrial carcinogenesis. *Hormone Mol Biology Clin Investigation.* 2016;25(2):129–48.
5. Raglan O, Kalliala I, Markozannes G, Cividini S, Gunter MJ, Nautiyal J, et al. Risk factors for endometrial cancer: An umbrella review of the literature. *Int J Cancer.* 2019;145(7):1719–30.
6. Deligdisch-Schor L. Hormonal Pathology of the Uterus. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1242:145–77.
7. Emons G, Mustea A, Tempfer C. Tamoxifen and Endometrial Cancer: A Janus-Headed Drug. *Cancers.* 2020;12(9):2535.
8. Gong TT, Wang YL, Ma XX. Age at menarche and endometrial cancer risk: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Sci Rep-uk.* 2015;5(1):14051.
9. Gavriluyk O, Braaten T, Weiderpass E, Licaj I, Lund E. Lifetime number of years of menstruation as a risk index for postmenopausal endometrial cancer in the Norwegian Women and Cancer Study. *Acta Obstet Gyn Scan.* 2018;97(10):1168–77.
10. Shaw E, Farris M, McNeil J, Friedenreich C. Obesity and Cancer. *Recent Results Canc.* 2016;208:107–36.
11. Meurs HS van, Bleeker MCG, Velden J van der, Overbeek LIH, Kenter GG, Buist MR. The Incidence of Endometrial Hyperplasia and Cancer in 1031 Patients With a Granulosa Cell Tumor of the Ovary: Long-Term Follow-Up in a Population-Based Cohort Study. *Int J Gynecol Cancer.* 2013;23(8):1417.
12. Meczekalski B, Pérez-Roncero GR, López-Baena MT, Chedraui P, Pérez-López FR. The polycystic ovary syndrome and gynecological cancer risk. *Gynecol Endocrinol.* 2020;36(4):1–5.
13. Pilleron S, Sarfati D, Janssen-Heijnen M, Vignat J, Ferlay J, Bray F, et al. Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: A population-based study. *Int J Cancer.* 2019;144(1):49–58.
14. Yang X, Wang J. The Role of Metabolic Syndrome in Endometrial Cancer: A Review. *Frontiers Oncol.* 2019;9:744.

## BIBLIOGRAFÍA

15. Sheikh MA, Althouse AD, Freese KE, Soisson S, Edwards RP, Welburn S, et al. USA Endometrial Cancer Projections to 2030: should we be concerned? *Future Oncol.* 2014;10(16):2561–8.
16. Khandekar MJ, Cohen P, Spiegelman BM. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(12):886–95.
17. Onstad MA, Schmandt RE, Lu KH. Addressing the Role of Obesity in Endometrial Cancer Risk, Prevention, and Treatment. *J Clin Oncol.* 2016;34(35):4225–30.
18. Bercow AS, Eisenhauer EL. Screening and surgical prophylaxis for hereditary cancer syndromes with high risk of endometrial and ovarian cancer. *J Surg Oncol.* 2019;120(5):864–72.
19. Carr C, Son J, Yao M, Priyadarshini A, Marquard J, Vargas R, et al. Clinicopathologic characteristics and outcomes of endometrial Cancer patients with mismatch repair deficiency in the era of universal Lynch syndrome screening. *Gynecol Oncol.* 2020;159(3):712–20.
20. Cho KR, Cooper K, Croce S, Djordevic B, Herrington S, Howitt B, et al. International Society of Gynecological Pathologists (ISGyP) Endometrial Cancer Project: Guidelines From the Special Techniques and Ancillary Studies Group. *Int J Gynecol Pathol.* 2019;38(Iss 1 Suppl 1):S114–22.
21. Sociedad, Español, Obstetricia, Ginecología. Guía de Asistencia Práctica. Oncoguía SEGO: Cáncer de Endometrio 2016. *Prog Obstet Ginecol.* 60 (3):273–302.
22. Møller P, Seppälä T, Bernstein I, Holinski-Feder E, Sala P, Evans DG, et al. Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynaecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database. *Gut.* 2017;66(3):464–72.
23. Pilarski R, Burt R, Kohlman W, Pho L, Shannon KM, Swisher E. Cowden Syndrome and the PTEN Hamartoma Tumor Syndrome: Systematic Review and Revised Diagnostic Criteria. *Jnci J National Cancer Inst.* 2013;105(21):1607–16.
24. MATANES E, VOLODARSKY-PEREL A, EISENBERG N, ROTTENSTREICH M, YASMEEN A, MITRIC C, et al. Endometrial cancer in germline BRCA mutation carriers: a systematic review and meta-analysis. *J Minim Invas Gyn L.* 2020;28(5):947–56.
25. Doherty MT, Sanni OB, Coleman HG, Cardwell CR, McCluggage WG, Quinn D, et al. Concurrent and future risk of endometrial cancer in women with endometrial hyperplasia: A systematic review and meta-analysis. *Plos One.* 2020;15(4):e0232231.
26. Organization WH, editor. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Female Genital Tumours, 5th ed, IARC, 2020. Vol 4.
27. Trimble CL, Kauderer J, Zaino R, Silverberg S, Lim PC, Burke JJ, et al. Concurrent endometrial carcinoma in women with a biopsy diagnosis of atypical endometrial hyperplasia. *Cancer.* 2006;106(4):812–9.

28. Banno K, Yanokura M, Iida M, Masuda K, Aoki D. Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: Involvement of genetics and epigenetics. *J Obstet Gynaecol Re.* 2014;40(8):1957–67.
29. Renehan AG, Zwahlen M, Egger M. Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(8):484–98.
30. Wong RWC, Ralte A, Grondin K, Talia KL, McCluggage WG. Endometrial Gastric (Gastrointestinal)-type Mucinous Lesions: Report of a Series Illustrating the Spectrum of Benign and Malignant Lesions. *Am J Surg Pathol.* 2019;44(3):406–19.
31. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1983;15(1):10–7.
32. Piulats JM, Guerra E, Gil-Martín M, Roman-Canal B, Gatus S, Sanz-Pamplona R, et al. Molecular approaches for classifying endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2017;145(1):200–7.
33. Levine DA, Getz G, Gabriel SB, Cibulskis K, Lander E, Sivachenko A, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature.* 2013;497(7447):67–73.
34. Stelloo E, Nout RA, Osse EM, Jürgenliemk-Schulz IJ, Jobsen JJ, Lutgens LC, et al. Improved Risk Assessment by Integrating Molecular and Clinicopathological Factors in Early-stage Endometrial Cancer—Combined Analysis of the PORTEC Cohorts. *Clin Cancer Res.* 2016;22(16):4215–24.
35. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Li-Chang HH, Kwon JS, Melnyk N, et al. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Brit J Cancer.* 2015;113(2):299–310.
36. Concin N, Creutzberg CL, Vergote I, Cibula D, Mirza MR, Marnitz S, et al. ESGO/ESTRO/ESP Guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. *Virchows Arch.* 2021;478(2):153–90.
37. Wortman BG, Creutzberg CL, Putter H, Jürgenliemk-Schulz IM, Jobsen JJ, Lutgens LCHW, et al. Ten-year results of the PORTEC-2 trial for high-intermediate risk endometrial carcinoma: improving patient selection for adjuvant therapy. *Brit J Cancer.* 2018;119(9):1067–74.
38. Vermij L, Smit V, Nout R, Bosse T. Incorporation of molecular characteristics into endometrial cancer management. *Histopathology.* 2020;76(1):52–63.
39. Yen TT, Wang TL, Fader AN, Shih IM, Gaillard S. Molecular Classification and Emerging Targeted Therapy in Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Pathol.* 2020;39(1):26–35.
40. León-Castillo A, Boer SM de, Powell ME, Mileschkin LR, Mackay HJ, Leary A, et al. Molecular Classification of the PORTEC-3 Trial for High-Risk Endometrial Cancer: Impact on Prognosis and Benefit From Adjuvant Therapy. *J Clin Oncol.* 2020;38(29):3388–97.
41. Talhouk A, Hoang LN, McConechy MK, Nakonechny Q, Leo J, Cheng A, et al. Molecular classification of endometrial carcinoma on diagnostic specimens is highly concordant with final

## BIBLIOGRAFÍA

hysterectomy: Earlier prognostic information to guide treatment. *Gynecol Oncol.* 2016;143(1):46–53.

42. Braun MM, Overbeek-Wager EA, Grumbo RJ. Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *Am Fam Physician.* 2016;93(6):468–74.

43. Timmermans A, Opmeer BC, Khan KS, Bachmann LM, Epstein E, Clark TJ, et al. Endometrial Thickness Measurement for Detecting Endometrial Cancer in Women With Postmenopausal Bleeding. *Obstetrics Gynecol.* 2010;116(1):160–7.

44. Hanegem N van, Prins MMC, Bongers MY, Opmeer BC, Sahota DS, Mol BWJ, et al. The accuracy of endometrial sampling in women with postmenopausal bleeding: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gyn R B.* 2016;197:147–55.

45. Faria SC, Devine CE, Rao B, Sagebiel T, Bhosale P. Imaging and Staging of Endometrial cancer. *Seminars Ultrasound Ct Mri.* 2019;40(4):287–94.

46. Barretina-Ginesta MP, Quindós M, Alarcón JD, Esteban C, Gaba L, Gómez C, et al. SEOM-GEICO clinical guidelines on endometrial cancer (2021). *Clin Transl Oncol.* 2022;24(4):625–34.

47. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynecol Amp Obstetrics.* 2009;105(2):103–4.

48. group A study, Kitchener H, Swart AMC, Qian Q, Amos C, Parmar MKB. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study. *Lancet.* 2009;373(9658):125–36.

49. Panici PB, Basile S, Maneschi F, Lissoni AA, Signorelli M, Scambia G, et al. Systematic Pelvic Lymphadenectomy vs No Lymphadenectomy in Early-Stage Endometrial Carcinoma: Randomized Clinical Trial. *J National Cancer Inst.* 2008;100(23):1707–16.

50. Daraï E, Dubernard G, Bats AS, Heitz D, Mathevet P, Marret H, et al. Sentinel node biopsy for the management of early stage endometrial cancer: Long-term results of the SENTI-ENDO study. *Gynecol Oncol.* 2015;136(1):54–9.

51. Rossi EC, Kowalski LD, Scalici J, Cantrell L, Schuler K, Hanna RK, et al. A Comparison of Sentinel Lymph Node Biopsy to Lymphadenectomy for Endometrial Cancer Staging (FIRES Trial). *Obstet Gynecol Surv.* 2017;72(8):479–80.

52. Euscher E, Sui D, Soliman P, Westin S, Ramalingam P, Bassett R, et al. Ultrastaging of Sentinel Lymph Nodes in Endometrial Carcinoma According to Use of 2 Different Methods. *Int J Gynecol Pathol.* 2018;37(3):242–51.

53. Bogani G, Murgia F, Ditto A, Raspagliesi F. Sentinel node mapping vs. lymphadenectomy in endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2019;153(3):676–83.

54. Accorsi GS, Paiva LL, Schmidt R, Vieira M, Reis R, Andrade C. Sentinel Lymph Node Mapping vs Systematic Lymphadenectomy for Endometrial Cancer: Surgical Morbidity and Lymphatic Complications. *J Minim Invas Gyn L*. 2020;27(4):938-945.e2.
55. Cusimano MC, Vicus D, Pulman K, Maganti M, Bernardini MQ, Bouchard-Fortier G, et al. Assessment of Sentinel Lymph Node Biopsy vs Lymphadenectomy for Intermediate- and High-Grade Endometrial Cancer Staging. *Jama Surg*. 2021;156(2):1–8.
56. Persson J, Salehi S, Bollino M, Lönnerfors C, Falconer H, Geppert B. Pelvic Sentinel lymph node detection in High-Risk Endometrial Cancer (SHREC-trial)—the final step towards a paradigm shift in surgical staging. *Eur J Cancer*. 2019;116:77–85.
57. Soliman PT, Westin SN, Dioun S, Sun CC, Euscher E, Munsell MF, et al. A prospective validation study of sentinel lymph node mapping for high-risk endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2017;146(2):234–9.
58. Galaal K, Bryant A, Fisher AD, Al-Khaduri M, Kew F, Lopes AD. Laparoscopy versus laparotomy for the management of early stage endometrial cancer. *Cochrane Db Syst Rev*. 2012;9(9):CD006655.
59. Walker JL, Piedmonte MR, Spirtos NM, Eisenkop SM, Schlaerth JB, Mannel RS, et al. Recurrence and Survival After Random Assignment to Laparoscopy Versus Laparotomy for Comprehensive Surgical Staging of Uterine Cancer: Gynecologic Oncology Group LAP2 Study. *J Clin Oncol*. 2012;30(7):695–700.
60. Kasherman L, Ahrari S, Lheureux S. Dostarlimab in the treatment of recurrent or primary advanced endometrial cancer. *Future Oncol*. 2021;17(8):877–92.
61. Oaknin A, León-Castillo A, Lorusso D. Progress in the management of endometrial cancer (subtypes, immunotherapy, alterations in PIK3CA pathway): data and perspectives. *Curr Opin Oncol*. 2020;32(5):471–80.
62. Creutzberg CL, Nout RA, Lybeert MLM, Wárlám-Rodenhuis CC, Jobsen JJ, Mens JWM, et al. Fifteen-Year Radiotherapy Outcomes of the Randomized PORTEC-1 Trial for Endometrial Carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biology Phys*. 2011;81(4):e631–8.
63. Boer SM de, Powell ME, Mileshekin L, Katsaros D, Bessette P, Haie-Meder C, et al. Adjuvant chemoradiotherapy versus radiotherapy alone for women with high-risk endometrial cancer (PORTEC-3): final results of an international, open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(3):295–309.
64. Boer SM de, Powell ME, Mileshekin L, Katsaros D, Bessette P, Haie-Meder C, et al. Adjuvant chemoradiotherapy versus radiotherapy alone in women with high-risk endometrial cancer (PORTEC-3): patterns of recurrence and post-hoc survival analysis of a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(9):1273–85.

## BIBLIOGRAFÍA

65. Bestvina CM, Fleming GF. Chemotherapy for Endometrial Cancer in Adjuvant and Advanced Disease Settings. *Oncol.* 2016;21(10):1250–9.
66. Creutzberg CL, Putten WL van, Koper PC, Lybeert ML, Jobsen JJ, Wárlám-Rodenhuis CC, et al. Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. *Lancet.* 2000;355(9213):1404–11.
67. Ørtoft G, Hansen ES, Bertelsen K. Omitting Adjuvant Radiotherapy in Endometrial Cancer Increases the Rate of Locoregional Recurrences but Has no Effect on Long-Term Survival: The Danish Endometrial Cancer Study. *Int J Gynecol Cancer.* 2013;23(8):1429.
68. Chapman BV, Swanick CW, Ning MS, Allen PK, Soliman PT, Westin SN, et al. Adjuvant combined-modality therapy for stage IIIC endometrioid and non-endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2019;154(1):22–8.
69. Onal C, Yildirim BA, Sari SY, Yavas G, Gultekin M, Guler OC, et al. Treatment outcomes of endometrial cancer patients with paraaortic lymph node metastasis: a multi-institutional analysis. *Int J Gynecol Cancer.* 2019;29(1):94.
70. Rajkumar S, Nath R, Lane G, Mehra G, Begum S, Sayasneh A. Advanced stage (IIIC/IV) endometrial cancer: Role of cytoreduction and determinants of survival. *Eur J Obstet Gyn R B.* 2019;234:26–31.
71. Kim SR, Zanden C van der, Ikiz H, Kuzelijevic B, Havelock J, Kwon JS. Fertility-Sparing Management Using Progestin for Young Women with Endometrial Cancer From a Population-Based Study. *J Obstetrics Gynaecol Can.* 2018;40(3):328–33.
72. Tucci CD, Capone C, Galati G, Iacobelli V, Schiavi MC, Donato VD, et al. Immunotherapy in endometrial cancer: new scenarios on the horizon. *J Gynecol Oncol.* 2019;30(3):e46.
73. Díaz-Montes TP, Ji H, Sehdev AES, Zahurak ML, Kurman RJ, Armstrong DK, et al. Clinical significance of Her-2/neu overexpression in uterine serous carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2006;100(1):139–44.
74. Santin AD, Bellone S, Roman JJ, McKenney JK, Pecorelli S. Trastuzumab treatment in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma overexpressing HER2/neu. *Int J Gynecol Obstet.* 2008;102(2):128–31.
75. Fader AN, Roque DM, Siegel E, Buza N, Hui P, Abdelghany O, et al. Randomized Phase II Trial of Carboplatin-Paclitaxel Versus Carboplatin-Paclitaxel-Trastuzumab in Uterine Serous Carcinomas That Overexpress Human Epidermal Growth Factor Receptor 2/neu. *J Clin Oncol.* 2018;36(20):2044–51.
76. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* 2017;357(6349):409–13.

77. Mehnert JM, Panda A, Zhong H, Hirshfield K, Damare S, Lane K, et al. Immune activation and response to pembrolizumab in POLE-mutant endometrial cancer. *J Clin Invest*. 2016;126(6):2334–40.
78. Slomovitz BM, Coleman RL. The PI3K/AKT/mTOR Pathway as a Therapeutic Target in Endometrial Cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):5856–64.
79. Roncolato F, Lindemann K, Willson ML, Martyn J, Mileskin L. PI3K/AKT/mTOR inhibitors for advanced or recurrent endometrial cancer. *Cochrane Db Syst Rev*. 2019;2019(10):CD012160.
80. Alvarez EA, Brady WE, Walker JL, Rotmensch J, Zhou XC, Kendrick JE, et al. Phase II trial of combination bevacizumab and temsirolimus in the treatment of recurrent or persistent endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2013;129(1):22–7.
81. Slomovitz BM, Filiaci VL, Coleman RL, Walker JL, Fleury AC, Holman LL, et al. GOG 3007, a randomized phase II (RP2) trial of everolimus and letrozole (EL) or hormonal therapy (medroxyprogesterone acetate/tamoxifen, PT) in women with advanced, persistent or recurrent endometrial carcinoma (EC): A GOG Foundation study. *Gynecol Oncol*. 2018;149:2.
82. Philip CA, Laskov I, Beauchamp MC, Marques M, Amin O, Bitharas J, et al. Inhibition of PI3K-AKT-mTOR pathway sensitizes endometrial cancer cell lines to PARP inhibitors. *Bmc Cancer*. 2017;17(1):638.
83. TAKEDA T, BANNO K, OKAWA R, YANOKURA M, IJIMA M, IRIE-KUNITOMI H, et al. ARID1A gene mutation in ovarian and endometrial cancers (Review). *Oncol Rep*. 2016;35(2):607–13.
84. Mao TL, Ardighieri L, Ayhan A, Kuo KT, Wu CH, Wang TL, et al. Loss of ARID1A Expression Correlates With Stages of Tumor Progression in Uterine Endometrioid Carcinoma. *Am J Surg Pathology*. 2013;37(9):1342–8.
85. Yen TT, Miyamoto T, Asaka S, Chui MH, Wang Y, Lin SF, et al. Loss of ARID1A expression in endometrial samplings is associated with the risk of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2018;150(3):426–31.
86. Alldredge JK, Eskander RN. EZH2 inhibition in ARID1A mutated clear cell and endometrioid ovarian and endometrioid endometrial cancers. *Gynecol Oncol Res Pract*. 2017;4(1):17.
87. Shen J, Peng Y, Wei L, Zhang W, Yang L, Lan L, et al. ARID1A Deficiency Impairs the DNA Damage Checkpoint and Sensitizes Cells to PARP Inhibitors. *Cancer Discov*. 2015;5(7):752–67.
88. Cai S, Zhang Y xiang, Han K, Ding Y qian. Expressions and clinical significance of COX-2, VEGF-C, and EFGR in endometrial carcinoma. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;296(1):93–8.
89. Kamat AA, Merritt WM, Coffey D, Lin YG, Patel PR, Broaddus R, et al. Clinical and Biological Significance of Vascular Endothelial Growth Factor in Endometrial Cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(24):7487–95.

## BIBLIOGRAFÍA

90. Makker V, Rasco D, Vogelzang NJ, Brose MS, Cohn AL, Mier J, et al. Lenvatinib plus pembrolizumab in patients with advanced endometrial cancer: an interim analysis of a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(5):711–8.
91. Simpkins F, Drake R, Escobar PF, Nutter B, Rasool N, Rose PG. A phase II trial of paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced and recurrent endometrial carcinoma (EMCA). *Gynecol Oncol.* 2015;136(2):240–5.
92. Aghajanian C, Filiaci V, Dizon DS, Carlson JW, Powell MA, Secord AA, et al. A phase II study of frontline paclitaxel/carboplatin/bevacizumab, paclitaxel/carboplatin/temsirolimus, or ixabepilone/carboplatin/bevacizumab in advanced/recurrent endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2018;150(2):274–81.
93. Bankenahally R, Krovvidi H. Autonomic nervous system: anatomy, physiology, and relevance in anaesthesia and critical care medicine. *Bja Educ.* 2016;16(11):381–7.
94. Houdeau E, Rousseau A, Meusnier C, Prud'homme M, Rousseau J. Sympathetic innervation of the upper and lower regions of the uterus and cervix in the rat have different origins and routes. *J Comp Neurol.* 1998;399(3):403–12.
95. Richeri A, Viettro L, Chávez-Genaro R, Burnstock G, Cowen T, Brauer MM. Effects of Infantile/Prepubertal Chronic Estrogen Treatment and Chemical Sympathectomy with Guanethidine on Developing Cholinergic Nerves of the Rat Uterus. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(6):839–50.
96. Vidt DG, Bakst AW, Graham RM. Adrenergic receptors: structure and function. *Clev Clin J Med.* 1990;57(5):481–91.
97. Insel P, Snead A, Murray F, Zhang L, Yokouchi H, Katakia T, et al. GPCR expression in tissues and cells: Are the optimal receptors being used as drug targets?: GPCR expression in tissues and cells. *Brit J Pharmacol.* 2012;165(6):1613–6.
98. Denny MC, Houlihan DD, McMillan H, Morrison JJ.  $\beta$ 2- and  $\beta$ 3-Adrenoreceptor agonists: Human myometrial selectivity and effects on umbilical artery tone. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(3):641–7.
99. Owman C, Rosenbren E, Sjöberg NO. Adrenergic innervation of the human female reproductive organs: a histochemical and chemical investigation. *Obstet Gynecol.* 1967;30(6):763–73.
100. Thorbert G, Alm P, Björklund AB, Owman C, Sjöberg NO. Adrenergic innervation of the human uterus Disappearance of the transmitter and transmitter-forming enzymes during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1979;135(2):223–6.
101. Xu X, Cai X, Liu X, Guo SW. Possible involvement of neuropeptide and neurotransmitter receptors in Adenomyosis. *Reproductive Biology Endocrinol Rb E.* 2021;19(1):25.



102. Sprague R, Kim JW, Kirimlioglu E, Guo X, Günay N, Guzeloglu-Kayisli O, et al. Catecholestradiol Activation of Adrenergic Receptors Induces Endometrial Cell Survival via p38 MAPK Signaling. *J Clin Endocrinol Metabolism*. 2020;106(2):337–50.
103. Sealfon SC, Olanow CW. Dopamine receptors: from structure to behavior. *Trends Neurosci*. 2000;23(10 Suppl):S34–40.
104. Novella-Maestre E, Carda C, Ruiz-Sauri A, Garcia-Velasco JA, Simon C, Pellicer A. Identification and Quantification of Dopamine Receptor 2 in Human Eutopic and Ectopic Endometrium: A Novel Molecular Target for Endometriosis Therapy. *Biol Reprod*. 2010;83(5):866–73.
105. Kim MO, Kim JH, Choi WS, Lee BH, Cho GJ, Roh SM, et al. Colocalization of dopamine D1 and D2 receptor mRNAs in rat placenta. *Mol Cells*. 1997;7(6):710–4.
106. Kügelgen I von, Starke K. Noradrenaline-ATP co-transmission in the sympathetic nervous system. *Trends Pharmacol Sci*. 1991;12(9):319–24.
107. Wang Y, Li J, Wen S, Yang X, Zhang Y, Wang Z, et al. CHRM3 is a novel prognostic factor of poor prognosis in patients with endometrial carcinoma. *Am J Transl Res*. 2015;7(5):902–11.
108. Brauer MM. Cellular and molecular mechanisms underlying plasticity in uterine sympathetic nerves. *Autonomic Neurosci*. 2008;140(1–2):1–16.
109. Pinsard M, Mouchet N, Dion L, Bessede T, Bertrand M, Darai E, et al. Anatomic and functional mapping of human uterine innervation. *Fertil Steril*. 2022;117(6):1279–88.
110. Arnold J, Arellano MLB de, Ruster C, Vercellino GF, Chiantera V, Schneider A, et al. Imbalance between sympathetic and sensory innervation in peritoneal endometriosis. *Brain Behav Immun*. 2012;26(1):132–41.
111. Coxon L, Horne AW, Vincent K. Pathophysiology of endometriosis-associated pain: a review of pelvic and central nervous system mechanisms. *Best Pract Res Cl Ob*. 2018;51:53–67.
112. Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS. Nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod*. 2006;21(11):3001–7.
113. Brauer M. Plasticity in Uterine Innervation: State of the Art. *Curr Protein Pept Sc*. 2016;18(2):108–19.
114. Brauer MM, Corbacho AM, Burnstock G. Effects of chronic and acute oestrogen treatment on the developing noradrenaline-containing nerves of the rat uterus. *Int J Dev Neurosci*. 1995;13(8):791–8.
115. Zoubina EV, Smith PG. Axonal degeneration and regeneration in rat uterus during the estrous cycle. *Autonomic Neurosci*. 2000;84(3):176–85.

## BIBLIOGRAFÍA

116. Zoubina EV, Smith PG. Sympathetic hyperinnervation of the uterus in the estrogen receptor  $\alpha$  knock-out mouse. *Neuroscience*. 2001;103(1):237–44.
117. Español P, Luna R, Soler C, Caruana P, Altés-Arranz A, Rodríguez F, et al. Neural plasticity of the uterus: New targets for endometrial cancer? *Women's Heal*. 2022;18:174550572210955.
118. Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res*. 2019;79(18):4557–66.
119. Silverman DA, Martinez VK, Dougherty PM, Myers JN, Calin GA, Amit M. Cancer-Associated Neurogenesis and Nerve-Cancer Cross-talk. *Cancer Res*. 2021;81(6):1431–40.
120. Cole SW, Nagaraja AS, Lutgendorf SK, Green PA, Sood AK. Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(9):563–72.
121. Nilsson MB, Sun H, Diao L, Tong P, Liu D, Li L, et al. Stress hormones promote EGFR inhibitor resistance in NSCLC: Implications for combinations with  $\beta$ -blockers. *Sci Transl Med*. 2017;9(415).
122. Krizanova O, Babula P, Pacak K. Stress, catecholaminergic system and cancer. *Ann Ny Acad Sci*. 2016;19(4):1–10.
123. Eiden LE. Neuropeptide-catecholamine interactions in stress. *Adv Pharmacol San Diego Calif*. 2013;68:399–404.
124. Liu H, Wang C, Xie N, Zhuang Z, Liu X, Hou J, et al. Activation of adrenergic receptor  $\beta$ 2 promotes tumor progression and epithelial mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med*. 2018;41(1):147–54.
125. Nagaraja AS, Dorniak PL, Sadaoui NC, Kang Y, Lin T, Armaiz-Pena G, et al. Sustained adrenergic signaling leads to increased metastasis in ovarian cancer via increased PGE2 synthesis. *Oncogene*. 2016;35(18):2390–7.
126. Amaro F, Silva D, Reguengo H, Oliveira JC, Quintas C, Vale N, et al.  $\beta$ -Adrenoceptor Activation in Breast MCF-10A Cells Induces a Pattern of Catecholamine Production Similar to that of Tumorigenic MCF-7 Cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):7968.
127. Zhi X, Li B, Li Z, Zhang J, Yu J, Zhang L, et al. Adrenergic modulation of AMPK-dependent autophagy by chronic stress enhances cell proliferation and survival in gastric cancer. *Int J Oncol*. 2019;54(5):1625–38.
128. Magnon C, Hall SJ, Lin J, Xue X, Gerber L, Freedland SJ, et al. Autonomic Nerve Development Contributes to Prostate Cancer Progression. *Science*. 2013;341(6142):1236361–1236361.
129. Zhao CM, Hayakawa Y, Kodama Y, Muthupalani S, Westphalen CB, Andersen GT, et al. Denervation suppresses gastric tumorigenesis. *Sci Transl Med*. 2014;6(250):250ra115–250ra115.

130. Faulkner S, Jobling P, March B, Jiang CC, Hondermarck H. Tumor Neurobiology and the War of Nerves in Cancer. *Cancer Discov.* 2019;9(6):702–10.
131. Kuol N, Stojanovska L, Apostolopoulos V, Nurgali K. Role of the nervous system in cancer metastasis. *J Exp Clin Canc Res.* 2018;37(1):5.
132. Hanoun M, Maryanovich M, Arnal-Estapé A, Frenette PS. Neural Regulation of Hematopoiesis, Inflammation, and Cancer. *Neuron.* 2015;86(2):360–73.
133. Boilly B, Faulkner S, Jobling P, Hondermarck H. Nerve Dependence: From Regeneration to Cancer. *Cancer Cell.* 2017;31(3):342–54.
134. Sarkar C, Chakroborty D, Basu S. Neurotransmitters as Regulators of Tumor Angiogenesis and Immunity: The Role of Catecholamines. *J Neuroimmune Pharm.* 2013;8(1):7–14.
135. Cole SW, Sood AK. Molecular Pathways: Beta-Adrenergic Signaling in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(5):1201–6.
136. Zahalka AH, Frenette PS. Nerves in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(3):143–57.
137. Ayala GE, Dai H, Powell M, Li R, Ding Y, Wheeler TM, et al. Cancer-Related Axonogenesis and Neurogenesis in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(23):7593–603.
138. Liebl F, Demir IE, Rosenberg R, Boldis A, Yildiz E, Kujundzic K, et al. The Severity of Neural Invasion Is Associated with Shortened Survival in Colon Cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(1):50–61.
139. Pundavela J, Roselli S, Faulkner S, Attia J, Scott RJ, Thorne RF, et al. Nerve fibers infiltrate the tumor microenvironment and are associated with nerve growth factor production and lymph node invasion in breast cancer. *Mol Oncol.* 2015;9(8):1626–35.
140. Amit M, Na'ara S, Gil Z. Mechanisms of cancer dissemination along nerves. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(6):399–408.
141. Flaherty RL, Owen M, Fagan-Murphy A, Intabli H, Healy D, Patel A, et al. Glucocorticoids induce production of reactive oxygen species/reactive nitrogen species and DNA damage through an iNOS mediated pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res Bcr.* 2017;19(1):35.
142. Renz BW, Takahashi R, Tanaka T, Macchini M, Hayakawa Y, Dantes Z, et al.  $\beta$ 2 Adrenergic-Neurotrophin Feedforward Loop Promotes Pancreatic Cancer. *Cancer Cell.* 2018;34(5):863–7.
143. Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, et al. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med.* 2006;12(8):939–44.
144. Xu P, He H, Gu Y, Wang Y, Sun Z, Yang L, et al. Surgical trauma contributes to progression of colon cancer by downregulating CXCL4 and recruiting MDSCs. *Exp Cell Res.* 2018;370(2):692–8.

## BIBLIOGRAFÍA

145. Budiu RA, Vlad AM, Nazario L, Bathula C, Cooper KL, Edmed J, et al. Restraint and Social Isolation Stressors Differentially Regulate Adaptive Immunity and Tumor Angiogenesis in a Breast Cancer Mouse Model. *Cancer Clin Oncol*. 2017;6(1):12–24.
146. Yoon S, Baik JH. Dopamine D2 Receptor-mediated Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation through a Disintegrin and Metalloprotease Regulates Dopaminergic Neuron Development via Extracellular Signal-related Kinase Activation\*. *J Biol Chem*. 2013;288(40):28435–46.
147. Jiang SH, Hu LP, Wang X, Li J, Zhang ZG. Neurotransmitters: emerging targets in cancer. *Oncogene*. 2020;39(3):503–15.
148. Li J, Zhu S, Kozono D, Ng K, Futalan D, Shen Y, et al. Genome-wide shRNA screen revealed integrated mitogenic signaling between dopamine receptor D2 (DRD2) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in glioblastoma. *Oncotarget*. 2014;5(4):882–93.
149. Jandaghi P, Najafabadi HS, Bauer AS, Papadakis AI, Fassan M, Hall A, et al. Expression of DRD2 Is Increased in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Inhibitors Slow Tumor Growth in Mice. *Gastroenterology*. 2016;151(6):1218–31.
150. Tegowski M, Fan C, Baldwin AS. Thioridazine inhibits self-renewal in breast cancer cells via DRD2-dependent STAT3 inhibition, but induces a G1 arrest independent of DRD2. *J Biol Chem*. 2018;293(41):15977–90.
151. Czerwiński M, Bednarska-Czerwińska A, Zmarzły N, Boroń D, Oplawski M, Grabarek BO. miRNAs in the Expression Regulation of Dopamine-Related Genes and Proteins in Endometrial Cancer. *J Clin Medicine*. 2021;10(21):4939.
152. Kline CLB, Ralff MD, Lulla AR, Wagner JM, Abbosh PH, Dicker DT, et al. Role of Dopamine Receptors in the Anticancer Activity of ONC201. *Neoplasia*. 2018;20(1):80–91.
153. Huang H, Wu K, Ma J, Du Y, Cao C, Nie Y. Dopamine D2 receptor suppresses gastric cancer cell invasion and migration via inhibition of EGFR/AKT/MMP-13 pathway. *Int Immunopharmacol*. 2016;39:113–20.
154. Moreno-Smith M, Lee SJ, Lu C, Nagaraja AS, He G, Rupaimoole R, et al. Biologic Effects of Dopamine on Tumor Vasculature in Ovarian Carcinoma. *Neoplasia*. 2013;15(5):502-IN15.
155. Chakroborty D, Sarkar C, Basu B, Dasgupta PS, Basu S. Catecholamines Regulate Tumor Angiogenesis. *Cancer Res*. 2009;69(9):3727–30.
156. Liu H, Yang J, Zhang Y, Han J, Yang Y, Zhao Z, et al. Psychologic Stress Drives Progression of Malignant Tumors via DRD2/HIF1 $\alpha$  Signaling. *Cancer Res*. 2021;81(20):5353–65.
157. Minami K, Liu S, Liu Y, Chen A, Wan Q, Na S, et al. Inhibitory Effects of Dopamine Receptor D1 Agonist on Mammary Tumor and Bone Metastasis. *Sci Rep-uk*. 2017;7(1):45686.

158. Borchering DC, Tong W, Hugo ER, Barnard DF, Fox S, LaSance K, et al. Expression and therapeutic targeting of dopamine receptor-1 (D1R) in breast cancer. *Oncogene*. 2016;35(24):3103–13.
159. Wang Z, Wen P, Hu B, Cao S, Shi X, Guo W, et al. Dopamine and dopamine receptor D1 as a novel favourable biomarker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int*. 2021;21(1):586.
160. Sobczuk P, Łomiak M, Cudnoch-Jędrzejewska A. Dopamine D1 Receptor in Cancer. *Cancers*. 2020;12(11):3232.
161. Nasi G, Ahmed T, Rasini E, Fenoglio D, Marino F, Filaci G, et al. Dopamine inhibits human CD8+ Treg function through D1-like dopaminergic receptors. *J Neuroimmunol*. 2019;332:233–41.
162. Wang X, Wang ZB, Luo C, Mao XY, Li X, Yin JY, et al. The Prospective Value of Dopamine Receptors on Bio-Behavior of Tumor. *J Cancer*. 2019;10(7):1622–32.
163. Tibensky M, Mravec B. Role of the parasympathetic nervous system in cancer initiation and progression. *Clin Transl Oncol*. 2021;23(4):669–81.
164. Pettersson A, Nilsson L, Nylund G, Khorram-Manesh A, Nordgren S, Delbro DS. Is acetylcholine an autocrine/paracrine growth factor via the nicotinic  $\alpha 7$ -receptor subtype in the human colon cancer cell line HT-29? *Eur J Pharmacol*. 2009;609(1–3):27–33.
165. Lee CH, Chang YC, Chen CS, Tu SH, Wang YJ, Chen LC, et al. Crosstalk between nicotine and estrogen-induced estrogen receptor activation induces  $\alpha 9$ -nicotinic acetylcholine receptor expression in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Tr*. 2011;129(2):331–45.
166. Kamiya A, Hayama Y, Kato S, Shimomura A, Shimomura T, Irie K, et al. Genetic manipulation of autonomic nerve fiber innervation and activity and its effect on breast cancer progression. *Nat Neurosci*. 2019;22(8):1289–305.
167. Zahalka AH, Arnal-Estapé A, Maryanovich M, Nakahara F, Cruz CD, Finley LWS, et al. Adrenergic nerves activate an angio-metabolic switch in prostate cancer. *Science*. 2017;358(6361):321–6.
168. Grytli HH, Fagerland MW, Fosså SD, Taskén KA. Association Between Use of  $\beta$ -Blockers and Prostate Cancer–Specific Survival: A Cohort Study of 3561 Prostate Cancer Patients with High-Risk or Metastatic Disease. *Eur Urol*. 2014;65(3):635–41.
169. Baek MH, Kim DY, Kim SO, Kim YJ, Park YH. Impact of beta blockers on survival outcomes in ovarian cancer: a nationwide population-based cohort study. *J Gynecol Oncol*. 2018;29(6):e82.
170. Barron TI, Connolly RM, Sharp L, Bennett K, Visvanathan K. Beta Blockers and Breast Cancer Mortality: A Population- Based Study. *J Clin Oncol*. 2011;29(19):2635–44.
171. Tang J, Li Z, Lu L, Cho CH.  $\beta$ -Adrenergic system, a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy. *Semin Cancer Biol*. 2013;23(6):533–42.

## BIBLIOGRAFÍA

172. Sorski L, Melamed R, Matzner P, Lavon H, Shaashua L, Rosenne E, et al. Reducing liver metastases of colon cancer in the context of extensive and minor surgeries through  $\beta$ -adrenoceptors blockade and COX2 inhibition. *Brain Behav Immun*. 2016;58:91–8.
173. Haldar R, Ricon-Becker I, Radin A, Gutman M, Cole SW, Zmora O, et al. Perioperative COX2 and  $\beta$ -adrenergic blockade improves biomarkers of tumor metastasis, immunity, and inflammation in colorectal cancer: A randomized controlled trial. *Cancer*. 2020;126(17):3991–4001.
174. Weissenrieder JS, Neighbors JD, Mailman RB, Hohl RJ. Cancer and the Dopamine D2 Receptor: A Pharmacological Perspective. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019;370(1):111–26.
175. Bakhtou H, Olfatbakhsh A, Deezagi A, Ahangari G. The Expression of Dopamine Receptors Gene and their Potential Role in Targeting Breast Cancer Cells with Selective Agonist and Antagonist Drugs. Could it be the Novel Insight to Therapy? *Curr Drug Discov Technologies*. 2019;16(2):184–97.
176. Rains SL, Amaya CN, Bryan BA. Beta-adrenergic receptors are expressed across diverse cancers. *Oncoscience*. 2017;4(7–8):95–105.
177. Cero C, Lea HJ, Zhu KY, Shamsi F, Tseng YH, Cypess AM.  $\beta$ 3-Adrenergic receptors regulate human brown/beige adipocyte lipolysis and thermogenesis. *Jci Insight*. 2021;6(11):e139160.
178. Babol K, Przybylowska K, Lukaszek M, Pertynski T, Blasiak J. An association between the Trp64Arg polymorphism in the beta3-adrenergic receptor gene and endometrial cancer and obesity. *J Exp Clin Cancer Res Cr*. 2004;23(4):669–74.
179. Chen H, Liu D, Yang Z, Sun L, Deng Q, Yang S, et al. Adrenergic signaling promotes angiogenesis through endothelial cell-tumor cell crosstalk. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(5):783–95.
180. Zhou J, Liu Z, Zhang L, Hu X, Wang Z, Ni H, et al. Activation of  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Promotes Growth and Angiogenesis in Breast Cancer by Down-regulating PPAR $\gamma$ . *Cancer Res Treat Official J Korean Cancer Assoc*. 2020;52(3):830–47.
181. Zhang X, Zhang Y, He Z, Yin K, Li B, Zhang L, et al. Chronic stress promotes gastric cancer progression and metastasis: an essential role for ADRB2. *Cell Death Dis*. 2019;10(11):788.
182. Abbink K, Zusterzeel PLM, Geurts-Moespot A, Steen R van der, Span PaulN, Sweep FCGJ. Prognostic significance of VEGF and components of the plasminogen activator system in endometrial cancer. *J Cancer Res Clin*. 2020;146(7):1725–35.
183. Pierce SR, Fang Z, Yin Y, West L, Asher M, Hao T, et al. Targeting dopamine receptor D2 as a novel therapeutic strategy in endometrial cancer. *J Exp Clin Cancer Res Cr*. 2021;40(1):61.
184. Fang Z, Wang J, Clark LH, Sun W, Yin Y, Kong W, et al. ONC201 demonstrates anti-tumorigenic and anti-metastatic activity in uterine serous carcinoma in vitro. *Am J Cancer Res*. 2018;8(8):1551–63.

185. Allen JE, Kline CLB, Prabhu VV, Wagner J, Ishizawa J, Madhukar N, et al. Discovery and clinical introduction of first-in-class imipridone ONC201. *Oncotarget*. 2016;7(45):74380–92.
186. Hu W, Zhang L, Ferri-Borgogno S, Kwan SY, Lewis KE, Cun HT, et al. Targeting Dopamine Receptor D2 by Imipridone Suppresses Uterine Serous Cancer Malignant Phenotype. *Cancers*. 2020;12(9):2436.
187. Brauer MM, Smith PG. Estrogen and female reproductive tract innervation: Cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity. *Autonomic Neurosci*. 2015;187:1–17.
188. Brauer MM, Richeri A. Highlights in basic autonomic neuroscience: Semaphorins in the remodeling of autonomic innervation. *Autonomic Neurosci*. 2013;174(1–2):1–4.
189. Zoubina EV, Smith PG. Distributions of estrogen receptors alpha and beta in sympathetic neurons of female rats: Enriched expression by uterine innervation. *J Neurobiol*. 2002;52(1):14–23.
190. Teicher BA. Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(10):2435–43.
191. Akbay EA, Peña CG, Ruder D, Michel JA, Nakada Y, Pathak S, et al. Cooperation between p53 and the telomere-protecting shelterin component Pot1a in endometrial carcinogenesis. *Oncogene*. 2013;32(17):2211–9.
192. Mirantes C, Eritja N, Dosil MA, Santacana M, Pallares J, Gatiús S, et al. An inducible knockout mouse to model the cell-autonomous role of PTEN in initiating endometrial, prostate and thyroid neoplasias. *Dis Model Mech*. 2013;6(3):710–20.
193. Maru Y, Hippo Y. Two-Way Development of the Genetic Model for Endometrial Tumorigenesis in Mice: Current and Future Perspectives. *Frontiers Genetics*. 2021;12:798628.
194. Jung J, Seol HS, Chang S. The Generation and Application of Patient-Derived Xenograft Model for Cancer Research. *Cancer Res Treat Official J Korean Cancer Assoc*. 2018;50(1):1–10.
195. Zhu M, Jia N, Nie Y, Chen J, Jiang Y, Lv T, et al. Establishment of Patient-Derived Tumor Xenograft Models of High-Risk Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2018;28(9):1812–20.
196. Siolas D, Hannon GJ. Patient-Derived Tumor Xenografts: Transforming Clinical Samples into Mouse Models. *Cancer Res*. 2013;73(17):5315–9.
197. Haldorsen IS, Popa M, Fonnes T, Brekke N, Kopperud R, Visser NC, et al. Multimodal Imaging of Orthotopic Mouse Model of Endometrial Carcinoma. *Plos One*. 2015;10(8):e0135220.
198. Sato A, Klaunberg B, Tolwani R. In vivo bioluminescence imaging. *Comparative Med*. 2004;54(6):631–4.
199. Devor EJ, Gonzalez-Bosquet J, Thiel KW, Leslie KK. Genomic characterization of five commonly used endometrial cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2020;57(6):1348–57.

## BIBLIOGRAFÍA

200. Skok K, Gradišnik L, Maver U, Kozar N, Sobočan M, Takač I, et al. Gynaecological cancers and their cell lines. *J Cell Mol Med.* 2021;25(8):3680–98.
201. Skok K, Maver U, Gradišnik L, Kozar N, Takač I, Arko D. Endometrial cancer and its cell lines. *Mol Biol Rep.* 2020;47(2):1399–411.
202. Salvadores M, Fuster-Tormo F, Supek F. Matching cell lines with cancer type and subtype of origin via mutational, epigenomic, and transcriptomic patterns. *Sci Adv.* 2020;6(27):eaba1862.
203. Weigelt B, Warne PH, Lambros MB, Reis-Filho JS, Downward J. PI3K Pathway Dependencies in Endometrioid Endometrial Cancer Cell Lines. *Clin Cancer Res.* 2013;19(13):3533–44.
204. Nyen TV, Moiola CP, Colas E, Annibali D, Amant F. Modeling Endometrial Cancer: Past, Present, and Future. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2348.
205. Qu W, Zhao Y, Wang X, Qi Y, Zhou C, Hua Y, et al. Culture characters, genetic background, estrogen/progesterone receptor expression, and tumorigenic activities of frequently used sixteen endometrial cancer cell lines. *Clin Chim Acta.* 2019;489:225–32.
206. Moiola CP, Lopez-Gil C, Cabrera S, Garcia A, Nyen TV, Annibali D, et al. Patient-Derived Xenograft Models for Endometrial Cancer Research. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2431.
207. Collins A, Miles GJ, Wood J, MacFarlane M, Pritchard C, Moss E. Patient-derived explants, xenografts and organoids: 3-dimensional patient-relevant pre-clinical models in endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2019;156(1):251–9.
208. Cabrera S, Llauradó M, Castellví J, Fernandez Y, Alameda F, Colás E, et al. Generation and characterization of orthotopic murine models for endometrial cancer. *Clin Exp Metastas.* 2012;29(3):217–27.
209. Depreeuw J, Hermans E, Schrauwen S, Annibali D, Coenegrachts L, Thomas D, et al. Characterization of patient-derived tumor xenograft models of endometrial cancer for preclinical evaluation of targeted therapies. *Gynecol Oncol.* 2015;139(1):118–26.
210. Unno K, Ono M, Winder AD, Maniar KP, Paintal AS, Yu Y, et al. Establishment of Human Patient-Derived Endometrial Cancer Xenografts in NOD scid Gamma Mice for the Study of Invasion and Metastasis. *Plos One.* 2014;9(12):e116064.
211. Dosil MA, Mirantes C, Eritja N, Felip I, Navaridas R, Gatus S, et al. Palbociclib has antitumour effects on Pten-deficient endometrial neoplasias. *J Pathology.* 2017;242(2):152–64.
212. Schrauwen S, Depreeuw J, Coenegrachts L, Hermans E, Lambrechts D, Amant F. Dual blockade of PI3K/AKT/mTOR (NVP-BEZ235) and Ras/Raf/MEK (AZD6244) pathways synergistically inhibit growth of primary endometrioid endometrial carcinoma cultures, whereas NVP-BEZ235 reduces tumor growth in the corresponding xenograft models. *Gynecol Oncol.* 2015;138(1):165–73.



213. Kuol N, Stojanovska L, Apostolopoulos V, Nurgali K. Crosstalk between cancer and the neuro-immune system. *J Neuroimmunol*. 2018;315:15–23.
214. Ben-David U, Ha G, Tseng YY, Greenwald NF, Oh C, Shih J, et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nat Genet*. 2017;49(11):1567–75.
215. Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(11):786–98.
216. Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W147–53.
217. R. Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing., R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Internet]. 2022. Available from: <https://www.R-project.org/>
218. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis Use R!* New York: Springer International Publishing, 2016; 260 p.
219. Mangiafico S. *rcompanion: Functions to Support Extension Education Program Evaluation*. R package version 2.4.15. [Internet]. 2022. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=rcompanion>
220. Huntington-Klein N. *vtable: Variable Table for Variable Documentation*. R package version 1.3.3 [Internet]. 2021. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=vtable>
221. Mair P, Wilcox R. Robust statistical methods in R using the WRS2 package. *Behav Res Methods*. 2019;52(2):464–88.
222. Therneau TM, Grambsch PM. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. *Statistics Biology Heal*. 2000;1–6.
223. Kassambara A. *survminer: Drawing Survival Curves using “ggplot2”*. R package version 0.4.9. [Internet]. 2021. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>
224. Medina-Gutiérrez E, Céspedes MV, Gallardo A, Rioja-Blanco E, Pavón MÀ, Asensio-Puig L, et al. Novel Endometrial Cancer Models Using Sensitive Metastasis Tracing for CXCR4-Targeted Therapy in Advanced Disease. *Biomed*. 2022;10(7):1680.
225. Kuramoto H. Studies of the growth and cytogenetic properties of human endometrial adenocarcinoma in culture and its development into an established line. *Acta Obstet Gyn Jpn*. 1972;19(1):47–58.
226. Dawe CJ, Banfield WG, Morgan WD, Slatick MS, Curth HO. Growth in Continuous Culture, and in Hamsters, of Cells From a Neoplasm Associated With Acanthosis Nigricans. *Inci J National Cancer Inst*. 1964;

## BIBLIOGRAFÍA

227. Sarkar C, Chakroborty D, Chowdhury UR, Dasgupta PS, Basu S. Dopamine Increases the Efficacy of Anticancer Drugs in Breast and Colon Cancer Preclinical Models. *Clin Cancer Res.* 2008;14(8):2502–10.
228. Institute. NC. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Cancer stat facts: uterine cancer. [Internet]. [cited 2022 Jul 15]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/corp.html>
229. Padilla-Iserte P, Lago V, Tauste C, Díaz-Feijoo B, Gil-Moreno A, Oliver R, et al. Impact of uterine manipulator on oncological outcome in endometrial cancer surgery. *Am J Obstet Gynecol.* 2021;224(1):65.e1-65.e11.
230. Frias-Gomez J, Peremiquel-Trillas P, Alemany L, Ameijide A, Marcos-Gragera R, Ponce J, et al. Predicting the rising incidence and mortality of endometrial cancers among women aged 65-74 years in Catalonia. *Maturitas.* 2021;144:11–5.
231. Duska L, Shahrokni A, Powell M. Treatment of Older Women With Endometrial Cancer: Improving Outcomes With Personalized Care. *Am Soc Clin Oncol Educ Book Asco Am Soc Clin Oncol Meet.* 2016;35(36):164–74.
232. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. Endometrial cancer. *Lancet Lond Engl.* 2015;387(10023):1094–108.
233. Jin X, Shen C, Yang X, Yu Y, Wang J, Che X. Association of Tumor Size With Myometrial Invasion, Lymphovascular Space Invasion, Lymph Node Metastasis, and Recurrence in Endometrial Cancer: A Meta-Analysis of 40 Studies With 53,276 Patients. *Frontiers Oncol.* 2022;12:881850.
234. Connor EV, Rose PG. Management Strategies for Recurrent Endometrial Cancer. *Expert Rev Anticanc.* 2018;18(9):1–13.
235. Secord AA, Hasselblad V, Gruenigen VEV, Gehrig PA, Modesitt SC, Bae-Jump V, et al. Body mass index and mortality in endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2016;140(1):184–90.
236. Hamilton CA, Cheung MK, Osann K, Chen L, Teng NN, Longacre TA, et al. Uterine papillary serous and clear cell carcinomas predict for poorer survival compared to grade 3 endometrioid corpus cancers. *Brit J Cancer.* 2006;94(5):642–6.
237. Han KH, Kim HS, Lee M, Chung HH, Song YS. Prognostic factors for tumor recurrence in endometrioid endometrial cancer stages IA and IB. *Medicine.* 2017;96(21):e6976.
238. Xu Y, Burmeister C, Hanna RK, Munkarah A, Elshaikh MA. Predictors of Survival After Recurrence in Women With Early-Stage Endometrial Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2016;26(6):1137–42.
239. Bosse T, Peters EEM, Creutzberg CL, Jürgenliemk-Schulz IM, Jobsen JJ, Mens JWM, et al. Substantial lymph-vascular space invasion (LVS1) is a significant risk factor for recurrence in

- endometrial cancer – A pooled analysis of PORTEC 1 and 2 trials. *Eur J Cancer*. 2015;51(13):1742–50.
240. Raffone A, Travaglino A, Raimondo D, Neola D, Renzulli F, Santoro A, et al. Prognostic value of myometrial invasion and TCGA groups of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2021;162(2):401–6.
241. Soslow RA, Tornos C, Park KJ, Malpica A, Matias-Guiu X, Oliva E, et al. Endometrial Carcinoma Diagnosis: Use of FIGO Grading and Genomic Subcategories in Clinical Practice. *Int J Gynecol Pathol*. 2019;38(Iss 1 Suppl 1):S64–74.
242. Gilks CB, Oliva E, Soslow RA. Poor Interobserver Reproducibility in the Diagnosis of High-grade Endometrial Carcinoma. *Am J Surg Pathology*. 2013;37(6):874–81.
243. Masood M, Singh N. Endometrial carcinoma: changes to classification (WHO 2020). *Diagn Histopathol*. 2021;27(12):493–9.
244. Yazawa T, Kaira K, Shimizu K, Shimizu A, Mori K, Nagashima T, et al. Prognostic significance of  $\beta$ 2-adrenergic receptor expression in non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res*. 2016;8(11):5059–70.
245. Madden KS, Szpunar MJ, Brown EB.  $\beta$ -Adrenergic receptors ( $\beta$ -AR) regulate VEGF and IL-6 production by divergent pathways in high  $\beta$ -AR-expressing breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Tr*. 2011;130(3):747–58.
246. Ogawa H, Kaira K, Motegi Y, Yokobori T, Takada T, Kato R, et al. Prognostic significance of  $\beta$ 2-adrenergic receptor expression in patients with surgically resected colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*. 2020;25(6):1137–44.
247. Braadland PR, Ramberg H, Grytli HH, Taskén KA.  $\beta$ -Adrenergic Receptor Signaling in Prostate Cancer. *Frontiers Oncol*. 2015;4:375.
248. Marchetti B, Fortier MA, Poyet P, Folléa N, Pelletier G, Labrie F. Beta-adrenergic receptors in the rat mammary gland during pregnancy and lactation: characterization, distribution, and coupling to adenylate cyclase. *Endocrinology*. 1990;126(1):565–74.
249. Powe DG, Voss MJ, Habashy HO, Zänker KS, Green AR, Ellis IO, et al. Alpha- and beta-adrenergic receptor (AR) protein expression is associated with poor clinical outcome in breast cancer: an immunohistochemical study. *Breast Cancer Res Tr*. 2011;130(2):457–63.
250. Hadi HE, Abdellaoui-Maane I, Kottwitz D, Amrani ME, Bouchoutrouch N, Qmichou Z, et al. Development and evaluation of a novel RT-qPCR based test for the quantification of HER2 gene expression in breast cancer. *Gene*. 2017;605:114–22.
251. Wilkerson MD, Schallheim JM, Hayes DN, Roberts PJ, Bastien RRL, Mullins M, et al. Prediction of Lung Cancer Histological Types by RT-qPCR Gene Expression in FFPE Specimens. *J Mol Diagnostics*. 2013;15(4):485–97.

## BIBLIOGRAFÍA

252. Campos RP de, Schultz IC, Mello P de A, Davies S, Gasparin MS, Bertoni APS, et al. Cervical cancer stem-like cells: systematic review and identification of reference genes for gene expression. *Cell Biol Int*. 2018;42(2):139–52.
253. BAE GE, KIM HS, WON KY, KIM GY, SUNG JY, LIM SJ. Lower Sympathetic Nervous System Density and  $\beta$ -adrenoreceptor Expression Are Involved in Gastric Cancer Progression. *Anticancer Res*. 2019;39(1):231–6.
254. Prasad K, Prabhu GK. Image Analysis Tools for Evaluation of Microscopic Views of Immunohistochemically Stained Specimen in Medical Research—a Review. *J Med Syst*. 2012;36(4):2621–31.
255. Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*. 2006;49(4):411–24.
256. Walker RA. Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology*. 2006;49(4):406–10.
257. Dong H, Liao XX, Mai HM, Zhou N, Wang DY, Peng JB, et al. Expression of beta adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma and its significance to the prognosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(10):10431–40.
258. Takahashi K, Kaira K, Shimizu A, Sato T, Takahashi N, Ogawa H, et al. Clinical significance of  $\beta$ 2-adrenergic receptor expression in patients with surgically resected gastric adenocarcinoma. *Tumor Biol*. 2016;37(10):13885–92.
259. Shimizu A, Kaira K, Mori K, Kato M, Shimizu K, Yasuda M, et al. Prognostic significance of  $\beta$ 2-adrenergic receptor expression in malignant melanoma. *Tumor Biol*. 2016;37(5):5971–8.
260. Chen D, Xing W, Hong J, Wang M, Huang Y, Zhu C, et al. The Beta2-Adrenergic Receptor is a Potential Prognostic Biomarker for Human Hepatocellular Carcinoma After Curative Resection. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(11):3556–65.
261. Caparica R, Ma Y, Angelis CD, Richard F, Desmedt C, Awada A, et al. Beta-2 Adrenergic Receptor Gene Expression in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Patients: A Post-hoc Analysis of the NCCTG-N9831 (Alliance) Trial. *Clin Breast Cancer*. 2022;22(4):308–18.
262. Bravo-Calderón DM, Oliveira DT, Marana AN, Nonogaki S, Carvalho AL, Kowalski LP. Prognostic significance of beta-2 adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark*. 2012;10(1):51–9.
263. Roque DR, Pierce S, Doll KM, Davidson B, Jackson AL, Ko EM, et al. Endometrial cancer outcomes in hypertensive women treated with beta-blocker. *J Clin Oncol*. 2014;32(15\_suppl):e16545–e16545.

264. Yap A, Lopez-Olivo MA, Dubowitz J, Pratt G, Hiller J, Gottumukkala V, et al. Effect of beta-blockers on cancer recurrence and survival: a meta-analysis of epidemiological and perioperative studies. *Brit J Anaesth*. 2018;121(1):45–57.
265. Grant CE, Flis AL, Ryan BM. Understanding the role of dopamine in cancer: past, present and future. *Carcinogenesis*. 2022;43(6):517–27.
266. Bernabé DG. Catecholamines Mediate Psychologic Stress–Induced Cancer Progression. *Cancer Res*. 2021;81(20):5144–6.
267. Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer IA, Bliss VS, et al. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med*. 2001;7(5):569–74.
268. Yan Y, Pan J, Chen Y, Xing W, Li Q, Wang D, et al. Increased dopamine and its receptor dopamine receptor D1 promote tumor growth in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Commun*. 2020;40(12):694–710.
269. Roney MdSI, Park SK. Antipsychotic dopamine receptor antagonists, cancer, and cancer stem cells. *Arch Pharm Res*. 2018;41(4):384–408.
270. Rosas-Cruz A, Salinas-Jazmín N, Velázquez MAV. Dopamine Receptors in Cancer: Are They Valid Therapeutic Targets? *Technol Cancer Res T*. 2021;20:15330338211027912.
271. Seeman P. The Dopamine Receptors. 2009;1–21.
272. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol Rev*. 2011;63(1):182–217.
273. Oliver-Perez MR, Magriña J, Villalain-Gonzalez C, Jimenez-Lopez JS, Lopez-Gonzalez G, Barcena C, et al. Lymphovascular space invasion in endometrial carcinoma: Tumor size and location matter. *Surg Oncol*. 2021;37:101541.
274. Sarkar C, Chakroborty D, Goswami S, Fan H, Mo X, Basu S. VEGF-A controls the expression of its regulator of angiogenic functions, dopamine D2 receptors on endothelial cells. *J Cell Sci*. 2022;135(11).
275. Pornour M, Ahangari G, Hejazi SH, Ahmadkhaniha HR, Akbari ME. Dopamine Receptor Gene (DRD1-DRD5) Expression Changes as Stress Factors Associated with Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer P*. 2015;15(23):10339–43.
276. Li L, Miyamoto M, Ebihara Y, Mega S, Takahashi R, Hase R, et al. DRD2/DARPP-32 Expression Correlates with Lymph Node Metastasis and Tumor Progression in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *World J Surg*. 2006;30(9):1672–9.

## BIBLIOGRAFÍA

277. Tung MC, Wen YC, Wang SS, Lin YW, Liu YC, Yang SF, et al. Dopamine receptor D2 genetic variations is associated with the risk and clinicopathological variables of urothelial cell carcinoma in a Taiwanese population. *Int J Med Sci.* 2018;15(11):1187–93.
278. Gemignani F, Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L, Chabrier A, Guino E, et al. Polymorphisms of the Dopamine Receptor Gene DRD2 and Colorectal Cancer Risk. *Cancer Epidem Biomar.* 2005;14(7):1633–8.
279. Murphy G, Cross AJ, Sansbury LS, Bergen A, Laiyemo AO, Albert PS, et al. Dopamine D2 receptor polymorphisms and adenoma recurrence in the Polyp Prevention Trial. *Int J Cancer.* 2009;124(9):2148–51.
280. Wu XY, Zhang CX, Deng LC, Xiao J, Yuan X, Zhang B, et al. Overexpressed D2 Dopamine Receptor Inhibits Non-Small Cell Lung Cancer Progression through Inhibiting NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(6):2258–72.
281. Prabhu VV, Madhukar NS, Gilvary C, Kline CLB, Oster S, El-Deiry WS, et al. Dopamine Receptor D5 is a Modulator of Tumor Response to Dopamine Receptor D2 Antagonism. *Clin Cancer Res.* 2018;25(7):clincanres.2572.2018.
282. Stein MN, Bertino JR, Kaufman HL, Mayer T, Moss R, Silk A, et al. First-in-Human Clinical Trial of Oral ONC201 in Patients with Refractory Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2017;23(15):4163–9.
283. Greer YE, Lipkowitz S. ONC201: Stressing tumors to death. *Sci Signal.* 2016;9(415):fs1.
284. Bar-Shavit R, Maoz M, Kancharla A, Nag JK, Agranovich D, Grisaru-Granovsky S, et al. G Protein-Coupled Receptors in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2016;17(8):1320.
285. Shin HY, Lee E ju, Yang W, Kim HS, Chung D, Cho H, et al. Identification of Prognostic Markers of Gynecologic Cancers Utilizing Patient-Derived Xenograft Mouse Models. *Cancers.* 2022;14(3):829.
286. Bonazzi VF, Kondrashova O, Smith D, Nones K, Sengal AT, Ju R, et al. Patient-derived xenograft models capture genomic heterogeneity in endometrial cancer. *Genome Med.* 2022;14(1):3.
287. Tanaka T, Nishie R, Ueda S, Miyamoto S, Hashida S, Konishi H, et al. Endometrial Cancer Patient-Derived Xenograft Models: A Systematic Review. *J Clin Medicine.* 2022;11(9):2606.
288. Li Z, Zhang W, Luo Z, Huang J, Li L. Clinical study of the clinical characteristics and prognosis of 1219 cases of endometrial cancer with lymph node metastasis. *Hum Exp Toxicol.* 2021;40(10):1601–11.
289. Mao W, Wei S, Yang H, Yu Q, Xu M, Guo J, et al. Clinicopathological study of organ metastasis in endometrial cancer. *Future Oncol.* 2020;16(10):525–40.

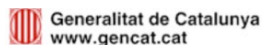
290. Jin K, Du W, Lan H, Liu Y, Mao C, Du J, et al. Development of humanized mouse with patient-derived xenografts for cancer immunotherapy studies: A comprehensive review. *Cancer Sci.* 2021;112(7):2592–606.
291. Jiang W, Xie S, Liu Y, Zou S, Zhu X. The Application of Patient-Derived Xenograft Models in Gynecologic Cancers. *J Cancer.* 2020;11(18):5478–89.
292. Oda K, Stokoe D, Taketani Y, McCormick F. High Frequency of Coexistent Mutations of PIK3CA and PTEN Genes in Endometrial Carcinoma. *Cancer Res.* 2005;65(23):10669–73.
293. Mravec B, Horvathova L, Hunakova L. Neurobiology of Cancer: The Role of  $\beta$ -Adrenergic Receptor Signaling in Various Tumor Environments. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):7958.
294. Luthy I, Bruzzone A, Pinero C, Castillo L, Chiesa I, Vazquez S, et al. Adrenoceptors: Non Conventional Target for Breast Cancer? *Curr Med Chem.* 2009;16(15):1850–62.
295. Coelho M, Soares-Silva C, Brandão D, Marino F, Cosentino M, Ribeiro L.  $\beta$ -Adrenergic modulation of cancer cell proliferation: available evidence and clinical perspectives. *J Cancer Res Clin.* 2017;143(2):275–91.
296. Song M, Bode AM, Dong Z, Lee MH. AKT as a Therapeutic Target for Cancer. *Cancer Res.* 2019;79(6):1019–31.
297. Kim H, Nam MH, Jeong S, Lee H, Oh SJ, Kim J, et al. Visualization of differential GPCR crosstalk in DRD1-DRD2 heterodimer upon different dopamine levels. *Prog Neurobiol.* 2021;213:102266.
298. Kou X, Han Y, Yang D, Liu Y, Fu J, Zheng S, et al. Dopamine d1-like receptors suppress proliferation of vascular smooth muscle cell induced by insulin-like growth factor-1. *Clin Exp Hypertens.* 2013;36(3):140–7.
299. Hartleben G, Schorpp K, Kwon Y, Betz B, Tsokanos F, Dantes Z, et al. Combination therapies induce cancer cell death through the integrated stress response and disturbed pyrimidine metabolism. *Embo Mol Med.* 2021;13(4):e12461.
300. Narayan RS, Molenaar P, Teng J, Cornelissen FMG, Roelofs I, Menezes R, et al. A cancer drug atlas enables synergistic targeting of independent drug vulnerabilities. *Nat Commun.* 2020;11(1):2935.

## VIII. ANEXOS



## VIII. Anexos

## 1. Aprobación del proyecto de experimentación animal por la Generalitat de Catalunya



GENERALITAT DE CATALUNYA

Generalitat de Catalunya  
Departament de Territori i Sostenibilitat  
**Direcció General de Polítiques Ambientals  
i Medi Natural**

**RESOLUCIÓ**

Assumpte: autorització de projecte d'experimentació núm. **10234**

**Identificació de l'expedient**

Expedient núm. FUE-2018-00819447 i ID 6ZVBZQ0PP relatiu a la sol·licitud d'autorització d'un projecte d'experimentació amb animals.

**Antecedents**

1. El centre usuari Institut Català de Ciències Cardiovasculars va presentar sol·licitud d'autorització per a l'execució del projecte d'experimentació:
  - a. Títol: "Evaluación de nanoconjugados para terapia dirigida en modelos murinos de cáncer de páncreas, endometrio y glioblastoma"
  - b. Responsable del projecte: Maria Virtudes Céspedes Navarro
2. Aquest projecte es troba inclòs en algun dels supòsits establerts a l'article 34 del Decret 214/1997, de 30 de juliol.
3. La Comissió d'Experimentació Animal, en la reunió feta el dia 20.03.2019 va informar Favorablement la realització del procediment corresponent d'aquest projecte d'experimentació.
4. La Comissió d'Experimentació Animal, com a òrgan habilitat, en data 20.03.2019 va avaluar el projecte d'acord amb l'article 34 del Reial Decret 53/2013, d'1 de febrer, amb un informe Favorable.

**Fonaments de dret**

1. Llei 5/1995, de 21 de juny, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques.
2. El Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per altres finalitats científiques.
3. Directiva 2010/63/UE del Parlament Europeu i del Consell de 22 de setembre de 2010 relativa a la protecció dels animals utilitzats per a finalitats científiques.
4. Reial Decret 53/2013, d'1 de febrer, pel qual s'estableixen les normes bàsiques aplicables per a la protecció dels animals utilitzats en experimentació i altres fins científics, incloent-hi la docència.
5. Llei 6/2013, d'11 de juny, de modificació de la Llei 32/2007, de 7 de novembre, per a la cura dels animals, en la seva explotació, transport, experimentació i sacrifici.
6. Reial decret 1386/2018, de 19 de novembre, pel qual es modifica el Reial decret 53/2013, d'1 de febrer, pel qual s'estableixen les normes bàsiques aplicables per a la protecció dels animals utilitzats en experimentació i altres finalitats científiques, incloent la docència.

Doctor Roux, 80  
08017 Barcelona  
Tel. 93 567 42 00  
Fax 93 280 33 20  
<http://territori.gencat.cat>

	Doc. original signat per: CPISR-1 C Ferran Miralles Sabadell 24/04/2019	Document electrònic garantit amb signatura electrònica. Podeu verificar la integritat d'aquest document a l'adreça web <a href="http://csv.gencat.cat">csv.gencat.cat</a>	Data creació còpia: 24/04/2019 10:34:32
	Original electrònic / Còpia autèntica <b>CODI SEGUR DE VERIFICACIÓ</b> <b>*0G6PC1014N6UMQQ96R617YKBC7SP88AD*</b> 0G6PC1014N6UMQQ96R617YKBC7SP88AD		Data caducitat còpia: 24/04/2024 00:00:00 Pàgina 1 de 2

**Resolució**


Per tant, resolc:

1. Informar Favorablement la sol·licitud d'autorització del projecte d'experimentació que es relaciona a continuació:  
  
Títol: "Evaluación de nanoconjugados para terapia dirigida en modelos murinos de cáncer de páncreas, endometrio y glioblastoma"  
  
Responsable del projecte: Maria Virtudes Céspedes Navarro  
  
Usuari: Institut Català de Ciències Cardiovasculars  
  
Instal·lació on es realitzarà el projecte: Institut Català de Ciències Cardiovasculars – Institut de Recerca de l'Hospital de Sta Creu i St Pau
2. Assignar al projecte el núm. d'ordre: 10234
3. Autoritzar la realització d'aquest projecte d'experimentació durant cinc anys a partir de la data de signatura d'aquesta resolució. En el moment que es disposi d'un mètode validat alternatiu a l'ús d'animals per a qualsevol dels procediments que integren el projecte, aquesta autorització quedarà suspesa i sense efecte.
4. Realitzar l'avaluació retrospectiva, d'acord amb l'informe de l'òrgan habilitat, al finalitzar el projecte o com a màxim als 5 anys de l'autorització d'aquest.

Aquesta autorització no eximeix del compliment i disposició d'altres autoritzacions, d'acord amb la normativa sectorial vigent.

Contra aquesta resolució que no exhaureix la via administrativa, es pot interposar recurs d'alçada davant la secretària de Medi Ambient i Sostenibilitat en el termini d'un mes, a comptar de l'endemà de la notificació d'aquesta resolució, segons el que estableix l'article 112, 121 i 122 de la Llei 39/2015, d'1 d'octubre, del procediment administratiu comú de les administracions públiques.

El director general de polítiques Ambientals i Medi Natural

	Doc. original signat per: CPIISR-1 C Ferran Miralles Sabadell 24/04/2019	Document electrònic garantit amb signatura electrònica. Podeu verificar la integritat d'aquest document a l'adreça web csv.gencat.cat	Data creació còpia: 24/04/2019 10:34:32
		Original electrònic / Còpia autèntica CODI SEGUR DE VERIFICACIÓ <b>*0G6PC1014N6UMQQ96R6I7YKBC7SP88AD*</b>	Data caducitat còpia: 24/04/2024 00:00:00 Pàgina 2 de 2

0G6PC1014N6UMQQ96R6I7YKBC7SP88AD

## 2. Protocolo de supervisión de experimentación animal

El protocolo de supervisión aplicado al seguimiento del modelo animal se expone a continuación:

### 1. Pérdida de peso

Puntuación	Característica
0	Peso normal
1	Menor de un 10%
2	Entre un 10 y un 15% en 5 días
3	Consistente o rápida, superior a un 20% mantenida durante 72 horas

### 2. Aspecto físico

Puntuación	Característica
0	Normal
1	Deshidratación, delgadez
2	Pelo no brillante, despeinado. Palidez. Cianosis
3	Encorvamiento. Pérdida de masa muscular (emaciación)

### 3. Signos clínicos

Puntuación	Característica
0	Ninguno
1	Hipotermia
2	Secreciones mucosas y/o sanguinolentas por cualquier orificio. Diarrea. Órganos hipertrofiados detectables (ganglios, bazo, hígado)
3	Distensión abdominal. Volumen de líquido ascítico superior al 10% de peso corporal inicial. Respiración dificultosa (particularmente si va acompañada de descarga nasal y/o cianosis). Caquexia.

### 4. Alteraciones en la conducta

Puntuación	Característica
0	Ninguna
1	Incapacidad de moverse con normalidad
2	Imposibilidad de llegar a la comida/bebida. Aislamiento del resto de los animales de la jaula.
3	Inconsciente o comatoso. Intención de "esconderse" en la viruta, no responde a estímulos.

## ANEXOS

### 5. Tamaño del tumor por palpación (inoculación ortotópica)

Puntuación	Característica
0	No se percibe al tacto
1	Tamaño de una lenteja
2	Tamaño de un garbanzo
3	Tacto mayor a un garbanzo, se observa distensión abdominal

### 6. Heridas

Puntuación	Característica
0	Ninguna
1	Arañazos
2	Heridas que no cicatrizan
3	Heridas ulceradas que pueden incluso supurar. Tumores ulcerados o necróticos

Cuando se dé la circunstancia de que haya más de un parámetro con un valor de 3, automáticamente todos los valores 3 pasarán a establecerse como 4.

### TOTAL

La toma de decisiones será según los siguientes criterios:

- De 0 a 6 puntos: Valoración individual del animal. Posible existencia de dolor o angustia. Plantearse el uso de analgésicos.
- De 6 a 12 puntos: Existencia de dolor o angustia. Administración de analgésicos paliativos.
- De 12 a 18 puntos: Dolor o angustia nivel grave. Hay que plantearse el sacrificio del animal.
- De 18 a 24 puntos: Dolor o angustia nivel muy grave. Hay que plantearse el final del procedimiento, comportando el sacrificio obligado del animal.

Igualmente se sacrificará inmediatamente el animal en cualquier momento del estudio si:

- El tamaño de la masa tumoral, aun no llegando a un tamaño considerado crítico (3 en la tabla de valoración), influya en las demás funciones corporales o que cause dolor y/o sufrimiento prolongado.
- Pérdida de peso corporal mayor al 20% con respecto al peso basal o de un control.
- Signos de emaciación aún sin pérdida de peso global.
- Ulceración o infección en el lugar de implantación.
- Trauma autoinflingido persistente y con afectación a la calidad de vida del animal.

### 3. Autorización del Comité de Experimentación e Investigación Clínica (CEIC) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau



Sant Antoni Ma Claret, 167 · 08025 Barcelona  
 Tel. 93 291 90 00 · Fax 93 291 94 27  
 e-mail: santpau@santpau.cat  
 www.santpau.cat

#### CONFORMIDAD DE LA DIRECCIÓN DEL CENTRO

Don Xavier Borràs, en su calidad de Director Médico de la Fundació de Gestió Sanitària de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y vista la autorización del Comité Ético de la Investigación con Medicamentos,

#### CERTIFICA:

Que conoce la propuesta del promotor **INSTITUT DE RECERCA HSCSP**, para que sea realizado en este Centro el estudio observacional titulado: **"Genomic signatures for the prediction of recurrence and metastasis in Endometrial Cancers"**.

CÓDIGO: **IIBSP-CEN-2020-14**

Nº EUDRACT: **NO PROCEDE**

INVESTIGADOR PRINCIPAL: **Virtudes Céspedes Navarro / S. GOGyP.**

Que acepta la realización de dicho estudio observacional en este Centro.

Lo que firma en Barcelona, a 19 de mayo de 2020.

FUNDACIÓ DE GESTIÓ SANITÀRIA DE  
 L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU  
 Direcció Mèdica

#### 4. Neural plasticity of the uterus: New targets for endometrial cancer?


Review



Women's Health  
Volume 18: 1–13  
© The Author(s) 2022  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/17455057221095537  
journals.sagepub.com/home/whe



## Neural plasticity of the uterus: New targets for endometrial cancer?

Pia Español<sup>1,2</sup> , Rocio Luna<sup>1,2</sup>, Cristina Soler<sup>1,2</sup>, Pablo Caruana<sup>1</sup>,  
Amanda Altés-Arranz<sup>1</sup>, Francisco Rodríguez<sup>1</sup>, Oriol Porta<sup>1,2</sup>,  
Olga Sanchez<sup>3,4</sup>, Elisa Llurba<sup>2,3,4</sup>, Ramón Rovira<sup>1,2\*</sup>  
and María Virtudes Céspedes<sup>1,5\*</sup>

### Abstract

Endometrial carcinoma is the most common gynecological malignancy in Western countries and is expected to increase in the following years because of the high index of obesity in the population. Recently, neural signaling has been recognized as part of the tumor microenvironment, playing an active role in tumor progression and invasion of different solid tumor types. The uterus stands out for the physiological plasticity of its peripheral nerves due to cyclic remodeling brought on by estrogen and progesterone hormones throughout the reproductive cycle. Therefore, a precise understanding of nerve-cancer crosstalk and the contribution of the organ-intrinsic neuroplasticity, mediated by estrogen and progesterone, of the uterine is urgently needed. The development of new and innovative medicines for patients with endometrial cancer would increase their quality of life and health. This review compiles information on the architecture and function of autonomous uterine neural innervations and the influence of hormone-dependent nerves in normal uterus and tumor progression. It also explores new therapeutic possibilities for endometrial cancer using these endocrine and neural advantages.

### Keywords

autonomic nervous system, endometrial cancer, nerve-cancer, nerve plasticity, neuroreceptor, neurotherapy, neurotransmitter, sex hormones signaling

Date received: 12 November 2021; revised: 28 March 2022; accepted: 1 April 2022

<sup>1</sup>Gynecology and Oncology Peritoneal Group, Institut d'Investigacions Biomèdiques Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Women and Perinatal Health Research Group, Obstetrics and Gynaecology Department, Hospital Sant Pau and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Maternal and Child Health and Development Network, Instituto Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>5</sup>CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Barcelona, Spain

\*Ramón Rovira and María Virtudes Céspedes provided equal co-author contribution.

### Corresponding authors:

María Virtudes Céspedes, Gynecology and Oncology Peritoneal Group, Institut d'Investigacions Biomèdiques Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain.  
Email: mcespedes@santpau.cat

Pia Español, Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain.  
Email: pia.espanol.lloret@gmail.com

## 5. Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges



biomolecules



Review

### Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges

Francisco Rodríguez <sup>1,†</sup> , Pablo Caruana <sup>1,†</sup> , Noa De la Fuente <sup>2</sup>, Pía Español <sup>3</sup> , María Gámez <sup>4</sup>, Josep Balart <sup>5</sup>, Elisa Llurba <sup>3</sup>, Ramón Rovira <sup>3</sup>, Raúl Ruiz <sup>1</sup>, Cristina Martín-Lorente <sup>6</sup>, José Luis Corchero <sup>7,\*</sup> and María Virtudes Céspedes <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Grup d'Oncologia Ginecològica i Peritoneal, Institut d'Investigacions Biomèdiques Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; frodriguez1@santpau.cat (F.R.); pcaruana@santpau.cat (P.C.); raulruizpalacios17@gmail.com (R.R.)
  - <sup>2</sup> Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo, Hospital HM Rosaleda, 15701 Santiago de Compostela, Spain; ndelaFuente@hnhospitales.com
  - <sup>3</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, 08041 Barcelona, Spain; mespanoll@santpau.cat (P.E.); ellurba@santpau.cat (E.L.); rroviran@santpau.cat (R.R.)
  - <sup>4</sup> Department of Pharmacy, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; mgamez1@santpau.cat
  - <sup>5</sup> Department of Radiation Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; jbalart@santpau.cat
  - <sup>6</sup> Department of Medical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; cmartin1@santpau.cat
  - <sup>7</sup> Institut de Biotecnologia i de Biomedicina and CIBER-BBN, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain
- \* Correspondence: jlcorchero@ciber-bbn.es (J.L.C.); mcespedes@santpau.cat (M.V.C.); Tel.: +34-93-5812148 (J.L.C.); +34-93-400000 (ext. 1427) (M.V.C.)
- † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Rodríguez, F.; Caruana, P.; De la Fuente, N.; Español, P.; Gámez, M.; Balart, J.; Llurba, E.; Rovira, R.; Ruiz, R.; Martín-Lorente, C.; et al. Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges. *Biomolecules* **2022**, *12*, 784. <https://doi.org/10.3390/biom12060784>

Academic Editor: Bahman Anvari

Received: 10 May 2022

Accepted: 2 June 2022

Published: 4 June 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Abstract:** Cancer is one of the main causes of death worldwide. To date, and despite the advances in conventional treatment options, therapy in cancer is still far from optimal due to the non-specific systemic biodistribution of antitumor agents. The inadequate drug concentrations at the tumor site led to an increased incidence of multiple drug resistance and the appearance of many severe undesirable side effects. Nanotechnology, through the development of nanoscale-based pharmaceuticals, has emerged to provide new and innovative drugs to overcome these limitations. In this review, we provide an overview of the approved nanomedicine for cancer treatment and the rationale behind their designs and applications. We also highlight the new approaches that are currently under investigation and the perspectives and challenges for nanopharmaceuticals, focusing on the tumor microenvironment and tumor disseminate cells as the most attractive and effective strategies for cancer treatments.

**Keywords:** nanomedicine; cancer therapy; nanotechnology; approved nanopharmaceuticals; targeted therapy









Universitat Autònoma  
de Barcelona

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA,  
GINECOLOGÍA Y MEDICINA PREVENTIVA

**Estudio del valor pronóstico de los receptores catecolaminérgicos  
en cáncer de endometrio: contribución a la progresión tumoral**

Autora: M. Pia Español Lloret

Directores: Elisa Llurba Olivé, María Virtudes Céspedes Navarro, Oriol Porta Roda

Tutora: Elisa Llurba Olivé