



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

BASES MOLECULARES DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

Invasión, diseminación y recurrencia

Memoria que presenta:

Lorena Alonso Alconada

para optar al grado de Doctora

A handwritten signature in blue ink, located below the text. The signature is stylized and appears to read 'Lorena Alonso Alconada'.

Fdo. Lorena Alonso Alconada
Santiago de Compostela, 2014



Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a una beca predoctoral del Gobierno Vasco (BF109.211).



Dr. Miguel Abal Posada, investigador estabilizado del Sistema Nacional de Salud (programa I3SNS), Dr. Rafael López López, Jefe del Servicio de Oncología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, y Dr. Anxo Vidal Figueroa, profesor contratado doctor del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral presentada por Lorena Alonso Alconada, que lleva por título: **“BASES MOLECULARES DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL Invasión, diseminación y recurrencia”** ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Oncología Traslacional en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor.

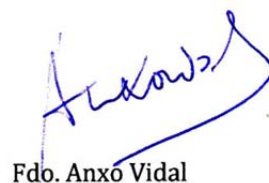
Revisada la misma, autorizamos su presentación para ser juzgada como Tesis Doctoral por el correspondiente tribunal, y para que conste firmamos la presente en Santiago de Compostela, a 19 de Junio de 2014.



Fdo. Miguel Abal



Fdo. Rafael López



Fdo. Anxo Vidal



*“Caminante no hay camino,
se hace camino al andar”*

Antonio Machado

*“No dejes apagar el entusiasmo,
virtud tan valiosa como necesaria;
trabaja, aspira, tiende siempre hacia la altura”*

Rubén Darío



A mis padres y a mis hermanos

A Andrés





Hoy, 22 de Junio, hace exactamente cinco años que empecé la aventura de una tesis doctoral. Y mirando atrás, se han olvidado los disgustos por los experimentos que nunca salieron (o que salieron una vez y nunca se repitieron), los ratones sin corazón o los nervios de las presentaciones. Y lo que queda es la gente. A todos los que de una forma u otra han contribuido en la realización de esta tesis, mi más sincero agradecimiento.

A mis directores de tesis, el Dr. Rafa López, por darme la oportunidad de empezar en esto de la ciencia en un campo en el que hay tantos retos como es la oncología. Y al Dr. Miguel Abal, por su confianza, su apoyo y sobre todo su optimismo.

A Laura y Jorge, por su ayuda incondicional desde el primer momento, por enseñarme cosas nuevas cada día, por las confidencias, los llantos y las risas. Aquí está nuestro trabajo.

Al resto de compañeros del labo, Javi, Álex, Marta, Carmen, Ali, Cloti y Ramiro, por todos los buenos momentos. Y a Bea, por las golosinas y los abrazos.

A mis amigas de la uni, Alicia, Miryam, Lucía, y Blanca, y a las de toda la vida, Hiart, Vero y Tamara, porque a pesar de la distancia, siempre las he sentido cerca.

Y finalmente, a las personas que más quiero. A mis padres, por dejarme la libertad de decidir y apoyarme en todo. Por ser las personas más generosas y cariñosas que conozco. A mi hermano, por ser un ejemplo para mí, por estar siempre pendiente de las hermanas pequeñas y ayudarlas en todo. A mi hermana, que siempre será la pequeña de la casa, por su cariño y por alegrarnos cada día con su risa.

A Andrés, por acompañarme durante estos años, por hacer más llevaderos los días malos y más felices los buenos.





ÍNDICE



ÍNDICE	III
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ABREVIATURAS	XVII
<u>INTRODUCCIÓN</u>	3
1. EL ENDOMETRIO	3
1.1 EL ÚTERO	3
1.2 EL ENDOMETRIO: HISTOLOGÍA	4
1.2.1 Regulación hormonal del endometrio	5
2. CARCINOMA ENDOMETRIAL	9
2.1 EPIDEMIOLOGÍA	9
2.1.1 Factores de riesgo	10
2.1.2 Factores protectores	13
2.2 DIAGNÓSTICO	14
2.3 LESIONES PRECURSORAS DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL	16
2.3.1 Hiperplasia endometrial	17
2.3.2 Pólipos endometriales	18
2.4 CLASIFICACIÓN DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL	19
2.4.1 Clasificación del carcinoma endometrial según la dependencia hormonal	19
2.4.2 Clasificación del carcinoma endometrial según el tipo histológico	20
2.4.3 Clasificación del carcinoma endometrial según el grado de invasión tumoral (F.I.G.O)	24
2.5 BASES MOLECULARES DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL	25
2.5.1 Modelo dual del carcinoma endometrial	25
2.5.1.1 Genética molecular asociada al CEE o Tipo I	26
2.5.1.2 Genética molecular asociada al CENE o Tipo II	30

2.6 TRATAMIENTO DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL	31
2.6.1 Terapia hormonal	32
2.6.2 Radioterapia	32
2.6.3 Quimioterapia	33
2.6.4 Terapias dirigidas	33
2.7 FACTORES PRONÓSTICOS DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL	34
3. INVASIÓN DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL	38
3.1 TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (EMT)	39
3.1.1 E-cadherina	40
4. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ETV5 EN EL CARCINOMA ENDOMETRIAL	42
4.1 LA FAMILIA ETS	42
4.1.1 La subfamilia PEA3	44
4.1.1.1 ETV5/ERM	44
4.2 FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO	47
5. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES (CTC)	51
5.1 TÉCNICAS DE ENRIQUECIMIENTO Y DETECCIÓN DE CTC	52
5.2 EMT Y CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES	54
5.3 EMT: ADQUISICIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE CÉLULA MADRE	55
6. ANEXINA A2	59
<u>OBJETIVOS</u>	65
7. OBJETIVOS PRINCIPALES	65
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	69
8. MATERIALES Y MÉTODOS	69

8.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES REGULADOS POR EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ETV5 EN EL FRENTE DE INVASIÓN DE LOS CARCINOMAS ENDOMETRIALES	69
8.1.1 PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO	69
8.1.2 LÍNEAS CELULARES	69
8.1.2.1 Cultivo de células tumorales humanas de cáncer de endometrio	69
8.1.2.2 Cultivo de la línea celular HEK293T	70
8.1.2.3 Producción de partículas lentivirales	70
8.1.2.4 Partículas lentivirales para inhibir la expresión de proteínas	71
8.1.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	72
8.1.3.1 Extracción de RNA total de tejidos	72
8.1.3.2 Extracción de RNA total de líneas celulares	72
8.1.3.3 Análisis de la concentración e integridad del RNA	73
8.1.3.4 Retrotranscripción	73
8.1.3.5 PCR cuantitativa a tiempo real (RT-q-PCR)	74
8.1.4 INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA SEGUIDO DE HIBRIDACIÓN DE MICROARRAY DE PROMOTORES GÉNICOS (CHIP-ON-CHIP)	75
8.1.4.1 Cross-linking y sonicado	75
8.1.4.2 Inmunoprecipitación	77
8.1.4.3 Purificación del DNA	78
8.1.4.4 Preparación de las muestras para la hibridación de Microarrays de Promotores	78
8.1.5 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS	81
8.1.5.1 Partek Genomic Suite 6.5	81
8.1.5.2 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)	82
8.1.6 VALIDACIÓN DE LA UNIÓN DE ETV5 A LOS PROMOTORES GÉNICOS	82

8.1.6.1 Inmunoprecipitación de cromatina en líneas celulares	82
8.1.6.2 PCR	83
8.1.7 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	83
8.1.7.1 Extracción de proteínas totales de tejido	83
8.1.7.2 Extracción de proteínas totales de líneas celulares	84
8.1.7.3 Western blot	84
8.1.7.4 Inmunofluorescencia	85
8.1.8 TRATAMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES	85
8.1.9 ENSAYOS DE MIGRACIÓN EN TRANSWELL	86
8.1.10 ENSAYOS DE INVASIÓN EN TRANSWELL	87
8.1.11 MODELOS <i>IN VIVO</i>	88
8.2 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CTC DE PACIENTES CON CARCINOMA ENDOMETRIAL DE ALTO RIESGO	90
8.2.1 PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO	90
8.2.2 INMUNOHISTOQUÍMICA	91
8.2.3 INMUNOAISLAMIENTO DE CTC Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	92
8.2.3.1 Inmunoaislamiento	92
8.2.3.2 Extracción de RNA total de CTC	92
8.2.3.3 Retrotranscripción	92
8.2.3.4 RT-q-PCR	93
8.2.4 INMUNOAISLAMIENTO DE CTC MEDIANTE LA TECNOLOGÍA CELLSEARCH (VERIDEX)	94
8.2.5 LÍNEAS CELULARES	94
8.2.6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LÍNEAS CELULARES	95
8.2.7 MODELOS <i>IN VIVO</i>	95

8.3 BÚSQUEDA DE MARCADORES CON VALOR PREDICTIVO DE RECURRENCIA EN PACIENTES CON CARCINOMA ENDOMETRIAL	96
8.3.1 PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO	96
8.3.2 ANÁLISIS 2D-DIGE	97
8.3.3 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO	98
8.3.4 LÍNEAS CELULARES	98
8.3.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	98
8.3.5.1 Análisis de expresión génica en CTC	98
8.3.5.2 Análisis de expresión génica en líneas celulares	99
8.3.6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	99
8.3.7 ENSAYOS DE SENSIBILIDAD A RADIOTERAPIA	99
8.3.8 ENSAYOS DE MIGRACIÓN	99
8.3.9 ENSAYOS DE CRECIMIENTO CELULAR EN AUSENCIA DE SUSTRATO	99
8.3.10 MODELOS <i>IN VIVO</i>	100
8.3.10.1 Identificación de CTC en modelos <i>in vivo</i>	101
8.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	101
8.5 TABLAS	102
<u>RESULTADOS</u>	109
9. RESULTADOS	109
9.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES REGULADOS POR EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ETV5 EN EL FRENTE DE INVASIÓN DE LOS CARCINOMAS ENDOMETRIALES	109
9.1.1 Análisis de expresión del factor de transcripción ETV5: zona superficial y frente de invasión tumoral	109

9.1.2 Identificación mediante ChIP-on-Chip de los promotores génicos regulados por el factor de transcripción ETV5	110
9.1.2.1 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	110
9.1.2.2 Hibridación de microarrays de promotores génicos y análisis bioinformático de los datos	111
9.1.3 Validación <i>in vitro</i> de los genes candidatos	113
9.1.3.1 Validación mediante ChIP	113
9.1.3.2 Validación en muestras de tejido y líneas celulares	115
9.1.4 Efecto de BDNF en el fenotipo asociado a EMT	116
9.1.5 Efecto de BDNF en la vía de ERK1/2	121
9.1.6 Efecto de BDNF en la migración e invasión celular	122
9.1.7 Efecto de BDNF en el patrón de diseminación en modelos <i>in vivo</i>	124
9.2 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CÉLULAS TUMORALES DE PACIENTES CON CARCINOMA ENDOMETRIAL DE ALTO RIESGO	130
9.2.1 Comprobación de la presencia de CTC en pacientes con CE de alto riesgo	130
9.2.1.1 Análisis de la presencia de CTC mediante la tecnología CellSearch (Veridex)	130
9.2.1.2 Análisis de la presencia de CTC mediante inmunoaislamiento seguido de RT-q-PCR	131
9.2.2 Determinación del perfil de expresión génica de las CTC de pacientes con CE de alto riesgo	132
9.2.2.1 Comprobación previa de la expresión génica	132
9.2.2.2 Agrupación de los pacientes de acuerdo con el estadio FIGO	133
9.2.3 Análisis de correlación CellSearch- RT-q-PCR	135

9.2.4	Análisis de correlación con características clinicopatológicas	136
9.2.5	Análisis de expresión en tumor primario y ganglios afectados	137
9.2.6	Modelo <i>in vivo</i> de diseminación de CTC	137
9.3	BÚSQUEDA DE MARCADORES CON VALOR PREDICTIVO DE RECURRENCIA EN PACIENTES CON CARCINOMA ENDOMETRIAL	139
9.3.1	Identificación de marcadores mediante análisis 2D-DIGE	139
9.3.2	Validación <i>in vitro</i> de ANXA2 mediante RNA de interferencia: implicación en resistencia a RT y QT	140
9.3.3	Validación <i>in vitro</i> de ANXA2 mediante RNA de interferencia: implicación en migración celular	142
9.3.4	Validación <i>in vivo</i> de ANXA2 en modelos animales de metástasis en CE	143
9.3.5	ANXA2 como marcador predictor de recurrencia en CE	145
	<u>DISCUSIÓN</u>	153
	<u>CONCLUSIONES</u>	165
	<u>ANEXO</u>	169
	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	173

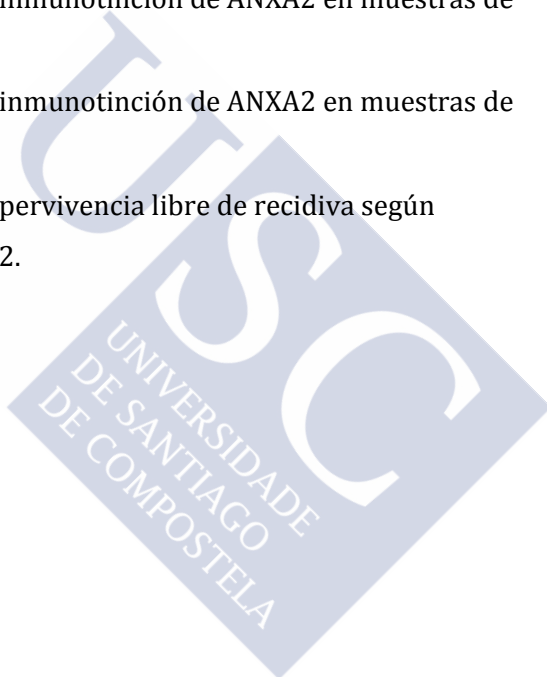


ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Diez tipos de cáncer más importantes de los nuevos casos estimados.	9
Tabla 2. Comparación de la evolución de las diferentes hiperplasias endometriales.	18
Tabla 3. Clasificación clinicopatológica y principales características del carcinoma endometrial.	20
Tabla 4. Clasificación histológica del cáncer de endometrio.	21
Tabla 5. Clasificación del carcinoma endometrial según la F.I.G.O.	24
Tabla 6. Principales alteraciones genéticas descritas en los carcinomas endometriales tipo I y tipo II.	26
Tabla 7. Clasificación de las pacientes con CE según el riesgo de recurrencia.	35
Tabla 8. Líneas celulares de CE empleadas.	70
Tabla 9. Plásmidos utilizados para la transformación de las líneas celulares.	102
Tabla 10. Secuencias de los shRNAs de BDNF.	102
Tabla 11. Líneas celulares modificadas empleadas.	72
Tabla 12. Sondas TaqMan empleadas en los análisis de RT-q-PCR.	103
Tabla 13. Anticuerpos utilizados en WB e IF.	103
Tabla 14. Características clínicas y patológicas de las pacientes con CE de alto riesgo incluidas en el estudio de expresión génica de CTC.	104
Tabla 15. Características clínicas y patológicas de las pacientes con CE de alto riesgo incluidas en el estudio de CTC usando la tecnología CellSearch (Veridex).	105
Tabla 16. Características clínico patológicas de las pacientes incluidas en el estudio 2D-DIGE.	105

Tabla 17. Características clínicas y patológicas de 140 pacientes con CE (115 tumores primarios y 25 recurrencias).	106
Tabla 18. Características clínicas y patológicas de 131 pacientes con CE (93 CEE y 38 CENE).	106
Tabla 19. Características clínicas y patológicas de 93 pacientes con CEE (43 no recurrentes y 50 recurrencias).	106
Tabla 20. 104 promotores génicos a los que se une ETV5 de forma diferencial en el frente de invasión tumoral de carcinomas endometriales.	127-129
Tabla 21. Intervalos de inmunotinción de ANXA2 en muestras de CEE estadio I, II o III.	147
Tabla 22. Intervalos de inmunotinción de ANXA2 en muestras de CEE estadio I o II.	148
Tabla 23. Análisis de supervivencia libre de recidiva según inmunotinción de ANXA2.	149



ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Anatomía del útero.	3
Figura 2. Sección completa del grosor endometrial.	5
Figura 3. Fase proliferativa con mitosis.	5
Figura 4. Fase secretora con vacuolas subnucleares.	6
Figura 5. Endometrio menstrual.	6
Figura 6. El ciclo ovulatorio y la menstruación.	7
Figura 7. Tasa de supervivencia relativa a cinco años para los estadios al diagnóstico de pacientes con cáncer de endometrio, EEUU, 2001 a 2007.	10
Figura 8. Representación de una biopsia guiada por histeroscopia.	15
Figura 9. Tipos de Hiperplasia.	18
Figura 10. Carcinoma endometrial tipo I.	19
Figura 11. Carcinoma seroso de endometrio.	22
Figura 12. Modelo dual de la tumorigénesis endometrial.	25
Figura 13. Cascada de invasión-metástasis.	37
Figura 14. Mediadores de la EMT.	41
Figura 15. Familia de factores de transcripción ETS.	42,43
Figura 16. TMA endometrial para el análisis de la expresión proteica de ETV5/ERM mediante inmunohistoquímica.	46
Figura 17. Estructuras del gen BDNF propuestas por diferentes estudios.	48
Figura 18. Representación esquemática de la transducción de señales mediada por TrkB tras la unión de BDNF.	49
Figura 19. Métodos de enriquecimiento, detección y caracterización de CTC.	53
Figura 20. Frecuencia de marcadores moleculares expresados en CTC de pacientes con cáncer de mama.	55
Figura 21. Dos modelos de propagación y heterogeneidad tumoral.	56,57

Figura 22. Estructura de la Anexina A2.	59
Figura 23. Sistema de ensamblaje de ANXA2 en la superficie de la célula endotelial.	60
Figura 24. Representación esquemática del proceso experimental de ChIP-on-Chip.	75
Figura 25. DNA con distintos ciclos de sonicación sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.	76
Figura 26. DNA amplificado y sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1%.	80
Figura 27. Espectro del DNA tras la fragmentación.	81
Figura 28. Ejemplos representativos de CTC.	94
Figura 29. Nivel relativo de mRNA de <i>ETV5</i> de la zona superficial y el frente de invasión de los carcinomas endometriales, determinado mediante RT-q-PCR.	109
Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de DNA sonificado tras crosslinking, correspondiente a muestra pareada.	110
Figura 31. Niveles relativos de DNA del promotor de <i>COX-2</i> tras la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti- <i>ETV5</i> en la zona superficial y el frente de invasión tumoral.	111
Figura 32. Análisis con el software <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> .	112
Figura 33. Análisis de expresión del promotor de <i>BDNF</i> en muestras pareadas sometidas a ChIP.	113,114
Figura 34. Análisis de expresión del promotor de <i>BDNF</i> en las líneas celulares Hec1A e Ishikawa sometidas a ChIP.	114
Figura 35. Niveles relativos de mRNA de <i>BDNF</i> , <i>NTRK2</i> , <i>FYN</i> y <i>NRCAM</i> analizados mediante RT-q-PCR, en muestras pareadas de la zona superficial y el frente de invasión.	115
Figura 36. Análisis de expresión de <i>ETV5</i> y <i>BDNF</i> en líneas celulares.	116
Figura 37. Análisis de expresión de <i>ETV5</i> y <i>BDNF</i> en líneas celulares modificadas con shRNAs frente a <i>BDNF</i> .	117

Figura 38. La inhibición de BDNF revierte el fenotipo asociado a la EMT en la línea H-ETV5-shCtrl.	118
Figura 39. Análisis de expresión de <i>SNAIL</i> , <i>TGF-β</i> , <i>ZEB1</i> y <i>ZEB2</i> mediante RT-q-PCR en las líneas celulares Hec1A-shCtrl, H-ETV5-shCtrl y H-ETV5-shBDNF.	119
Figura 40. La inhibición de BDNF revierte el fenotipo asociado a la EMT en la línea IK-ETV5-pLKO.	120
Figura 41. Análisis de expresión de p-ERK1/2.	122
Figura 42. Ensayos de migración en transwell.	123
Figura 43. Ensayos de invasión en transwell.	124
Figure 44. Patrón de metástasis en ratones tras la inyección IC de las líneas Hec1A-shCtrl, H-ETV5-shCtrl y H-ETV5-shBDNF.	125,126
Figura 45. Imagen representativa de un carcinoma primario marcado con anticuerpo frente a EpCAM.	130
Figura 46. Cuantificación de CTC mediante la tecnología CellSearch en pacientes con CE de alto riesgo.	131
Figura 47. Niveles de mRNA de <i>GAPDH</i> y <i>CD45</i> en las CTC aisladas a partir de controles y pacientes, analizados mediante RT-q-PCR.	132
Figura 48. Perfil de expresión génica en CTC de pacientes con CE.	133,134
Figura 49. Niveles de mRNA, en CTC de pacientes con CE, de los genes relacionados con el proceso de EMT.	135
Figura 50. Niveles de mRNA de <i>GDF15</i> , <i>ETV5</i> y <i>TGFβ1</i> en el grupo de pacientes negativos y positivos para la detección de CTC mediante la tecnología CellSearch.	136
Figura 51. Expresión de <i>ZEB2</i> en muestras pareadas de carcinoma endometrial primario y ganglios linfáticos afectados.	137
Figure 52. Patrón de metástasis en ratones tras la inyección IC de las líneas Hec1A y Hec1A-ETV5.	138
Figura 53. Listado de proteínas identificadas en el análisis 2D-DIGE. Marcaje para ANXA2 mediante IH en arrays de tejido. Evaluación estadística de ANXA2 como marcador de recurrencia en CE.	140

Figura 54. Niveles de expresión de <i>ANXA2</i> analizados mediante RT-q-PCR en las líneas IK-pLKO e IK-shANXA2. Ensayo de formación de colonias tras RT. Ensayo de formación de colonias en agar.	141
Figura 55. Niveles de expresión de E-cadherina y Vimentina mediante RT-q-PCR en las líneas IK-pLKO e IK-shBDNF. Análisis de western blot frente a Vimentina. Microscopía de contraste de fases e inmunofluorescencia frente a E-cadherina. Ensayos de migración en transwell.	142,143
Figura 56. Patrón de metástasis en ratones tras la inyección IC de las líneas IK-pLKO e IK-shANXA2. Tejido con tinción hematoxilina-eosina. Cuantificación de CTC mediante CellSearch en ratones inoculados con células IK-pLKO o IK-shANXA2.	144
Figura 57. Niveles de mRNA de <i>ANXA2</i> analizados mediante RT-q-PCR en CTC de controles, pacientes con enfermedad no recurrente y pacientes que han sufrido recurrencia.	145
Figura 58. Expresión diferencial de <i>ANXA2</i> , mediante IH, en carcinomas endometriales.	146
Figura 59. Curva ROC para la evaluación del valor pronóstico de los niveles de inmunoexpresión de <i>ANXA2</i> . Curvas Kaplan-Meier para el análisis de los tiempos de supervivencia libre de recidiva según los valores de inmunoexpresión de <i>ANXA2</i> .	148

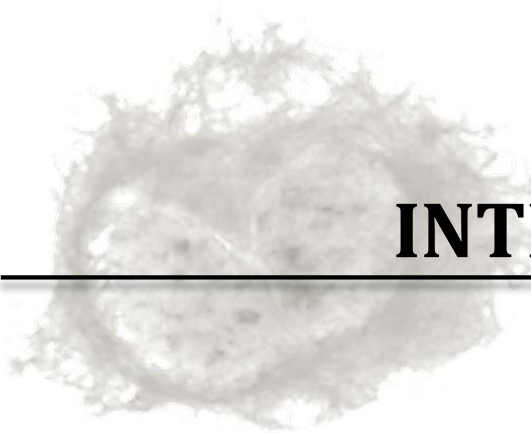
ABREVIATURAS

AKT	<i>V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1</i>
ALDH	<i>Aldehyde dehydrogenase</i>
ANXA2	<i>Annexin A2</i>
AUC	Área bajo la curva
BCA	Ácido bicinconónico
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CDH1	<i>Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)</i>
cDNA	DNA complementario
CE	Carcinoma endometrial
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CI	Intervalo de confianza
CK	Citoqueratina
cm	Centímetros
COX2/PTGS2	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (cyclooxygenase)</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CSC	Célula madre tumoral
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CTC	Células tumorales circulantes
CTD	Células tumorales diseminadas
CTNNB1	<i>Catenin (cadherin-associated protein), beta 1</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DIGE	Electroforesis en gel diferencial
DNA	Ácido deoxirribonucleico
DTX	Docetaxel
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMT	Transición epitelio-mesénquima
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos

ETV5	<i>Ets variant 5</i>
FBS	Suero fetal bovino
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FISH	Hibridación in situ fluorescente
g	Gramos
GFP	Proteína verde fluorescente
GSK3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
h	Horas
HE4	<i>Human epididymis protein 4</i>
HNPCC	Cáncer colorrectal no polipósico hereditario
HP	Haptoglobina
HR	<i>Hazard Ratio</i>
HTA	Hipertensión arterial
IC	Intracardiaca
ICC	Inmunocitoquímica
IF	Inmunofluorescencia
IGF1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IMC	Índice d masa corporal
IMS	Inestabilidad microsatélite
IMT	Inmunomagnéticas
IP	Intraperitoneal
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LOXL2	<i>Lysyl oxidase-like 2</i>
LPP	<i>Lipoma-preferred partner</i>
M&M	Materiales y métodos
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MB	Membrana basal
MEC	Matriz extracelular
MEMS	Sistemas micro-electro-mecánicos
MET	Transición mesénquima-epitelio

µm	Micrómetros
mg	Miligramos
min	Minutos
MMP	Metaloproteinasa de matriz
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
MRP	Proteínas de resistencia a múltiples fármacos
mTOR	<i>Mechanistic Target Of Rapamycin (Serine/Threonine Kinase)</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
nm	Nanómetros
NTRK2	<i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2</i>
ON	Durante la noche
OS	<i>Overall Survivall</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PEI	Poli(et)il(en)amina
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
PIC	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
Plg	Plasminógeno
PN	Plasmina
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTPRC/CD45	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C</i>
QT	Quimioterapia
RE	Receptor de estrógenos
RIN	Número de integridad del RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosómico

RT	Radioterapia
RT-q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
seg	Segundos
SIGP	Sociedad internacional de ginecología patológica
SNAI1	<i>Snail family zinc finger 1</i>
SNAI2	<i>Snail family zinc finger 2</i>
SSC	Célula madre somática
TA	Temperatura ambiente
TGFβ	<i>Transforming growth factor, beta 1</i>
THS	Tratamiento hormonal sustitutivo
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
tPA	Activador tisular del plasminógeno
TWIST1	<i>Twist basic helix-loop-helix transcription factor 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WB	Western blot
WGA	Amplificación de genoma completo
ZA	Ácido zoledrónico
ZEB1	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
ZEB2	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 2</i>
Δ4A	Δ4- androstenediona



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. EL ENDOMETRIO

1.1 EL ÚTERO

El útero o matriz es un órgano con forma triangular que mide, en condiciones normales, de 7 a 8 cm en su zona más larga. Se divide en cuatro regiones anatómicas: 1) el fundus: zona superior situada entre las trompas de Falopio; 2) el corpus: parte central del útero; 3) el istmo: parte estrecha del útero que separa el corpus del cérvix y 4) el cérvix: parte cilíndrica de unos 2 a 3 cm de longitud que se comunica con la vagina en la parte inferior (Figura 1).

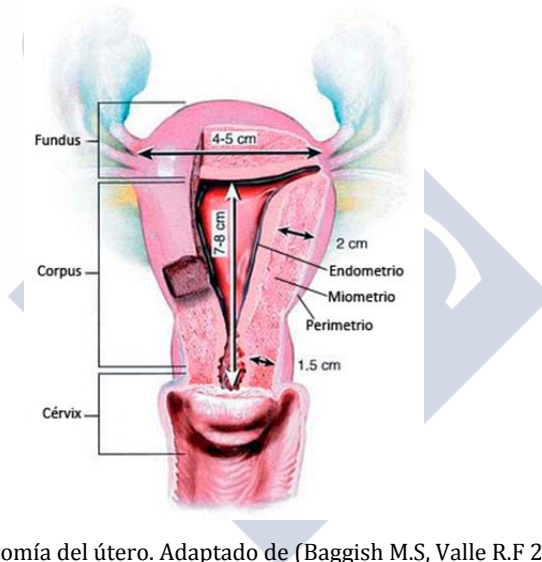


Figura 1. Anatomía del útero. Adaptado de (Baggish M.S, Valle R.F 2007).

El útero tiene tres componentes principales: perimetrio, miometrio y endometrio (Figura 1).

1. Perimetrio o *túnica serosa*: es una parte del peritoneo visceral que recubre al fundus y al corpus del útero. Lateralmente forma dos anchos pliegues que constituyen los ligamentos anchos uterinos. Anteriormente cubre la vejiga urinaria y posteriormente el recto (Graaf 2001).

2. Miometrio o *túnica muscularis*: es la capa intermedia que constituye el grueso de la pared uterina. Está formada por tres capas de fibras musculares que se extienden en todas direcciones y que confieren al útero la fuerza muscular necesaria durante las contracciones del parto (Graaf 2001).

3. Endometrio o *túnica mucosa*: capa lisa y altamente vascularizada que constituye el recubrimiento interno del útero y está compuesta de glándulas embebidas en un estroma celular. A continuación se lleva a cabo una revisión detallada de sus características por ser el tejido de estudio en esta tesis.

1.2 EL ENDOMETRIO: HISTOLOGÍA

El endometrio humano o *túnica mucosa*, es la mucosa que tapiza la cavidad uterina. Se trata de un órgano regulado hormonalmente que sufre cambios periódicos que son la base del ciclo menstrual y que van a permitir la implantación embrionaria y el desarrollo de la gestación. Además de por una población de células inmunes, el endometrio está constituido por:

- **Compartimento epitelial:** formado por una monocapa de células columnares simples polarizadas con cilios superficiales, que tapiza el interior de la cavidad uterina, y por un componente luminal y glandular.
- **Compartimento estromal:** el estroma endometrial es un tejido conectivo compuesto por células, principalmente fibroblastos, y matriz extracelular.
- **Compartimento vascular:** se trata de una intrincada red vascular que comienza en el miometrio.

Todo ello se encuentra situado en dos regiones:

- *Capa funcionalis*: compuesta por epitelio columnar, contiene las glándulas secretoras. Durante la menstruación se descama y pierde espesor.

- *Capa basalis*: formada por los pliegues glandulares más profundos y altamente vascularizada. Su espesor permanece constante y es la base para regenerar cíclicamente el endometrio tras la menstruación.

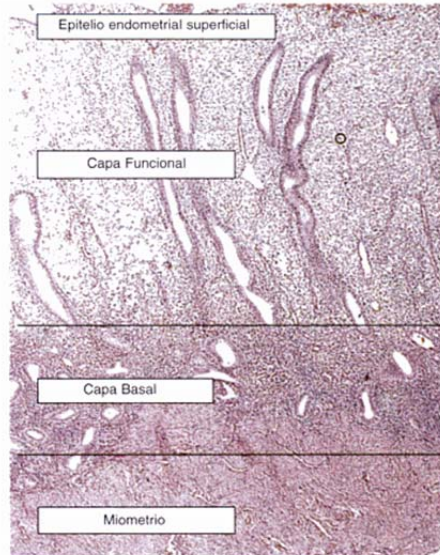


Figura 2. Sección completa del grosor endometrial. Tinción con hematoxilina-eosina, 40X (Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J 2009).

1.2.1 Regulación hormonal del endometrio

Al mismo tiempo que tiene lugar el ciclo menstrual, en el endometrio tienen lugar una serie de cambios que conducen a la implantación del embrión y que permiten la distinción de los diferentes tipos de endometrio:

- **Endometrio proliferativo**

Se trata del tejido endometrial durante la fase proliferativa, justo antes de la ovulación (fase folicular, del día 5 al 14). Se caracteriza por una proliferación celular de la capa epitelial y un aumento de grosor como resultado de la estimulación estrogénica. La concentración de receptores de estrógenos es máxima. El endometrio está constituido por

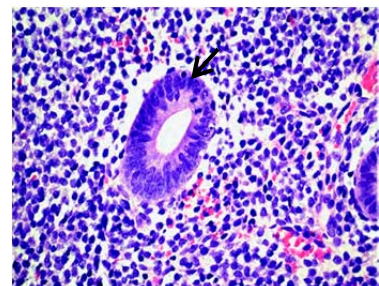


Figura 3. Fase proliferativa con mitosis (Robbins S, Cotran R 2003).

glándulas endometriales rectilíneas delimitadas por células que presentan una marcada pseudoestratificación nuclear y componentes mitóticos. El estroma es denso con células con escaso citoplasma (Cabero L 2003).

- **Endometrio secretor**

Tejido endometrial presente durante la fase de secreción del ciclo menstrual, posterior a la ovulación (fase lútea, del día 14 al 28). Estimulado por la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo incrementa las secreciones luminales de las glándulas. El estroma se vuelve adenomatoso y puede incrementar su grosor hasta llegar a 8 mm. En esta fase tiene lugar la denominada “ventana de implantación”, del día 20 al 24 del ciclo, en la que la receptividad del endometrio es máxima (Cabero L 2003).

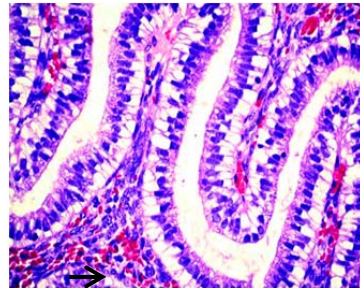


Figura 4. Fase secretora con vacuolas subnucleares (Robbins S, Cotran R 2003).

- **Endometrio menstrual o en fase descamativa**

Tejido endometrial durante la fase menstrual (del día 1 al 5). Se forma cuando el oocito no ha sido fecundado. Tiene lugar una descamación no uniforme con desintegración de las glándulas y estroma endometrial, infiltración leucocitaria y extravasación de células rojas del útero. En su segunda fase, como consecuencia del estímulo hormonal, comienza su regeneración a partir del endometrio basal (Cabero L 2003).

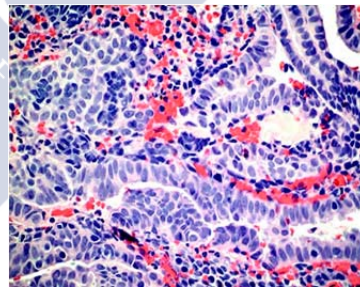


Figura 5. Endometrio menstrual (Robbins S, Cotran R 2003).

- **Endometrio gestacional**

Tejido endometrial que se da cuando el blastocisto se ha implantado. Cuando esto ocurre el cuerpo lúteo no involuciona y así persiste la secreción de progesterona, el endometrio incrementa las secreciones y se hipertrofia,

tanto a nivel glandular como estromal. Las glándulas endometriales son ricas en glicógeno y las células estromales aumentan de tamaño (Cabero L 2003).

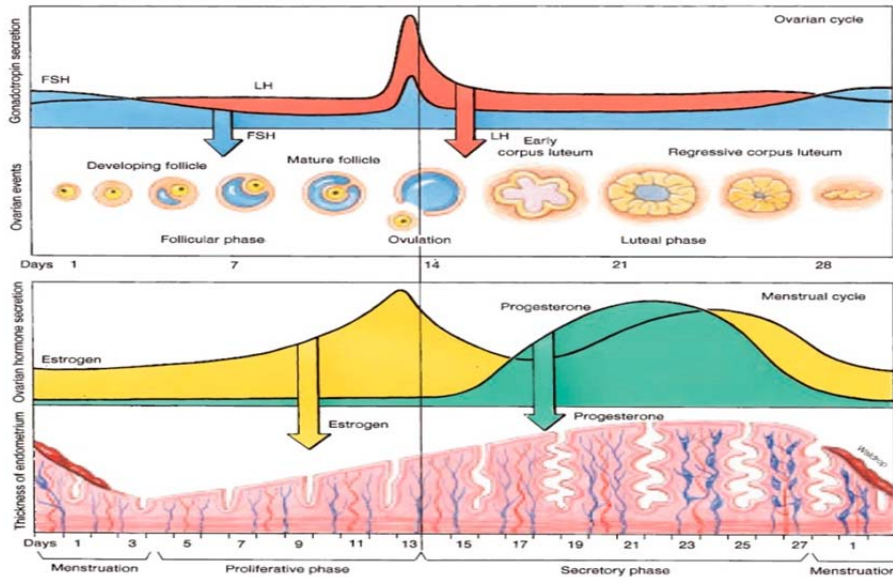


Figura 6. El ciclo ovulatorio y la menstruación (Graaf 2001).

- **Endometrio atrófico**

Se presenta en la etapa de la menopausia. Histológicamente, el tejido epitelial queda reducido a monocapa, se pierde la distinción entre la capa basal y la funcional. Las glándulas endometriales pierden la morfología ramificada organizándose de forma esférica y pierden su capacidad de secreción y proliferación debido a la privación de progesterona al no tener lugar la ovulación. Las células poseen una escasa actividad mitótica con un núcleo reducido. El componente estromal es más abundante y presenta una morfología densa y fibrosa, con células finas y alargadas y una coloración blanca característica (Cabero L 2003; Liang & Shang 2013).

La estimulación por estrógenos, sin embargo, continúa ya que los andrógenos secretados por los ovarios y corteza suprarrenal durante la menopausia pueden transformarse en estrógenos gracias a la acción de la aromatasa del tejido adiposo. Niveles elevados de estrógenos, especialmente de estradiol, se unen a sus receptores y el endometrio atrófico abandona su

estado inerte, con proliferaciones locales de las glándulas endometriales. En estas condiciones, el endometrio desarrolla atipias arquitecturales y citológicas, principal causa de hiperplasia endometrial (Cabero L 2003; Liang & Shang 2013), a partir de la cual se puede desarrollar un carcinoma endometrial.



2. CARCINOMA ENDOMETRIAL

2.1 EPIDEMIOLOGÍA

El carcinoma endometrial (CE) es el cáncer ginecológico más frecuente en los países desarrollados (Sankaranarayanan & Ferlay 2006) y representa la cuarta neoplasia más frecuente en mujeres en Estados Unidos, después del cáncer de mama, pulmón y colon (Siegel et al. 2012) (Tabla 1). La Sociedad Americana contra el Cáncer estima que en 2014 se diagnosticarán 49.560 nuevos casos de CE (Facts 2013). La mayoría de los casos se detectan de forma precoz (68%), gracias a la aparición de síntomas como la metrorragia postmenopáusica, lo que se traduce en una relativa baja mortalidad (3%) (Siegel et al. 2012) (Tabla 1). En España la incidencia anual es 10,9 nuevos casos diagnosticados por cada 100.000 habitantes (Sánchez et al. 2010).

Tabla 1. Diez tipos de cáncer más importantes de los nuevos casos estimados, en mujeres. Adaptado de (Siegel et al. 2012).

Nuevos casos estimados*			Muertes estimadas		
Mama	226.870	29%	Pulmón & Bronquios	72.590	26%
Pulmón & Bronquios	109.690	14%	Mama	39.510	14%
Colon & Recto	70.040	9%	Colon & Recto	25.220	9%
Útero	47.130	6%	Páncreas	18.540	7%
Tiroides	43.210	5%	Ovario	15.500	6%
Melanoma de piel	32.000	4%	Leucemia	10.040	4%
Linfoma no-Hodgkin	31.970	4%	Linfoma no-Hodgkin	8.620	3%
Riñón & Pelvis renal	24.520	3%	Útero	8.010	3%
Ovario	22.280	3%	Hígado & Ducto biliar intrahepático	6.570	2%
Páncreas	21.830	3%	Cerebro & Sistema nervioso	5.980	2%
Todos	790.740	100%	Todos	257.370	100%

*Las estimaciones se han redondeado y no incluyen los cánceres de piel de células basales, de células escamosas ni el carcinoma in situ, excepto el de vejiga urinaria.

La prevalencia del CE está aumentando debido a un incremento tanto en la esperanza de vida de la población como en los niveles de obesidad (Bray et al. 2005). Aproximadamente el 75% de los casos se dan en mujeres postmenopáusicas con una media de edad al diagnóstico de 61 años (Siegel et al. 2013).

La supervivencia relativa a 1, 5 y 10 años es de un 92.0%, 81.8% y 79.5%, respectivamente (Siegel et al. 2013). Cuando la enfermedad está localizada, la supervivencia relativa a 5 años es del 91% mientras que disminuye hasta un 57% cuando la enfermedad es regional y a un 19% cuando se produce metástasis a distancia (Siegel et al. 2012).

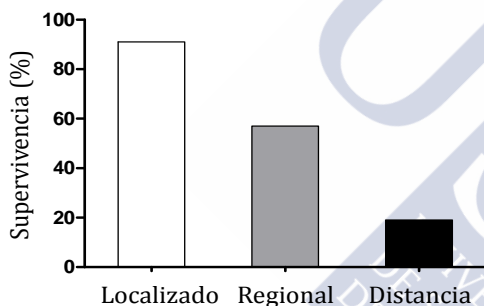


Figura 7. Tasa de supervivencia relativa a cinco años para los estadios al diagnóstico de pacientes con cáncer de endometrio, EEUU, 2001 a 2007.

*El error estándar de la tasa de supervivencia es de entre 5 y 10 puntos porcentuales. Adaptado de (Siegel et al. 2012).

2.1.1 Factores de riesgo

La causa precisa del CE es desconocida, aunque hay diferentes factores de riesgo que se han asociado a su desarrollo. Debido a que los carcinomas endometriales endometrioides o de Tipo I (ver sección 2.4, Clasificación del CE) comprenden más del 80% de los casos de CE, la mayoría de los factores de riesgo se relacionan con un exceso en la exposición a estrógenos, causa principal del desarrollo de este carcinoma. A continuación se muestran los factores de riesgo más importantes y de mayor relevancia clínica:

- **Excesiva exposición a estrógenos**

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas (derivadas del ciclo-pentano perhidrofenantreno), producidos por los ovarios y la placenta durante el embarazo y, en menores cantidades, por las glándulas adrenales. Poseen un amplio espectro de funciones fisiológicas que van desde

la regulación del ciclo menstrual y la reproducción a la modulación de la densidad ósea, la función cerebral, y la movilización del colesterol. Son hormonas lipofílicas que atraviesan las membranas plasmáticas y cuyos efectos biológicos están mediados por la unión a los receptores de estrógenos citoplasmáticos α y β , codificados por los genes *ESR1* y *ESR2*, respectivamente. El complejo estrógeno-receptor de estrógeno puede activar la transcripción génica de forma directa, mediante su unión a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en los promotores génicos, o de forma indirecta a través de la interacción con otros factores de transcripción.

El efecto mitogénico de los estrógenos está mediado principalmente por la activación del receptor de estrógenos (RE) α y se pone de manifiesto durante la transición G1-S, como consecuencia de la activación de c-Myc (Wang et al. 2011) y la ciclina D1 (Musgrove et al. 2011). Por otro lado, el complejo estrógeno-RE α interacciona con proteínas como c-Src para la activación de las vías MAPK y PI3K/AKT, clásicamente relacionadas con supervivencia celular (Zhou et al. 2013; Renoir et al. 2013).

Se ha demostrado que las mujeres que utilizan tratamiento hormonal sustitutivo (THS) basado en estrógenos durante un tiempo superior a dos años tienen un incremento en el riesgo de padecer cáncer de endometrio de entre 2 y 12 veces superior a las mujeres que reciben progesterona (Ziel et al. 1998).

- **Factores menstruales**

Factores menstruales tales como una edad precoz de la menarquia (antes de los 11 años), una menopausia tardía o la nuliparidad se han relacionado con un incremento en el riesgo de CE ya que se da un aumento acumulativo en la exposición a estrógenos debido a un mayor número de ciclos de ovulación (Brinton et al. 1992; Cramer D.W 2013).

El Síndrome del ovario poliquístico se caracteriza por una deficiencia en los niveles de progesterona que conlleva la aparición de ciclos menstruales

irregulares o incluso anovulación. Se ha relacionado con un incremento de 3 veces en el riesgo de desarrollar un CE (Shafiee et al. 2013).

- **Obesidad**

El CE es uno de los cánceres en los que se ha identificado una relación directa con la obesidad. Hay un incremento lineal entre el riesgo de su desarrollo y el aumento de peso o Índice de Masa Corporal (IMC) de entre 2 y 3,5 veces en mujeres obesas (Calle & Kaaks 2004; Boeing 2013). El tejido adiposo produce la enzima Aromatasa encargada de la conversión de los andrógenos Δ 4-androstenediona (Δ 4A), secretados por las glándulas gonadales y adrenales, en estrógenos estrona (E1), aumentando su biodisponibilidad (Lukanova et al. 2004).

- **Diabetes mellitus e hipertensión arterial (HTA)**

La diabetes mellitus es un factor que ha sido asociado al CE en diferentes estudios (Brinton et al. 1992; Friberg et al. 2007; Lindemann et al. 2008) así como la HTA (Lindemann et al. 2008; Jung 1997). Una explicación puede ser que ambas situaciones se asocian frecuentemente con la obesidad y el exceso de exposición a estrógenos (Calle & Kaaks 2004; Soler et al. 1999). El efecto tumorigénico de la insulina puede estar mediado por receptores de insulina en las células diana o por cambios en el metabolismo hormonal endógeno, secundario a la hiperinsulinemia, por ejemplo, promoviendo la síntesis de IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) que regula la proliferación celular (Parazzini et al. 1999).

- **Edad**

El CE es un carcinoma de mujeres perimenopáusicas y postmenopáusicas, con una edad media al diagnóstico de 61 años, como se comentó anteriormente, y con aproximadamente el 90% de los casos diagnosticados en mujeres mayores de 40 años (Siegel et al. 2013).

- **Componente hereditario**

Se ha descrito un componente hereditario en relación al riesgo de padecer un CE que representa entre un 5% y un 10% de todos los casos de CE. Algunas publicaciones aumentan el riesgo hasta un 50% si hay una fuerte historia familiar de carcinomas endometriales (Sandles et al. 1992).

Por otra parte, el riesgo de una mujer con cáncer colorrectal no polipósico hereditario (HNPCC) o síndrome de Lynch II de desarrollar un CE está entre un 20% y un 50%. Además, en estos casos las mujeres suelen desarrollar el carcinoma en edades más tempranas, a una media de 50 años (Barrow et al. 2013).

- **Tamoxifeno como tratamiento para el cáncer de mama**

El tamoxifeno es una molécula no esteroidea antagonista del estradiol (E2). Es la base del tratamiento adjuvante en los tumores de mama con receptores de estrógenos positivos. Se han descrito numerosos casos de cáncer de endometrio en pacientes que han recibido este tratamiento por un antecedente de neoplasia mamaria (Fisher et al. 1994; Jones et al. 2012).

2.1.2 Factores protectores

Se han descrito algunos factores que protegen frente al desarrollo de un CE. La utilización de anticonceptivos orales posee un efecto protector por su contenido en progesterona (Maxwell et al. 2006). Se han propuesto tres posibles mecanismos de acción: la progesterona bloquea la producción estromal de mediadores mitogénicos inducidos por estradiol; induce la generación de inhibidores de la proliferación celular paracrinosa; y/o inhibe el RE de forma indirecta (Kim et al. 2013).

2.2 DIAGNÓSTICO

La manifestación clínica más frecuente del CE en mujeres postmenopáusicas es la metrorragia, que se presenta en un 90% de las pacientes. En mujeres pre- o perimenopáusicas suele presentarse hipermenorrea o pérdidas intercíclicas. El dolor no es un síntoma constante (Ponce J, Torrejón R 2010).

Hasta el momento no hay un método de diagnóstico precoz de la enfermedad cuando todavía es asintomática. Las técnicas que se emplean son:

- **Examen pélvico**

Un examen ginecológico o pélvico permite comprobar la forma y consistencia del útero y las estructuras anexas. Los resultados suelen ser normales en los estadios iniciales de la enfermedad.

- **Citología cervical**

La prueba de Papanicolaou permite un examen microscópico de las células que recubren la pared del cérvix, pero para el diagnóstico del CE es limitada. En mujeres con enfermedad avanzada sólo es capaz de detectarla en un 25-55% de los casos (Ponce J, Torrejón R 2010).

- **Ultrasonografía transvaginal**

Se trata de una técnica sencilla, no invasiva y barata para comprobar el estado del endometrio en mujeres sintomáticas y permite descartar patologías como pólipos o miomas y comprobar el grosor del endometrio. En mujeres postmenopáusicas que sufren un sangrado vaginal, un grosor mayor de 5 mm se considera sospechoso (Saso et al. 2011).

- **Biopsia endometrial**

El diagnóstico definitivo del CE se lleva a cabo mediante análisis histológico a partir de una pequeña muestra de la pared del útero.

Las biopsias endometriales pueden llevarse a cabo por aspiración (Cánula de Cournier) o mediante catéter guiado por histeroscopia (Figura 8). La biopsia endometrial por aspiración presenta una tasa de detección del 99,6% y 91% en mujeres postmenopáusicas y premenopáusicas, respectivamente (Ponce J, Torrejón R 2010). Por otro lado, la histeroscopia permite un diagnóstico preciso así como la determinación del origen de la lesión y la extensión de la misma. Presenta una especificidad de diagnóstico del 100% (Marchetti et al. 2002).

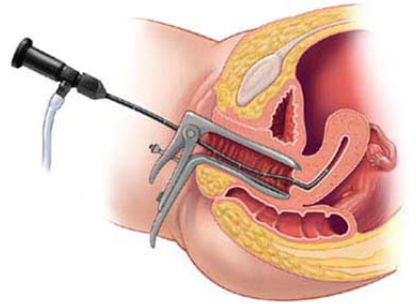


Figura 8. Representación de una biopsia guiada por histeroscopia.

- **Tomografía computerizada**

Sistemas accesibles en países desarrollados pero caros y dañinos debido a la necesidad de radiación ionizante. No es un método específico para discriminar enfermedades uterinas (Van den Bosch et al. 2012).

- **Resonancia magnética**

Permite determinar el grado de invasión miometrial, la afectación cervical y de nódulos linfáticos pélvicos y se ha demostrado que es un método más fiable que los ultrasonidos o la tomografía computerizada (Saso et al. 2011).

- **Biomarcadores en sangre**

La determinación de proteínas circulantes en sangre supone una estrategia atractiva debido a su accesibilidad pero no existe un marcador específico para tumores uterinos. En el estudio prospectivo multicéntrico ENDOMET se ha visto que los niveles de proteína HE4 (*Human Epididymis Protein 4*) y CA125 correlacionan con factores pronósticos de alto riesgo en CE y podrían ser una herramienta adicional en el diagnóstico de la enfermedad (Antonsen et al. 2013).

- **Marcadores moleculares en aspirados uterinos**

Colás E. y colaboradores identificaron un panel de marcadores moleculares compuesto por 20 genes para el *screening* de pacientes con CE a partir de muestras de aspirados uterinos. Para ello, en un principio llevaron a cabo un análisis de expresión génica con microarrays comparando carcinomas endometriales y tejido endometrial normal, que resultó en un listado de 236 genes expresados de forma diferencial. Tras diferentes validaciones los candidatos escogidos fueron: ACAA1, AP1M2, CGN, DDR1, EPS8L2, FASTKD1, GMIP, IKBKE, P2RX4, P4HB, PHKG2, PPFIBP2, PPP1R16A, RASSF7, RNF183, SIRT6, TJP3, EFEMP2, SOCS2 y DCN. Mediante la comparación de los niveles de expresión de estos genes en muestras pareadas de tumores primarios y aspirados uterinos, confirmaron la validez de este tipo de muestra no invasiva, al encontrar un elevado nivel de correlación entre ambas. Finalmente, la utilidad del panel de marcadores se confirmó mediante la comparación de muestras provenientes de pacientes con CE o sin él. Actualmente el test basado en estos marcadores está siendo probado en diferentes hospitales, para el *screening* de las pacientes con riesgo de desarrollo de un CE (Colas et al. 2011).

2.3 LESIONES PRECURSORAS DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

El CE es un tipo de carcinoma con una tumorigénesis compleja ya que puede originarse a partir de un endometrio normal, de un endometrio atrófico o de un endometrio con hiperplasia (lesión premaligna). De forma general, puede considerarse que la hiperplasia atípica de endometrio es la lesión precursora del carcinoma endometrial endometriode (Tipo I), mientras que el carcinoma endometrial no endometriode (Tipo II) suele desarrollarse a partir de pólipos endometriales (ver sección 2.4, Clasificación del CE).

2.3.1 Hiperplasia endometrial

El concepto de hiperplasia endometrial implica la presencia de una proliferación anormal del endometrio, tanto del componente estromal como del glandular, aunque predomina claramente este último. Por lo general es el resultado de una estimulación estrogénica prolongada. Su clasificación histológica se basa tanto en la arquitectura (simple o compleja) como en las características citológicas de las glándulas (con o sin atipia).

- **Hiperplasia sin atipia**

En la hiperplasia sin atipia el endometrio responde de manera difusa al estímulo estrogénico con un aumento equilibrado de glándulas y estroma. En la hiperplasia simple el endometrio es más grueso que en condiciones normales, con glándulas más dilatadas y agrupadas y con mayores invaginaciones y proyecciones. El estroma presenta una mayor densidad celular, pero es escaso en relación a la superficie glandular. En la hiperplasia compleja todas las características anteriores se exageran, las glándulas proliferan enormemente y adquieren una arquitectura más compleja ya que no pueden ser contenidas por el estroma que es mínimo y la alteración arquitectural máxima. Es frecuente la pseudoestratificación, con una estructura de dos a cuatro capas celulares (Robbins S, Cotran R 2003).

- **Hiperplasia atípica**

También se denomina neoplasia intraepitelial. Su principal característica es la presencia de atipias citológicas en las glándulas endometriales. Puede encontrarse asociada a un patrón de hiperplasia simple aunque habitualmente la arquitectura histológica es compleja. Las células atípicas son más grandes, tienen un núcleo irregular con una membrana nuclear más gruesa que acumula cromatina (Robbins S, Cotran R 2003).

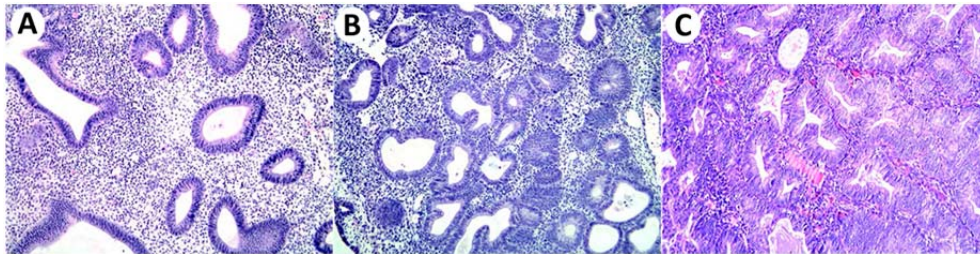


Figura 9. Tipos de Hiperplasia. **A,** Hiperplasia simple sin atipia con anomalías arquitectónicas, incluyendo apiñamiento glandular leve y dilatación glandular quística. **B,** Hiperplasia compleja sin atipia con apiñamiento glandular y características citológicas similares a las del endometrio proliferativo. **C,** Hiperplasia compleja con atipia con características arquitecturales similares a las de la hiperplasia compleja sin atipia, pero las características citológicas han cambiado (Robbins S, Cotran R 2003).

Como se observa en la Tabla 2, el riesgo de progresión a neoplasia de cada una de las hiperplasias es diferente.

Tabla 2. Comparación de la evolución de las diferentes hiperplasias endometriales (Montgomery et al. 2004).

Patología	Regresión	Persistencia	Progresión a carcinoma
Hiperplasia Simple	80%	19%	1%
Hiperplasia Compleja	80%	17%	3%
Hiperplasia Simple con Atipia	69%	23%	8%
Hiperplasia Compleja con Atipia	57%	14%	29%

2.3.2 Pólipos endometriales

Los pólipos endometriales son masas de tamaño variable que se proyectan en la cavidad endometrial. Miden desde 0.5 hasta 3 cm de diámetro, pero en ocasiones son grandes y pediculados. Pueden permanecer asintomáticos o causar hemorragia anormal si se ulceran o experimentan necrosis. La mayoría de las veces las glándulas que constituyen los pólipos son hiperplásicas o atróficas, pero en ocasiones pueden mostrar cambios secretores (pólipos funcionales) (Robbins S, Cotran R 2003).

2.4 CLASIFICACIÓN DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

Los principales parámetros anatomopatológicos que definen el CE permiten su clasificación en tres grandes grupos: 1) según la dependencia hormonal a estrógenos, 2) según la histología en función del tipo celular y 3) según una clasificación quirúrgica adoptada por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (F.I.G.O).

2.4.1 Clasificación del carcinoma endometrial según la dependencia hormonal

De acuerdo a la inmunohistoquímica y a los estudios de genética molecular, en el año 1983, Bokhman propuso la diferenciación de dos tipos de CE: el carcinoma endometrial endometriode (CEE) o de Tipo I y el carcinoma endometrial no endometriode (CENE) o de Tipo II (Bokhman 1983).

❖ Carcinoma endometrial endometriode o de Tipo I

Representa aproximadamente el 80% de los casos. Normalmente expresa receptores de estrógenos y progesterona y se asocia a una exposición excesiva a estrógenos. Se da en mujeres pre- o perimenopáusicas y suele estar precedido de hiperplasia endometrial con o sin atipia. Se trata de un tumor de bajo grado, con un pronóstico favorable (Bansal et al. 2009).

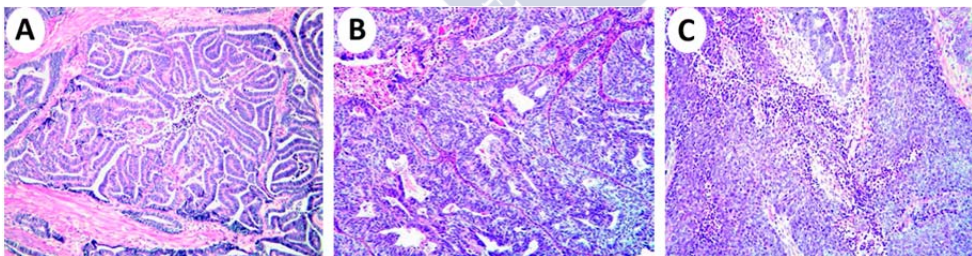


Figura 10. Carcinoma endometrial tipo I. **A**, Adenocarcinoma endometriode bien diferenciado (grado 1) con arquitectura glandular conservada pero carente de estroma intermedio, lo que lo diferencia de la hiperplasia. **B**, Adenocarcinoma endometriode moderadamente diferenciado (grado 2) que muestra arquitectura glandular mezclada con áreas macizas. **C**, Adenocarcinoma endometriode poco diferenciado (grado 3) con crecimiento predominantemente sólido (Robbins S, Cotran R 2003).

❖ **Carcinoma endometrial no endometriode o de Tipo II**

Supone entre un 10% y un 20% de los carcinomas endometriales. Afecta a mujeres de más edad que el CEE, por definición es un tumor poco diferenciado (Grado 3), con una histología de células claras o serosa y de peor pronóstico, que además no suele estar asociado a estimulación estrogénica pero sí a un endometrio atrófico u ocasionalmente a pólipos endometriales. A pesar de detectarse en estadios tempranos, el 20% de las pacientes presenta invasión miometrial y/o afectación ganglionar, principales indicadores asociados a mal pronóstico y descenso en la tasa de supervivencia (Denschlag et al. 2010).

A continuación se muestra una tabla resumen con las principales características de los dos tipos de carcinomas:

Tabla 3. Clasificación clinicopatológica y principales características del carcinoma endometrial. Adaptado de (Bokhman 1983).

	Tipo I	Tipo II
Edad	Pre- o perimenopáusia	Postmenopáusia
Exposición a estrógenos	Asociado	No asociado
Hiperplasia precursora	Presente	Ausente
Grado	Bajo	Alto
Invasión miometrial	Mínima	Profunda
Subtipos específicos	Carcinoma endometriode, mucinoso	Carcinomas seroso y de células claras
Pronóstico	Buen	Mal

2.4.2 Clasificación del carcinoma endometrial según el tipo histológico

La clasificación histopatológica del CE propuesta por la Sociedad Internacional de Ginecología Patológica (S.I.G.P.) con la aprobación de la O.M.S. se basa en la diferenciación de los tipos histológicos en función del tipo celular presente en el área tumoral y se resume a continuación:

Tabla 4. Clasificación histológica del cáncer de endometrio.

Adenocarcinoma endometriode	Carcinoma seroso
Variantes:	Carcinoma de células claras
Con diferenciación escamosa	Carcinoma mixto
Villoglandular	Carcinoma de células escamosas
Secretor	Carcinoma transicional
Con células ciliadas	Carcinoma de células pequeñas
Adenocarcinoma mucinoso	Carcinoma indiferenciado

❖ **Adenocarcinoma endometriode**

Recibe su nombre por estar compuesto por glándulas que recuerdan al endometrio proliferativo normal. Como se ha comentado anteriormente, es la forma más común de CE, representando el 80-85% de los casos. Los tumores de esta categoría, por definición, no han de contener áreas mayores del 10% de diferenciación escamosa, serosa, mucinosa o de células claras. Su apariencia microscópica está determinada por el grado de diferenciación del tumor (Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J 2009).

Los adenocarcinomas endometrioides presentan cuatro variantes:

1. Adenocarcinoma endometriode con diferenciación escamosa:

Representa un 20-50% de los carcinomas endometrioides. En los tumores bien diferenciados se presenta en forma de agregados celulares (mórulas). Los tumores de alto grado presentan grandes masas sólidas de células con citoplasma abundante, eosinófilo (Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J 2009).

2. Adenocarcinoma endometriode villoglandular: Representa un 15-30% y está constituido por una proliferación celular de bajo grado, con papilas alargadas. No presenta diferencias en el comportamiento con respecto al CE típico (Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J 2009).

3. Adenocarcinoma endometriode secretor: Constituido por células tumorales que presentan vacuolas subnucleares que contienen

glicógeno. Forma glándulas semejantes al endometrio secretor (Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J 2009).

4. Adenocarcinoma endometriode con células ciliadas: Ya que ocasionalmente es posible ver células ciliadas en los carcinomas endometrioides, el diagnóstico de la variante ciliada se realiza cuando ocupa la mayoría de las glándulas malignas.

❖ **Adenocarcinoma mucinoso**

Es un tipo de carcinoma poco frecuente, entre un 1-9%. Se caracteriza por presentar células columnares con un citoplasma de tono pálido rico en mucina. Suelen ser de bajo grado y mínimamente invasivos, por lo que el pronóstico es favorable (Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J 2009).

❖ **Carcinoma seroso**

Representa un 5-10% y junto con el carcinoma de células claras forma parte del grupo de carcinomas independientes de estrógenos o de tipo II. La lesión que le precede es el carcinoma seroso intraepitelial, también llamado CE in situ o carcinoma seroso de superficie. Compuesto por papilas recubiertas de células tumorales muy atípicas, con apilamientos de núcleos. Es una forma muy agresiva, con tendencia a desarrollar una invasión profunda del miometrio y extenderse a ganglios linfáticos, siendo el responsable del 25% de las muertes por cáncer de endometrio (Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J 2009).

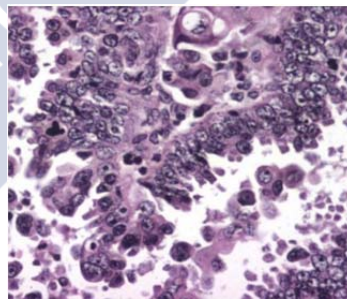


Figura 11. Carcinoma seroso de endometrio (Prat 2004).

❖ **Carcinoma de células claras**

Su prevalencia varía entre el 1-5%. Está compuesto por células alargadas, con un citoplasma claro rico en glicógeno y con distintos márgenes celulares. Las pacientes son diagnosticadas en estadios avanzados, con invasión

miometrial, por lo que el pronóstico es desfavorable (Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J 2009).

❖ **Carcinoma de tipo mixto**

Está compuesto por una mezcla de carcinoma de tipo I (CEE incluyendo las diferentes variantes, o carcinoma mucinoso) y carcinoma de tipo II (seroso o de células claras). El tipo minoritario debe comprender al menos el 10% del tumor (Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J 2009).

❖ **Carcinoma de células escamosas**

Representa el 0.25-0.5% de los carcinomas endometriales pero tiene mal pronóstico. Constituido exclusivamente por componente escamoso, con ausencia de componente glandular (Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J 2009).

❖ **Carcinoma transicional**

Se trata de un tipo histológico muy minoritario con rasgos similares a los carcinomas de tracto urinario (Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J 2009).

❖ **Carcinoma de células pequeñas**

Es muy infrecuente y es similar a los carcinomas de células pequeñas de pulmón.

❖ **Carcinoma indiferenciado**

Representan el 1.5% de los carcinomas endometrioides y corresponde a aquellos carcinomas que no presentan diferenciación y no pueden incluirse en los tipos anteriores. Las células tumorales presentan un núcleo grande con un nucléolo prominente (Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J 2009).

Mientras que los CENE son considerados de alto grado por definición, en los CEE es necesario definir el **grado histológico** que junto con el estadiaje F.I.G.O suponen un factor pronóstico muy importante (Zaino et al. 1995) (Figura 10).

G1. Adenocarcinoma bien diferenciado, menos del 5% de crecimiento sólido, patrones glandulares fácilmente reconocibles.

G2. Adenocarcinoma moderadamente diferenciado con crecimiento sólido parcial (menos del 50%), muestra glándulas bien formadas mezcladas con láminas sólidas de células malignas.

G3. Adenocarcinoma poco diferenciado con crecimiento predominantemente sólido (más del 50%), con láminas sólidas de células con glándulas apenas reconocibles y mayor grado de atipia nuclear y actividad mitótica.

2.4.3 Clasificación del carcinoma endometrial según el grado de invasión tumoral (F.I.G.O)

La clasificación quirúrgica del CE de acuerdo con la F.I.G.O ha sido obligatoria desde 1988. Sin embargo, en 2009 se presentó una nueva clasificación que aparece reflejada en la Tabla 5.

Tabla 5. Clasificación del carcinoma endometrial según la F.I.G.O. (Amant et al. 2012).

Estadio I*	Tumor confinado al cuerpo del útero
IA*	Sin invasión miometrial o <50% del miometrio
IB*	Invasión miometrial igual o > 50% del miometrio
Estadio II*	Tumor invade el estroma cervical, sin extensión más allá del útero**
Estadio III*	Extensión local y/o regional del tumor
IIIA*	Tumor invade la serosa del cuerpo del útero y/o los anexos#
IIIB*	Extensión a vagina#
IIIC*	Metástasis a nódulos linfáticos pélvicos y/o para-aórticos#
IIIC1*	Nódulos pélvicos positivos
IIIC2*	Nódulos linfáticos para-aórticos positivos con o sin nódulos linfáticos pélvicos positivos
Estadio IV*	Tumor invade la vejiga y la mucosa del intestino, y/o metástasis a distancia
IVA*	Tumor invade la vejiga y/o la mucosa del intestino
IVB*	Metástasis a distancia, incluyendo intra-abdominales y/o nódulos linfáticos inguinales

*G1, G2 o G3

**Afectación de la glándula endocervical sólo debe considerarse como estadio I y no más que estadio II.

#Citología positiva ha de considerarse por separado sin cambiar el estadio.

2.5 BASES MOLECULARES DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

2.5.1 Modelo dual del carcinoma endometrial

Las bases moleculares del CE se conocen parcialmente. El modelo dual propone la progresión del CE desde una hiperplasia simple a una compleja como una reacción a la exposición elevada a estrógenos, mientras que las mutaciones en *PTEN* y *KRAS*, así como la aparición de inestabilidad microsatélite (IMS) definirían la progresión de la hiperplasia atípica al CE. Las mutaciones en *TP53* y la sobreexpresión de *HER2/neu* caracterizarían eventos tardíos de la progresión y desdiferenciación de los tumores tipo I, mientras que serían eventos tempranos en el desarrollo de tumores de tipo II (Figura 12).

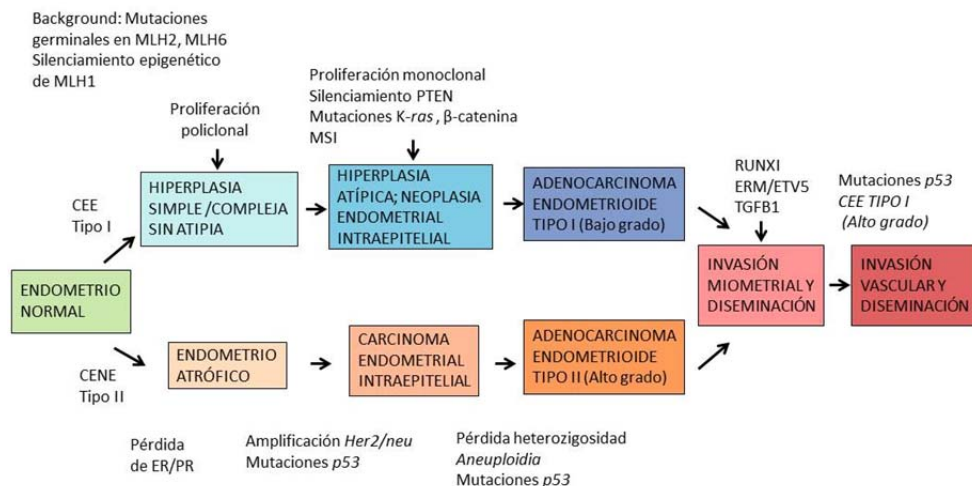


Figura 12. Modelo dual de la tumorigénesis endometrial. Adaptado de (Doll et al. 2008).

Estas alteraciones moleculares están relacionadas con el desarrollo del CEE o con el CENE, aunque hay características genéticas comunes a ambos tipos (Tabla 6).

Tabla 6. Principales alteraciones genéticas descritas en los carcinomas endometriales tipo I y tipo II (Salvesen et al. 2012).

	Función	Alteración	Prevalencia en CE Tipo I	Prevalencia en CE Tipo II
PIK3CA	Oncogén	Amplificación	2-14%	46%
KRAS	Oncogén	Mutación	13-26%	0-10%
TP53	Supresor tumoral	Mutación	5-10%	80-90%
MLH1	Reparación DNA	Metilación	20-35%	0-10%
MSH2	Reparación DNA	Metilación, mutación	20-45%	0-5%
ER, PR	Factores de transcripción	Expresión	70-73%	19-24%
ERBB2	Oncogén	Amplificación, expresión	Inusual	18-80%
PIK3CA	Oncogén	Mutación	26-36%	26-36%
PTEN	Supresor tumoral	Mutación, delección, metilación	35-55%	0-11%
hTERT	Oncoproteína	Sobreexpresión	15%	64%
CDKN2A	Supresor tumoral	Mutación, metilación, expresión	10%	10-40%
β-catenina	Oncogén	Mutación	25-38%	0-5%

2.5.1.1 Genética molecular asociada al CEE o Tipo I

Las principales alteraciones genéticas que tienen lugar en los CEE o tipo I son:

❖ Silenciamiento de *PTEN*

La inactivación del supresor tumoral *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*), localizado en el cromosoma 10q23, es el defecto genético más común en el CEE. Un 83% de los casos de CEE y un 55% de las lesiones precancerosas presentan pérdida de expresión de este gen, por lo que se considera un evento temprano en la tumorigénesis endometrial (Samarntjai et al. 2010; Bansal et al. 2009). Se ha descrito pérdida de actividad por mutaciones en un 15-55% de las hiperplasias con o sin atipia (Samarntjai et al. 2010), en un 40% de los carcinomas endometriales por pérdida de

heterozigosidad (LOH) y en un 20% por hipermetilación del promotor (Samarntjai et al. 2010; Salvesen et al. 2001).

La proteína codificada por *PTEN* actúa como fosfatasa de lípidos y de proteínas. Un descenso en su expresión conlleva una pérdida de inhibición de PI3K (*phosphoinositide-3-kinase*), incremento en la actividad de AKT y una actividad descontrolada de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), relacionado con proliferación, apoptosis y migración celular. La función fosfatasa de proteínas está relacionada con la inhibición de la formación de adhesiones focales y migración celular, así como la inhibición de la vía de señalización de MAPK inducida por factores de crecimiento (Salvesen et al. 2001). Las consecuencias funcionales de la pérdida de PTEN resultan en un crecimiento celular aberrante, salida de la apoptosis y migración celular.

❖ **Inestabilidad microsatélite (IMS)**

Los microsatélites son zonas del DNA, generalmente no codificantes, donde una secuencia de 1-5 pares de bases se repite varias veces. En los humanos la región microsatélite más común es la repetición del dinucleótido CA. La IMS se refiere a la acumulación progresiva de alteraciones en los *loci* microsatélite, y se ha visto que está relacionada con defectos en los genes reparadores del DNA (*MLH-1*, *MSH-2*, *MSH-6*) (Bansal et al. 2009). En el caso del CE, en estas regiones predominan mecanismos epigenéticos sobre mutaciones. La hipermetilación del promotor de *MLH1* también se ha detectado en hiperplasias endometriales y casi exclusivamente en hiperplasias atípicas, de las cuales muchas coexisten con carcinomas, lo que sugiere que podría ser un primer grado en la patogénesis del CEE (Esteller et al. 1999). Se ha encontrado IMS en un 17-25% de los CEE esporádicos, pero no suele aparecer en los CENE (Salvesen et al. 2000). La asociación de la inactivación de *PTEN*, IMS, metilación y baja expresión de *MLH1* serían las bases para los pasos iniciales de la tumorigénesis del CEE y reflejan la heterogeneidad en los mecanismos moleculares que contribuyen al desarrollo de este tipo de tumores (Bansal et al. 2009; Konopka et al. 2007).

❖ **Amplificación de *PIK3CA***

El gen *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*) se localiza en el cromosoma 3q26.32. La enzima PI3K es una quinasa lipídica heterodimérica formada por una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85) de la ruta de señalización PI3K/AKT. Esta ruta está activada frecuentemente en el CE. La activación de PI3K genera el segundo mensajero PI3P, que posteriormente activa varias moléculas, por ejemplo AKT. Esta regulación implica supresión apoptótica e incremento de la proliferación celular. La activación de *PI3KCA* se ha descrito en el 26-36% de los carcinomas endometriales y coexiste con mutaciones en *PTEN* (15-27%) y *KRAS*, lo que sugiere una cooperación en la transformación maligna (Samarthai et al. 2010). Además la amplificación del oncogén *PIK3CA* se ha asociado a un peor pronóstico y a un fenotipo tumoral más agresivo y con mayor riesgo de recurrencia (Salvesen et al. 2009).

❖ **Mutación en *KRAS***

KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) codifica una GTPasa de membrana implicada en la transducción de señales entre la superficie celular y el núcleo. Se han identificado mutaciones en este gen en un 19-46% de los carcinomas endometriales, principalmente en los de Tipo I (10-30%). También se han detectado mutaciones en hiperplasias endometriales, sugiriendo una implicación en la tumorigénesis temprana. Además, las mutaciones en *KRAS* se consideran un factor de mal pronóstico (Ito et al. 1996; Doll et al. 2008).

❖ **Mutación en *CTNNB1* (β -Catenina)**

La proteína β -catenina, codificada por el gen *CTNNB1* tiene dos funciones según su localización celular. En la membrana plasmática se une al citoesqueleto de actina formando un complejo con E-cadherina y α -catenina para generar las uniones adherentes célula-célula. En el núcleo actúa como componente principal de la vía de señalización de Wnt. Las mutaciones en *CTNNB1* conllevan a la estabilización de la proteína, que resiste la

degradación citoplasmática en el proteosoma (ubiquitinación), acumulándose en el citoplasma y en el núcleo lo que resulta en una activación constitutiva de genes como el de la metaloproteasa de matriz 7 (*MMP-7*) o la Ciclina D1 (*CD1*) (Brabletz et al. 1999; Shih et al. 2003).

Se han encontrado mutaciones en el exón 3 del gen *CTNNB1* con acumulación nuclear en un 14-44% de los carcinomas endometriales, y mientras que las mutaciones en *PTEN*, *KRAS* y la IMS a menudo coexisten, las mutaciones en β -catenina suelen ser independientes. Se ha descrito una buena correlación entre las mutaciones en *CTNNB1* y la inmunotinción nuclear de β -catenina, aunque existe controversia sobre el valor pronóstico de esta mutación en el CE (Llobet et al. 2009).

❖ **Receptor de estrógenos (RE) y receptor de progesterona (RP)**

Los receptores de estrógenos α (RE α) y β (RE β) y los receptores de progesterona A (RP-A) y B (RP-B) pertenecen a la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas/tiroideas. La unión del ligando conlleva la dimerización del receptor que actúa como factor de transcripción translocándose al núcleo para ejercer su función. En el útero el subtipo RE α es predominante y se ha visto que está modulado por el RE β (Mylonas et al. 2009). Induce la proliferación y diferenciación de las células del endometrio.

La progesterona, actuando a través de los RP es el regulador negativo fisiológico de la acción de los estrógenos en el endometrio. Los RP-A y RP-B se generan a partir del mismo gen con lugares de inicio de la transcripción alternativos. El RP-A actúa como represor transcripcional disminuyendo la acción de los estrógenos al impedir la transactivación del RE α (Savouret et al. 1994). RP-B actúa como activador agonista de los estrógenos, por lo que el ratio RP-A/RP-B será importante en el desarrollo de hiperplasias.

Alteraciones en los genes de estos receptores promueven la activación constitutiva de sus vías, lo que puede traducirse en un crecimiento incontrolado de las células del endometrio. En el CEE el análisis de la expresión conjunta de los receptores de estrógenos y progesterona tiene

mayor valor pronóstico que únicamente la evaluación de uno de ellos (Doll et al. 2008; Zannoni et al. 2013).

2.5.1.2 Genética molecular asociada al CENE o Tipo II

Las principales alteraciones genéticas que tienen lugar en los CENE o tipo II son:

❖ Mutación en *TP53*

El gen supresor de tumores *TP53* (*tumor protein p53*) está localizado en el cromosoma 17p13.1. Se trata de un punto clave de la regulación del ciclo celular y de la apoptosis, así como de otras funciones como la diferenciación y la senescencia. Tras el daño en el DNA, se acumula la proteína nuclear p53, y a través de p21 provoca arresto del ciclo celular y promueve la apoptosis. Las mutaciones en el gen *TP53* se dan en un 10% de los CEE mientras que aparecen hasta en un 90% de los carcinomas serosos Tipo II, siendo la modificación genética más característica de los mismos (Lax et al. 2000).

Se postula que la mutación en uno de los alelos ocurre de forma temprana durante el desarrollo del carcinoma seroso, y la pérdida del segundo alelo tiene lugar de forma tardía en la progresión a carcinoma. Este hecho puede reforzar la hipótesis de que la mutación en *TP53* puede influir en la progresión del CEE al CENE (Llauradó et al. 2012; Sakuragi et al. 2005).

❖ Amplificación de *HER2/neu*

El gen *HER2/neu* (*c-erb-B2*) es un oncogén localizado en el brazo largo del cromosoma 17q12 que codifica un miembro de la familia de receptores tirosín-quinasa del factor EGF (*epidermal growth factor*), el receptor II. Se ha observado que existen niveles elevados de *HER2/neu* en varios tipos tumorales, incluyendo los carcinomas de mama, ovario y endometrio, de hecho, se ha descrito su sobreexpresión en el 18-80% de los CENE y se ha asociado con un peor pronóstico y un descenso en la supervivencia global (Samarntai et al. 2010; Okuda et al. 2010).

❖ **Inactivación del supresor tumoral p16^{INK4a}**

El supresor tumoral p16^{INK4a} juega un papel importante en la regulación del ciclo celular. El gen *CDKN2A*, que codifica p16^{INK4a} está localizado en el cromosoma 9p21 y su inactivación conlleva un crecimiento celular descontrolado. La inactivación de p16 es más frecuente en el CENE (40-45%) que en el CEE (10%) a pesar de que el mecanismo no está claro ya que la hipermetilación del promotor, mutaciones o deleciones no son frecuentes. La pérdida de expresión de p16 está relacionada con mutaciones en *KRAS* y *TP53* y está asociada con tumores de alto grado y peor pronóstico (Samarthai et al. 2010; Salvesen, Das, et al. 2000).

❖ **Sobreexpresión de la proteína Stathmin**

Stathmina es una fosfoproteína citosólica que promueve la desestabilización de los microtúbulos, la movilidad y proliferación celular y la resistencia a terapia antimicrotúbulos. La fosforilación está mediada por la familia MAPK así como por la vía PI3K y regula su actividad desestabilizante sobre los microtúbulos siendo importante en la entrada en mitosis. La sobreexpresión de esta proteína se ha asociado a un CE de fenotipo más agresivo (Wik et al. 2013).

2.6 TRATAMIENTO DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

El tratamiento principal para las pacientes con CE es la cirugía. Generalmente incluye histerectomía y salpingo-ovarectomía bilateral, llevada a cabo por laparotomía tradicional, laparoscopia convencional o asistida por robot. La muestra quirúrgica dará información del grado histológico, el grado de invasión, la invasión del espacio linfovascular, el tamaño tumoral, así como la extensión extrauterina de la enfermedad si se han realizado biopsias peritoneales o linfadenectomía. Con la utilización del estadiaje quirúrgico del tumor es posible eliminar el tratamiento adyuvante innecesario en las

pacientes con bajo riesgo, mientras que permite definir el grupo de pacientes de alto riesgo que podrían beneficiarse de terapias más agresivas.

Dependiendo del estadiaje tumoral la linfadenectomía de la zona pélvica y para-aórtica puede ser obligatoria, como en el caso de las pacientes con carcinomas con histologías de células claras o serosa, candidatas para el análisis de ganglios aórticos (Amant et al. 2012), pero en el caso de pacientes con enfermedad de bajo riesgo o estadios tempranos es controvertido llevar a cabo esta operación y la práctica difiere según la institución. Los ensayos clínicos no han demostrado beneficios en la supervivencia global o libre de progresión entre los brazos con o sin linfadenectomía para pacientes con estadio I (Kitchener et al. 2009; Benedetti Panici et al. 2008).

2.6.1 Terapia hormonal

La progesterona es una hormona esteroidea esencial para la normal fisiología reproductiva femenina. Es secretada principalmente por el cuerpo lúteo que se desarrolla en el ovario tras la ovulación. Se ha visto que su acción es protectora frente al desarrollo del CE dependiente de estrógenos. Se han descrito ratios de respuesta entre un 11-50% en el tratamiento del tumor primario y recurrente (Decruze & Green 2007), sin embargo, también se ha descrito la ausencia de un beneficio en la supervivencia (Martin-Hirsch et al. 1996), por lo que sólo se recomienda en el caso de pacientes con tumores inoperables o en mujeres que quieren mantener la fertilidad.

Se emplea progesterona o sus análogos como el acetato de medroxiprogesterona y el acetato de megestrol. El mayor problema es que la exposición prolongada a progestinas resulta en la inhibición de la expresión del RP y en la resistencia a la terapia (Shao 2013).

2.6.2 Radioterapia

Las características histológicas se emplean para determinar si una paciente necesita radioterapia (RT) adjuvante. Diferentes ensayos clínicos han determinado que las pacientes con CE estadio I, grado 1 ó 2, sin o con

invasión miometrial superficial o que presentan un único factor de riesgo no requieren radioterapia al no suponer un beneficio (Creutzberg et al. 2000; Keys et al. 2004; Blake et al. 2009).

Por el contrario, en pacientes con factores de riesgo intermedios-altos (que presenten dos o más factores: >60 años, invasión miometrial profunda, grado 3, histología serosa o células claras, invasión linfovascular) se ha demostrado que la braquiterapia vaginal (la radiación se aplica directamente en el tumor o muy cerca) presenta un beneficio frente a la terapia de radiación externa (Nout et al. 2010). En pacientes con enfermedad de alto riesgo (3 o más factores de riesgo, estadios II y III), se está analizando el papel de la RT externa en combinación con quimioterapia (QT). El ensayo clínico NSGO-EC-9501/EORTC-55991 compara la RT externa con o sin cuatro ciclos de QT con varias combinaciones de tratamiento, demostrando un incremento del 7% en la supervivencia libre de progresión con la adición de QT, pero no mostró diferencias en la supervivencia global.

2.6.3 Quimioterapia

El valor de la QT en pacientes con enfermedad en estadio I no es claro, pero sí ha demostrado tener un beneficio en la supervivencia global en estadios avanzados (Randall et al. 2006). En las pacientes con enfermedad en estadio IV la QT neoadyuvante es el tratamiento de elección, particularmente si hay presencia de ascitis. Si hay evidencia de metástasis extra-abdominales, así como en recidivas, la terapia está basada en la combinación de doxorubicina, paclitaxel y cisplatino o carboplatino y paclitaxel.

2.6.4 Terapias dirigidas

El avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo del CE permite el diseño de nuevas terapias dirigidas. Los fármacos más comunes incluyen dianas relacionadas con el proceso de progresión del ciclo celular, apoptosis, resistencia a fármacos o angiogénesis.

La proteína mTOR es un regulador central del crecimiento, proliferación y apoptosis celulares, como se describió en la sección 2.5.1.1. Algunas terapias potenciales dirigidas a inhibir mTOR incluyen el temserolimus (CCI-779), everolimus (RAD001) y deferolimus (AP23573). Se ha visto que promueven una enfermedad estable en el 44% de las pacientes con CE metastásico o recurrente (Slomovitz et al. 2010; Oza et al. 2011). Además de los inhibidores de mTOR, se están desarrollando otros componentes dirigidos frente a la vía mTOR-AKT-PI3K-PTEN, como enzastaurin (inhibidor de PI3K) y triciribine (inhibidor de AKT) (Bansal et al. 2009).

Los miembros de la familia del receptor de EGF (EGFR), como HER-2/neu están sobreexpresados en el CE, como se describió en la sección 2.5.1.2. Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal dirigido frente a HER-2/neu que ha demostrado actividad en cáncer de mama en combinación con citotóxicos, sin embargo en el CE ha mostrado una actividad mínima. Se están investigando otros anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la familia ERBB/HER, incluyendo pertuzumab, cetuximab y panitumumab.

El factor de crecimiento VEGF juega un papel principal en la angiogénesis y en el incremento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos asociados a tumor. Se están estudiando anticuerpos monoclonales anti-VEGF como el bevacizumab y sorafenib (Bansal et al. 2009).

2.7 FACTORES PRONÓSTICOS DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

Como se ha comentado anteriormente, en las pacientes con CE el tratamiento principal es la cirugía, tras la cual el patólogo tiene un papel muy importante en el establecimiento del pronóstico y la necesidad de tratamiento adyuvante. A pesar de que generalmente se detecta de forma temprana, cuando el tumor todavía está confinado en el útero, entre un 13-17% de las

mujeres sufren una recurrencia, la mayoría aproximadamente tres años después de recibir el primer tratamiento, un tercio de ellas en regiones locales de la vagina o la pelvis y dos tercios en lugares a distancia (Fung-Kee-Fung et al. 2006; Smith et al. 2007).

Los factores pronósticos para el CE pueden dividirse en uterinos o extrauterinos (Prat 2004). Los factores uterinos incluyen: tipo histológico, grado histológico, presencia de hiperplasia endometrial con atipia, alcance de la invasión miometrial, invasión vascular, afectación cervical, ploidía del DNA y el estado de los receptores hormonales. Los factores extrauterinos incluyen: citología peritoneal positiva, implicación de anexos, metástasis en ganglios linfáticos pélvicos y para-aórticos y metástasis peritoneal. Los factores más significativos son el tipo y grado histológico, el grado de invasión miometrial y la invasión linfovascular (Vidal & Rafii 2013).

El estadio FIGO (explicado en la sección 2.4.3) es el factor pronóstico individual más importante, con una reducción significativa en la supervivencia cuando los estadios son más avanzados (Siegel et al. 2012). A pesar de que la diseminación a ganglios linfáticos regionales también es un factor pronóstico importante, el papel de la linfadenectomía en mujeres con tumores en estadios tempranos sigue siendo controvertido (Wright et al. 2012). No se ha demostrado un beneficio en la supervivencia ni global ni libre de recidiva (Benedetti Panici et al. 2008; Kitchener et al. 2009).

Tabla 7. Clasificación de las pacientes con CE según el riesgo de recurrencia. Adaptado de (Salvesen et al. 2012).

Riesgo de recurrencia	Características histopatológicas
Bajo riesgo	CEE Grado 1 ó 2, invasión miometrial <50%
Riesgo intermedio	CEE Grado 3, invasión miometrial <50%
	CEE 1 ó 2, invasión miometrial >50%
Alto riesgo	CEE Grado3, invasión miometrial >50%
	CENE

En las pacientes con estadios tumorales tempranos es importante encontrar el mejor balance entre el riesgo de recurrencia como consecuencia

de no someterlas a tratamiento o el riesgo de complicaciones debido a un tratamiento excesivo, que además es costoso. La disponibilidad de un biomarcador de pronóstico fiable y estandarizado permitiría estratificar a las pacientes según el riesgo de recurrencia y llevar a cabo un tratamiento más personalizado. La proteína serológica HE4, se ha descrito recientemente como un biomarcador pronóstico en el CE (Brennan et al. 2014), así como la proteína L1CAM ha demostrado tener valor pronóstico en pacientes con CEE estadio I (Zeimet et al. 2013).

En este escenario nos planteamos el desarrollo de esta tesis, teniendo en cuenta (i) que la invasión miometrial es un factor pronóstico independiente y se ha visto que está directamente relacionado con el riesgo de recurrencia (Salvesen et al. 2012), (ii), que la enfermedad metastásica es responsable del 90% de la mortalidad por cáncer (Gupta & Massagué 2006) y (iii) que hay una necesidad evidente de encontrar un marcador que pronostique el riesgo de recurrencia en las pacientes con estadios tumorales tempranos.

Para explicar mejor el desarrollo de la misma, a continuación se presenta un esquema modificado de la “cascada metastásica” de Valastyan S. y Robert A. Weinberg. Durante la progresión metastásica las células tumorales salen de sus sitios de crecimiento primarios, llevando a cabo una invasión local. En el caso del CE, la forma más común de diseminación es a través de la **invasión del miometrio**. El estudio, a nivel molecular, de este proceso es el primer objetivo planteado.

A continuación tiene lugar un proceso de intravasación de células tumorales, (diseminación linfática y hematogena) que circulan de forma sistémica, sobreviviendo en la circulación (**Células tumorales Circulantes, CTC**, segundo contenido de estudio en esta tesis), se detienen en un lugar a distancia, extravasan y se adaptan a sobrevivir y prosperar en los microambientes extraños de tejidos distantes, dando lugar a la formación de

micrometástasis y posterior colonización metastásica. (Thompson et al. 2005; Valastyan & Weinberg 2011).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que muchas pacientes no presentan síntomas clínicos tras la terapia y sin embargo sufrirán, a menudo varios años más tarde, recurrencias tumorales agresivas. La búsqueda de un **marcador que pronostique la recurrencia** en las pacientes con CE en estadios tempranos supone el tercer objetivo planteado en esta tesis.

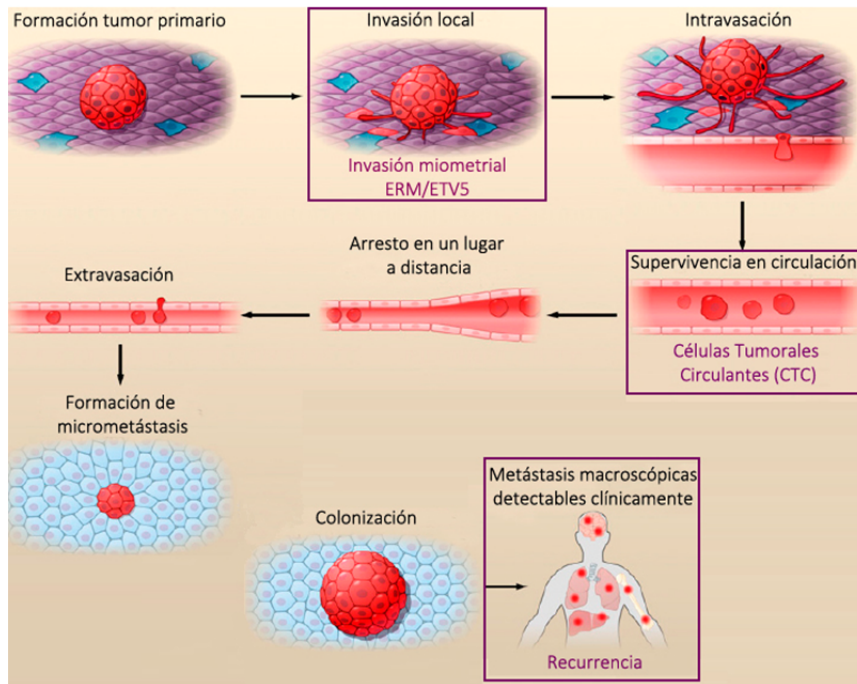


Figura 13. Cascada de invasión-metástasis. Modificado de (Valastyan & Weinberg 2011).

3. INVASIÓN DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

La invasión local supone la entrada de las células tumorales, previamente confinadas en el tumor primario, en el estroma tumoral adyacente y en el parénquima tisular normal. Para invadir el estroma las células tumorales primero deben romper la membrana basal (MB), una matriz extracelular (MEC) que juega un papel vital en la organización de los tejidos epiteliales, en parte por la separación de sus compartimentos epiteliales y estromales. Además de estas funciones estructurales, la MEC contiene un repositorio de factores de crecimiento que pueden liberarse por proteasas secretadas por las células tumorales. La MB juega un papel crucial en los procesos de transducción de señales a través de vías mediadas por integrinas y uniones célula-matriz, que conducen a alteraciones en la polaridad celular, proliferación, invasión y supervivencia (Valastyan & Weinberg 2011).

El CE disemina mediante (1) extensión directa a través del miometrio, (2) exfoliación celular a las trompas de Falopio, (3) diseminación linfática, y (4) diseminación hematogena. La forma más común de diseminación es por extensión directa del tumor a través del miometrio. De hecho, esta invasión local se considera uno de los factores pronósticos más importantes y se ha visto que está directamente relacionada con el riesgo de recurrencia, con un aumento del riesgo de metástasis linfáticas, pélvicas y aórticas, así como con la supervivencia global (Lee et al. 1994).

Desde la perspectiva en la que se desarrolla esta tesis es importante describir los factores moleculares que intervienen en el proceso de invasión miometrial. La caracterización de estas bases moleculares responsables del inicio o el control del proceso de invasión permitirán el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la supervivencia global de las pacientes (Abal et al. 2007).

3.1 TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (EMT)

La invasión de células individuales es claramente incompatible con un elemento crítico de la organización del tejido epitelial, las uniones intercelulares mediadas por E-cadherina, que unen células epiteliales y evitan la disociación de células individuales. Para superar este y otros obstáculos para la invasión, las células tumorales llevan a cabo el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT).

La EMT es un proceso vital durante el desarrollo embrionario, la formación de tejidos y órganos como la cresta neural, el corazón, el sistema musculoesquelético o el sistema nervioso periférico. También es importante en la reparación de tejidos en el adulto. Es un proceso por el que las células epiteliales pierden la polaridad, los contactos célula-célula, sufren un remodelado del citoesqueleto, expresan componentes mesenquimales así como proteínas que degradan la matriz extracelular y manifiestan un fenotipo migratorio. Las células tumorales mesenquimales adquieren la capacidad de separarse del tumor primario, penetrar a través de la membrana e infiltrar tejidos contiguos para metastatizar (Kang & Massagué 2004).

La EMT se desencadena por un conjunto diverso de estímulos incluyendo la señalización por factores de crecimiento, interacciones tumor-estroma e hipoxia (Polyak & Weinberg 2009). Las transiciones entre el estado epitelial y mesenquimal contribuyen a la progresión tumoral y a la heterogeneidad intratumoral.

Tras la diseminación celular y para la formación de metástasis a distancia las células tumorales abandonan los vasos sanguíneos o linfáticos y revierten su fenotipo adquiriendo características epiteliales en un proceso conocido como transición mesénquima-epitelio (MET) (Polyak & Weinberg 2009).

3.1.1 E-cadherina

La pérdida de expresión de E-cadherina (gen *CDH1* en 16q22.1) es clave en el proceso de EMT (Peinado et al. 2004). Se trata de una glicoproteína central en las uniones adherentes célula-célula. Con su dominio extracelular se une a cadherinas de células vecinas, mientras que en su dominio intracelular interacciona con proteínas citoplasmáticas que transmiten la señal de adhesión y anclan el complejo proteico al citoesqueleto de actina. La E-cadherina también está implicada en la formación de desmosomas y *tight junctions* (Rowlands et al. 2000).

La represión a nivel transcripcional del gen *CDH1* está mediada por factores de las familias Snail (**SNAI1** (*snail family zinc finger 1*) y **SNAI2** (*snail family zinc finger 1*)), ZEB (**ZEB1** (*zinc finger E-box binding homeobox 1*) y **ZEB2** (*zinc finger E-box binding homeobox 2*)) y hélice-loop-hélice básica (bHLH: **E47** y **TWIST** (*Twist Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor 1*)). Las modificaciones postraduccionales de los represores son un nivel adicional en la represión de E-cadherina. Por ejemplo, la estabilidad proteica, la localización nuclear y la actividad de SNAI1 están controlada por modificaciones postraduccionales como fosforilación o lisina-oxidación mediada por **LOXL2** (*lysyl oxidase-like 2*) (Peinado et al. 2007). Existen diferentes factores de transcripción que actúan sobre los represores de E-cadherina para promover la EMT. Los factores de crecimiento **TGF β** (*transforming growth factor, beta*), **EGF** (*epidermal growth factor*), **IGF-1**, **VEGF** (*vascular endothelial growth factor*), **PDGF** (platelet-derived growth factor) y **FGF** (*fibroblast growth factor*), junto con las vías de señalización de Notch y Wnt/ β -Catenina juegan un papel principal en la inducción de los represores de E-cadherina (Thiery et al. 2009; Moreno-Bueno et al. 2008). La vía de Notch induce EMT mediante la activación de la ruta NF- $\kappa\beta$ (*nuclear factor- $\kappa\beta$*) o mediante la modulación de la actividad de TGF β . La vía Wnt lleva a la EMT a través de la inhibición de la fosforilación de la β -catenina mediada por GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 beta*) (Polyak & Weinberg 2009). En el CE diversos autores han establecido una correlación entre niveles bajos de

expresión de E-cadherina y una mayor invasión tumoral (Sakuragi et al. 1994; Mell et al. 2004), de hecho, los carcinomas más agresivos, serosos y de células claras, tienen menor expresión de E-cadherina que los CEE (Holcomb et al. 2002). En cuanto a sus represores, la expresión nuclear de SNAIL se ha identificado como un factor independiente predictivo de supervivencia en el CE (Tanaka et al. 2013) y una elevada expresión de TWIST se ha visto asociada a un peor pronóstico así como a un mayor nivel de invasión miometrial (Kyo et al. 2006). También se ha descrito una relación entre el nivel de expresión de ZEB1 y la progresión de carcinomas ginecológicos (Hurt et al. 2008).

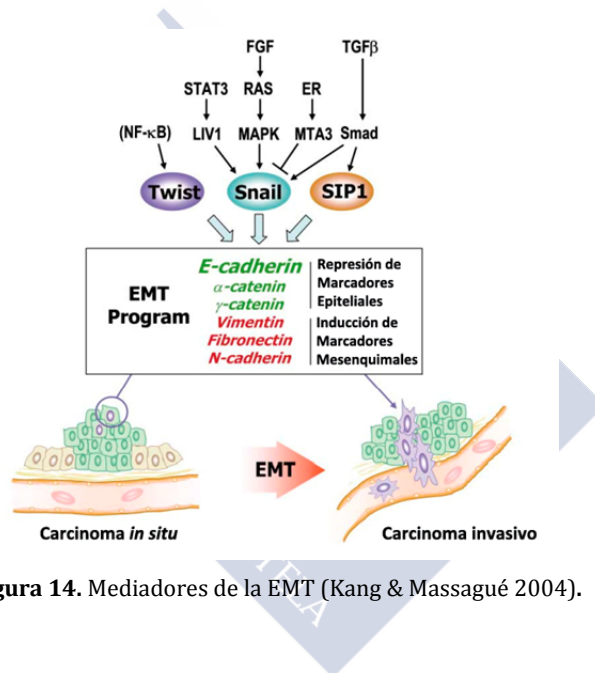


Figura 14. Mediadores de la EMT (Kang & Massagué 2004).

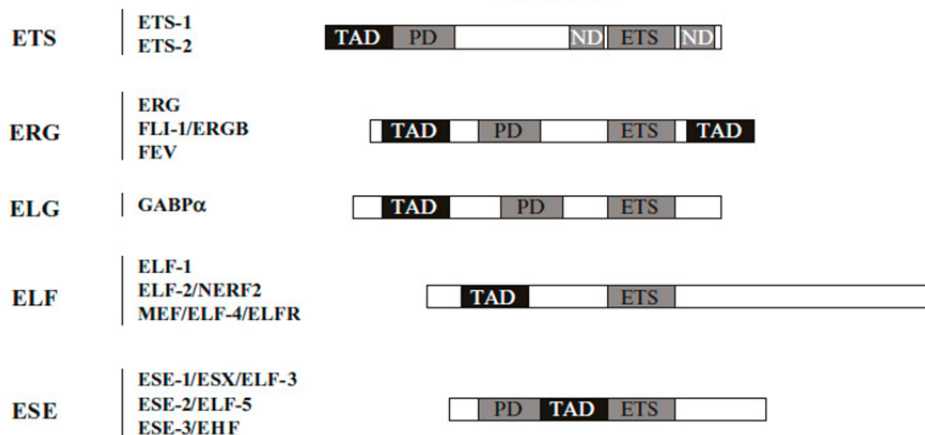
4. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ETV5 EN EL CARCINOMA ENDOMETRIAL

4.1 LA FAMILIA ETS

Los genes *ETS* (*E26 transformation specific*) codifican una familia de factores de transcripción que conservan una secuencia de 85 aminoácidos (dominio ETS) de unión al DNA, compuesto por tres alfa hélices y una hoja beta plegada de cuatro hebras. Regulan la transcripción mediante la unión a la secuencia 5'-GGAA/T-3' (EBS, sitio de unión de ETS) en los promotores de sus genes diana. Las secuencias que flanquean este motivo central son las que dan la especificidad de unión a cada miembro. La familia está compuesta por 27 miembros que se clasifican en grupos según la secuencia del dominio ETS, la posición del mismo en la proteína y la presencia de otros dominios funcionales conservados. Se han identificado 13 grupos: ETS, PEA3, TEL, YAN, SPI, ERG, ELF, DETS4, ELK4, GABP, ER71, ERF y ESE (de Launoit et al. 2006). En 11 de los 27 genes *ETS* humanos se ha encontrado un segundo dominio de 65-85 aminoácidos conservado, el dominio PNT, que está implicado en la interacción proteína-proteína y en la oligomerización (Seth & Watson 2005).

Subfamilia Miembros

Estructura



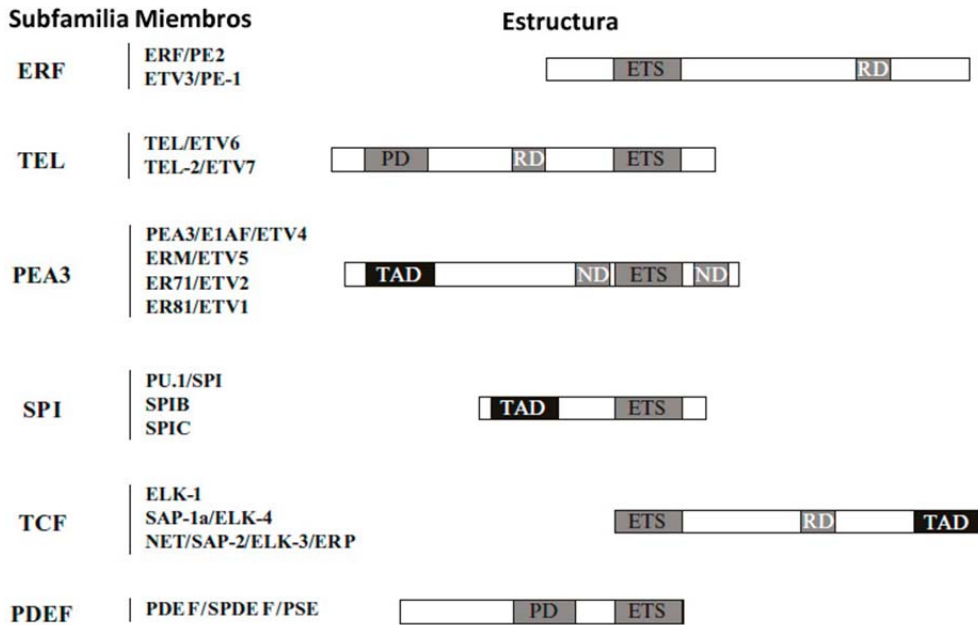


Figura 15. Familia de factores de transcripción ETS. Se presentan 11 subfamilias y sus miembros. Se representa una estructura característica de cada subfamilia. Las cajas corresponden a los dominios conservados. TAD dominio transcripcional activador, ND dominio negativo (control negativo de la unión al DNA), RD dominio de represión (Charlot et al. 2010).

Gracias a la especificidad y a su grado de conservación, estudios experimentales sugieren que las proteínas ETS tienen funciones biológicas únicas, siendo algunos de los factores ETS activadores y otros represores (Kopp et al. 2004). Han sido descritos como factores importantes durante el crecimiento, la diferenciación y supervivencia celular, así como durante el proceso de hematopoyesis, angiogénesis inflamación y cáncer (Sharrocks 2001).

En relación a los procesos tumorales, se ha descrito la presencia de elementos de unión a miembros de la familia ETS en los promotores inducibles de diferentes metaloproteinasas de matriz (MMPs) importantes en el remodelado de la MEC durante la migración e invasión (Westermarck & Kähäri 1999).

A pesar de que la mayoría de tumores derivan de células epiteliales que sufren múltiples alteraciones genéticas, es evidente que los cambios en el

microambiente tumoral contribuyen significativamente a la progresión tumoral. Distintos estudios han asociado a los factores ETS con transformación celular y progresión tumoral a través de la regulación de genes diana no sólo en las células epiteliales, sino también en estromales (Oikawa 2004; Seth & Watson 2005).

4.1.1 La subfamilia PEA3

La subfamilia PEA3 está compuesta por tres miembros: ETV5 (también llamado ERM), ER81 (ETV1) y PEA3 (ETV4 o E1Af). El gen *ETV5* se localiza en el cromosoma 3, en la posición 3q27-29, el gen *ER81* en el cromosoma 7q21 y el gen *PEA3* en el cromosoma 17q21. Se ha descrito su expresión en múltiples órganos en desarrollo derivados de las tres capas germinales, como por ejemplo los pulmones, las glándulas mamarias o los riñones. Los tres factores se han descrito como activadores transcripcionales y comparten el dominio ETS, así como dos dominios de transactivación, uno en el dominio aminoterminal y el otro en el carboxiterminal (de Launoit et al. 2006; Laget et al. 1996).

La actividad transcripcional dependiente de los factores PEA3 está regulada por modificaciones post-traduccionales. La modificación más común es la fosforilación, siendo dianas de la vía MAPK (de Launoit et al. 2006).

Existen distintos estudios que relacionan la expresión de los factores PEA3 en procesos carcinogénicos del tracto gastrointestinal, pulmón, mama, ovario y endometrio (de Launoit et al. 2006; Oh et al. 2012).

4.1.1.1 ETV5/ERM

El gen *ETV5/ERM* (*ets variant 5*) pertenece a la subfamilia PEA3 de factores de transcripción ETS, de unión al pentanucleótido consenso 5'-CGGAA/T-3'. Consta de 14 exones distribuidos a lo largo de 65 Kb de DNA genómico en el cromosoma 3, posición 3q27-29. La región 3' no traducida consta de 2.1 Kb, mientras que la 5' consta de 0.3 Kb, lo que permite la transcripción de aproximadamente 4 Kb.

ETV5 se expresa tanto en tejidos en desarrollo como adultos, incluyendo los testículos y ovarios (Monté et al. 1994). En humanos y en ratones se localiza en las células de Sertoli de los testículos y es esencial para la autorenovación de las células madre de las espermatogonias (Chen et al. 2005; Eo et al. 2011). En el ovario ETV5 se localiza en las células de la granulosa y del cumulus (Eo et al. 2008). Los ratones hembra *ETV5*^{-/-} son estériles y presentan, alrededor de la segunda semana de vida, defectos en la arquitectura de los ovarios y en el desarrollo de los óvulos (Eo et al. 2012; Jamsai et al. 2013). Además, los ratones macho *ETV5*^{-/-} no son capaces de llevar a cabo un desarrollo completo de los riñones (Lu et al. 2009).

Se trata de un proto-oncogén que juega un papel principal en la progresión del cáncer de mama, funcionando como una molécula adaptadora en la interacción de los receptores de adhesión y tirosín-quinasa intracelulares (Llauradó et al. 2012). En tumores ginecológicos se ha descrito el papel pronóstico de ETV5. En cáncer de cérvix su sobreexpresión se ha asociado con un mayor grado, metástasis y peor pronóstico, a la vez que se ha visto una correlación con niveles elevados de MMP-1 y una mayor angiogénesis (Gutierrez-Hartmann et al. 2007). En cáncer de endometrio Planaguma J. y col. describieron la correlación entre la sobreexpresión de ETV5 y el grado de invasión miometrial, con un incremento en la expresión a nivel proteico a medida que se avanza desde un endometrio atrófico, a una hiperplasia simple, compleja y finalmente al CEE (Figura 16). Estudios posteriores llevados a cabo por Monge M. y col. permitieron determinar que el proceso de infiltración miometrial mediado por ETV5 se lleva a cabo, entre otros mecanismos, a través de la activación de la MMP-2 que degrada los dominios helicoidales del colágeno tipo IV, principal componente de la membrana basal (Monge et al. 2007). Además, describieron una relación entre las propiedades migratorias e invasivas de las células tumorales mediadas por ETV5 y un incremento en la respuesta protectora ante estrés oxidativo producido durante la invasión del CE (Monge et al. 2009).

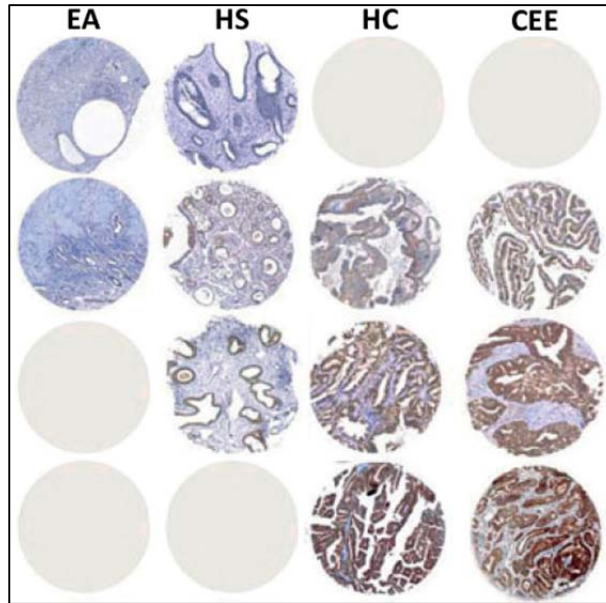


Figura 16. TMA endometrial para el análisis de la expresión proteica de ETV5/ERM mediante inmunohistoquímica. En la imagen se muestra el nivel de expresión de ETV5/ERM en tejido: endometrio atrófico (EA), hiperplasia simple (HS), hiperplasia compleja (HC), carcinoma endometrial endometriode (CEE) (Planagumà et al. 2005).

Más recientemente Colás. E y col. han descrito como ETV5 tiene un papel principal en el proceso de EMT, modulando la represión de E-caherina a través de la regulación de ZEB1, lo que conlleva una completa reorganización de los contactos célula-célula y célula-sustrato. Además, identificaron a la proteína LPP como sensor de las señales extracelulares durante la promoción de la invasión (Colas et al. 2012).

Estos datos ponen de manifiesto un papel crucial de ETV5 durante el proceso de EMT e invasión en el CE y la necesidad de identificar los genes regulados por este factor de transcripción, siendo el punto de partida de esta tesis doctoral.

4.2 FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO

El factor BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) es una neurotrofina miembro de la familia del NGF (*nerve growth factor*). Tiene un papel esencial en el desarrollo, mantenimiento y plasticidad del sistema nervioso central y periférico (Chao et al. 2006). BDNF promueve la diferenciación de las células madre a neuronas, mejora el crecimiento de las neuritas y la sinaptogénesis, regula la morfología de axones y dendritas y puede prevenir la muerte celular programada o apoptosis. Se expresa en las neuronas del sistema nervioso en desarrollo y adulto de los mamíferos, en el que se produce en cantidades relativamente bajas, pero es altamente potente, provocando respuestas biológicas a concentraciones picomolares (Marosi & Mattson 2013). En las etapas tardías del desarrollo del sistema nervioso y en el adulto regula la transmisión y plasticidad sináptica, actuando como un modulador central del dolor y durante el aprendizaje y la memoria. Se ha visto que la señalización de BDNF es crítica en determinadas enfermedades neurodegenerativas (Pruunsild et al. 2007).

En el sistema nervioso adulto los niveles más altos de mRNA y proteína están en las neuronas del hipocampo, hipotálamo y corteza cerebral. Fuera del sistema nervioso central también se ha detectado en células del músculo esquelético, timo, hígado, bazo, corazón, pulmones y adiposas (Pruunsild et al. 2007). Se ha descrito un papel para BDNF durante la implantación del blastocisto y posterior desarrollo de la placenta (Kawamura et al. 2009).

El gen *BDNF* (cromosoma 11p13) contiene múltiples exones 5' no codificantes y un exón 3' codificante (exón IX), que da lugar a la pre-proteína BDNF (Pruunsild et al. 2007). Se ha descrito la presencia de hasta 11 exones diferentes, como se refleja en la figura 17. Estos promotores 5' alternativos permiten la sobrerregulación de BDNF durante diferentes periodos del desarrollo bajo distintas demandas del ambiente y pueden permitir la expresión en un tejido específico (Wong et al, 2009).

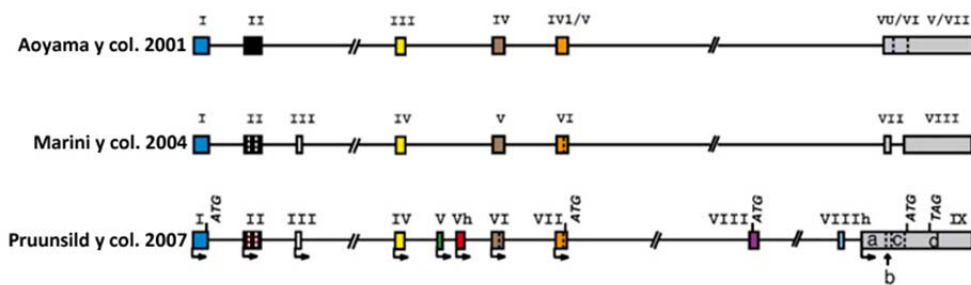


Figura 17. Estructuras del gen *BDNF* propuestas por diferentes estudios. Las estructuras presentadas de acuerdo a Aoyama y col. (Aoyama et al. 2001), Marini y col. (Marini et al. 2004) y Pruunsild y col. Los exones se muestran como cajas y los intrones como líneas. Modificado de (Pruunsild et al. 2007).

BDNF comparte aproximadamente un 50% de aminoácidos con los otros miembros de la familia (NGF, NT-3 y NT-4/5). Las neurotrofinas ejercen su actividad biológica en estado homodimérico y cada secuencia monomérica se compone de tres pares de hojas- β antiparalelas conectadas a cuatro bucles (Figura 18). Los aminoácidos de las hojas- β están muy conservados, sin embargo las regiones N- y C-terminal y los bucles 1-4 son variables y desempeñan un papel funcional en la unión del ligando y en la activación del receptor (Géral et al. 2013).

BDNF se produce, inicialmente, como pro-neurotrofina (proBDNF; P.M \sim 30 KDa) y es cortado por proteasas intracelulares como la furina y proconvertasas, o por proteasas extracelulares como la plasmina, MMP-3 y MMP-7, generando la neurotrofina madura (mBDNF; P.M \sim 14KDa) (Pang et al. 2004; Chao & Bothwell 2002). Se secreta como una mezcla de proBDNF y mBDNF.

Todas las neurotrofinas son capaces de unirse al receptor común de neurotrofinas $p75^{NTR}$, y cada una se une también a un receptor Trk (*tropomyosin related kinase*) específico: NGF se une a TrkA, BDNF y NT-4/5 a TrkB, y NT-3 a TrkC. Los receptores Trk están formados por la región 5' del gen de la tropomiosina fusionado con un dominio tirosina quinasa desconocido. El receptor TrkB tiene tres variantes, el receptor tirosina quinasa catalítico p145kd (TrkB.FL), y otros dos receptores que pierden el

dominio tirosina quinasa (TrkB.T1 y TrkB.T2). Bajo determinadas condiciones celulares estas dos últimas variantes pueden funcionar como dominantes negativos atenuando los efectos de TrkB.FL (Thiele et al. 2009).

La unión de BDNF a TrkB conlleva la activación del dominio tirosina quinasa, la autofosforilación de las tirosinas de su dominio catalítico y finalmente la activación de las principales vías reguladas por factores de crecimiento, la vía Ras/MAPK, la vía PI3K/PDK1/AKT y la vía de la fosfolipasa C- γ (PLC- γ) (Reichardt 2006).

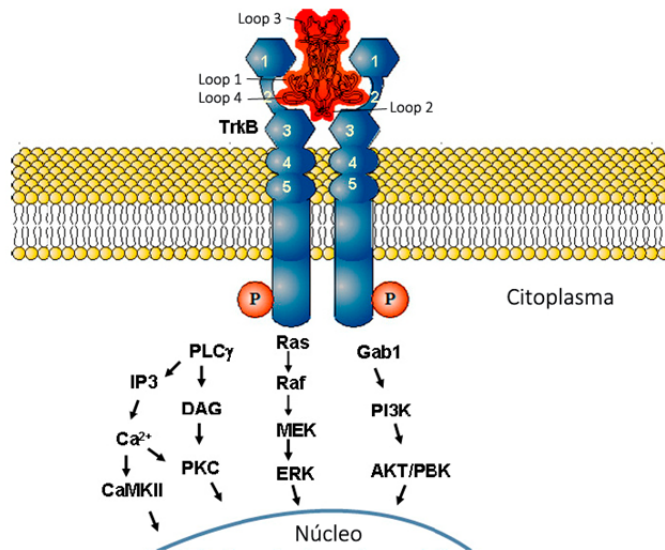



Figura 18. Representación esquemática de la transducción de señales mediada por TrkB tras la unión de BDNF. La unión de la neurotrofina al receptor TrkB controla tres vías principales de señalización intracelular. La fosforilación del receptor y la activación de Ras resultan en la activación de la cascada de señalización de MAPK, que promueve la diferenciación neuronal, incluyendo el crecimiento de neuritas y neurogénesis. La activación de la vía PI3K/AKT, a través de Gab1, promueve la supervivencia y proliferación de las neuronas y otras células. La activación de PLC- γ resulta en la activación de las vías reguladas por Ca^{2+} y por la proteína quinasa-C (PKC) que promueven la plasticidad sináptica y la neurotransmisión. Cada una de estas vías de señalización también regula la transcripción de genes (CREB, proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP) (Géral et al. 2013).

La unión de BDNF a su receptor desencadena un gran espectro de funciones celulares que podrían ser utilizadas por las células tumorales para sobrevivir al tratamiento citotóxico o para metastatizar.

Se ha descrito que la vía TrkB/BDNF juega un papel importante en la proliferación, diferenciación, invasión, angiogénesis, respuesta a quimioterapia y resistencia a anoikis (Douma et al. 2004). Además, la hipoxia induce un incremento en la expresión de receptores TrkB lo que puede contribuir a la activación autocrina de las señales de supervivencia (Thiele et al. 2009).

Tanto BDNF como TrkB están sobreexpresados en diferentes tumores sólidos malignos. En pacientes con neuroblastoma los tumores que expresan mayores niveles de TrkB y BDNF tienen peor pronóstico (Nakagawara et al. 1994). No sólo se ha descrito su expresión en células de neuroblastoma, sino también en células tumorales de ovario (Yu et al. 2008), mama (Vanhecke et al. 2011), pulmón (Zhang et al. 2010), páncreas (Sclabas et al. 2005), próstata (Festuccia et al. 2007), colon (Yang et al. 2013), y mieloma (Sun et al. 2010), así como en carcinomas de cabeza y cuello (Kupferman et al. 2010), hepatocelulares (Guo et al. 2011) y gástricos (Okugawa et al. 2013).

En cuanto al endometrio, se ha descrito un incremento en la síntesis de las cinco neurotrofinas de la familia, especialmente BDNF y NGF, en biopsias de pacientes con endometriosis, en comparación con muestras de mujeres control (Browne et al. 2012). Bao W. y col. describieron un aumento en la expresión tanto de BDNF como de su receptor en el CE en comparación con un endometrio normal.



5. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES (CTC)

Durante la tumorigénesis una subpoblación de células tumorales localizadas en el tumor primario puede adquirir características de invasividad y motilidad que les permiten entrar en los vasos sanguíneos o linfáticos (intravasación). El mecanismo de intravasación está fuertemente influenciado por las características estructurales de los vasos sanguíneos asociados al tumor. A través de una variedad de mecanismos, muchos de los cuales convergen en las acciones de VEGF, las células tumorales estimulan la formación de nuevos vasos en su microambiente local a través del proceso denominado neoangiogénesis. A diferencia de los vasos sanguíneos presentes en los tejidos normales, la neovasculatura generada por el carcinoma es tortuosa y en un estado de continua reconfiguración. Las interacciones débiles entre células endoteliales adyacentes que forman esta microvasculatura y la ausencia de una extensa cobertura de pericitos facilitan la intravasación (Carmeliet & Jain 2011).

Una vez en circulación a estas células se las conoce como Células Tumorales Circulantes (CTC). Tienen que ser capaces de sobrevivir en circulación, evitando el fenómeno de anoikis así como el daño causado por las fuerzas hemodinámicas y por las células del sistema inmune. Posteriormente sufren un proceso de arresto en un lugar a distancia debido a restricciones en el tamaño de los capilares o incluso debido a un fenómeno activo de interacción ligando-receptor (Valastyan & Weinberg 2011). Tras la extravasación de la circulación, las CTC pueden establecer un tumor secundario en un órgano a distancia (Chambers et al. 2002).

La detección de las CTC podría ser un protocolo complementario a los procedimientos de imagen rutinarios que mejorara la identificación de los pacientes con elevado riesgo de sufrir metástasis. Sin embargo, supone un gran desafío, al encontrarse en una concentración muy baja entre millones de células sanguíneas, por lo que es necesario llevar a cabo un protocolo de enriquecimiento.

5.1 TÉCNICAS DE ENRIQUECIMIENTO Y DETECCIÓN DE CTC

Las técnicas de aislamiento/enriquecimiento se pueden dividir en dos grupos: métodos físicos y biológicos. El aislamiento mediante métodos físicos se basa en características físicas de las CTC, como tamaño, densidad, carga eléctrica o capacidad migratoria. Estos métodos incluyen el gradiente de centrifugación, filtración y dielectroforesis. Se ha descrito que las CTC de origen epitelial presentan mayor tamaño que las células sanguíneas (Zheng et al. 2007), sin embargo, las variaciones en el tamaño celular entre pacientes y tipos tumorales requieren el desarrollo de nuevas aproximaciones.

Los métodos biológicos se basan en la inmunocaptura mediante anticuerpos. Suelen centrarse en la selección positiva con anticuerpos anti-EpCAM (*epitelial cell adhesion molecule*), citoqueratinas (CK), así como selección negativa con anticuerpos frente al antígeno de leucocitos CD45. Entre las técnicas basadas en anticuerpos, el sistema CellSearch (Veridex LCC) es el más empleado. Combina inmunoenriquecimiento basado en EpCAM e inmunofluorescencia (marcaje positivo para CK8, 18 y 19 y negativo para CD45) estando aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para su uso en la monitorización de los cánceres metastásicos de mama, próstata y colon. Todavía está bajo debate la determinación del *threshold* del número de células que debe usarse para establecer si un paciente está libre de enfermedad o la supervivencia global. La mayoría de grupos de investigación aplica un cut-off de 5 CTC, como estableció Cristofanilli y col. en pacientes con cáncer de mama metastásico (Cristofanilli et al. 2004).

Sin embargo, debido a que durante el proceso de diseminación tumoral puede tener lugar el proceso de EMT, que va acompañado de un descenso en los niveles de EpCAM, las nuevas técnicas tratan de capturar también estas CTC que presentan un fenotipo mesenquimal (Bednarz-Knoll et al. 2011).

Tras el proceso de enriquecimiento existen diferentes metodologías que conducen a investigar los perfiles genéticos y biológicos de las CTC aisladas. Las aproximaciones basadas en PCR y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-q-PCR) emplean la detección de alteraciones genéticas y epigenéticas específicamente asociadas a la célula cancerígena. También puede utilizarse en la detección de secuencias de mRNA (Pantel & Brakenhoff 2004). Los métodos más actuales incluyen tecnología basada en el escaneo de arrays de fibra óptica con alto rendimiento en la detección de CTC (Hsieh et al. 2006).

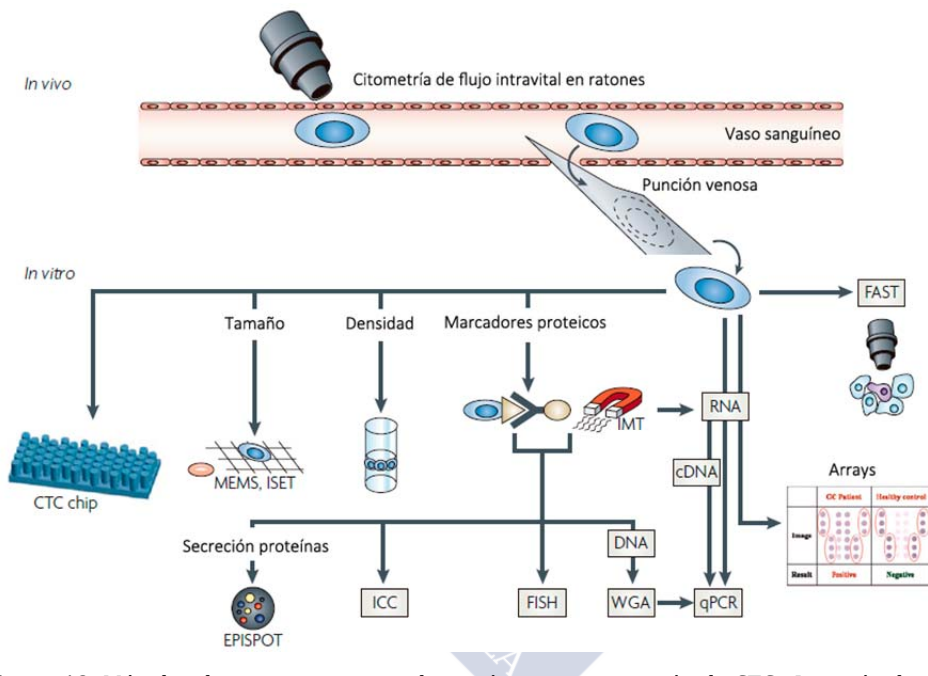


Figura 19. Métodos de enriquecimiento, detección y caracterización de CTC. Los métodos de enriquecimiento se basan en el tamaño celular (microfiltros de membrana (sistemas micro-electro-mecánicos (MEMS); aislamiento de células tumorales epiteliales por tamaño (ISET)), densidad celular, expresión de marcadores proteicos o mutación de ácidos nucleicos. Con mayor frecuencia se aplican técnicas con partículas inmunomagnéticas (IMT) utilizando anticuerpos específicos frente a proteínas de superficie (EpCAM). Las células enriquecidas se caracterizan por inmunocitoquímica (ICC), EPISPOT, hibridación *in situ* fluorescente (FISH) o RT-q-PCR. Para la cuantificación exacta de la dosis génica en una sola célula se puede introducir una amplificación de genoma completo (WGA). Tras la transcripción reversa del RNA, se pueden aplicar métodos de detección basados en arrays de cDNA. Omitiendo la separación basada en EpCAM, la microscopía digital automatizada de ultra-velocidad se ha utilizado para detectar CTC marcadas con anticuerpos fluorescentes. *In vivo* el problema de detección de CTC ya ha sido abordado en ratones mediante citometría de flujo intravital (Pantel et al. 2008).

La detección temprana de las CTC puede ayudar a predecir qué pacientes necesitan una terapia adicional tras la resección quirúrgica del tumor primario o la determinación de la respuesta a terapia. Además la caracterización molecular y funcional de estas células es esencial para el desarrollo y la selección de terapias más efectivas.

5.2 EMT Y CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

La forma de diseminación pasiva de un tumor podría tener lugar a través del crecimiento expansivo que resulta en la infiltración de las células tumorales en la vasculatura. Estas células deberían retener el fenotipo epitelial y por tanto en las CTC aparecerían los marcadores E-cadherina, EpCAM o CK. Alternativamente, las células tumorales podrían transformarse en más agresivas, bajo la acción de determinados estímulos externos o modificaciones internas (Polyak & Weinberg 2009), migrar e intravasarse como células individuales o en grupo. En este caso, esta subpoblación celular llevaría a cabo el proceso de EMT y presentaría marcadores mesenquimales (Bednarz-Knoll et al. 2012).

Diferentes autores han descrito la expresión de marcadores de EMT en CTC (Figura 20) en combinación con marcadores epiteliales, lo que sugiere un fenotipo semi-mesenquimal en esta población celular (Bonnomet et al. 2010).

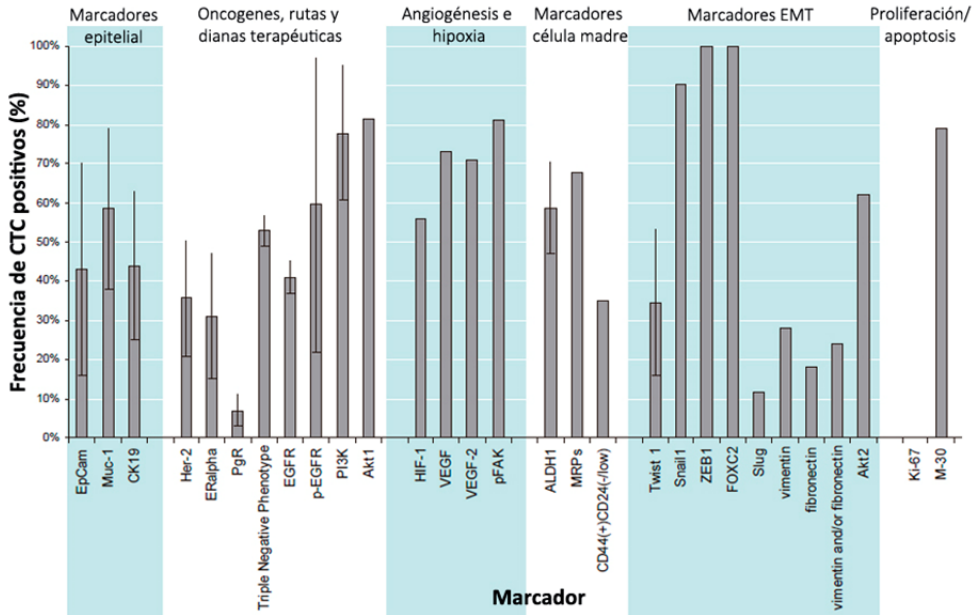


Figura 20. Frecuencia de marcadores moleculares expresados en CTC de pacientes con cáncer de mama. Las frecuencias que se muestran se basan en datos de la literatura y se refieren a la frecuencia notificada (porcentaje del número total de CTC detectadas en un artículo particular) de CTC positivas para el marcador descrito. Para los marcadores en los que hay más de un artículo se presentan como la media del valor y la desviación estándar de los datos disponibles en la literatura. Modificado de (Bednarz-Knoll et al. 2012).

Estudios previos en CTC de pacientes con CE se basan en el análisis de la expresión de CK19, mediante inmunohistoquímica en aspirados de médula ósea (Fehm et al. 2006), y CK20 mediante RT-q-PCR en sangre periférica y ganglios linfáticos (Altaras et al. 2002; Ji et al. 2006). Además, Obermayr E. y col. describieron un panel de expresión de 6 genes en CTC de mujeres con CE (Obermayr et al. 2010).

La caracterización del perfil molecular de las CTC de pacientes con carcinoma endometrial será el segundo punto desarrollado en esta tesis.

5.3 EMT: ADQUISICIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE CÉLULA MADRE

Las células madre adultas o somáticas (SSC) se definen como células que son capaces de auto-renovarse, diferenciarse en distintos tipos celulares y ser capaces de responder al control homeostático. Permiten el

mantenimiento, regeneración y crecimiento de los tejidos adultos (Lobo et al. 2007; Du & Taylor 2010).

El tejido endometrial es, probablemente, el que sufre mayores cambios proliferativos y de remodelado en los mamíferos adultos, renovándose completamente cada mes. Se ha descrito que las células madre adultas endometriales residen en la capa basal y sirven como fuente celular para regenerar el endometrio en respuesta a la hipoxia, estímulos proteolíticos e inflamatorios asociados a la menstruación, aborto involuntario, trauma o el parto (Du & Taylor 2010; Cervelló et al. 2011; Gargett & Ye 2012).

Por otro lado, las células madre tumorales (CSC) aunque se auto-renuevan, generan una progenie que se diferencia aberrantemente y que no es capaz de responder al control homeostático. Hoy en día se han propuesto dos modelos de carcinogénesis. El modelo clásico o estocástico, mediante el cual cualquier célula puede transformarse en tumoral cuando se da la combinación oportuna de mutaciones. Por otro lado, la teoría de las CSC asume que sólo unas pocas células del tumor tienen la habilidad de iniciar y mantener el crecimiento tumoral (Visvader & Lindeman 2008).

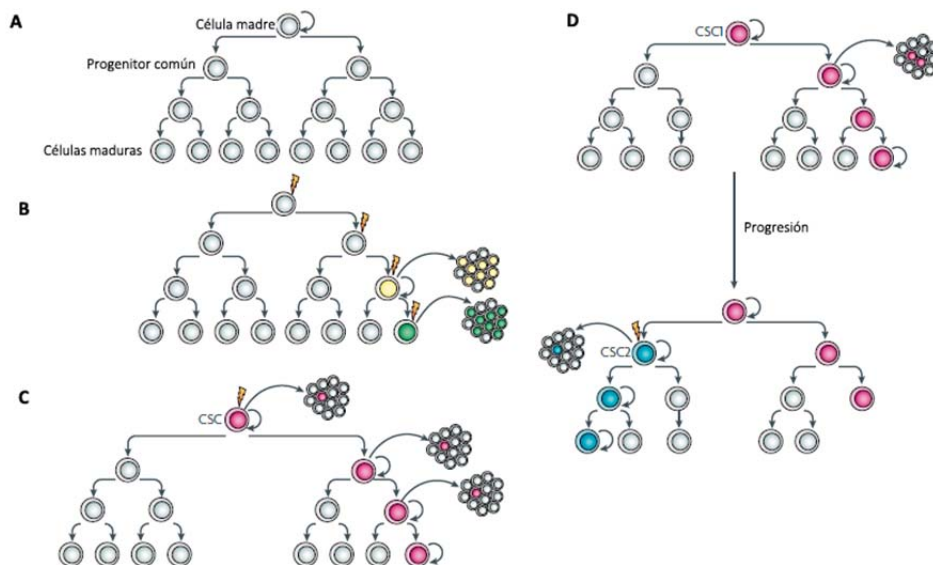


Figura 21. Dos modelos de propagación y heterogeneidad tumoral. **A**, Una jerarquía celular normal que comprende células madre que generan progresivamente células progenitoras comunes y más restringidas, dando lugar, en última instancia, a los tipos celulares maduros que comprenden un tejido particular. **B**, En el modelo de evolución clonal todas las células indiferenciadas tienen similar capacidad tumorigénica. **C**, En el modelo de CSC, solo la CSC puede generar un tumor, gracias a sus propiedades de auto-renovación y potencial proliferativo. **D**, Ambos modelos de mantenimiento del tumor pueden ser la base de la tumorigénesis. Inicialmente, el crecimiento del tumor será impulsado por una CSC específica (CSC1). Con la progresión del tumor, otra CSC distinta (CSC2) puede surgir debido a la evolución clonal de CSC1. Esto puede ser el resultado de la adquisición de una mutación adicional o de una modificación epigenética. La CSC2 será más agresiva e impulsa la formación del tumor (Visvader & Lindeman 2008).

Hasta la fecha no se ha descrito un fenotipo de marcadores de superficie diferente para las SSC y las CSC. Algunos marcadores como CD133/1 (PROM1), CD44, CD24 y THY1 son comunes en distintos tumores sólidos y se han utilizado para aislar CSC (Visvader & Lindeman 2008; Hubbard & Gargett 2010). En el caso de las CSC endometriales, **CD133** fue el primer marcador utilizado para su aislamiento. Tanto las fracciones celulares CD133⁺ como CD133⁻ crecen en cultivo como célula única, aunque las primeras con una mayor tasa de proliferación (Rutella et al. 2009). Se trata de una glicoproteína de membrana con una posible implicación en la organización de la membrana plasmática, propuesta para la identificación de CSC en cáncer de próstata, ovario y colon (Mizrak et al. 2008). Además, existen otros candidatos interesantes como CD44 o ALDH1.

CD44 es una molécula de adhesión con múltiples funciones biológicas, inicialmente implicada en el proceso de invasión y metástasis y que se expresa en poblaciones enriquecidas en CSC en cáncer de mama, próstata, ovario y colon (Hubbard & Gargett 2010). La familia de enzimas **ALDH** (*aldehyde dehydrogenase*) catalizan la oxidación de aldehídos alifáticos y aromáticos en ácidos carboxílicos. ALDH1 participa en la conversión del retinol a ácido retinoico, importante en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Ha sido detectada en una pequeña población de células tumorales endometriales menos maduras, más tumorigénicas e invasivas y resistentes a terapias. Clínicamente, niveles elevados de ALDH1 se han

relacionado con invasión linfática, recurrencia y peor pronóstico en pacientes con CE (Hill & Dizon 2012).

Estudios recientes sugieren que las células que sufren EMT adquieren propiedades de células madre (Mani et al. 2008). Ambos tipos celulares podrían compartir un fenotipo mesenquimal que incrementa su habilidad para preservar las capacidades migratorias y de respuesta a estímulos y aumentar la resistencia a terapias. Como se ha comentado anteriormente, las citocinas miembros de la familia del TGF β son uno de los inductores de EMT más importantes y mejor caracterizados. Algunos autores describen un papel para TGF β en la regulación del fenotipo celular stem en cáncer de mama y en el mantenimiento de la pluripotencia en células madre embrionarias humanas (James et al. 2005).

Como se observa en la figura 20, también se ha descrito la expresión del posible marcador de células madre ALDH1 o el fenotipo CD44⁺/CD24^{bajo}/- en las CTC de pacientes con cáncer de mama (Aktas et al. 2009; Theodoropoulos et al. 2010). Teniendo en cuenta que se ha observado la expresión de genes de resistencia a fármacos (proteínas de resistencia a múltiples fármacos, MRP) en las CTC (Aktas et al. 2009), es esperable que estas células presenten, al igual que las células madre, una mayor resistencia a terapia.

6. ANEXINA A2

Las anexinas son una familia de proteínas de unión a fosfolípidos de membrana reguladas por calcio (Ca^{2+}). Presentan dos dominios estructurales, el dominio principal contiene cuatro α -hélices, una masa de 30 a 35 KDa, un calcio y forma una estructura convexa de unión a los fosfolípidos. La cola amino-terminal, más hidrofílica, es única de cada miembro de la familia, contiene lugares de modificación post-traduccional y permite la unión a diferentes proteínas (Figura 22). Presentan una gran variedad de funciones biológicas, incluyendo el tráfico de vesículas, división celular, apoptosis, señalización mediada por calcio y regulación del crecimiento celular (Luo & Hajjar 2013).

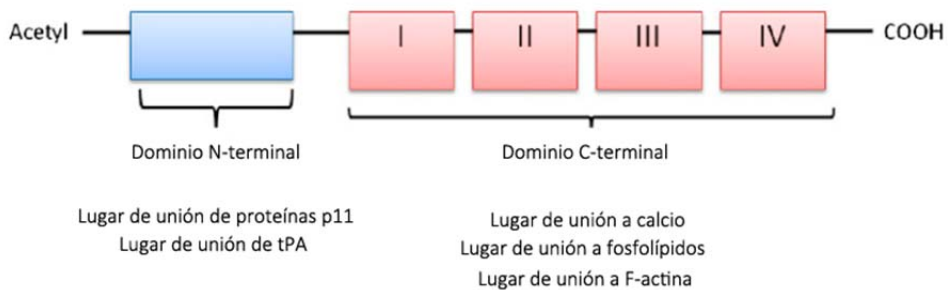


Figura 22. Estructura de la Anexina A2. El dominio N-terminal consiste en los sitios de unión a p11 y tPA. El dominio C-terminal está compuesto por cuatro dominios repetidos, cada uno con la secuencia consenso de ANXA2 y los sitios de unión para calcio, fosfolípidos y F-actina (Lokman et al. 2011).

Se han identificado 12 anexinas, anexinas A1 a A11 y la anexina A13. De todas ellas, la anexina A2 (ANXA2 o A2) es la más estudiada. El gen *ANXA2* (15q21) está compuesto por 13 exones distribuidos en 40 kb de DNA. La proteína ANXA2 tiene una masa de 36 KDa y es producida por células endoteliales, monocitos, macrófagos, células dendríticas, trofoblastos, células epiteliales, células tumorales y muchas otras (Luo & Hajjar 2013). Puede existir como monómero libre en el citoplasma, en asociación con membranas intracelulares o expuesta en la cara externa de la membrana plasmática (Gerke & Moss 2002), formando un tetrámero con la proteína S100A10 (comúnmente conocida como p11; $(\text{A2}\cdot\text{p11})_2$). ANXA2 se expresa en la

superficie de las células endoteliales y la formación del complejo $(A2 \cdot p11)_2$ sirve de sitio de anclaje para el plasminógeno (Plg) y el activador tisular del plasminógeno (tPA) (Figura 23). La ruptura del plasminógeno da lugar a la proteasa fibrinolítica plasmina (PN), importante en la regulación de la homeostasis celular (Cesarman-Maus & Hajjar 2005).

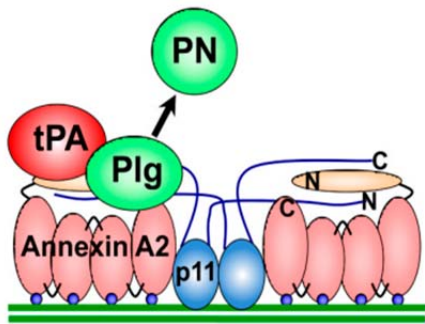


Figura 23. Sistema de ensamblaje de ANXA2 en la superficie de la célula endotelial. El heterotetrámero está compuesto por dos subunidades p11 y dos subunidades ANXA2. ANXA2 consiste en cuatro dominios principales (rosa) y un dominio de "cola" N-terminal (naranja). El heterotetrámero une tanto plasminógeno (Plg) como el activador de plasminógeno tisular (tPA) acelerando la formación de plasmina (PN) (Flood & Hajjar 2011).

ANXA2 está implicada en gran variedad de eventos relacionados con el tráfico de membrana como la biogénesis de los cuerpos multivesiculares o de los exosomas, regula eventos de fusión de membrana y reclutamiento de proteínas especializadas y participa en la reparación de las membranas (Luo & Hajjar 2013).

La expresión de ANXA2 se ha relacionado con la aparición, invasión y metástasis de tumores malignos (Lokman et al. 2011; Zhang et al. 2012). Se ha descrito su implicación en la migración celular a través de la regulación del citoesqueleto de actina (Hansen et al. 2002). Sirve de proteína de unión a las proteasas catepsina B y a las proteínas de matriz extracelular (colágeno tipo 1 y tenascina C) (Matsuda et al. 1999). El mecanismo propuesto para la promoción de la invasión tumoral mediada por Plg consiste en la activación de la formación de PN que activa MMPs que degradan la matriz extracelular (Lokman et al. 2011).

En el caso del CE, se ha descrito una sobreexpresión de esta proteína en el CE estadio I en comparación con el endometrio normal (Maxwell et al.

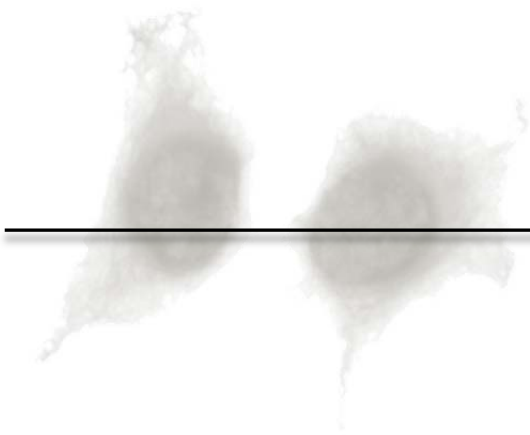
2011) así como una relación con marcadores de EMT en pacientes con adenomiosis severa (Zhou et al. 2012). Además, la inhibición de ANXA2 disminuye significativamente la adhesividad del embrión, estando implicada en la migración de las células epiteliales endometriales (Garrido-Gómez et al. 2012).







OBJETIVOS





OBJETIVOS

El cáncer de endometrio es el más frecuente de los tumores invasivos del tracto genital femenino. Normalmente se diagnostica en estadios tempranos, cuando la enfermedad está confinada en el útero, por lo que suele presentar un buen pronóstico. Sin embargo, en torno a un 20% de las pacientes presenta enfermedad avanzada al diagnóstico o sufrirá una recurrencia, lo que va asociado a un descenso en la supervivencia. Esto hace de las células del tumor primario, con capacidad de invadir y colonizar localmente o a distancia, y de las células tumorales circulantes (CTC), fuente potencial de recurrencias, las dianas para poder controlar la aparición y desarrollo de metástasis.

El conocimiento del proceso de metástasis en el carcinoma endometrial (CE) y el desarrollo de modelos de estudio *in vitro/in vivo* apropiados serán la base para la identificación y validación de nuevas estrategias terapéuticas que permitan controlar su progresión y transformarlo en una enfermedad crónica. Por ello en esta tesis nos hemos planteado los objetivos que se detallan a continuación.

7. OBJETIVOS PRINCIPALES

7.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES REGULADOS POR EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ETV5 EN EL FRENTE DE INVASIÓN DE LOS CARCINOMAS ENDOMETRIALES

7.1.1 Análisis de expresión del factor de transcripción ETV5 e identificación, mediante ChIP-on-Chip y tratamiento bioinformático, del programa transcripcional específico de ETV5 en el frente de invasión de los carcinomas endometriales.

7.1.2 Validación *in vitro* de *BDNF* mediante RNA de interferencia y determinación de su papel en la plasticidad asociada a la invasión.

7.1.3 Validación *in vivo* de *BDNF* como potencial diana en el bloqueo de la invasión.

7.2 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CTC DE PACIENTES CON CARCINOMA ENDOMETRIAL DE ALTO RIESGO

7.2.1 Comprobación de la presencia de CTC en pacientes con CE de alto riesgo mediante técnicas de inmunoaislamiento seguidas de RT-q-PCR y mediante la tecnología CellSearch (Veridex).

7.2.2 Determinación de la expresión de un panel de genes relacionados con: vías de señalización asociadas a la progresión del CE, proceso de EMT, características de células madre y vías hormonales en las CTC aisladas de pacientes con CE de alto riesgo.

7.2.3 Determinación *in vivo* del impacto que el perfil de EMT tiene en las CTC, reproducido con la sobreexpresión de ETV5.

7.3 BÚSQUEDA DE MARCADORES CON VALOR PREDICTIVO DE RECURRENCIA EN PACIENTES CON CARCINOMA ENDOMETRIAL

7.3.1 Búsqueda de marcadores de recurrencia mediante análisis proteómico 2D-DIGE en muestras de tumor primario y recurrencias tumorales.

7.3.2 Validación de ANXA2 mediante RNA de interferencia y modelos animales de diseminación tumoral.

7.3.3 Validación de ANXA2 como marcador predictor de recurrencia.



MATERIALES Y MÉTODOS



8. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se presentan en tres bloques los materiales empleados y los métodos llevados a cabo en el desarrollo de esta tesis de acuerdo con los objetivos planteados.

8.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES REGULADOS POR EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ETV5 EN EL FRENTE DE INVASIÓN DE LOS CARCINOMAS ENDOMETRIALES

8.1.1 PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

En este estudio se incluyeron 13 pacientes diagnosticadas de un CEE sometidas a cirugía (histerectomía) en el Departamento de Ginecología Oncológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Barcelona, España). Ninguna de ellas recibió tratamiento hormonal ni radio o quimioterapia previos a la cirugía y se obtuvo un consentimiento informado de todas las participantes. El estadiage tumoral se llevó a cabo de acuerdo con la clasificación de la FIGO, correspondiendo las muestras seleccionadas a un estadio tumoral IB (infiltración >50% del miometrio). Los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético correspondiente.

Tras la cirugía se recogió la muestra de tejido tumoral. Una parte de la misma fue rápidamente congelada en nitrógeno líquido y mantenida a -80°C. Para su utilización el/la patólogo/a separó mediante macrodissección las secciones de tejido correspondientes a la zona superficial y al frente de invasión tumoral de los CEE estadio IB.

8.1.2 LÍNEAS CELULARES

8.1.2.1 Cultivo de células tumorales humanas de cáncer de endometrio

Los experimentos *in vitro* que aparecen en esta tesis se llevaron a cabo con dos líneas celulares de CE:

Tabla 8. Líneas celulares de CE empleadas.

Línea celular	Procedencia	Origen	Morfología
Hec1A	ATCC (HTB-112)	Adenocarcinoma de endometrio	Epitelial
Ishikawa	HPA Culture Collections	Adenocarcinoma de endometrio	Epitelial

Estas líneas fueron mantenidas a 37°C en atmósfera húmeda con el 5% de CO₂. Las células Hec1A se cultivaron en medio McCoy's 5A (Gibco, Grand Island, NY, USA) y las células Ishikawa en medio DMEM F-12 (1:1) (Lonza, Verviers, Belgium). Ambos medios se suplementaron con un 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco, South America) y un 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY, USA).

8.1.2.2 Cultivo de la línea celular HEK293T

La línea celular humana de riñón embrionario se utilizó por ser un buen modelo para transfectar y obtener partículas lentivirales. Se mantuvo a 37°C en atmósfera húmeda con el 5% de CO₂ en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle médium; Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado con un 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomicina.

8.1.2.3 Producción de partículas lentivirales

Con el objetivo de modificar las líneas celulares Hec1A e Ishikawa se generaron partículas lentivirales en la línea HEK293T. Para ello se utilizó polietilenamina (PEI, Sigma), un lípido catiónico que condensa el DNA plasmídico, neutralizando las cargas negativas y facilitando la entrada a través de la membrana celular cargada negativamente.

La transfección se llevó a cabo en 3 placas p100 sembradas el día anterior con 3.10⁶ células HEK293T. Una hora antes de la transfección se cambió el medio de cultivo para que no tuviera suero ni antibióticos. Por un lado se hizo una dilución que contenía 30 µg de DNA correspondiente a los tres vectores plasmídicos (psPAX2, PMD2G y plásmido interés) en proporción 1:1:1 (Tabla 9) en 0.5ml de una solución salina estéril (NaCl 150 µM). Por otro lado se mezclaron 0.1ml de PEI (10 µM) con 0.5 ml de la solución salina

estéril (NaCl 150 μ M) y se añadieron sobre la solución de DNA, se mezcló y se incubó durante 20min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente la mezcla se añadió sobre la placa de cultivo que contenía las células HEK293T y se incubó durante 4 h. Pasado este tiempo se cambió el medio por DMEM completo y al cabo de 24 h se recogió el medio que contenía las partículas virales, se centrifugó (2000 rpm, 5 min), filtró y concentró en una columna VIVASPIN 20 (Sartoriusstedim biotech) en una centrífuga (4000 rpm, 2 h).

Los sobrenadantes lentivirales se utilizaron para la infección de las líneas celulares en presencia de Polybrene (Hexadimethrinebromide; Sigma) a una concentración final de 8 μ g/ml. Las células epiteliales se dejaron en contacto con el virus durante 16-18 h y posteriormente se reemplazó el medio de cultivo por el medio correspondiente más el antibiótico de selección a la concentración indicada en la tabla 9. La eficacia de la infección fue testada mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa a tiempo real (RT-q-PCR) y western blot (WB).

La línea celular Hec1A modificada para la sobreexpresión de ETV5 (H-ETV5) fue previamente generada y caracterizada por Monge M. y col. y amablemente donada (Monge et al. 2007; Colas et al. 2012). Se mantuvo en selección con Geneticina (500 μ g/ml; Gibco, Grand Island, NY, USA).

8.1.2.4 Partículas lentivirales para inhibir la expresión de proteínas

Con el objetivo de bloquear la expresión de BDNF en las líneas celulares Hec1A y H-ETV5 se utilizaron partículas lentivirales que contienen constructos comerciales (Mission Lentiviral Transduction Particles, Sigma, St. Louis, MO, USA), de forma que el gen es representado por múltiples vectores dirigidos frente a diferentes regiones de la secuencia génica. Se probaron 5 shRNAs diferentes (Tabla 10), siguiendo las instrucciones del fabricante y empleando una multiplicidad de infección (MOI) de 10. Además se utilizaron partículas comerciales que contenían el shRNA frente a una secuencia no presente en mamíferos (shCtrl; Mission Non-Mammalian shRNA Control

Transduction Particles, Sigma) como control. Las líneas se seleccionaron en presencia de puromicina (1µg/ml).

La eficacia de la infección fue testada mediante RT-q-PCR y WB.

Todas las líneas fueron además infectadas con partículas virales que contenían el plásmido para la expresión estable de luciferasa (Tabla 9) como se indicó en el apartado 9.1.2.3, y en esta tesis las denominamos:

Tabla 11. Líneas celulares modificadas empleadas.

Línea celular	Modificación
H-luc-shCtrl	Hec1A + luciferasa + plásmido shCtrl
H-ETV5-luc-shCtrl	Hec1A+sobreexpresión de ETV5 + luciferasa + plásmido shCtrl
H-ETV5-luc-shBDNF	Hec1A + sobreexpresión de ETV5 + luciferasa + shRNA BDNF
IK-pLKO	Ishikawa + plásmido pLKO
IK-ETV5	Ishikawa + sobreexpresión de ETV5
IK-ETV5-shBDNF	Ishikawa + sobreexpresión de ETV5 + shRNA BDNF

8.1.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

8.1.3.1 Extracción de RNA total de tejidos

Las muestras seleccionadas para este estudio consistían en 1-5 mg de tejido tumoral mantenido a -80°C. La extracción del RNA se realizó empleando el kit de extracción *MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones de fabricante.

8.1.3.2 Extracción de RNA total de líneas celulares

El RNA total de las líneas celulares se extrajo utilizando el kit *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Previamente las células se lavaron en PBS y se recogieron de la placa de cultivo con ayuda de un scrapper.

8.1.3.3 Análisis de la concentración e integridad del RNA

La concentración y pureza del RNA obtenido se determinaron por medición de la absorbancia a 260 nm y 280 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, DE, USA). La concentración de RNA puede determinarse mediante la ley de Lambert-Beer, que predice un cambio lineal en la absorbancia con la concentración. El ratio A_{260}/A_{280} refleja la pureza del RNA, de forma que un ratio de 2 nos indica una pureza elevada, y si es apreciablemente menor nos indica contaminación con proteínas o fenol. Se utilizó como criterio un ratio superior a 1.9. Por otro lado, el ratio $260/230$ se utiliza como medida secundaria y su valor debe estar entre 2-2.2.

Para determinar la integridad del RNA se utilizó un analizador Bioanalyzer2100, *chips RNA Nano Chips* y reactivos del kit *Agilent RNA 6000 Nano Reagent* (Agilent Biotechnologies, Waldbrom, Germany). En una muestra de RNA no degradado podremos ver un primer pico que corresponde al marcador, seguido de dos picos muy aparentes que corresponden a las subunidades menor y mayor del RNA ribosómico (rRNA; 18S y 28S, respectivamente). El ratio entre el rRNA 28S y el 18S se aproxima a 2 cuando el RNA no presenta ningún tipo de degradación y disminuye a medida que el RNA se degrada. En nuestro caso se empleó como medida de integridad del RNA el RIN (Número de integridad del RNA), una herramienta diseñada específicamente para la estimación de la integridad del RNA. Valores de RIN en torno a 7 son estimados como aceptables, mientras que valores inferiores señalan degradación del RNA. Para nuestro estudio se estableció como valor mínimo de RIN 6.

8.1.3.4 Retrotranscripción

La retrotranscripción es el proceso mediante el cual el RNA mensajero (mRNA) se transforma en DNA complementario (cDNA) gracias a la acción de la enzima transcriptasa reversa. El cDNA obtenido es de doble cadena y más estable que el RNA molde. La retrotranscripción del RNA procedente de

muestras de tejido y líneas celulares se llevó a cabo a partir de 1µg de RNA utilizando el kit *Gene Amp RNA* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. El proceso se llevó a cabo en un termociclador bajo las siguientes condiciones: 42°C durante 45 min; 95°C durante 5 min y un paso final de 4°C. La muestra se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

8.1.3.5 PCR cuantitativa a tiempo real (RT-q-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real (RT-q-PCR) es una técnica que permite la detección y cuantificación de los productos generados durante cada ciclo del proceso de PCR. Para ello, se incorpora un oligonucleotido marcado fluorescentemente que hibrida con la secuencia del gen diana. Durante la PCR esta sonda se libera gracias a la actividad nucleasa 5' de la Taq polimerasa y permite la detección de la señal.

Se utilizó la RT-q-PCR para comprobar y cuantificar los niveles de expresión de diferentes genes dentro de este estudio. La amplificación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos en la plataforma *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a partir de 9 µl de cDNA diluido 1:4 en agua Nucelase-free, 1 µl de sonda y 10 µl de *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), con las siguientes condiciones: 50°C, 2 min; 95°C, 10 min; 40 ciclos (95°C, 15 seg; 60°C, 1 min).

Se utilizaron sondas prediseñadas *TaqMan Gene Expression Assay* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Tabla 12).

Los datos se analizaron con el software *StepOne v.2.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando la sonda para el gen que codifica la enzima Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) como “normalizador” interno con el que poder corregir las fluctuaciones debidas a las variaciones en concentraciones o volúmenes de muestra. Los resultados

se presentan como *fold change* en la expresión génica relativa a la expresión de *GAPDH* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

8.1.4 INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA SEGUIDO DE HIBRIDACIÓN DE MICROARRAY DE PROMOTORES GÉNICOS (CHIP-ON-CHIP)

La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) es una técnica que permite determinar si una proteína se une a una secuencia específica de DNA. Con el análisis ChIP-on-Chip el DNA inmunoprecipitado y purificado se hibrida a un microarray. Con el fin de identificar los genes regulados por el factor de transcripción ETV5 se realizaron ensayos de ChIP de la zona superficial y del frente de invasión (zona profunda) de carcinomas endometriales estadio IB y el DNA inmunoprecipitado se hibridó a microarrays de promotores génicos (Figura 24). Así mismo se utilizó el método de ChIP para validar esta regulación en las líneas celulares.

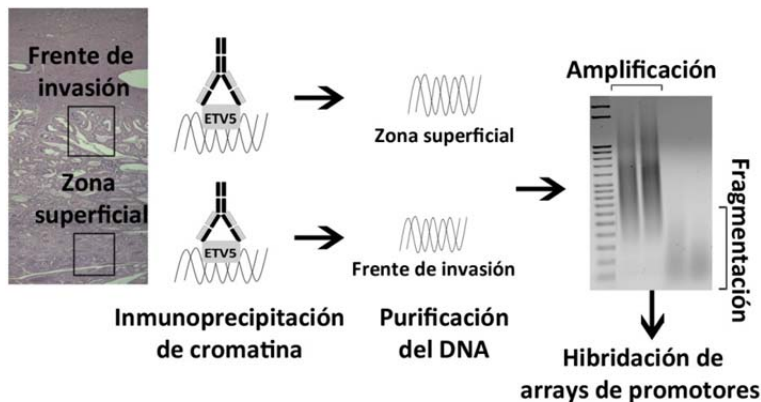


Figura 24. Representación esquemática del proceso experimental de ChIP-on-Chip.

8.1.4.1 Cross-linking y sonicado

El primer paso en el proceso de ChIP consistió en la fijación de forma covalente de las proteínas al DNA mediante el uso de formaldehído. Para ello se utilizaron alrededor de 30 mg de tejido tumoral que se cortaron en trozos de entre 1-3 mm³ e incubaron durante 15 min en una noria a TA con una solución de *cross-linking* [135 µl de formaldehído al 37%, 50 µl de *Protease*

Inhibitor Cocktail 100X (PIC; Sigma, St. Louis, MO, USA)] hasta un volumen de 5 ml en PBS. Se añadieron 500 μ l de glicina 1.25 M y se volvió a incubar durante 5 min en noria a TA.

Tras la incubación se centrifugó a 4°C, 1500 rpm, 5 min, se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet dos veces con 10 ml de PBS frío y PIC 1X. Llegado este punto todo el proceso se llevó a cabo en hielo. Se añadieron 100 μ l de PBS frío con PIC 1X y se homogeneizó con un homogeneizador de pistilo. Posteriormente se pasó la muestra por una aguja para disgregar completamente el tejido. A continuación se centrifugó a 4°C, 3000 rpm, 5 min, se retiró el sobrenadante y se incubó 15 min en hielo con 600 μ l de buffer de lisis (SDS 1%; EDTA 10 mM; Tris-HCl 50 mM; pH 8.1, PIC 1X).

A continuación es necesario fragmentar el DNA mediante sonicación, hasta obtener segmentos de 200-1000 pb que deben ser confirmados mediante electroforesis. Se probaron diferentes ciclos de sonicación (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 ciclos) con 40seg en sonicación y 20 seg de pausa en frío, para lo que se utilizó un sonicador *Branson Sonifier 150* (Biogen) (Figura 25). Finalmente se decidió que el número de ciclos óptimo era 15. Las muestras sonicadas se centrifugaron a 4°C y 14000 rpm durante 10 min y los sobrenadantes se transfirieron a un eppendorf nuevo, momento en el que se separó una alícuota de 5 μ l para someterlos a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%.

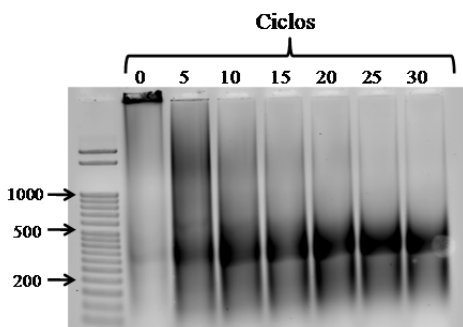


Figura 25. DNA con distintos ciclos de sonicación sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

8.1.4.2 Inmunoprecipitación

Durante el proceso de CHIP, cualquier secuencia de DNA unida covalentemente a las proteínas de interés será precipitada. En este proceso se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo anti-ETV5. Además se añadieron IgG inespecíficas como control negativo (10 µg de cada anticuerpo; Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) y se incubaron durante toda la noche a 4°C con bolas de agarosa conjugadas con Proteína G (*Protein G Agarose/Salmon Sperm DNA*; Millipore, California, USA).

Previamente, las bolas de agarosa se lavaron e incubaron con la muestra para evitar uniones inespecíficas. Para ello se añadieron 100 µl de buffer RIPA (Tris HCl 50mM, pH8; NaCl 150mM; NP-40 1%; DOC 0.5%; SDS 0.1%, PIC 1X, PMSF 1X). Se hicieron tres lavados centrifugando a 4°C y 2000g durante 1 minuto y descartando el sobrenadante cada vez. Posteriormente las bolas se incubaron con 600 µl de muestra sonicada, PIC 1X y PMSF 1X en una noria a 4°C durante 6 h. A continuación las muestras se centrifugaron a 4°C, 14000 g, 10 min y se transfirieron 100 µl de sobrenadante a cada eppendorf junto con 900 µl de RIPA, PIC 1X, PMSF 1X y el anticuerpo correspondiente.

Al día siguiente, y tras la incubación con el anticuerpo primario, se añadieron 60 µl de bolas de agarosa. Se incubó durante 4h en una noria a 4°C y posteriormente se centrifugó 1min a 4°C y 2000g. Esta centrifugación se repitió cuatro veces, descartando el sobrenadante, para lavar el pellet con buffer de lavado (SDS 0.1%; Triton X-100 1%; EDTA 2 mM, pH8; NaCl 150 mM; Tris-HCl 20 mM, pH8). A continuación se añadió 1ml de buffer final de lavado (SDS 0.1%; Triton X-100 1%; EDTA 2 mM, pH8; NaCl 500 mM; Tris-HCl 20 mM, pH8) al pellet, se centrifugó un minuto a 4°C y 2000 g y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se añadieron 100 µl de buffer de elución (SDS 1%; NaHCO₃ 100 mM) y se incubó durante 15 min a 30°C. A continuación se centrifugaron a TA durante 1 minuto a 2000 g y se transfirió

el sobrenadante a un tubo nuevo. Este último paso se repitió otra vez de modo que se obtuvo un volumen final de 200 μ l.

8.1.4.3 Purificación del DNA

La siguiente fase del protocolo consiste en revertir la unión proteína-DNA. A cada muestra se añadieron 8 μ l de NaCl 5M y se incubó a 65°C toda la noche (ON). Al día siguiente se añadió 1 μ l *RNase A* (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) y se incubó 30 min a 37°C. Posteriormente se añadieron 4 μ l de EDTA 0.5M, 8 μ l de Tris-HCL 1 M y 1 μ l de Proteinasa K (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) y se incubó durante 2 h a 45°C. El paso final del proceso de inmunoprecipitación consistió en la purificación del DNA. Para ello se utilizó el kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante, de forma que en esta fase se obtuvo un volumen de 40 μ l para cada una de las muestras.

8.1.4.4 Preparación de las muestras para la hibridación de Microarrays de Promotores

Tras la purificación del DNA inmunoprecipitado y previo a la hibridación de los arrays de promotores se comprobó mediante RT-q-PCR que el DNA inmunoprecipitado estuviese enriquecido en el promotor del gen de la coclooxigenasa 2 (*COX-2/PTGS2*) ya descrito como diana de regulación por ETV5 (Eo et al. 2008). Para este análisis se utilizó 1 μ l de DNA purificado, 10 μ l de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y 1 μ l de cada uno de los primers de *COX2* a una concentración 5 μ M (Forward: TAAGGGGAGAGGAGGGAAAAAT; Reverse: ACAATTGGTCGCTAACCGAG; Invitrogen) hasta un volumen final de 20 μ l. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C, 10 min; 50 ciclos (95°C, 20 seg; 61°C, 1 min); 95°C, 20 seg; 61°C, 1 min; 95°C, 30 seg; 60°C, 15 seg.

Para la hibridación de microarrays de promotores de genes humanos *GeneChip Human Tiling 1.0R Array Set* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), se llevaron a cabo una serie de procesos:

8.1.4.4.1 Primera amplificación del DNA purificado

10 µl de DNA purificado de cada una de las muestras se sometieron a un proceso de amplificación por PCR, utilizando 4 µl de *Sequenase Reaction Buffer 5X* (Affimetrix, Santa Clara, CA, USA) y 4 µl del primer GTTCCAGTCACGGTC(N)₉ (Invitrogen) con las siguientes condiciones: 95°C, 4 min; hielo durante 3 seg, mantenimiento a 10°C. A continuación las muestras se sometieron a una segunda ronda de PCR, combinando cada una de ellas con 2.6 µl de un cocktail formado por 0.1 µl de BSA 20 mg/ml, 1 µl de DTT 0.1 M, 0.5 µl de dNTPs 25 mM y 1 µl de Sequenase 1.3 U/µl (Affimetrix, Santa Clara, CA, USA). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 10°C, 5 min; aumento de la temperatura hasta 37°C en 9 min; 37°C, 8 min; 95°C, 4 min; se mantuvo en hielo mientras se añadió 1 µl de Sequenase; 10°C, 5 min; aumento de la temperatura hasta 37°C en 9 min; 37°C, 8 min. Se repitieron los 7 últimos pasos dos veces más.

Una vez llevado a cabo el proceso de amplificación, las muestras se purificaron con el kit *Microspin S-300 HR* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

8.1.4.4.2 Segunda amplificación del DNA

Tras la purificación las muestras se sometieron a un proceso de amplificación adicional para incorporar dUTPs. Se utilizaron tres proporciones diferentes de dUTPs para comprobar cuál era la óptima en el proceso posterior de fragmentación mediante una dUTPasa. La mezcla de reactivos para PCR fue la siguiente: 20 µl de muestra purificada; 10 µl de PCR Buffer 10X (Promega, Madison, WI, USA); 3 µl de MgCl₂ 25 mM (Promega, Madison, WI, USA); 4 µl del primer TTTCCAGTCACGGTC 100 µM; 2 µl de polimerasa Takara 5 U/µl (Affimetrix); 57.25 µl de agua; 3.75 µl de dNTPs, probando:

- a) 10mM (dATP,dCTP, dGTP) + dTTP 8mM + dUTP 2mM
- b) 10mM (dATP,dCTP, dGTP) + dTTP 6mM + dUTP 4mM
- c) 10mM (dATP,dCTP, dGTP) + dTTP 4mM + dUTP 6mM

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 15 ciclos (95°C, 30 seg; 45°C, 30 seg; 55°C, 30 seg; 72°C, 1 min). Tras la amplificación las muestras deben tener un tamaño entre 200 pb y 1 kb y para comprobarlo se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Figura 26).

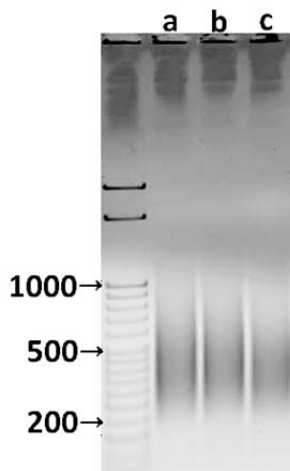


Figura 26. DNA amplificado y sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Opciones: **a)** dTTP 8mM + dUTP 2mM, **b)** dTTP 6mM + dUTP 4mM y **c)** dTTP 4mM + dUTP 6mM.

A continuación las muestras se sometieron a un segundo paso de purificación con el kit *GeneChip Sample Cleanup Module* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.1.4.4.3 Fragmentación del DNA amplificado

Para llevar a cabo la fragmentación de las muestras se empleó el kit *GeneChip WT Double-Stranded DNA Terminal Labeling* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para comprobar el estado de la fragmentación la muestra se cargó tanto en un chip RNA Nano para su análisis en la plataforma Bioanalyzer2100, como en un gel de agarosa al 1% (Figura 27). Un tamaño de fragmentos óptimo está en torno a 66 nt, determinado por un tiempo de migración entre 20 y 25 seg. De acuerdo a las pruebas realizadas se consideró que la proporción adecuada de dUTPs correspondía a la opción C (10mM (dATP,dCTP, dGTP) + dTTP 4mM + dUTP 6mM).

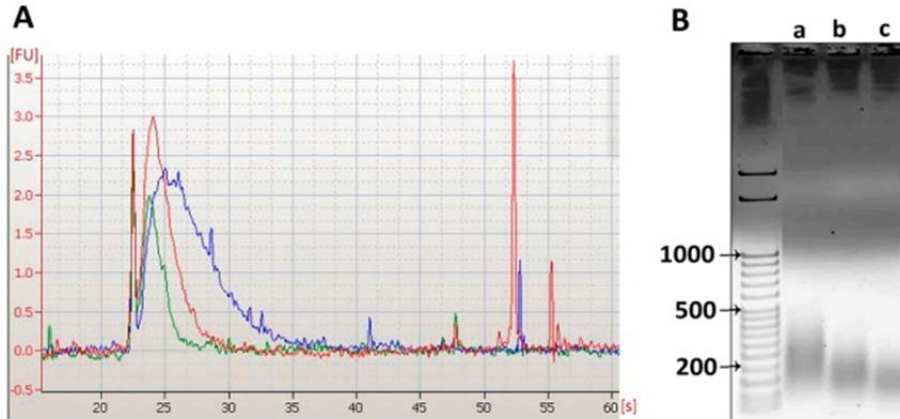


Figura 27. **A**, Espectro del DNA tras la fragmentación analizado en Bioanalyzer; Opciones a) dTTP 8mM + dUTP 2mM (azul), b) dTTP 6mM + dUTP 4mM (rojo) y c) dTTP 4mM + dUTP 6mM (verde). **B**, DNA fragmentado y sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1%.

8.1.4.4 Marcaje del DNA e hibridación de microarrays

El siguiente paso del protocolo consistió en el marcaje de las muestras antes de su hibridación en el array. Para ello se siguió el protocolo indicado en el kit *GeneChip WT Double-Stranded DNA Terminal Labeling* (Affimetrix, Santa Clara, CA, USA).

Finalmente se hibridaron los microarrays de promotores génicos *GeneChip Human Tiling 1.0R Array Set* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante (16 h a 45°C). Estos arrays incluyen, cada uno, 4.6 millones de sondas correspondientes a 25500 promotores humanos. Se hibridaron 12 microarrays correspondientes a las muestras pareadas de tumor inmunoprecipitadas con el anticuerpo frente a ETV5, 6 pertenecientes a la zona superficial y 6 a los frentes de invasión.

8.1.5 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS

8.1.5.1 Partek Genomic Suite 6.5

Los archivos .CEL generados por el software *Affymetrix GeneChip Operating Software* (GCOS) contienen todos los valores de intensidad de señal para cada sonda presente en el array. Se importaron en el software *Partek Genomic Suite 6.5* y se normalizaron usando el algoritmo *Robust Multichip*

Averaging (Partek Inc., Missouri, USA) que elimina el *background* de intensidad de señales y las convierte en valores de expresión mediante una transformación logarítmica.

Con el propósito de detectar los promotores génicos a los que se une ETV5 diferencialmente en el frente de invasión, la señal media de cada sonda correspondiente a la zona superficial, se restó a la señal media correspondiente a la misma sonda del frente de invasión. Se seleccionaron las sondas con una señal positiva y con el parámetro estadístico $p < 0.005$ (*t* test).

8.1.5.2 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

El software *Ingenuity Pathway Analysis 2.0* (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA) identifica las rutas canónicas, los procesos biológicos y las redes de interacción génica más significativas en las que están implicados los promotores génicos a los que se une ETV5 de forma diferencial en el frente de invasión tumoral. Se seleccionaron los genes relacionados con el proceso de invasión, migración y metástasis tumoral.

8.1.6 VALIDACIÓN DE LA UNIÓN DE ETV5 A LOS PROMOTORES GÉNICOS

8.1.6.1 Inmunoprecipitación de cromatina en líneas celulares

Con el fin de validar la unión de ETV5 a los genes seleccionados se llevó a cabo el protocolo de CHIP en las líneas celulares. Para ello se sembraron 2.10^6 células en una placa de 100 mm y cuando llegaron al 80-90% de confluencia se añadió PIC 1X y formaldehído al 37% hasta una concentración final del 0.75%. Se incubaron durante 10 min a TA, se añadió glicina a una concentración final de 125 mM durante 5 min a TA. Posteriormente las placas se pusieron en hielo, se lavaron con PBS y las células se recogieron con ayuda de un scraper. Se centrifugaron a 1500 rpm, 5min, 4°C y el pellet se homogeneizó en buffer de lisis (SDS 1%; EDTA 10 mM; Tris-HCl 50 mM, pH8.2, PIC 1X). Las células se sonicaron dos veces durante 10

seg, en hielo, se centrifugaron a 14000 rpm, 10 min, 4°C y el sobrenadante se guardó a -20°C hasta su uso.

Para llevar a cabo la ChIP se siguió el mismo protocolo que en el apartado 9.1.4.2 de los materiales y métodos (M&M), con la excepción de que en este caso se emplearon 4µg de cada anticuerpo.

La purificación del DNA se realizó de la misma forma que la descrita en el apartado 9.1.4.3 de los M&M.

8.1.6.2 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica empleada para amplificar una secuencia de DNA, generando cientos de millones de copias. Se emplea la enzima termoestable Taq polimerasa y una cadena de DNA simple como molde.

Esta técnica se empleó para validar la unión de ETV5 a la región promotora del gen BDNF en muestras inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-ETV5, tanto de tejido como de líneas celulares. Se utilizó el kit *GoTaq Flexi DNA Polymerase* (Promega, Madison, WI, USA) y los primers del promotor de BDNF (forward: GTGACCACCCAGGTGTAGAAT y reverse: GCAGGAATGTGTGACAGGAAC; 10µM). La PCR se llevó a cabo en un termociclador bajo las siguientes condiciones: 94°C, 3 min; 40 ciclos (94°C, 3 min; 57°C, 30 seg; 72°C, 30 min), 72°C, 10 min, 4°C. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%.

8.1.7 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

8.1.7.1 Extracción de proteínas totales de tejido

La extracción de proteínas totales se llevó a cabo en las muestras pareadas de tejido tumoral, pertenecientes a la zona superficial y al frente de invasión (n=6). El tejido fue lisado en frío utilizando el buffer de lisis (SDS 0.1%; NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 8.5; DOC 0.5%; NP-40 1%; Na3VO4

2 mM, NaF 4 mM, PIC 1X). Las muestras se sonicaron en hielo 2 veces durante 20seg y se centrifugaron a 22000 g durante 20 min a 4°C.

La concentración de proteínas totales en el sobrenadante se determinó utilizando el método del ácido bicinconónico (BCA). Este protocolo se basa en el principio de que, en un medio alcalino, los enlaces peptídicos de las proteínas reducen los iones cúpricos a iones cuprosos (reacción de Biuret). Los iones cuprosos reaccionan con el BCA (verdoso) para formar un color morado que es proporcional al contenido proteico de la muestra y medible mediante absorbancia.

8.1.7.2 Extracción de proteínas totales de líneas celulares

Las líneas celulares se lavaron con PBS e incubaron con buffer de lisis (SDS 0.1%; NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 8.5; DOC 0.5%; NP-40 1%; Na3VO4 2 mM; NaF 4 mM, PIC 1X) en la propia placa de cultivo durante 30 min en hielo. A continuación se recogieron con ayuda de un scraper, se sonicaron en hielo 2 veces durante 20 seg y se centrifugaron a 15000 g y 4°C. El sobrenadante se guardó a -80°C hasta su utilización. La concentración de proteínas totales se determinó utilizando el método del BCA.

8.1.7.3 Western blot

El western blot (WB) es una técnica que se utiliza para detectar proteínas específicas en un extracto proteico de tejido o células. Se emplea la electroforesis en gel para separar las proteínas en función del tamaño y la transferencia a una membrana para la incubación con el anticuerpo específico. 50 µg de proteína total se mezclaron con Laemmli Buffer (Sigma, St. Louis, MO, USA), se incubaron a 95°C durante 5 min y se cargaron en un gel de SDS-acrilamida al 12%. Posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham Bioscience, UK) durante 1 h y 30 min. Las membranas se bloquearon con leche al 5% en TBS-Tween 0.05% (TBS-T) durante 1 hora a TA y a continuación se incubaron con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente (Tabla 13), ON a 4°C. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 min a TA y se incubaron con el anticuerpo

secundario correspondiente (Tabla 13). La señal se detectó utilizando el kit *Immobilon Western Blotting* (Millipore, Billerica, MA, USA).

Las imágenes se densitometraron utilizando el software ImageJ.

8.1.7.4 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia (IF) permite marcar específicamente proteínas celulares mediante la utilización de anticuerpos conjugados a moléculas fluorescentes. Para llevar a cabo la IF, las células se sembraron en cubre objetos de cristal y se cultivaron durante 48h. Se lavaron con PBS y se fijaron con metanol a -20°C durante 10 min. A continuación se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 13) diluido en BSA al 2%, durante 1 hora a TA. Tras lavar 3 veces con PBS se incubaron en oscuridad durante 1 hora a TA con el anticuerpo secundario combinado con Texas Red o Alexa Fluor. Tras los lavados con PBS los cubreobjetos se montaron sobre un portaobjetos utilizando medio de montaje Mowiol (Calbiochem). Las imágenes de fluorescencia se tomaron con un microscopio de fluorescencia invertido (Leica, Wetzlar, Germany), empleando un objetivo 100X.

8.1.8 TRATAMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES

La proteína BDNF es secretada al medio y ejerce su función a través de la unión al receptor tirosina quinasa TrkB presente en la membrana celular. Para determinar el efecto de esta proteína en las funciones celulares estudiadas (migración, invasión), las líneas celulares de CE fueron tratadas con **BDNF recombinante humano** (Peprotech, USA), a una concentración de 250 ng/ml.

El compuesto **K252a** (Calbiochem, Darmstadt, Germany) es un potente inhibidor de varias proteína quinasas, así como de la familia de receptores Trk, al competir con el sitio de unión del ATP. Se ha empleado a una concentración de 100 nM para caracterizar el efecto del bloqueo de la vía de señalización mediada por BDNF.

El compuesto **PD98059** (Calbiochem, Darmstadt, Germany) es un inhibidor potente de la quinasa MAPK/ERK. Previene la fosforilación de ERK1/2 (p44/p42 MAPK) a través de su unión selectiva a MEK1/2. Se ha empleado a una concentración de 10 μM para determinar el efecto de la inhibición de esta vía de señalización en las funciones celulares de las líneas de CE.

8.1.9 ENSAYOS DE MIGRACIÓN EN TRANSWELL

La migración celular, generalmente en respuesta a un estímulo, es un proceso clave durante el proceso de reparación de heridas, diferenciación celular y desarrollo embrionario, así como durante el proceso de metástasis tumoral. Para testar la capacidad migratoria de las líneas celulares de CE, se utilizaron transwells para placas de 24 pocillos, con una membrana de policarbonato con poros de 8.0 μm (Corning, NY, USA). Sobre el transwell se sembraron 5×10^4 células en 200 μl de medio sin suero. En la parte inferior, el pocillo se rellenó con 500 μl de medio de cultivo completo con un 20% de FBS como agente quimioatrayente. Tras una incubación de 48 h a 37°C, las células que no migraron se limpiaron con un bastoncillo de algodón y el transwell se colocó en un pocillo con 500 μl de tripsina para despegar las células que habían atravesado la membrana. Estas células se tiñeron con *calcein acetoxymethyl ester* (4 μM ; Invitrogen, Paisley, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se visualizaron a 485 nm usando un fluorímetro. En las células vivas la calceína es hidrolizada por esterasas intracelulares generando el anión de calceína fluorescente que queda retenido en el citoplasma celular. Se realizaron 3 ensayos con triplicados independientes por condición.

En los casos en los que se utilizó este ensayo para testar el efecto de algún tratamiento, éste se incorporó en el medio sin FBS, para que estuviese en contacto con las células y también en el pocillo inferior, para que el gradiente sólo estuviese generado por la diferencia de concentración de FBS.

8.1.10 ENSAYOS DE INVASIÓN EN TRANSWELL

La invasión celular requiere la migración de las células a través de una MEC o una MB degradando, primero, la barrera de una forma enzimática y es una característica típica de las células metastásicas. La capacidad de invasión de las líneas celulares de CE se comprobó utilizando transwells para placas de 24 pocillos, con una membrana de policarbonato con poros de 8.0 μm (Corning, NY, USA). Primero los transwell se colocaron de forma inversa y las células se sembraron en la parte inferior de la membrana (5×10^4 células en 100 μl de medio completo). Tras 5 h los transwells se dieron la vuelta y se rellenaron con matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) diluido en medio de cultivo sin FBS (dilución 2:3). El pocillo se rellenó con 500 μl de medio sin FBS y el matrigel se dejó polimerizar durante 45 min a 37°C. En la parte superior del matrigel se añadieron 150 μl de medio suplementado con 20% FBS. A los 3 días se cambió el medio de cultivo del pocillo y también el superior y a los 5 días se reveló el ensayo. Para ello, el transwell se traspasó a un pocillo de una placa de 24 que contenía *calcein acetoxymethyl ester* (4 μM ; Invitrogen, Paisley, UK), en 500 μl de medio, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la visualización se limpió la parte inferior de la membrana y se utilizó un microscopio confocal (Leica AOB5 SP5-X; Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Germany) fijando como partida la membrana del transwell y tomando imágenes consecutivas en planos ascendentes cada 5 μM . Se realizaron 3 ensayos con triplicados independientes por condición.

Además, el matrigel se recogió en 800 μl de PBS, se centrifugó a 600 g durante 5 min a 4°C y se extrajo el RNA de las células que habían invadido mediante una extracción con trizol (Molecular Research Center, OH, USA). El RNA se purificó empleando el kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo la transcripción reversa y se utilizó la técnica de RT-q-PCR para cuantificar de forma indirecta y a través de la expresión del gen *GAPDH*, el número de células que habían invadido el matrigel.

En los casos en los que se probó el efecto de un tratamiento sobre la invasión celular, éste se incorporó en el medio sin FBS del pocillo en contacto con las células, así como en la mezcla de matrigel-medio y en la parte superior, para que el gradiente se crease únicamente con el FBS al 20%.

8.1.11 MODELOS *IN VIVO*

Los ratones empleados en este estudio fueron estabulados y mantenidos bajo condiciones específicas de ausencia de patógenos y siguiendo la guía institucional aprobada por el Comité para el empleo y cuidado de animales. Todos los procedimientos experimentales con animales fueron diseñados por personal investigador categoría C y realizados por personal categoría B, según las directrices de la Federación de Asociaciones Europeas para la Ciencia del Animal de Laboratorio (FELASA) y recogidos en la normativa vigente.

En este estudio se emplearon ratones hembras atímicas Nude-Foxn1^{nu} (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN), de 5 semanas. Los ratones se anestesiaron con una mezcla de isofluorano/oxígeno al 2% y las células se inyectaron en el ventrículo izquierdo del corazón. Para comprobar si la inyección había sido correcta, se inyectaron 150 mg/kg de luciferina (Firefly Luciferin, Caliper Lifescience Corp, Hopkinton, MA, USA) de forma intraperitoneal (IP) y se comprobó que la señal bioluminiscente estuviese distribuida por todo el animal utilizando el sistema IVIS (Xenogen Corp) y el software *Living Imaging software 4.2* (Xenogen Corporation). Sólo continuaron el estudio los ratones que cumplieron este criterio.

Los grupos experimentales se detallan a continuación:

Grupo H-luc-shCtrl: 5 ratones a los que se les inyectaron de forma intracardiaca (IC) 5×10^5 células H-luc-shCtrl en 100 μ l de PBS estéril.

Grupo H-ETV5-luc-shCtrl: 5 ratones a los que se les inyectaron de forma IC 5×10^5 células H-ETV5-luc-shCtrl en 100 μ l de PBS estéril.

Grupo H-ETV5-luc-shBDNF: 5 ratones a los que se les inyectaron de forma IC 5×10^5 células H-ETV5-luc-shBDNF en 100 μ l de PBS estéril.

A los ratones se les hizo un seguimiento de imagen semanal mediante la inyección IP de luciferina y cuatro semanas tras la inyección y previo al sacrificio se empleó el IVIS para analizar la distribución tumoral.



8.2 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CTC DE PACIENTES CON CARCINOMA ENDOMETRIAL DE ALTO RIESGO

8.2.1 PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

El estudio fue llevado a cabo en un grupo de pacientes diagnosticadas de un CE de alto riesgo, incluyendo desde los carcinomas estadio IB G3, a los stadios IV y las recurrencias. El estadiage tumoral se llevó a cabo de acuerdo con la clasificación de la FIGO. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético correspondiente y se obtuvo un consentimiento informado de todas las participantes.

Las pacientes incluidas en este estudio fueron reclutadas en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (Santiago de Compostela, España), Hospital Universitario Vall d'Hebron (Barcelona, España), Hospital Arnau de Vilanova (Lleida, España), MD-Anderson Cancer Center Madrid (Madrid, España), Fundación Dexeus (Barcelona, España) y Haukeland University Hospital (Bergen, Noruega).

8.2.1.1 Estudio de expresión génica de CTC.

Las muestras consistieron en 7.5ml de sangre periférica recogidos en un tubo EDTA-BD Vacutainer, mantenidas a TA y procesadas 24 h después de la recogida. En este caso se incluyeron 34 muestras de pacientes cuyas características clinicopatológicas se resumen en la Tabla 14. Además se analizaron 27 muestras procedentes de donantes sanas, con ausencia de episodios tumorales previos y con una edad similar a la media de edad de las pacientes, de las que se obtuvo un consentimiento informado.

8.2.1.2 Presencia de CTC: CellSearch (Veridex)

Las muestras consistieron en 7.5ml de sangre periférica recogida en un tubo CellSave (Veridex), mantenidas a TA y procesadas 96 h después de la recogida. En este caso se incluyeron 32 muestras de pacientes cuyas características clinicopatológicas se resumen en la Tabla 15.

8.2.1.3 Estudio de expresión génica en muestras de tejido

En este estudio se incluyeron muestras de tejido mantenidas a -80°C correspondientes a 6 carcinomas endometriales primarios y los ganglios linfáticos afectados de las mismas pacientes. Fueron suministrados por el Hospital Universitario Vall d'Hebron (Barcelona, España).

8.2.2 INMUNOHISTOQUÍMICA (IH)

Para comprobar la presencia de CTC en la sangre periférica de las pacientes con CE se lleva a cabo un inmunoaislamiento con partículas magnéticas cubiertas con un anticuerpo frente a la molécula EpCAM. Previo al aislamiento se determinó la expresión de la misma en secciones de parafina de los carcinomas primarios de las pacientes incluidas. Este protocolo se llevó a cabo en el Hospital Arnau de Vilanova (Lleida, España).

Brevemente, las secciones se secaron durante 1h a 65°C antes del pre-tratamiento de desparafinado, rehidratación y recuperación antigénica que se llevó a cabo en el sistema *Pre-Treatment Module, PT-LINK* (DAKO, Glostrup, Denmark). La peroxidasa endógena se bloqueó añadiendo peróxido de hidrógeno al 1% sobre las muestras durante 15 min. Las muestras se permeabilizaron con Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA), se lavaron con TBS-T e incubaron con el anticuerpo anti-EpCAM (clon MOC-31, dilución 1:50; DAKO, Glostrup, Denmark) ON a 4°C . Posteriormente se hicieron lavados con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario 1 h a TA. La reacción se visualizó con el kit *EnVision FLEX Detection* (DAKO, Glostrup, Denmark) empleando diaminobencidina como sustrato. Como paso final las muestras se lavaron en PBS y se introdujeron en una solución de hematoxilina durante 3seg como contratinción. Por último los cortes se deshidrataron empleando alcoholes de graduación creciente y se montaron en portaobjetos.

8.2.3 INMUNOAISLAMIENTO DE CTC Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

8.2.3.1 Inmunoaislamiento

Las CTC de las pacientes con CE se aislaron utilizando el kit *CELLlection™ Epithelial Enrich* (Invitrogen, Dynal, Oslo, Norway). Este kit está compuesto por unas micropartículas magnéticas cubiertas por el anticuerpo monoclonal que reconoce la molécula EpCAM. 7.5ml de sangre periférica se mezclaron con 15 ml de buffer 2 (PBS 1X, BSA 0.1%, EDTA 2 mM), se centrifugaron a 1250 g, 15 min y se descartó la fracción de plasma del sobrenadante. El pellet se mezcló con 7.5 ml de buffer 2 y se añadieron 100 µl de partículas magnéticas. Tras incubar la muestra a 4°C durante 30min en una noria, se aislaron las CTC unidas a las partículas mediante el uso de un imán. Se realizaron 3 lavados con 1ml de buffer 1 (PBS 1X, BSA 0.1%), recuperando el complejo partícula-CTC tras incubar 4min en el imán. Finalmente la muestra se resuspendió en 100 µl de solución *RNAlater®* (Ambion, Austin, TX, USA) y se guardó a -80°C hasta su uso.

El mismo protocolo se llevó a cabo a partir de muestras de sangre de voluntarias sanas, para evaluar los niveles de células hematopoyéticas aisladas inespecíficamente.

8.2.3.2 Extracción de RNA total de CTC

El RNA total de las CTC se extrajo empleando el kit *Qiap Viral* (Qiagen, Valencia, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.2.3.3 Retrotranscripción

El cDNA se sintetizó utilizando el kit *Superscript III* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con el siguiente protocolo: 11 µl de RNA se mezclaron con 1 µl de *Random Hexamers* (Applied Biosystems) y 1 µl de dNTPs (10 mM). Se incubó en termociclador 5min a 65°C y posteriormente se puso en hielo mientras se preparaba la mezcla: 4µl de *First-Strand buffer 5X*; 1 µl DTT 0.1 M; 1 µl *RNAse out*; 1 µl *SuperScript III*, por muestra. Se incubó en

termociclador con las siguientes condiciones: 25°C, 5 min; 50°C, 2 h; 70°C, 15 min. Al acabar la reacción se añadió 1 µl de *RNAse H* (Invitrogen) y se incubó 20 min a 37°C. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

8.2.3.4 RT-q-PCR

Previo al desarrollo de la RT-q-PCR y para maximizar los ratios de detección se llevó a cabo un proceso de pre-amplificación. Se mezclaron 2.08 µl de cDNA y 4.17 µl de agua. Se preparó una mezcla dependiente del número de sondas a testar y el número de muestras incluidas en el estudio, en este caso: 111.5 µl TE 1X, 2.23 µl de cada sonda y 24.54 µl de agua. Se añadieron 6.25 µl de esta mezcla al cDNA diluido y 12.5 µl de *TaqMan®PreAmp Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a cada tubo. Las muestras se incubaron en termociclador con las siguientes condiciones: 95°C 10 min; 14 ciclos (95°C 15 seg; 60°C 4 min). Posteriormente se guardaron a -20°C hasta su uso. Este proceso permite incrementar la sensibilidad de detección entre 6-7 Ct (*threshold cycle*) sin comprometer las proporciones originales del RNA.

A continuación se llevó a cabo la RT-q-PCR a partir de los productos pre-amplificados, de la misma forma que se describió en el apartado 9.1.3.5 de los M&M, salvo que en este caso el cDNA se diluyó 1:20 en TE1X. Los datos se analizaron con el Software *StepOne v.2.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando, en este caso, el gen del receptor tipo C de la proteína tirosina fosfatasa (*PTPRC*, *CD45*) como normalizador e indicador del aislamiento inespecífico. Los datos se representan como $(40-\Delta Ct)$, donde $\Delta Ct = \text{media de los duplicados de los Ct correspondientes al gen de interés} - \text{media de los duplicados de los Ct correspondientes a } CD45$.

En todos los casos se emplearon sondas TaqMan (Tabla 12). Inicialmente se comprobó la expresión de los genes seleccionados en un set de 6 pacientes y 6 controles y se descartaron los genes en los que no se detectó amplificación.

8.2.4 INMUNOAISLAMIENTO DE CTC MEDIANTE LA TECNOLOGÍA CELLSEARCH (VERIDEX)

Para la detección de CTCs en pacientes con CE se llevó a cabo un estudio independiente empleando la tecnología CellSearch (Veridex, Janssen Diagnostics, SouthRaritan, NJ, USA). Se trata de un procesamiento semi-automático mediante el cual se aíslan las células que expresan la molécula EpCAM en su superficie a través de unas micropartículas magnéticas unidas a un anticuerpo que reconoce esta proteína. Además, el núcleo celular se marca con DAPI y tiene lugar una IF para marcar las células de origen hematopoyético con CD45-APC y las células epiteliales con CK-PE. Las imágenes se adquieren a través de un microscopio semi-automático de fluorescencia (Celltracks Analyzer II), y dos personas se encargan de seleccionar las CTC de acuerdo con el siguiente criterio: morfología redondeada, nucleares (DAPI+ y $\geq 4\mu\text{m}$), expresión negativa de CD45 y expresión positiva de CK-PE (CK8, 18 y 19) (Figura 28).

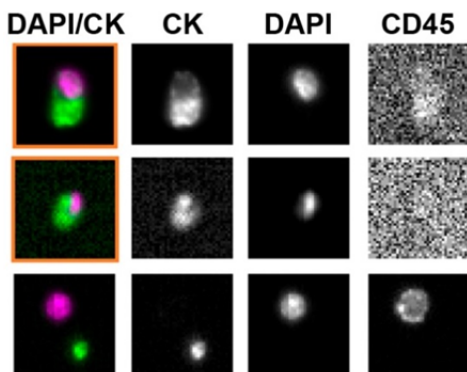


Figura 28. Ejemplos representativos de CTC (recuadradas en naranja) con marcaje para CK, indicativo de origen epitelial, y DAPI, para células nucleadas. Célula de origen hematopoyético (paneles inferiores) positiva para CD45.

8.2.5 LÍNEAS CELULARES

En este estudio se emplearon las líneas celulares de CE Hec1A-luc y Hec1A-ETV5-luc, obtenidas y mantenidas de acuerdo a los protocolos mencionados anteriormente en los apartados 9.1.2.1 y 9.1.2.3 de los M&M.

8.2.6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LÍNEAS CELULARES

Los análisis de expresión a partir de líneas celulares y muestras de tejido llevados a cabo en esta sección de la tesis se realizaron de la misma forma que aparece descrita en la sección 9.1.3 de los M&M. Las sondas TaqMan empleadas también se recogen en la tabla 12.

8.2.7 MODELOS *IN VIVO*

Las condiciones de mantenimiento de los animales y el protocolo llevado a cabo en este estudio fue el mismo que el descrito en el apartado 9.1.13 de los M&M. En este caso se utilizaron hembras Nude-Foxn1^{nu} (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN) de 5 semanas y los grupos experimentales fueron:

Grupo H-luc-shCtrl: 3 ratones a los que se les inyectaron de forma IC 5×10^5 células H-luc-shCtrl en 100 μ l de PBS estéril.

Grupo H-ETV5-luc-shCtrl: 3 ratones a los que se les inyectaron de forma IC 5×10^5 células H-ETV5-luc-shCtrl en 100 μ l de PBS estéril.

A los ratones se les hizo un seguimiento de imagen semanal mediante inyección IP de luciferina y cuatro semanas tras la inyección y previo al sacrificio se empleó el IVIS para analizar la distribución tumoral, de la misma forma que aparece descrito en el apartado 9.1.13 de los M&M.

8.3 BÚSQUEDA DE MARCADORES CON VALOR PREDICTIVO DE RECURRENCIA EN PACIENTES CON CARCINOMA ENDOMETRIAL

8.3.1 PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

Las pacientes participantes en este estudio fueron diagnosticadas de un CE, sometidas a cirugía y reclutadas en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (Santiago de Compostela, España), Hospital Universitario Vall d'Hebron (Barcelona, España), Hospital Arnau de Vilanova (Lleida, España), MD-Anderson Cancer Center Madrid (Madrid, España), Fundación Dexeus (Barcelona, España), Hospital Virgen del Rocio (Sevilla, España), Massachusetts General Hospital (Boston, USA), Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (Nueva York, USA) y Haukeland University Hospital (Bergen, Noruega). Se obtuvo un consentimiento informado de todas las participantes. El estadiage tumoral se llevó a cabo de acuerdo con la clasificación de la FIGO y los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético correspondiente.

8.3.1.1 Análisis proteómico 2D-DIGE

Las muestras incluidas corresponden a 6 carcinomas endometriales primarios y la muestra de tumor correspondiente a sus recurrencias. Tras la cirugía, cada muestra fue analizada por un/a patólogo/a y conservada a -80°C hasta su utilización. Las características clinicopatológicas se resumen en la tabla 16.

8.3.1.2 Análisis inmunohistoquímico

Las muestras incluidas en este análisis están compuestas por tejido tumoral fijado en formalina y embebido en parafina y se pueden dividir en tres grupos:

1) Muestras procedentes de 140 pacientes con CE (115 tumores primarios y 25 recurrencias post-radioterapia). Las características clínicas y patológicas se resumen en la tabla 17.

2) Muestras procedentes de 131 pacientes con CE primario (93 CEE y 38 CENE, incluyendo seroso y células claras). Las características clínicas y patológicas se resumen en la tabla 18.

3) El grupo formado por 93 pacientes con CEE (50 recurrencias y 43 no recurrentes) también se analizó de forma independiente. Las características clínicas y patológicas se resumen en la tabla 19.

8.3.1.3 Estudio de expresión génica en CTC.

En este estudio se determinó la expresión de *ANXA2* en CTC de muestras procedentes de mujeres sanas, así como en pacientes con CE agrupadas en función de si habían sufrido recurrencia o no. Se emplearon las mismas muestras que en el caso del análisis de expresión de CTC descrito en el apartado 9.2.1.1 de los M&M y cuyas características clinicopatológicas se resumen en la tabla 14.

8.3.2 ANÁLISIS 2D-DIGE

La electroforesis en gel diferencial (DIGE) es una técnica que permite monitorizar diferencias en el perfil proteico entre muestras. Permite separar y comparar hasta tres muestras en un mismo gel. Este protocolo fue llevado a cabo en el laboratorio del Dr. Jaume Reventós. Brevemente, se analizaron 12 muestras correspondientes a carcinomas primarios de endometrio y recurrencias (Tabla 16). Se empleó buffer de lisis DIGE para la extracción proteica (urea 7 M; thiourea 2 M; CHAPS 4%; Tris 30 mM, pH 8.5) y el marcaje se realizó con fluorocromos Cy3 y Cy5. Se empleó un pool con cantidades iguales de cada muestra como estándar interno y se unió a Cy2. Las muestras se combinaron de acuerdo al diseño experimental, con 50 µg de proteína por sonda Cy y por gel, diluida dos veces con buffer IEF (urea 7 M; thiourea 2 M; CHAPS 4% (p/v), ditiotretitol 2%; 2% *pharmalytes* pH 3–10; *bromofenol blue* 0.002%). La electroforesis en 2D se llevó a cabo con los reactivos y equipamiento de GE Healthcare. Las imágenes de fluorescencia de los geles se adquirieron con el escáner Typhoon 9400 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Las imágenes de Cy2, Cy3 y Cy5 se escanearon a longitudes de onda de

excitación/emisión de 488/520, 532/580 y 633/670 nm, respectivamente, a 100 μm de resolución. El análisis de imagen y la cuantificación estadística se llevó a cabo con el software *Progenesis SameSpots v3.2* (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK). Se seleccionaron las proteínas diferencialmente expresadas entre los tumores primarios y recurrencias que cumplían el criterio *fold* $-1.5 \geq x \geq 1.5$ y Anova $p < 0.05$.

8.3.3 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

El análisis inmunohistoquímico llevado a cabo en este apartado de la tesis lo realizaron la Dra. María Santacana y el Dr. Xavier Matias-Guiu en el Hospital Arnau de Vilanova (Lleida, España) de la misma forma que aparece descrita en el apartado 9.2.2 de los M&M. En este caso se empleó un anticuerpo primario monoclonal anti-ANXA2 (dilución 1:100; Abcam, Cambridge, UK). El marcaje inmunohistoquímico se determinó de forma semicuantitativa basándose en el porcentaje y la intensidad de señal. Los valores histológicos reciben un valor que va desde 0 (no inmunorreacción) a 300 (máxima inmunorreacción) aplicando la fórmula: *Histoscore* = 1X (% marcaje suave) + 2X (% marcaje moderado) + 3X (% marcaje fuerte).

8.3.4 LÍNEAS CELULARES

En este estudio se empleó la línea celular de CE Ishikawa, descrita y mantenidas de acuerdo al protocolo mencionado en el apartado 9.1.2.1. Esta línea se modificó para inhibir la expresión de ANXA2 según el método descrito en la sección 9.1.2.3 de los M&M con los plásmidos que aparecen en la tabla 9. Se obtuvieron las líneas IK-luc-shANXA2 y su control de transducción (IK-luc-pLKO).

8.3.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

8.3.5.1 Análisis de expresión génica en CTC

La determinación de la expresión de ANXA2 en las muestras de CTC se realizó de acuerdo al protocolo descrito en los apartados 9.2.3.2 a 9.2.3.4 de los M&M.

8.3.5.2 Análisis de expresión génica en líneas celulares

Los análisis de expresión a partir de líneas celulares llevados a cabo en esta sección de la tesis se realizaron de la misma forma que aparece descrita en la sección 9.1.3 de los M&M. Las sondas TaqMan empleadas también se recogen en la tabla 12.

8.3.6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Los análisis de expresión de proteínas a partir de las líneas IK-luc-pLKO e IK-luc-shANXA2 se realizaron siguiendo el mismo método que aparece en las secciones 9.1.7.2 a 9.1.7.4 de los M&M, empleando los anticuerpos descritos en la tabla 13.

8.3.7 ENSAYOS DE SENSIBILIDAD A RADIOTERAPIA

El efecto de ANXA2 en la sensibilidad a radioterapia se examinó utilizando ensayos de clonogenicidad. Se sembraron 1×10^3 células en pocillos de placas de 6 pocillos y se irradiaron con diferentes dosis (0 Gy, 2Gy, 4Gy, 6Gy). Las células se incubaron durante 15 días a 37°C en CO₂ al 5%, y el ensayo se reveló empleando MTT (3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; SIGMA-M-2128, Saint Louis, MO, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

8.3.8 ENSAYOS DE MIGRACIÓN

Los ensayos de migración llevados a cabo en este apartado de la tesis se realizaron según lo descrito en la sección 9.1.9 de los M&M. Sin embargo, hay que comentar que, tanto las células control IK-luc-pLKO como las IK-luc-shANXA2, se sometieron a un gradiente de EGF (60 ng/ml; Sigma, Saint Louis, MO, USA) para facilitar la migración.

8.3.9 ENSAYOS DE CRECIMIENTO CELULAR EN AUSENCIA DE SUSTRATO

El crecimiento celular en ausencia de adhesión a un sustrato es una propiedad de las células transformadas e identifica las células con capacidad metastásica. Para testar esta capacidad en las células de CE se utilizaron

ensayos de formación de colonias en agarosa. Para ello, cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos se cubrió con 50 μ l de agarosa (Promega, Madison, USA) al 0.6% en medio de cultivo completo. Una vez que gelificó, se añadieron 100 μ l de agarosa al 0.3% en medio completo conteniendo 4×10^3 células. A continuación se añadieron 50 μ l de medio completo. Tras 5 días de incubación a 37°C con 5% CO₂ las colonias se incubaron con una dilución 1:10 de Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 3 h a 37°C y se determinó la fluorescencia a 590 nm en un fluorímetro. Se realizaron 3 ensayos independientes con 10 pocillos de p96 por condición.

Se probó el efecto de dos tratamientos que se incorporaron en los 50 μ l de medio de cultivo que se añadieron encima del agar. Se testaron los compuestos ácido zoledrónico (ZA; 100 μ M, 250 μ M; Zometa, Novartis, Horsham, UK) y docetaxel (DTX; 10 nM, 100 nM; Hospira, Warwickshire, UK).

8.3.10 MODELOS *IN VIVO*

Este protocolo fue llevado a cabo por el Dr. Pablo García-Sanz en el centro MD-Anderson Cancer Center Madrid (Madrid, España) y las condiciones de mantenimiento de los animales siguieron las guías institucionales aprobadas por el Comité para el Uso y Cuidado de los Animales de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

El proceso se llevó a cabo de la misma forma que la descrita en el apartado 9.1.13 de los M&M. En este caso se emplearon ratones hembra nu/nu (Charles River) de 7 semanas y los grupos experimentales fueron:

Grupo IK-luc-pLKO: 5 ratones a los que se les inyectaron de forma IC 5×10^5 células IK-luc-pLKO en 100 μ l de PBS estéril.

Grupo IK-luc-shANXA2: 5 ratones a los que se les inyectaron de forma IC 5×10^5 células IK-luc-shANXA2 en 100 μ l de PBS estéril.

A los ratones se les hizo un seguimiento de imagen semanal mediante inyección IP de luciferina y cuatro semanas tras la inyección y previo al

sacrificio se empleó el IVIS para analizar la distribución tumoral, de la misma forma que aparece descrito en el apartado 9.1.13 de los M&M. Se recogieron los distintos tejidos, se fijaron en formalina al 4% y se incluyeron en parafina. Posteriormente se llevó a cabo una tinción de hematoxilina-eosina para determinar la presencia de metástasis.

8.3.10.1 Identificación de CTC en modelos *in vivo*

Con el fin de analizar la diseminación a distancia se cuantificó el número de CTC mediante la tecnología CellSearch con el kit *CellCapture™ CTC Mouse* (Veridex LLC, Janssen Diagnostics, NJ, USA) CellSearch (Veridex). Para ello se recogieron 50 μ l de sangre periférica de cada animal, se mezclaron con 25 μ l de partículas magnéticas cubiertas con el anticuerpo Anti-EpCAM y se incubaron durante 15 min. Tras la captura por medio de un imán, las CTC se marcaron con anticuerpos Anti-CK 8, 18 y 19 y con DAPI. El análisis se realizó en la plataforma *CellTracks Analyzer II®* (Veridex LLC, Janssen Diagnostics, NJ, USA), como se describió en el apartado 9.2.4 de los M&M.

8.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando los software SPSS (Chicago, version 15.00 for Windows) y GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Softwares Inc, San Diego, CA, USA). En el caso de tratarse de muestras pareadas, se empleó el test de Wilcoxon y en caso contrario el test de Mann-Whitney para determinar la existencia de diferencias. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante un análisis ANOVA seguido de un test de Dunn. Se empleó un modelo de regresión logística para estimar los *odds-ratios* (OR) y el tiempo de supervivencia libre de recidiva.

Se aceptó como significativa una probabilidad menor al 5% ($p < 0.05$)

8.5 TABLAS

Tabla 9. Plásmidos utilizados para la transformación de las líneas celulares.

Pásmido	Casa comercial	Función	Antibiótico resistencia
psPAX2	Addgene, Cambridge, MA, USA	Empaquetador	
PMD2.G	Addgene, Cambridge, MA, USA	Envoltura vírica	
ETV5: EXF0800-Lv105; NM_004454	GeneCopoeia, Rockville, MD, USA	Sobreexpresión de ETV5	Puromicina (1µg/ml)
SHC002V: non-mammalian shRNA Control	Sigma, MO, USA	shRNA frente a gen no presente en mamíferos	Puromicina (1µg/ml)
BDNF: Sigma Mission; NM_001709	Sigma, MO, USA	shRNA para silenciamiento estable de BDNF	Puromicina (1µg/ml)
pLKO.1-puro (SHC001)	Sigma, MO, USA	Control plasmídico, no contiene shRNA	Puromicina (1µg/ml)
ANXA2: Sigma Mission; NM_001002857	Sigma, MO, USA	shRNA para silenciamiento estable de ANXA2	Puromicina (1µg/ml)
pLenti CMV V5-LUC Blast (w567-1)	Addgene, Cambridge, MA, USA	Sobreexpresión de luciferasa	Blasticidina S HCl (3µg/ml)

Tabla 10. Secuencias de los shRNA de *BDNF* (MISSION® shRNA Lentiviral Transduction Particles; Sigma-Aldrich, MO, USA).

Oligo	Secuencia
shRNA Control	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTG TTGTTTTT
shBDNF#1	CCGGGCTCAGTAGTCAAGTGCCTTTCTCGAGAAAGGCACCTTGACTACTG AGCTTTTTTG
shBDNF#2	CCGGGAATTGGCTGGCGATTCATAACTCGATTATGAATCGCCAGCCAAT TCTTTTTGTTTTG
shBDNF#3	CCGGCTGTTGGATGAGGACCAGAAACTCGAGTTTCTGGTCCTCATCCAA CAGTTTTTG
shBDNF#4	CCGGACAGTGGTTCTACAATCTATTCTCGAGAATAGATTGTAGAACCAC TGTTTTTTG
shBDNF#5	CCGGGCAATACTTCTACGAGACCAACTCGAGTTGGTCTCGTAGAAGTAT TGCTTTTTG

Tabla 12. Sondas TaqMan empleadas en los análisis de RT-q-PCR.

	Gen	Sonda TaqMan		Gen	Sonda TaqMan
Vías de señalización relacionadas con el CE	<i>BRAF</i>	Hs00269944_m1	Marcadores EMT	<i>CYP19</i>	Hs00903413_m1
	<i>CTNNB1</i>	Hs00355049_m1		<i>ESR1</i>	Hs00174860_m1
	<i>ERBB2</i>	Hs01001580_m1		<i>ESR2</i>	Hs01100353_m1
	<i>FGFR2</i>	Hs01552926_m1		<i>GPER</i>	Hs00173506_m1
	<i>GDF15</i>	Hs00171132_m1		<i>HSD17B1</i>	Hs00166219_g1
	<i>IDO</i>	Hs00984148_m1		<i>PGR</i>	Hs01556702_m1
	<i>MTOR</i>	Hs00234508_m1		<i>STS</i>	Hs00996676_m1
	<i>p53</i>	Hs01034249_m1		<i>TFF1</i>	Hs00907239_m1
	<i>PIK3CA</i>	Hs00907957_m1		<i>ETV5</i>	Hs00231790_m1
	<i>PTEN</i>	Hs02621230_s1		<i>CDH1</i>	Hs00170423_m1
	<i>PTGS2</i>	Hs01573471_m1		<i>VIM</i>	Hs00958116_m1
	<i>RELA</i>	Hs00153294_m1		<i>LOXL2</i>	Hs00158757_m1
	<i>RUNX1</i>	Hs00231079_m1		<i>NOTCH1</i>	Hs01062014_m1
	<i>STMN1</i>	Hs00606370_m1		<i>SNAI1</i>	Hs00195591_m1
	<i>TERT</i>	Hs00972656_m1		<i>TGFB1</i>	Hs00998133_m1
	<i>VIL1</i>	Hs00200229_m1		<i>ZEB1</i>	Hs01566407_m1
<i>ZWINT</i>	Hs00199952_m1	<i>ZEB2</i>	Hs00207691_m1		
Célula madre	<i>ALDH</i>	Hs01007998_m1	<i>BDNF</i>	Hs00380947_m1	
	<i>CD133</i>	Hs01009250_m1	<i>NTRK2</i>	Hs00178811_m1	
	<i>CD44</i>	Hs01075861_m1	<i>FYN</i>	Hs00941600_m1	
			<i>NRCAM</i>	Hs00170554_m1	
			<i>ANXA2</i>	Hs01561520_m1	
			<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1	

Tabla 13. Anticuerpos utilizados en WB e IF.

Anticuerpo	Dilución WB; IF	Casa comercial
ETV5	1:500; 1:100	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
BDNF	1:500; 1:100	Abcam, Cambridge, UK
E-cadherina	1:1500; 1:200	Abcam, Cambridge, UK
Vimentina	1:1000; 1:500	Dako, Barcelona, España
P-p42/44 MAPK	1:500	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
p42/44 MAPK	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Actina	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Tubulina	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Rabbit	1:1500	Pierce, Rockford, IL, USA
Anti-Mouse	1:1500	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Anti-Rabbit-Texas Red	1:500	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Anti-Mouse-Alexa Fluor	1:500	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Anti-Mouse- Texas Red	1:500	Invitrogen, Oregon, USA

Tabla 14. Características clínicas y patológicas de las pacientes con CE de alto riesgo incluidas en el estudio de expresión génica de CTC.

	n (%)		n (%)
Edad (años)		Invasión linfovascular	
Media	69	Positiva	6 (17,6)
		Negativa	15 (44,1)
		Desconocida	13 (38,2)
Estadio FIGO		Metástasis en ganglios linfáticos	
I	6 (17,7)	Positiva	12 (35,3)
II	1 (2,9)	Negativa	20 (58,8)
III	10 (29,41)	Desconocida	2 (5,9)
IV	17 (50)		
Histología		Recurrencia	
Endometriode	19 (55,9)	No	18 (52,9)
Seroso	10 (29,4)	Sí	15 (44,1)
Células claras	5 (14,7)	Desconocida	1 (2,9)
Grado de diferenciación		Primer tratamiento	
Bien (G1)	4 (11,8)	Radioterapia	4 (11,8)
Moderadamente (G2)	6 (17,6)	Quimioterapia	7 (20,6)
Pobremente (G3)	21 (61,8)	Ninguno	17 (50)
Desconocido	3 (8,8)	Desconocido	6 (17,6)
Invasión miometrial			
<50%	13 (38,2)		
>50%	18 (52,9)		
Desconocido	3 (8,8)		

Tabla 15. Características clínicas y patológicas de las pacientes con CE de alto riesgo incluidas en el estudio de CTC usando la tecnología CellSearch (Veridex).

	n (%)		n (%)
Edad (años)		Invasión linfovascular	
Media	69,4	Positiva	9 (28,1)
		Negativa	17 (53,1)
		Desconocida	6 (18,8)
Estadio FIGO		Metástasis en ganglios linfáticos	
I	4 (12,5)	Positiva	16 (50)
II	2 (6,3)	Negativa	12 (37,5)
III	10 (31,2)	Desconocida	4 (12,5)
IV	16 (50)		
Histología		Recurrencia	
Endometriode	20 (62,5)	No	20 (60)
Seroso	10 (31,2)	Sí	12 (40)
Células claras	2 (6,3)		
Grado de diferenciación		Primer tratamiento	
Bien (G1)	3 (9,4)	Radioterapia	4 (12,5)
Moderadamente (G2)	7 (21,8)	Quimioterapia	4 (12,5)
Pobrementemente (G3)	22 (68,8)	Ninguno	24 (62,5)
		Desconocido	4 (12,5)
Invasión miometrial			
<50%	9 (28,1)		
>50%	21 (65,7)		
Desconocido	2 (6,2)		

Tabla 16. Características clínico patológicas de las pacientes incluidas en el estudio 2D-DIGE.

Diagnóstico	Tumor primario		
	Diagnóstico	Grado	Estadio
Recurrencia	CE Endometriode	3	IA
Tumor primario	CE Endometriode	3	IA
Recurrencia	CE Seroso	<<<	IA
Tumor primario	CE Seroso	3	IA
Recurrencia	CE Endometriode	1	II
Tumor primario	CE Endometriode	1	II
Recurrencia	CE Endometriode	1	IB
Tumor primario	CE Endometriode	1	IB
Recurrencia	CE Endometriode	1	IA
Tumor primario	CE Endometriode	1	IA
Recurrencia	CE Endometriode	2	II
Tumor primario	CE Endometriode	2	II

Tabla 17. Características clínicas y patológicas de 140 pacientes con CE (115 tumores primarios y 25 recurrencias).

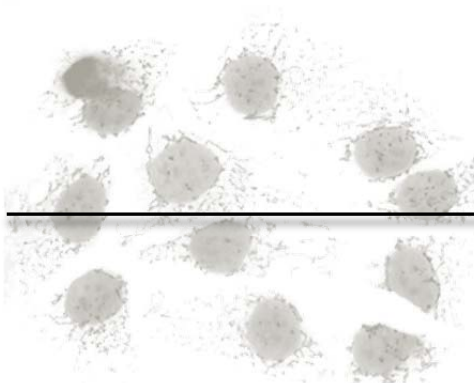
CE primario			Recurrencia			
		Casos			Casos	
Tipo	CEE	108	Tipo	CEE	25	
	CENE	7		CENE	0	
Grado	1	40	Grado	1	9	
	2	48			2	10
	3	27			3	6
Estadio	IA	36				
	IB	28				
	II	19				
	III	5				
	IV	1				
	Desconocido	26				

Tabla 18. Características clínicas y patológicas de 131 pacientes con CE (93 CEE y 38 CENE).

CEE primario			CENE primario			
		Casos			Casos	
Tipo	CEE	93	Tipo	CENE	38	
Grado	1	35	Grado	Seroso	29	
	2	39			Células claras	2
	3	20			MMMT	4
				Mixto CEE/CENE	3	
Estadio	IA	50	Estadio	IA	15	
	IB	12			II	3
	II	15			III	10
	III	15			Desconocido	10
	IV	1				

Tabla 19. Características clínicas y patológicas de 93 pacientes con CEE (43 no recurrentes y 50 recurrencias).

CEE primario no recurrente			CEE primario recurrente			
		Casos			Casos	
Tipo	CEE	43	Tipo	CEE	50	
Grado	1	21	Grado	1	14	
	2	20			2	19
	3	3			3	17
Estadio	IA	21	Estadio	IA	29	
	IB	11			IB	2
	II	8			II	7
	III	3			III	10
	IV	0			IV	2



RESULTADOS



9. RESULTADOS

9.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES REGULADOS POR EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ETV5 EN EL FRENTE DE INVASIÓN DE LOS CARCINOMAS ENDOMETRIALES

9.1.1 Análisis de expresión del factor de transcripción ETV5: zona superficial y frente de invasión tumoral

El primer objetivo de esta tesis consiste en determinar qué genes están regulados por el factor de transcripción ETV5 durante el proceso de invasión miometrial. Para ello, el primer paso fue analizar los niveles de expresión de *ETV5* en dos zonas diferenciadas de 13 carcinomas endometriales estadio IB (infiltración >50% del miometrio), la zona superficial y el frente de invasión (zona que penetra en el miometrio). Tras la extracción del RNA de las muestras tumorales y la comprobación de la integridad del mismo, se llevó a cabo un análisis mediante RT-q-PCR. Los valores de RIN de todas las muestras analizadas fueron superiores a 6 y los ratios A260/A280 fueron siempre mayores de 1.9.

Como se observa en la figura 29, mediante RT-q-PCR se encontró un incremento significativo en los niveles de mRNA del factor de transcripción *ETV5* en el frente de invasión de los carcinomas endometriales, en comparación con las zonas superficiales de los mismos.

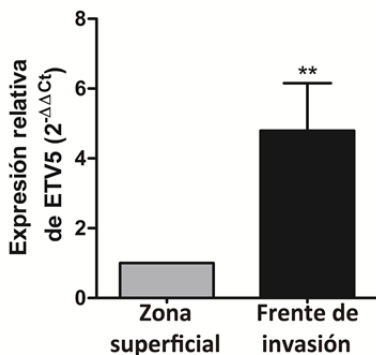


Figura 29. Histograma que representa el nivel relativo de mRNA de *ETV5* normalizado frente a *GAPDH* como gen *housekeeping*, de la zona superficial y el frente de invasión de los carcinomas endometriales, determinado mediante RT-q-PCR. (Test de Wilcoxon; ** $p < 0.01$).

9.1.2 Identificación mediante ChIP-on-Chip de los promotores génicos regulados por el factor de transcripción ETV5

Una vez comprobado que existe un incremento en la expresión de *ETV5* en el frente de invasión de los carcinomas endometriales estadio IB, nuestro objetivo fue determinar qué genes está regulando este factor durante el proceso de invasión tumoral. Para ello se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina en 6 muestras tumorales pareadas (zona superficial y frente de invasión), utilizando un anticuerpo anti-ETV5, seguido de una hibridación de microarrays de promotores génicos.

9.1.2.1 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Durante el protocolo de ChIP y, tras la unión covalente del DNA a las proteínas (crosslinking), es necesaria la fragmentación del DNA mediante un sonicador. Lo óptimo es obtener unos fragmentos de DNA con un tamaño entre 200 y 1000pb. En la figura 30 se muestra una imagen representativa de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en la que aparecen las muestras de DNA sonificado correspondientes a la zona superficial (S) y el frente de invasión (FI) de uno de los tumores endometriales analizados (n=10 parejas). Se comprobó que el tamaño de todos los fragmentos de DNA entrase dentro de este rango.

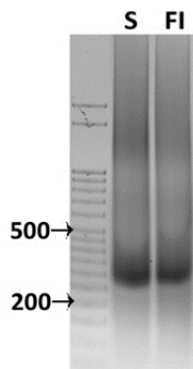


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de DNA sonificado tras crosslinking, correspondiente a muestras pareadas (zona superficial, S; frente de invasión, FI) de un carcinoma endometrial estadio IB.

Como control del proceso de inmunoprecipitación y previo a la hibridación de los arrays, se comprobó si las secuencias de DNA unidas a ETV5 estaban enriquecidas en el promotor del gen de la ciclooxigenasa 2 (*COX-2/PTGS2*) ya descrito como diana de regulación de ETV5 (Eo et al. 2008). Como se observa en la figura 31, se encontró un incremento en los niveles del promotor de la enzima *COX-2* en las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-ETV5, tanto en las muestras procedentes de la zona superficial del tumor como del frente de invasión, al compararlas con las muestras inmunoprecipitadas con IgGs inespecíficas (n=10). Además, se puede observar como en el DNA inmunoprecipitado perteneciente al frente de invasión hay un mayor enriquecimiento en el promotor de *COX-2*.

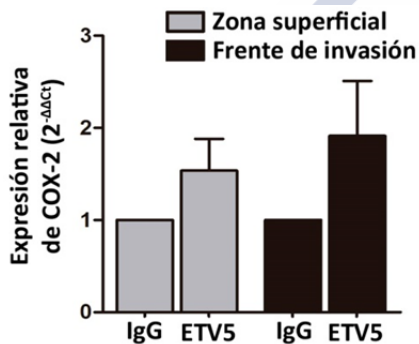


Figura 31. Niveles relativos de DNA del promotor de *COX-2* tras la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-ETV5 en la zona superficial y el frente de invasión tumoral analizados mediante RT-q-PCR y normalizados respecto al Input (Test de Wilcoxon).

9.1.2.2 Hibridación de microarrays de promotores génicos y análisis bioinformático de los datos

Tras el proceso de ChIP, se llevó a cabo la hibridación de microarrays de promotores génicos *GeneChip Human Tiling 1.0R Arrays* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Se hibridaron 12 microarrays, 6 correspondientes a muestras de la zona superficial y 6 a los frentes de invasión de los mismos tumores. El análisis de los datos con el programa *Partek Genomic Suite 6.5* (Partek Inc., Missouri, USA) se llevó a cabo utilizando el estadístico *t test*, restando la señal media de cada sonda en la zona superficial a la señal media correspondiente a la misma sonda del frente de invasión. Se seleccionaron las sondas con una señal positiva y que cumplieran el parámetro estadístico $p < 0.005$. Se obtuvo un listado de 799 promotores génicos que se introdujeron en el software *Ingenuity Pathway Analysis 2.0* (IPA; Ingenuity Systems). Curiosamente, más

del 30% de estos genes están relacionados con eventos de migración y movimiento neuronal.

Con el fin de acotar el listado de genes, se empleó el software IPA, que permite la selección de las funciones biológicas de interés. Se llevó a cabo una selección de funciones relacionadas con los procesos de migración, invasión y adhesión celular. De esta forma el listado se redujo a 104 promotores génicos a los que ETV5 se une de forma diferencial en el frente de invasión tumoral de los carcinomas endometriales (Tabla 20). Además de una implicación en vías de interacción y señalización célula-célula, desarrollo de órganos, movimiento celular y desórdenes del tejido conectivo, como principales funciones biológicas, el funcionamiento y desarrollo del sistema nervioso resultó ser la red principal asociadas a los promotores génicos regulados por ETV5 en el frente de invasión tumoral. Esta red de interacción biológica está dirigida por PKC en cooperación con AKT y ERK1/2, como se observa en la figura 32.

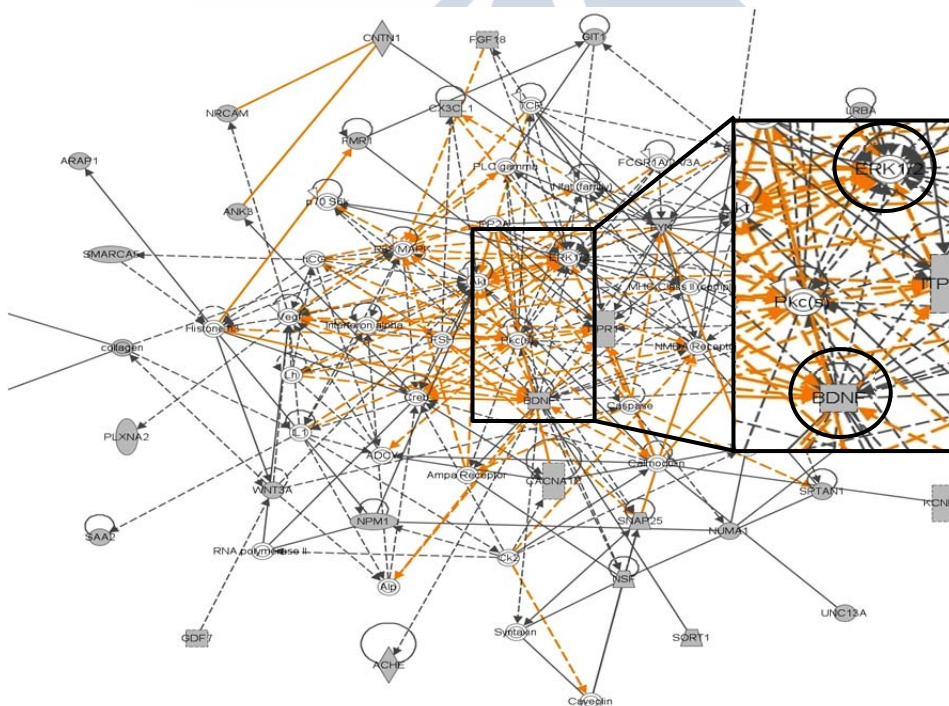


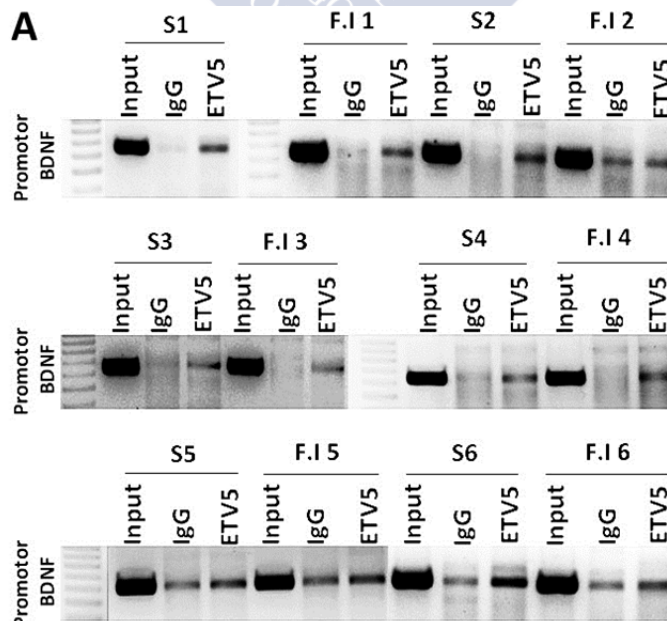
Figura 32. Análisis con el software *Ingenuity Pathway Analysis* de los genes diferencialmente regulados por ETV5 en el frente de invasión tumoral de carcinomas endometriales estadio IB.

Entre estos genes potencialmente modulados por ETV5 en el frente de invasión, encontramos el gen *BDNF* (*Brain-derived neurotrophic factor*), candidato escogido para validar su regulación por ETV5, por ocupar un lugar central en la red de interacción génica (Figura 32), lo que sugiere un papel principal en el proceso de plasticidad celular que puede estar mediando la invasión en el CE.

9.1.3 Validación in vitro de los genes candidatos

9.1.3.1 Validación mediante ChIP

Tras la selección de *BDNF* como gen diana de regulación por ETV5 se llevó a cabo su validación. Para ello se determinaron, mediante PCR, los niveles de promotor de *BDNF* inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-ETV5 (ETV5), tanto en la zona superficial (S) como en el frente de invasión (FI) tumoral, y se comparó con las muestras inmunoprecipitadas con IgG inespecíficas (IgG) como control negativo. Como se observa en la figura 33, las **muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo frente a ETV5 están enriquecidas en la región del promotor de *BDNF***. También se sometieron a la PCR las muestras totales sin inmunoprecipitar (Input) como control positivo.



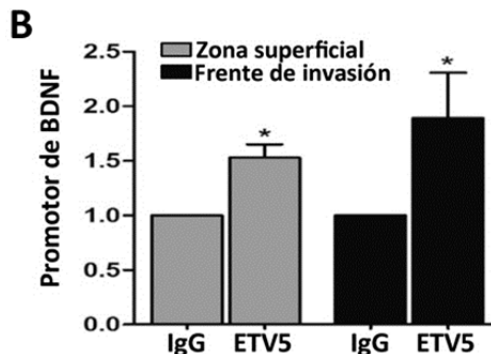


Figura 33. A, Imágenes de los productos de PCR semicuantitativa del promotor de *BDNF* en muestras pareadas sometidas a ChIP correspondientes a la zona superficial y el frente de invasión de carcinomas endometriales. Gel de agarosa al 2%. (Input: muestra sin inmunoprecipitar; IgG: muestra inmunoprecipitada con IgG inespecíficas; ETV5: muestra inmunoprecipitada con anti-ETV5). **B,** Histograma que representa los niveles de promotor de *BDNF* mediante densitometría de los diferentes geles en la zona superficial y el frente de invasión tras la corrección con el Input de DNA (Test de Wilcoxon; * $p < 0.05$).

De la misma forma que en el proceso de ChIP en tejido, la sobreexpresión de ETV5 en las líneas celulares de CE H-ETV5 e IK-ETV5, va acompañada de un incremento en los niveles de secuencia del promotor de *BDNF* inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-ETV5, en comparación con las líneas parentales (Hec1A e Ishikawa, respectivamente) (Figura 34). El análisis de PCR se llevó a cabo en las muestras inmunoprecipitadas con IgG inespecíficas (IgG) como control negativo y en las muestras no sometidas a ChIP (Input), como control positivo.

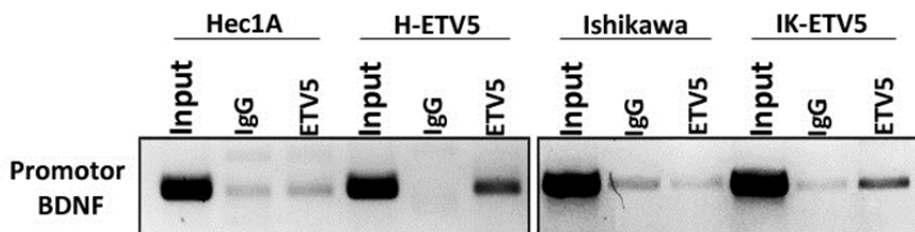


Figura 34. Imágenes de los productos de PCR semicuantitativa correspondientes al promotor de *BDNF* en muestras sometidas a ChIP correspondientes a las líneas celulares Hec1A e Ishikawa, así como las mismas células sobreexpresando ETV5 (H-ETV5 e IK-ETV5, respectivamente). Gel de agarosa al 2%. (Input: muestra sin inmunoprecipitar; IgG: muestra inmunoprecipitada con IgG inespecíficas; ETV5: muestra inmunoprecipitada con anticuerpo frente a ETV5).

9.1.3.2 Validación en muestras de tejido y líneas celulares

Una vez comprobado que la inmunoprecipitación de cromatina con un anticuerpo frente a ETV5 conlleva una mayor precipitación de secuencia génica del promotor de *BDNF*, se analizaron los niveles de expresión de este gen en muestras de tejido y en líneas celulares de CE. Se observó un **incremento significativo en los niveles de expresión de *BDNF*, a nivel de mRNA, en el frente de invasión de los carcinomas endometriales**, en comparación con las zonas superficiales de los mismos tumores (n=13). En estas muestras también se analizaron los niveles de mRNA del receptor de *BDNF*, *TrkB (NTRK2)* y se observó un incremento en el frente de invasión tumoral, aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa (Figura 35A).

Durante el proceso de validación también se comprobó la expresión de dos dianas de regulación de ETV5 que resultaron del análisis de microarrays (Tabla 20), y que pertenecen a la misma red de interacción génica que *BDNF* (Figura 32), el gen de la tirosina quinasa *FYN* y el de la molécula de adhesión *NRCAM*. En este caso también se confirma un incremento en la expresión de estos genes, a nivel de mRNA, en el frente de invasión tumoral de los carcinomas endometriales (n=13) (Figura 35B).

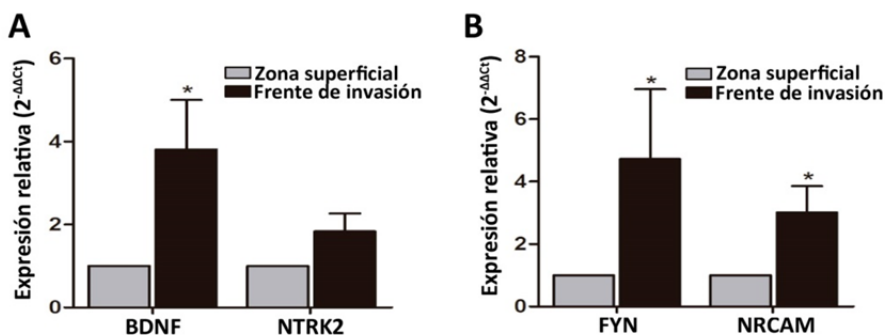


Figura 35. A, Histograma que representa los niveles relativos de mRNA de *BDNF* y *NTRK2* analizados mediante RT-q-PCR, normalizados frente a *GAPDH* como gen *housekeeping*, en muestras pareadas de la zona superficial y el frente de invasión (Test de Wilcoxon; * $p < 0.05$). **B,** Niveles relativos de mRNA de *FYN* y *NRCAM* medidos mediante RT-q-PCR, normalizados frente a *GAPDH* como gen *housekeeping* (Test de Wilcoxon; * $p < 0.05$).

La sobreexpresión de **ETV5** en la línea celular **Hec1A** (H-ETV5) va acompañada de un incremento en la expresión de **BDNF**, tanto a nivel de mRNA como de proteína, analizado mediante RT-q-PCR, WB e IF (Figura 36). Como se observa en la figura 36B el anticuerpo frente a BDNF reconoce tanto la pre-proteína (proBDNF) como la forma madura (mBDNF).

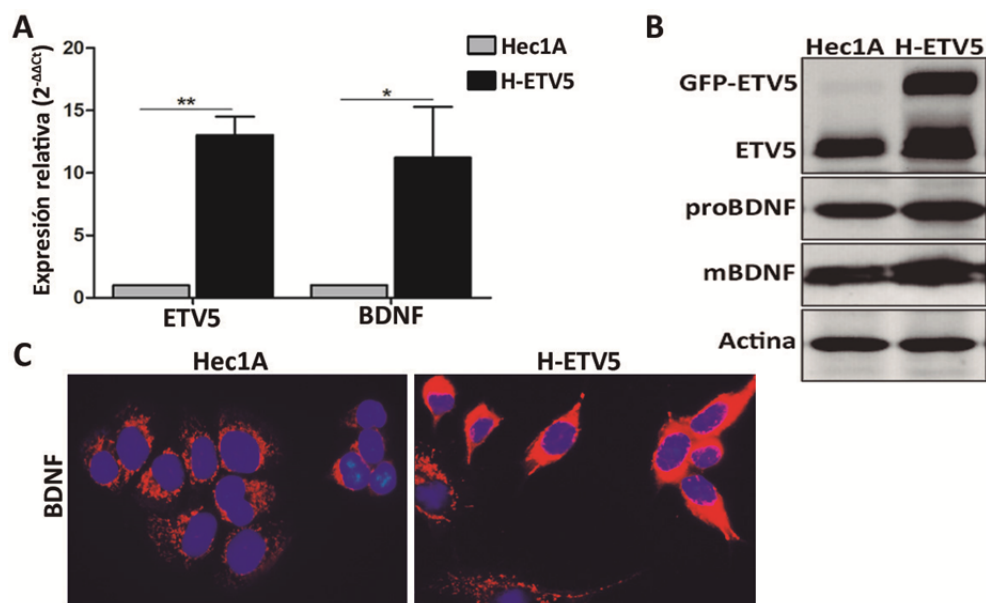


Figura 36. Análisis de expresión de ETV5 y BDNF en líneas celulares. **A**, Niveles de expresión de *ETV5* y *BDNF* analizados mediante RT-q-PCR, normalizados frente a *GAPDH* como gen *housekeeping*, en las líneas celulares Hec1A y H-ETV5. Valores relativos a Hec1A (Test de Mann-Whitney; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). **B**, Análisis de western blot con anticuerpos frente a ETV5 y BDNF en las líneas Hec1A y H-ETV5. Se ha empleado β -actina como control de carga. **C**, Imagen de inmunofluorescencia para BDNF en las líneas Hec1A y H-ETV5. Los núcleos celulares aparecen marcados con DAPI.

9.1.4 Efecto de BDNF en el fenotipo asociado a EMT

BDNF juega un papel principal en la plasticidad sináptica, regulando la morfología de axones y dendritas gracias a la unión a su receptor TrkB. Con el objetivo de comprobar si tiene un efecto en el fenotipo de las líneas celulares de CE que sobreexpresan ETV5 se llevó a cabo la inhibición de su expresión mediante un RNA de interferencia. En un principio se escogieron, mediante análisis de RT-q-PCR, las secuencias de shRNA con un mayor nivel de

inhibición que no modificaban la expresión de ETV5, seleccionándose los constructos comerciales 2, 4 y 5 para su validación mediante WB.

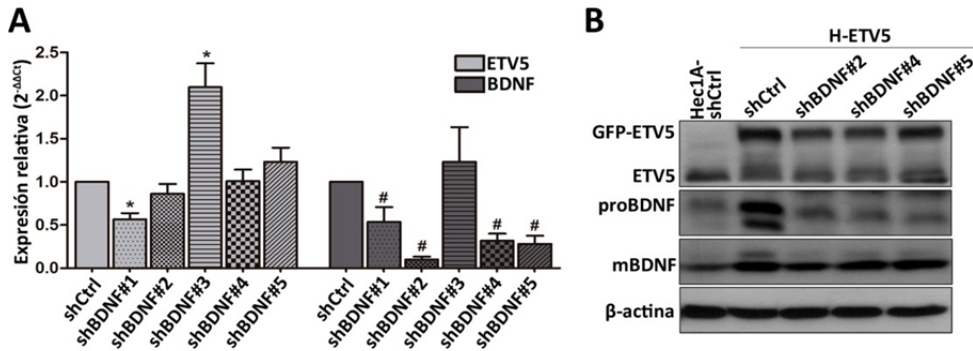


Figura 37. Análisis de expresión de ETV5 y BDNF en líneas celulares modificadas con shRNAs frente a BDNF. **A**, Niveles de expresión de *ETV5* y *BDNF* analizados mediante RT-q-PCR y normalizados frente a *GAPDH* como gen *housekeeping*, en la línea celular que sobreexpresa ETV5 (H-ETV5) establemente modificada con diferentes shRNAs frente a *BDNF* (shBDNF), respecto a la línea modificada con el shRNA control (shCtrl) (Test de Mann-Whitney; * $p < 0.05$ referente a ETV5; # $p < 0.05$ referente a BDNF). **B**, Análisis de western blot con anticuerpos frente a ETV5 y BDNF en las líneas Hec1A-shCtrl, H-ETV5-shCtrl y H-ETV5-shBDNF. Se ha empleado β -actina como control de carga.

En ensayos posteriores se empleó únicamente la línea modificada a partir del constructo shBDNF#2 ya que se obtuvo una mayor inhibición de *BDNF* sin modificar la expresión de *ETV5*.

La sobreexpresión de ETV5 en la línea Hec1A (H-ETV5-shCtrl) se traduce en un cambio fenotípico evidente, de uno epitelial a uno más mesenquimal (Figura 38A) acompañado de un incremento, a nivel de RNA y de proteína, del marcador mesenquimal vimentina, y una disminución de E-cadherina. **La inhibición de BDNF revierte el fenotipo mesenquimal promovido por la sobreexpresión de ETV5 en la línea celular Hec1A (H-ETV5-shCtrl).** A nivel proteico esto se confirma con el aumento en la expresión de E-cadherina y la disminución de vimentina (Figura 38).

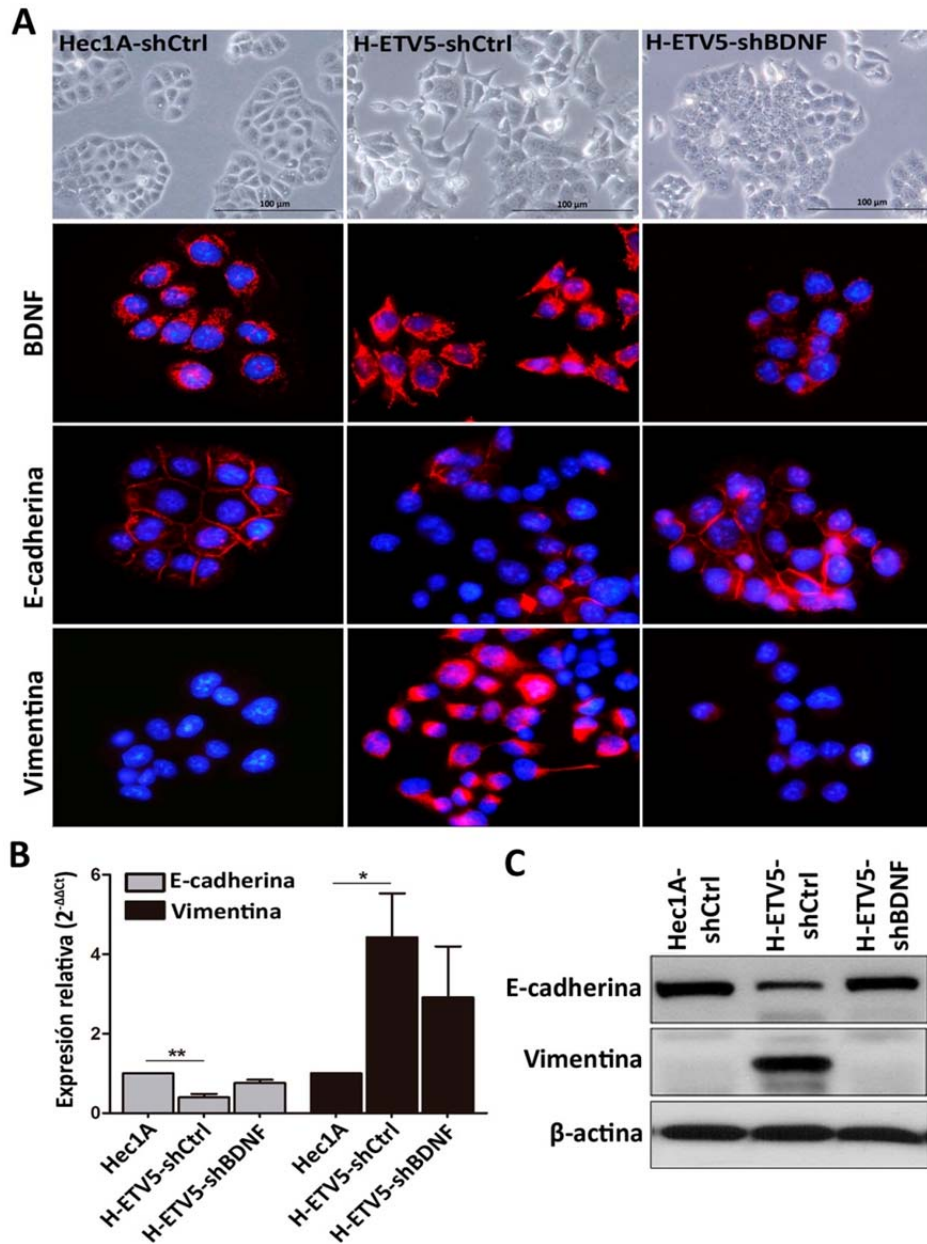


Figura 38. La inhibición de BDNF revierte el fenotipo asociado a la EMT en la línea H-ETV5-shCtrl. **A**, Imágenes de microscopía de contraste de fases que muestran la morfología asociada a la sobreexpresión de ETV5 (H-ETV5-shCtrl) y a la inhibición de BDNF (H-ETV5-shBDNF) (paneles superiores). Inmunofluorescencia con anticuerpos frente a BDNF, E-cadherina y Vimentina. Los núcleos celulares aparecen marcados con DAPI (paneles inferiores). **B**, Niveles relativos de expresión de E-cadherina y Vimentina analizados mediante RT-q-PCR y normalizados frente a *GAPDH* como gen *housekeeping*, en las líneas celulares Hec1A-shCtrl, H-ETV5-shCtrl y H-ETV5-shBDNF (Test de Kruskal-Wallis; * $p < 0.05$). **C**, Análisis de western blot con anticuerpos frente a E-cadherina y Vimentina. Se ha empleado β -actina como control de carga.

Por otro lado, se puede observar como la sobreexpresión de ETV5 induce el incremento en los niveles de expresión de genes clásicos del proceso de EMT, como *SNAIL*, *TGF- β* , *ZEB1* y *ZEB2*. Como se observa en la figura 39, el silenciamiento de BDNF revierte este incremento.

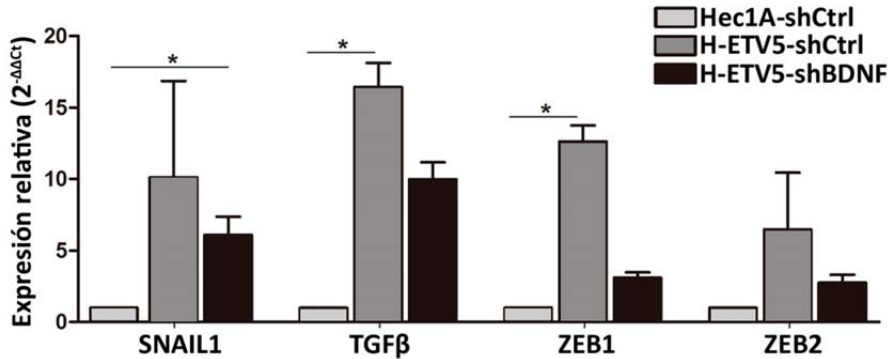


Figura 39. Análisis de expresión de *SNAIL*, *TGF- β* , *ZEB1* y *ZEB2* analizados mediante RT-q-PCR en las líneas celulares Hec1A-shCtrl, H-ETV5-shCtrl y H-ETV5-shBDNF (test de Kruskal-Wallis; * $p < 0.05$).

Resultados similares se obtuvieron con la **sobreexpresión de ETV5 en la línea celular Ishikawa (IK-ETV5-pLKO)**, observándose un **incremento en la expresión de BDNF** tanto a nivel de RNA, analizado mediante RT-q-PCR (figura 40B), como de proteína, analizado mediante inmunofluorescencia (Figura 40D). **El fenotipo mesenquimal** (caracterizado por un aumento de vimentina y una disminución de E-cadherina) **adquirido con la sobreexpresión de ETV5 se revierte al inhibir la expresión de BDNF** en la línea IK-ETV5-pLKO (Figura 40C y D).

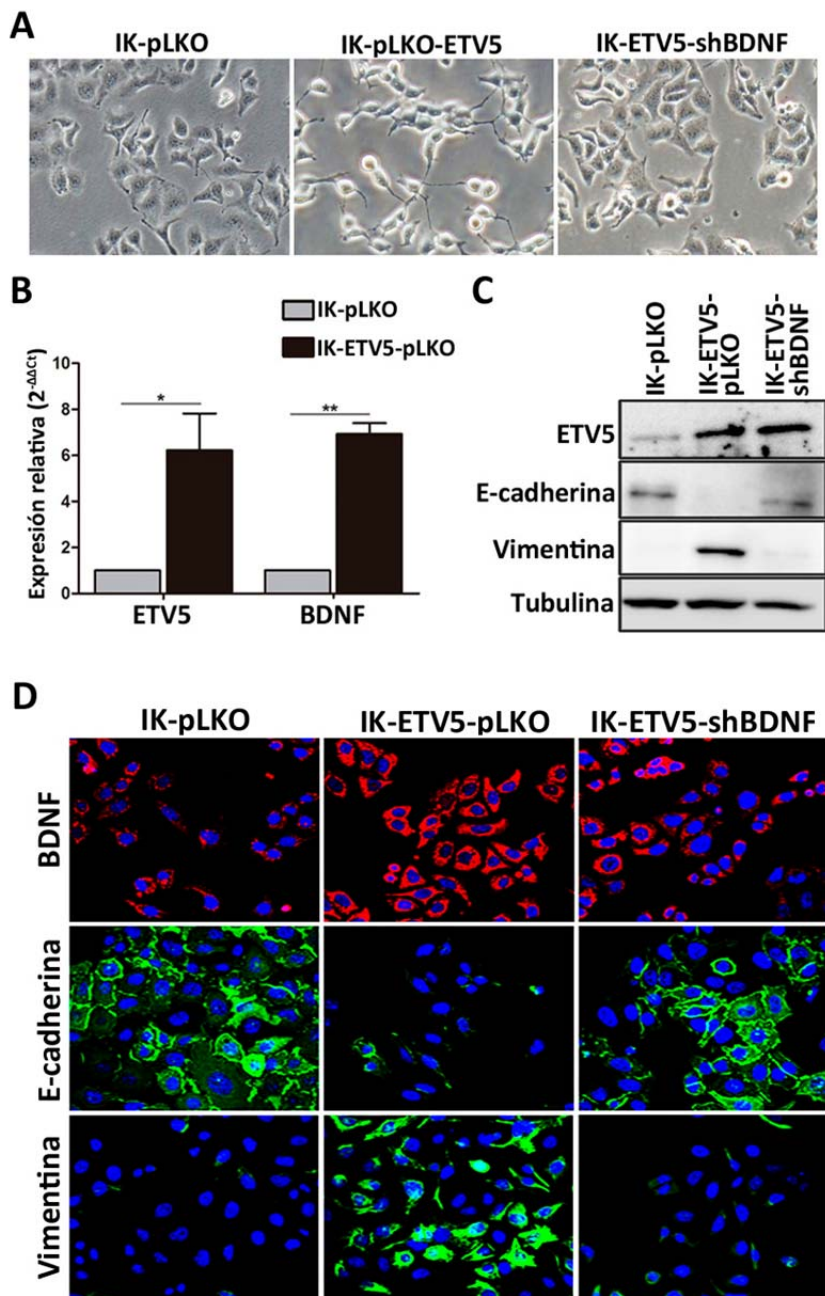


Figura 40. **A**, Imágenes de microscopía de contraste de fases que muestran la morfología asociada a la sobreexpresión de ETV5 (IK-ETV5-pLKO) y a la inhibición de BDNF (IK-ETV5-shBDNF). **B**, Niveles de expresión de *ETV5* y *BDNF* analizados mediante RT-q-PCR y normalizados frente a *GAPDH* como gen *housekeeping*, en las líneas celulares IK-pLKO e IK-ETV5-pLKO. Valores relativos a la línea IK-pLKO (Test de Mann-Whitney; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). **C**, Análisis de western blot con anticuerpos frente a ETV5, E-cadherina y Vimentina. Se ha empleado tubulina como control de carga. **D**, Inmunofluorescencia con anticuerpos frente a BDNF, E-cadherina y Vimentina. Los núcleos celulares aparecen marcados con DAPI.

9.1.5 Efecto de BDNF en la vía de ERK1/2

Como se comentó anteriormente, en el centro de la red de interacción génica que nos proporcionó el software IPA, y en la que aparecen representados los genes regulados por ETV5 en el frente de invasión tumoral, la quinasa ERK1/2 ocupa una posición central. Con el fin de confirmar la relación entre BDNF y la vía de ERK1/2, analizamos el estado de activación de la misma en muestras de tejido tumoral y en las líneas celulares de CE.

En lo referente a las muestras de tejido se analizó, mediante WB, el nivel de fosforilación de ERK1/2 en muestras pareadas (n=6) correspondientes a la zona superficial y el frente de invasión tumoral. Se observó **un incremento en la fosforilación de ERK1/2 en el frente de invasión tumoral** (Figura 41A).

En cuanto al análisis en líneas celulares, la línea con mayor expresión de ETV5 y por tanto de BDNF (H-ETV5-shCtrl), presenta una mayor activación de la vía de ERK1/2, reflejado en el nivel de fosforilación de la quinasa. Al **disminuir la expresión de BDNF** en esta línea (H-ETV5-shBDNF) se observa como **revierte el estado de fosforilación de ERK1/2** (Figura 41B).

Por otro lado, cuando la línea celular Hec1A-shCtrl se serodepriva durante 24h y posteriormente se trata con 250ng/ml de BDNF recombinante humano a diferentes tiempos, se observa un aumento en la fosforilación de ERK1/2 a partir de 30 minutos de incubación (Figura 41C).

Todo ello hace pensar **que ETV5 juega un papel en la activación de la vía ERK1/2 a través de la sobrerregulación de la expresión de BDNF.**

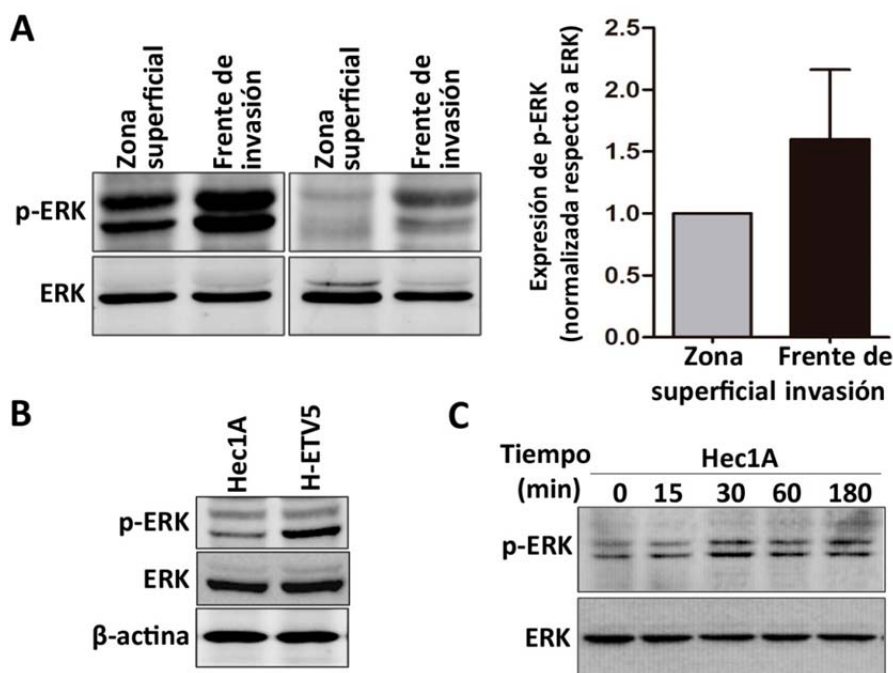


Figura 41. **A**, Imágenes representativas (panel izquierdo) y cuantificación de la intensidad de señal mediante densitometría (histograma en panel derecho; U.A.) de los diferentes análisis de western blot con anticuerpo frente a p-ERK1/2 en muestras de la zona superficial y el frente de invasión tumoral. Se ha empleado ERK total como control de carga (Test de Wilcoxon). **B**, Análisis de western blot con anticuerpo frente a p-ERK1/2 en las líneas celulares Hec1A-shCtrl, H-ETV5-shCtrl y H-ETV5-shBDNF. Se ha empleado ERK total y β -actina como control de carga. **C**, Análisis de western blot en la línea Hec1A-shCtrl que muestra los cambios en la fosforilación de ERK tras el tratamiento con BDNF recombinante en el tiempo indicados. Se ha empleado ERK total como control de carga.

9.1.6 Efecto de BDNF en la migración e invasión celular

El efecto de la sobreexpresión de ETV5 en líneas celulares de CE y su relación con la promoción de la EMT, migración e invasión ya ha sido descrito por Monge M. y Colás E. y col.. Con el fin de determinar si este efecto está mediado, al menos en parte, por la sobrerregulación de BDNF y la consecuente activación de la vía de ERK1/2, se llevaron a cabo ensayos de migración e invasión en transwell.

El silenciamiento de BDNF revierte la capacidad de migración promovida por la sobreexpresión de ETV5 en la línea celular H-ETV5-shCtrl (Figura 42A), confirmando la implicación de BDNF en este proceso. Por otro lado, la adición de BDNF recombinante a la línea silenciada para BDNF (H-ETV5-shBDNF) consigue recuperar su capacidad de migración. Sin embargo, al bloquear con inhibidores específicos, el receptor de BDNF TrkB (k252a 100nM) así como la activación de la quinasa ERK1/2 (PD98059 10 μ M) se reduce la capacidad de migración de esta línea, aun en presencia de BDNF recombinante (Figura 42B).

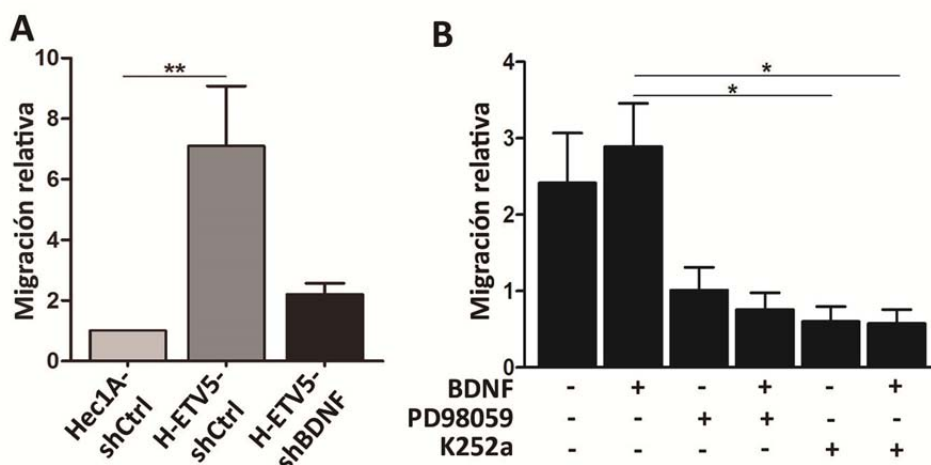


Figura 42. **A**, Ensayos de migración en transwell con las líneas celulares Hec1A-shCtrl, H-ETV5-shCtrl y H-ETV5-shBDNF cuantificado como fluorescencia relativa respecto a las células Hec1A-shCtrl (histograma en el panel izquierdo) (Test de Kruskal-Wallis; ** $p < 0.01$). **B**, Ensayos de migración en transwell con la línea H-ETV5-shBDNF en presencia o ausencia de BDNF recombinante con o sin PD98059 y K252a como tratamiento (histograma en panel derecho) (Test de Kruskal-Wallis; * $p < 0.05$).

En cuanto al proceso de invasión tumoral, los ensayos en transwell también evidencian que la promoción de la invasión debida a la sobreexpresión de ETV5 se revierte con el silenciamiento de BDNF (Figura 43).

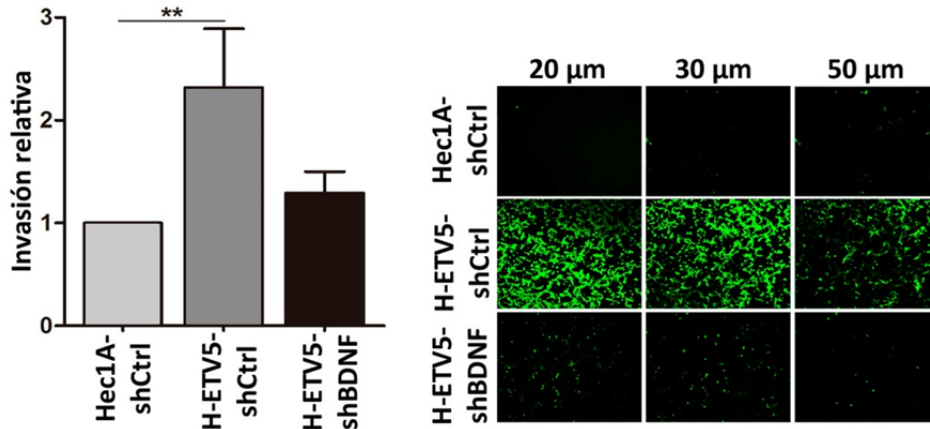


Figura 43. Cuantificación de la invasión relativa a través de los niveles de mRNA de *GAPDH* de las células invadiendo el matrigel, respecto a la línea Hec1A-shCtrl (histograma en panel izquierdo) (Test de Kruskal-Wallis; ** $p < 0.01$). C, Imágenes representativas de microscopía confocal mostrando secciones con células invadiendo el matrigel teñidas con *calcein acetoxymethyl ester*.

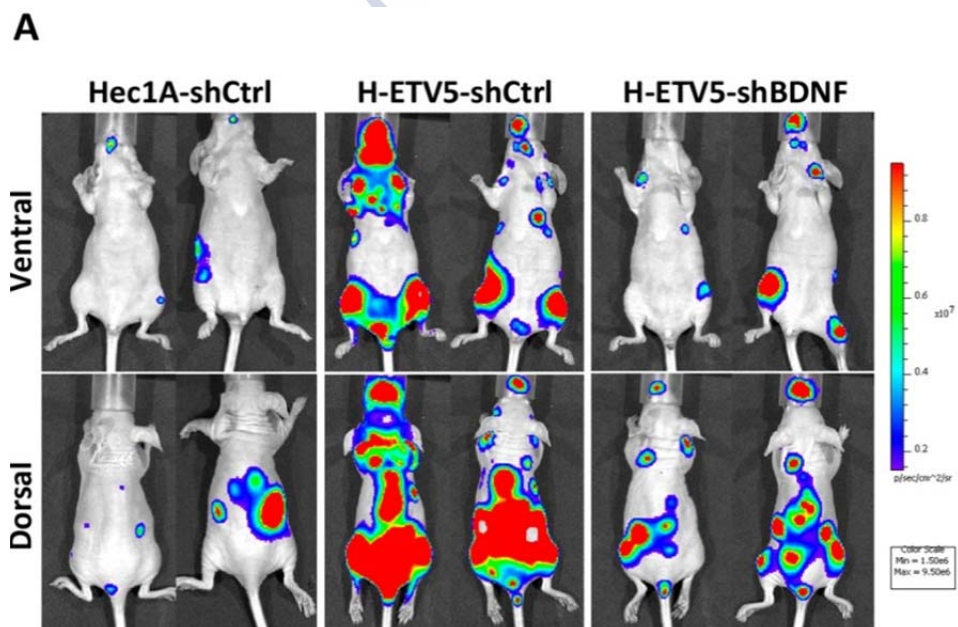
Estos resultados refuerzan la relación entre la activación de la vía de **ERK1/2 y la promoción de la invasión y, principalmente, de la migración celular mediada por el eje ETV5-BDNF-TrkB.**

9.1.7 Efecto de BDNF en el patrón de diseminación en modelos *in vivo*

Finalmente se evaluó en un modelo *in vivo* el efecto del fenotipo mesenquimal asociado a la sobreexpresión de ETV5 en la línea Hec1A (H-ETV5-shCtrl) y la reversión del mismo como consecuencia de la inhibición de BDNF (H-ETV5-shBDNF). Para ello, se comparó el patrón de diseminación tumoral en ratones inmunodeprimidos, tras la inyección intracardiaca de las tres líneas celulares. En la figura 44A se muestran las imágenes de bioluminiscencia correspondientes a dos animales representativos de cada grupo experimental, tres semanas tras la inyección de las células. Como se puede observar, la sobreexpresión de ETV5 tiene como resultado una diseminación sistémica más agresiva que en el caso de la línea parental Hec1A-shCtrl. Además, tras el sacrificio de los animales, se observó cómo los ratones inyectados con células H-ETV5-shCtrl presentaron mayor número de

tejidos afectados y una mayor intensidad de señal luminiscente en los mismos (Figura 44B), con afectación de ovarios, glándulas suprarrenales, pulmón, hígado, páncreas, grasa gonadal e intestino.

El silenciamiento de BDNF en la línea H-ETV5-shCtrl tiene como resultado la reversión del patrón de diseminación tumoral en el modelo *in vivo*, observándose un descenso tanto en el número de tejidos afectados, (hígado y páncreas sin metástasis), como en la señal de luminiscencia de los mismos (Figura 44).



B

	Ovario	G. suprarrenal	Pulmón	Hígado	Páncreas	Grasa gonadal	Intestino
Hec1A-shCtrl (n=5)	4	4	2	1	2	1	0
H-ETV5-shCtrl (n=5)	5	4	3	1	3	1	3
H-ETV5-shBDNF (n=5)	4	5	1	0	0	1	1

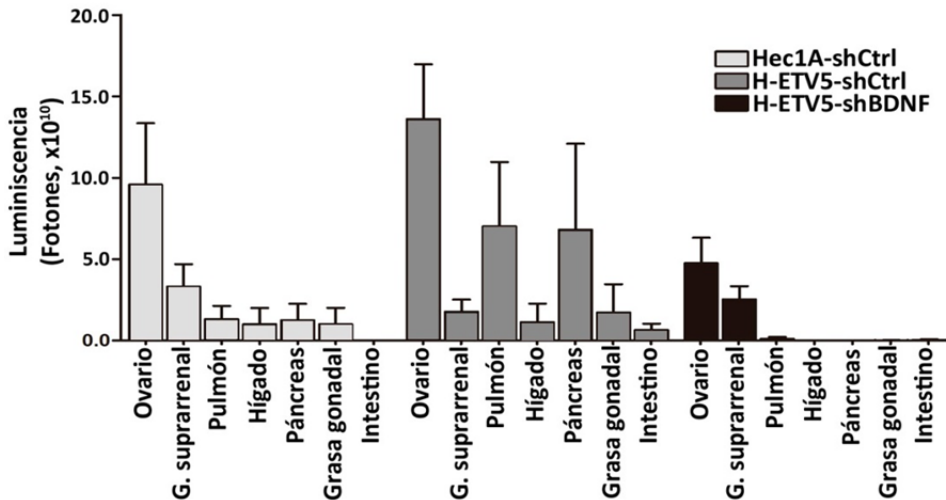


Figura 44. A, Imágenes representativas del patrón de metástasis en ratones, tras la inyección intracardiaca de células Hec1A-shCtrl (paneles izquierdos), H-ETV5-shCtrl (paneles centrales) y H-ETV5-shBDNF (paneles derechos). Imágenes de bioluminiscencia en posición ventral (paneles superiores) y dorsal (paneles inferiores). **B,** Diseminación tumoral evaluada como tejidos afectados (tabla) y como cuantificación de señal luminiscente en los implantes tumorales de los ratones inyectados con células Hec1A-shCtrl, H-ETV5-shCtrl y H-ETV5-shBDNF (histograma).

Tabla 20. 104 promotores génicos a los que se une ETV5 de forma diferencial en el frente de invasión tumoral de carcinomas endometriales, filtrados con el software IPA en relación con el proceso de invasión miometrial (migración, adhesión e invasión celular).

Gen	Nombre completo
<i>ACHE</i>	<i>Acetylcholinesterase (Yt blood group)</i>
<i>ADCYAP1R1</i>	<i>Adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) receptor type I</i>
<i>AEN</i>	<i>Apoptosis enhancing nuclease</i>
<i>ANK3</i>	<i>Ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)</i>
<i>APCDD1</i>	<i>Adenomatosis polyposis coli down-regulated 1</i>
<i>ARAP1</i>	<i>ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 1</i>
<i>AREG</i>	<i>Amphiregulin</i>
<i>ARR3</i>	<i>Arrestin 3, retinal (X-arrestin)</i>
<i>ARX</i>	<i>Aristaless related homeobox</i>
<i>ATM</i>	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
<i>BAIAP2</i>	<i>BAI1-associated protein 2</i>
<i>BDKRB2</i>	<i>Bradykinin receptor B2</i>
<i>BDNF</i>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<i>BMP2</i>	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
<i>BRCA2</i>	<i>Breast cancer 2, early onset</i>
<i>CACNA1C</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit</i>
<i>CCND2</i>	<i>Cyclin D2</i>
<i>CDH4</i>	<i>Cadherin 4, type 1, R-cadherin (retinal)</i>
<i>CDK2AP2</i>	<i>Cyclin-dependent kinase 2 associated protein 2</i>
<i>CHMP5</i>	<i>Charged multivesicular body protein 5</i>
<i>CHN1</i>	<i>Chimerin 1</i>
<i>CHRM1</i>	<i>Cholinergic receptor, muscarinic 1</i>
<i>CLVS2</i>	<i>Clavesin 2</i>
<i>CNTN1</i>	<i>Contactin 1</i>
<i>COL5A1</i>	<i>Collagen, type V, alpha 1</i>
<i>COL5A2</i>	<i>Collagen, type V, alpha 2</i>
<i>CTNND2</i>	<i>Catenin (cadherin-associated protein), delta 2</i>
<i>CX3CL1</i>	<i>Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1</i>
<i>DCN</i>	<i>Decorin</i>
<i>DLL4</i>	<i>Delta-like 4 (Drosophila)</i>
<i>EIF2A</i>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2A, 65kDa</i>
<i>EIF4B</i>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4B</i>
<i>EIF4E</i>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
<i>ESR2</i>	<i>Estrogen receptor 2 (ER beta)</i>
<i>FGF18</i>	<i>Fibroblast growth factor 18</i>
<i>FLNA</i>	<i>Filamin A, alpha</i>
<i>FMR1</i>	<i>Fragile X mental retardation 1</i>
<i>FYN</i>	<i>FYN oncogene related to SRC, FGR, YES</i>
<i>GAB2</i>	<i>GRB2-associated binding protein 2</i>
<i>GBX2</i>	<i>Gastrulation brain homeobox 2</i>

Tabla 20. Continuación	
<i>GDF7</i>	<i>Growth differentiation factor 7</i>
<i>GDF9</i>	<i>Growth differentiation factor 9</i>
<i>GIT1</i>	<i>G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 1</i>
<i>GRIK1</i>	<i>Glutamate receptor, ionotropic, kainate 1</i>
<i>GRM1</i>	<i>Glutamate receptor, metabotropic 1</i>
<i>GRM3</i>	<i>Glutamate receptor, metabotropic 3</i>
<i>HMGCL</i>	<i>3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA lyase</i>
<i>HPS4</i>	<i>Hermansky-Pudlak syndrome 4</i>
<i>IFT122</i>	<i>Intraflagellar transport 122 homolog (Chlamydomonas)</i>
<i>IGF1R</i>	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
<i>IK</i>	<i>IK cytokine, down-regulator of HLA II</i>
<i>IL12A</i>	<i>Interleukin 12A</i>
<i>IL16</i>	<i>Interleukin 16</i>
<i>IL23A</i>	<i>Interleukin 23, alpha subunit p19</i>
<i>INA</i>	<i>Internexin neuronal intermediate filament protein, alpha</i>
<i>ITGA2B</i>	<i>Integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)</i>
<i>ITPR1</i>	<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1</i>
<i>ITPR2</i>	<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 2</i>
<i>JAK2</i>	<i>Janus kinase 2</i>
<i>KCNN3</i>	<i>Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3</i>
<i>KIF3A</i>	<i>Kinesin family member 3A</i>
<i>LRBA</i>	<i>LPS-responsive vesicle trafficking, beach and anchor containing</i>
<i>LTBP2</i>	<i>Latent transforming growth factor beta binding protein 2</i>
<i>LYN</i>	<i>V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog</i>
<i>LZTS2</i>	<i>Leucine zipper, putative tumor suppressor 2</i>
<i>MBL2</i>	<i>Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble</i>
<i>NCDN</i>	<i>Neurochondrin</i>
<i>NCK2</i>	<i>NCK adaptor protein 2</i>
<i>NKX2-8</i>	<i>NK2 homeobox 8</i>
<i>NPM1</i>	<i>Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)</i>
<i>NRCAM</i>	<i>Neuronal cell adhesion molecule</i>
<i>NSF</i>	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
<i>NUMA1</i>	<i>Nuclear mitotic apparatus protein 1</i>
<i>OPRM1</i>	<i>Opioid receptor, mu 1</i>
<i>PARG</i>	<i>Poly (ADP-ribose) glycohydrolase</i>
<i>PCP2</i>	<i>Purkinje cell protein 2</i>
<i>PHGDH</i>	<i>Phosphoglycerate dehydrogenase</i>
<i>PICALM</i>	<i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>
<i>PLXNA2</i>	<i>Plexin A2</i>
<i>RDX</i>	<i>Radixin</i>

Tabla 20. Continuación	
<i>RNF128</i>	<i>Ring finger protein 128, E3 ubiquitin protein ligase</i>
<i>ROBO2</i>	<i>Roundabout, axon guidance receptor, homolog 2 (Drosophila)</i>
<i>RORC</i>	<i>RAR-related orphan receptor C</i>
<i>RUNX1</i>	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
<i>SAA2</i>	<i>Serum amyloid A2</i>
<i>SCN4B</i>	<i>Sodium channel, voltage-gated, type IV, beta subunit</i>
<i>SERP1</i>	<i>Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1</i>
<i>SHARPIN</i>	<i>SHANK-associated RH domain interactor</i>
<i>SLITRK2</i>	<i>SLIT and NTRK-like family, member 2</i>
<i>SMARCA5</i>	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5</i>
<i>SNAP25</i>	<i>Synaptosomal-associated protein, 25kDa</i>
<i>SORT1</i>	<i>Sortilin 1</i>
<i>SPP1</i>	<i>Secreted phosphoprotein 1</i>
<i>SPTA1</i>	<i>Spectrin, alpha, erythrocytic 1 (elliptocytosis 2)</i>
<i>SYN1</i>	<i>Synapsin I</i>
<i>TNFAIP6</i>	<i>Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6</i>
<i>TUBGCP2</i>	<i>Tubulin, gamma complex associated protein 2</i>
<i>TUBGCP6</i>	<i>Tubulin, gamma complex associated protein 6</i>
<i>UBE2D3</i>	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3</i>
<i>UCN</i>	<i>Urocortin</i>
<i>UGCG</i>	<i>UDP-glucose ceramide glucosyltransferase</i>
<i>UNC13A</i>	<i>Unc-13 homolog A (C. elegans)</i>
<i>WNT3A</i>	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 3A</i>
<i>XAB2</i>	<i>XPA binding protein 2</i>

9.2 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CÉLULAS TUMORALES DE PACIENTES CON CARCINOMA ENDOMETRIAL DE ALTO RIESGO

9.2.1 Comprobación de la presencia de CTC en pacientes con CE de alto riesgo

El primer objetivo planteado en el segundo apartado de esta tesis consiste en la comprobación de la presencia de CTC en pacientes con CE de alto riesgo. Para ello se emplearon dos técnicas, por un lado la tecnología CellSearch (Veridex) y por otro el inmunoaislamiento seguido de RT-q-PCR. Ambas metodologías utilizan un aislamiento basado en anticuerpos que reconocen la molécula EpCAM, por lo que en un principio se confirmó la expresión de esta molécula epitelial en los tumores primarios de las pacientes incluidas en el estudio (Figura 45).

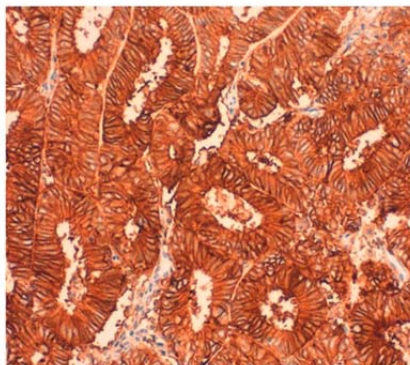


Figura 45. Imagen representativa de un carcinoma primario de una paciente incluida en el estudio, positivo para el marcaje con anticuerpo frente a EpCAM.

9.2.1.1 Análisis de la presencia de CTC mediante la tecnología CellSearch (Veridex)

El aislamiento de CTC se llevó a cabo en 7.5 ml de sangre periférica de 32 mujeres con CE de alto riesgo (CE estadio IB G3, estadio IV y recurrencias) empleando la tecnología semiautomática CellSearch (Veridex, Janssen Diagnostics, SouthRaritan, NJ, USA). Del total de pacientes, 7 presentaron CTC (21.9%) con un rango de 1 a 10 CTC. Es interesante mencionar que las pacientes con tumores de mayor grado histológico presentaron niveles más elevados de CTC (31.5% en tumores G3 frente al 10% en G1 ó 2). Por otro lado, los **mayores niveles de CTC se encontraron en las pacientes con**

tumores en estadio IV, al compararlas con estadios más tempranos (Figura 46).

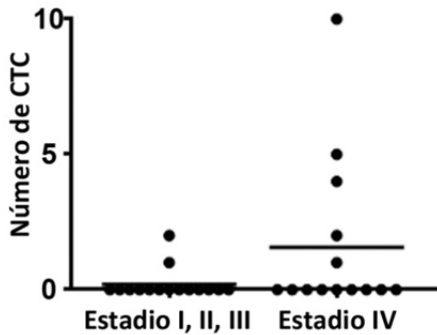


Figura 46. Cuantificación de CTC mediante la tecnología CellSearch en pacientes con CE de alto riesgo estadio FIGO I a III frente a pacientes con estadio tumoral IV y recurrencias.

9.2.1.2 Análisis de la presencia de CTC mediante inmunoaislamiento seguido de RT-q-PCR

El aislamiento de CTC se llevó a cabo en la sangre periférica de 34 mujeres con CE de alto riesgo (CE estadio IB G3, estadio IV y recurrencias) y en 27 donantes sanas. En este caso se empleó el inmunoaislamiento con partículas magnéticas unidas al anticuerpo anti-EpCAM con un método manual.

Tras el inmunoaislamiento, se extrajo el RNA de las CTC y después del proceso de preamplificación se analizaron los niveles de mRNA del gen *GAPDH* como marcador de celularidad. Los niveles de *GAPDH* en cada muestra incluyen tanto a las CTC aisladas como a las células sanguíneas unidas inespecíficamente. Para eliminar este fondo inespecífico en cada muestra analizamos los niveles de mRNA, mediante RT-q-PCR, del marcador de células hematopoyéticas *CD45* y se empleó como normalizador. Como se observa en la figura 47A, los niveles de mRNA de *GAPDH* en el grupo de pacientes fueron significativamente superiores al grupo de los controles sanos, mientras que los niveles de *CD45* no presentaron diferencias significativas (Figura 47B). Esto indica, por un lado, que **se ha aislado una población celular extra a partir de la sangre de los pacientes**, en comparación con los controles

sanos, y por el otro, que el nivel de inespecificidad en el proceso de inmunoadesamiento es similar en ambos grupos.

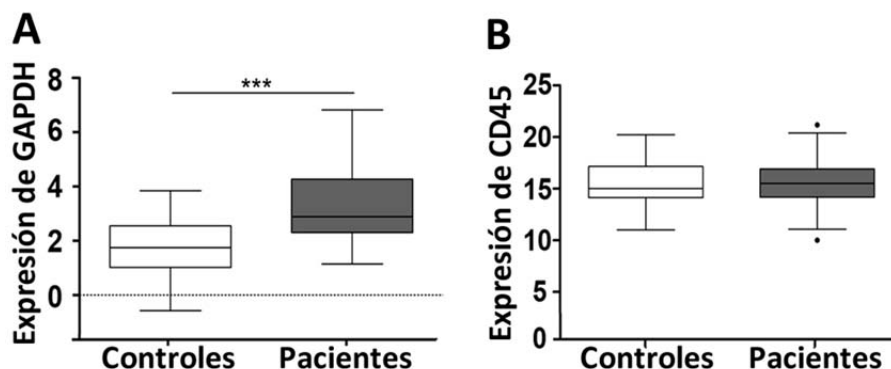


Figura 47. A, Niveles de mRNA de *GAPDH*, normalizados con *CD45*, en las CTC aisladas a partir de controles y pacientes, analizados mediante RT-q-PCR (Test de Mann-Whitney, ***p<0.001). B, Niveles de mRNA de *CD45* en las CTC aisladas de controles y pacientes, analizados mediante RT-q-PCR (Test de Mann-Whitney).

9.2.2 Determinación del perfil de expresión génica de las CTC de pacientes con CE de alto riesgo

Una vez confirmada la presencia de CTC en la sangre de pacientes con CE de alto riesgo, se analizó el perfil de expresión de estas células, analizando un panel de genes relacionados con vías de señalización asociadas a la progresión del CE, con el proceso de EMT, con las características de células madre y con vías hormonales (Tabla 12 de los M&M).

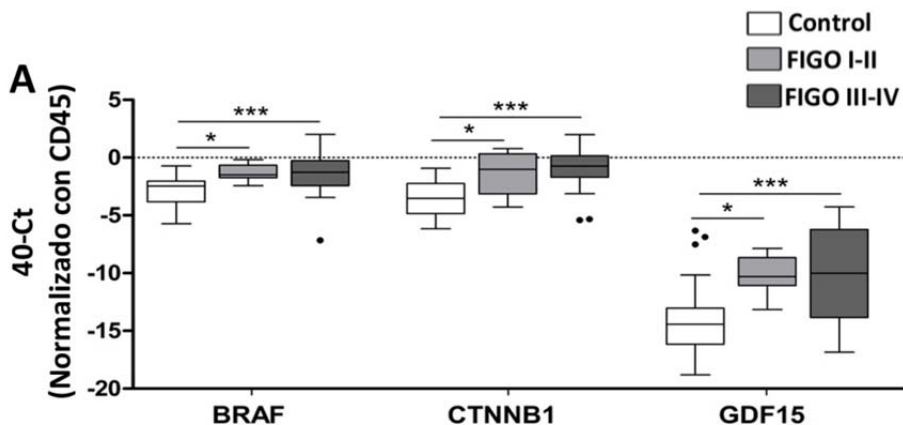
9.2.2.1 Comprobación previa de la expresión génica

En un principio, se llevó a cabo una comprobación de la expresión de todos los genes seleccionados, con el fin de descartar en posteriores evaluaciones aquellos en los que no se observase amplificación. Para ello, se seleccionaron aleatoriamente 6 muestras de controles sanos y 6 correspondientes a pacientes, y se analizó la expresión del set completo de genes, resultando en la exclusión de *CD133*, *GPER*, *HSD17B1*, *PGR* y *TERT*, al no presentar señal de amplificación.

9.2.2.2 Agrupación de los pacientes de acuerdo con el estadio FIGO

Posteriormente se analizaron los niveles de expresión del set restante de genes y se identificaron aquellos genes con unos niveles significativamente diferentes en las CTC del grupo de pacientes, comparándolos con el *background* de expresión en los controles.

Para llevar a cabo este análisis las pacientes se agruparon en función del estadio tumoral FIGO (I-II frente a III-IV). Entre los genes relacionados con la patogénesis en el CE, se encontró un **incremento significativo en los niveles de mRNA de *BRAF*, *CTNNB1*, *GDF15*, *PIK3CA*, *RELA* y *RUNX1* en el grupo de pacientes con estadios III-IV, en comparación con los controles sanos** (Figura 48A). En cuanto a los genes relacionados con rutas hormonales, se encontró un incremento significativo en el nivel de mRNA de *STS* en estadios avanzados al compararlo con controles (Figura 48B), al igual que en lo que se refiere a los genes relacionados con características de células madre, *ALDH* y *CD44* (Figura 48C). Hay que señalar, que a pesar de que en todos los casos las mayores diferencias se encontraron entre el grupo de controles y los estadios FIGO III-IV, para los genes *BRAF*, *CTNNB1* y *GDF15* también se encontró un incremento significativo en los estadios FIGO I-II con respecto a los controles (Figura 48A).



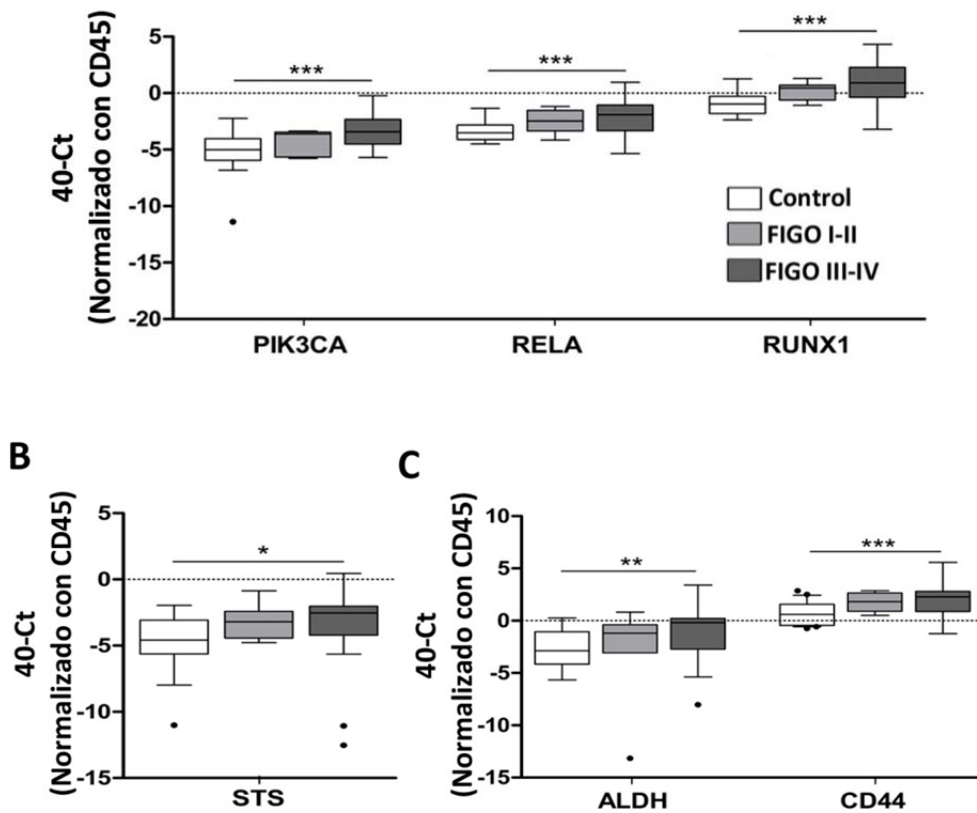


Figura 48. Perfil de expresión génica en CTC de CE. **A**, Niveles de mRNA de los genes alterados en CE, **B**, rutas hormonales y **C**, características de célula madre en CTC de pacientes con CE de alto riesgo. Grupo de controles (cajas blancas), estadio FIGO I-II (cajas gris claro), estadio FIGO III-IV (cajas gris oscuro) (Test de Kruskal-Wallis; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Hay que resaltar que se encontró un **incremento significativo** en los niveles de mRNA de prácticamente el set completo de genes seleccionados como **marcadores del proceso de EMT** (*ETV5*, *NOTCH1*, *SNAI1*, *TGFB1*, *ZEB1* y *ZEB2*), en las CTC de pacientes al compararlo con controles sanos (Figura 49).

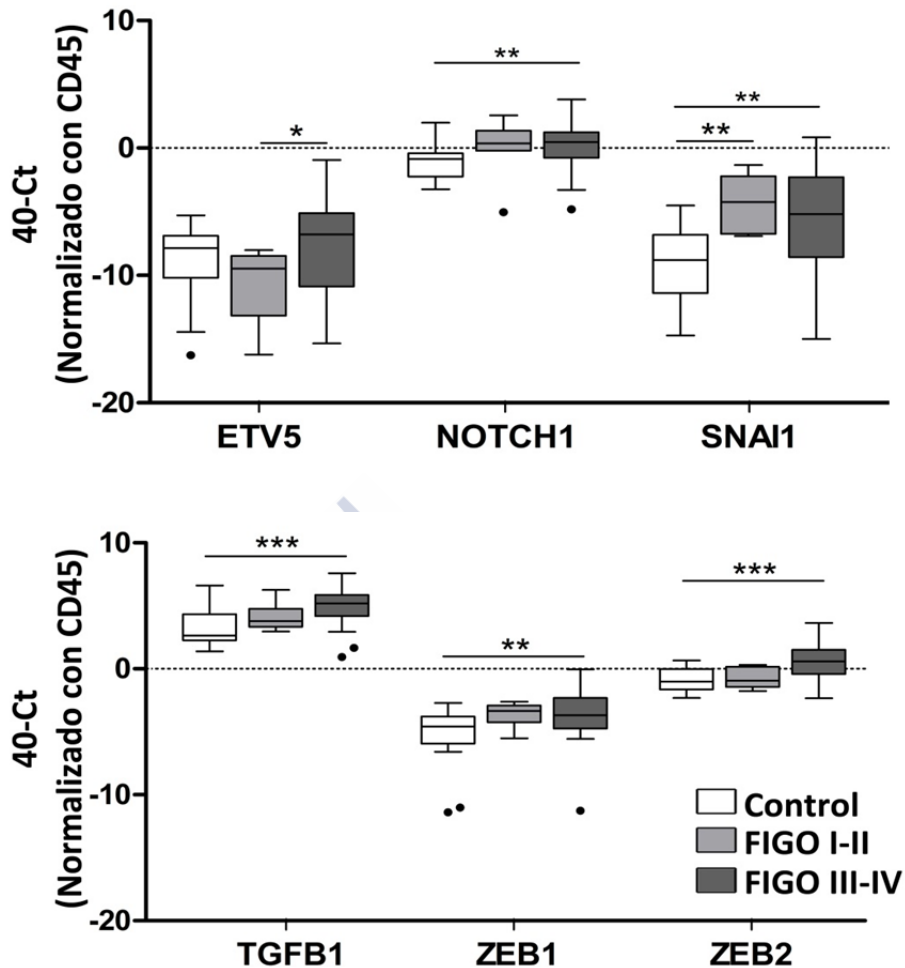


Figura 49. Niveles de mRNA, en CTC de pacientes con CE, de los genes relacionados con el proceso de EMT, en comparación con los niveles en controles sanos. Grupo de controles (cajas blancas), estadio FIGO I-II (cajas gris claro), estadio FIGO III-IV (cajas gris oscuro) (Test de Kruskal-Wallis; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

9.2.3 Análisis de correlación CellSearch- RT-q-PCR

A continuación, se llevó a cabo un estudio de correlación entre los resultados obtenidos del perfil de expresión mediante RT-q-PCR y la cuantificación del número de CTC mediante CellSearch. Se encontró un incremento en los niveles de mRNA de *GDF15* y de los marcadores de EMT *ETV5* y *TGFB1* en las CTC de las pacientes en las que se había detectado más de una CTC por CELLSearch (Figura 50).

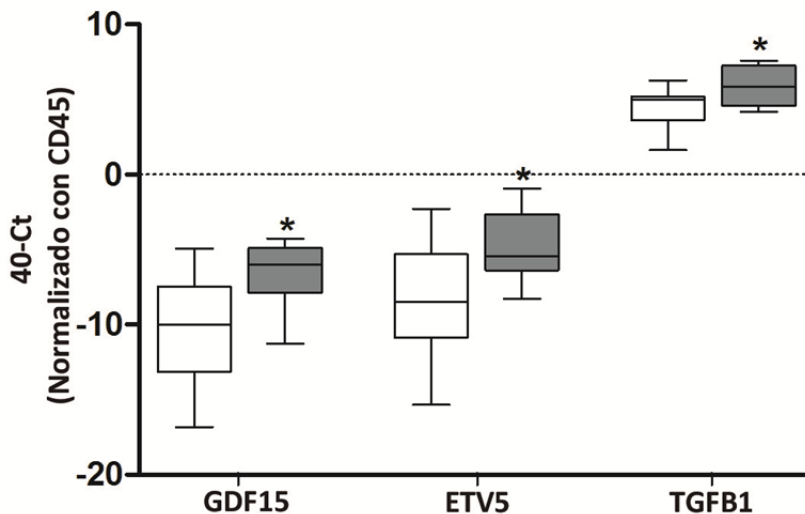


Figura 50. Niveles de mRNA de *GDF15*, *ETV5* y *TGFβ1* en el grupo de pacientes negativos (cajas blancas) y positivos (cajas grises) para la detección de CTC mediante la tecnología CellSearch (Test de Mann-Whitney; * $p < 0.05$).

9.2.4 Análisis de correlación con características clinicopatológicas

Se llevó a cabo un análisis de correlación entre los niveles de mRNA de los genes analizados en CTC y las características clinicopatológicas de las pacientes incluidas en el estudio (Tabla 14 de los M&M). Se encontró un **incremento en los niveles de mRNA de *BRAF*, *PIK3CA*, *RELA*, *RUNX1*** (implicados en la carcinogénesis endometrial) y ***CD44*** (marcador de células madre) **en las CTC aisladas de pacientes en las que el tumor infiltraba más del 50% del miometrio** (n=18), en comparación con las que presentaban una invasión menor del 50% (n=13).

Además, se encontró un **incremento significativo en los niveles de mRNA de *RUNX1* y de los marcadores de EMT *ETV5* y *ZEB2*** cuando las **pacientes se agrupaban en presencia de enfermedad metastásica** (FIGO IV; n=17) frente a pacientes de alto riesgo con tumores en estadio FIGO I a III (n=17).

9.2.5 Análisis de expresión en tumor primario y ganglios afectados

Finalmente, en una pequeña serie de muestras pareadas de tumores primarios y ganglios linfáticos afectados (n=6) se comprobó la expresión de los genes que caracterizaron la población de CTC de pacientes. La expresión del gen *ZEB2* mostró los mejores resultados (p=0.09). Actualmente se está reclutando un mayor número de muestras para ampliar este estudio.

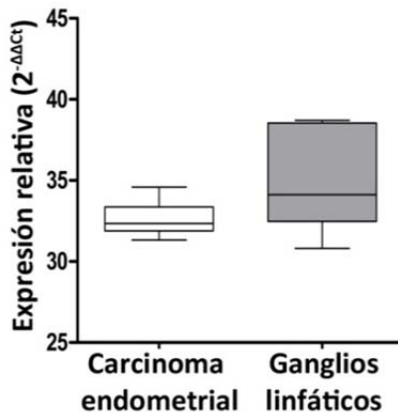


Figura 51. Expresión de *ZEB2* en muestras pareadas de carcinoma endometrial primario (caja blanca) y ganglios linfáticos afectados (caja gris), mediante RT-q-PCR (Test de Wilcoxon).

9.2.6 Modelo *in vivo* de diseminación de CTC

Con el fin de determinar si el fenotipo invasivo promovido por la sobreexpresión de *ETV5* en el frente de invasión tumoral tiene una implicación en las CTC de las pacientes con CE, se analizó el patrón de expresión génica de las CTC en las líneas de CE Hec1A y la misma sobreexpresando *ETV5* (Hec1A-*ETV5*). Como se observa en la figura 52A, la sobreexpresión de *ETV5* en la línea Hec1A tiene como resultado un incremento en la expresión de genes relacionados con EMT, al igual que se había visto en las CTC de pacientes.

Además, se determinó el impacto de la sobrerregulación de *ETV5* y el consecuente fenotipo de EMT en un modelo *in vivo* de diseminación sistémica que mimetizara lo que ocurre en una paciente con CTC. Para ello se comparó el alcance de la diseminación en ratones a los que se les inyectaron de forma IC las líneas celulares de CE Hec1A y Hec1A-*ETV5*, modificadas para la

expresión estable de luciferasa. Como se ve en la figura 52B, la sobreexpresión de **ETV5** en la línea **Hec1A (Hec1A-ETV5)** genera tanto un **patrón de diseminación más agresivo** como un **mayor número de focos metastásicos** (Figura 52C y D).

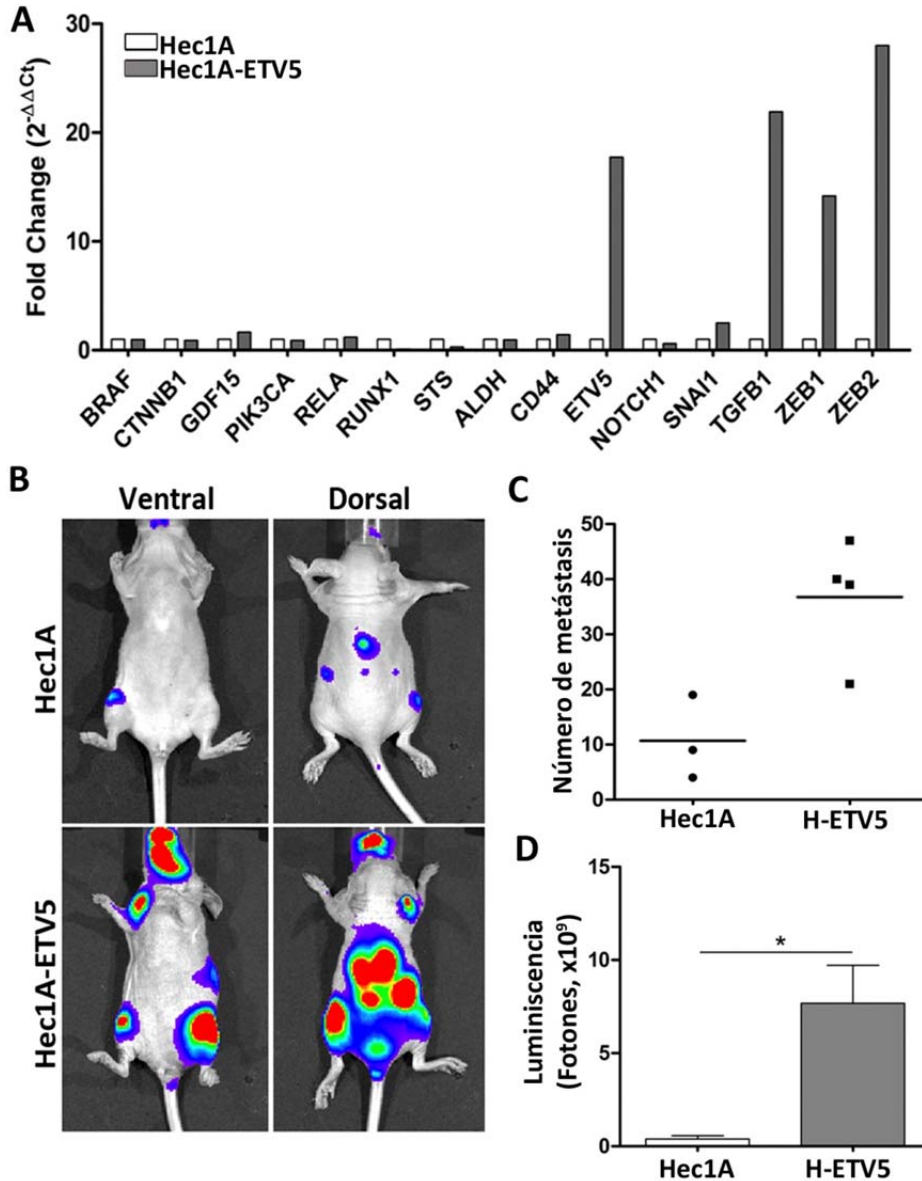


Figura 52. A, Análisis de expresión del perfil de CTC en las líneas Hec1A y Hec1A-ETV5, analizado mediante RT-q-PCR. Los datos se presentan como *fold change* en la expresión del gen relativo a la expresión de *GAPDH* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). B, Imágenes representativas de bioluminiscencia en ratones inoculados con células Hec1A (paneles superiores) o Hec1A-ETV5 (paneles inferiores) mediante inyección IC. C, Extensión de la diseminación evaluada como número de metástasis y D, cuantificación de luminiscencia en las metástasis.

9.3 BÚSQUEDA DE MARCADORES CON VALOR PREDICTIVO DE RECURRENCIA EN PACIENTES CON CARCINOMA ENDOMETRIAL

9.3.1 Identificación de marcadores mediante análisis 2D-DIGE

Inicialmente, en el laboratorio del Dr. Jaume Reventós se llevó a cabo una comparación entre muestras pareadas correspondientes a lesiones primarias de CE y recurrencias (n=12), mediante análisis proteómico 2D-DIGE. Se seleccionaron las proteínas expresadas de forma diferencial que cumplieran el criterio $-1.5 \geq x \geq 1.5$; $p \leq 0.05$ (Figura 53A). Entre todas las proteínas se escogió ANXA2 para posteriores validaciones, debido a que el ratio Tumor/Recurrencia es negativo, es decir, la señal es mayor en recurrencias que en tumor primario. Además, el resto de candidatos identificados están bajo debate como predictores de recurrencia en otros tipos de cáncer.

A continuación, en el laboratorio del Dr. Xavier Matias-Guiu, se evaluó la expresión de ANXA mediante IH en microarrays de tejido incluyendo 115 carcinomas endometriales primarios y 25 recurrencias post-radioterapia. Se analizaron dos cilindros diferentes por caso y se asignaron valores de 0 (no inmunorreacción) a 300 (máxima inmunorreacción). Se encontró un incremento significativo en la inmunorreacción frente a ANXA2 en las muestras correspondientes a las recurrencias post-radiación, con una media de 221.6 (*histoscore*; rango 90-295), en comparación con la señal encontrada en los carcinomas primarios (media 155.4; rango 0-295) ($p < 0.0001$; Figura 53B).

A

NLD Id	# acces (Uniprot)	Gene name	Identification	Av. Ratio (T/R)	Paired T-test	Theor. pl	Observed pl	Theor. MW (Da)	Observed app. MW (kDa)	Mascot Score	# Pept. matched	% Seq
ID: 1075	P60709	ACTB	Actin, cytoplasmic 1	1.69	0.032	5,55	5.34-6.27	40536.00	37-50	72.00	10,00	30,00
ID: 0845	P00352	ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase family 1 member A1	3,12	0.034	6,29	6.27-7.13	55323.00	50-75	187,00	28,00	50,00
ID: 0026	P07355	ANXA2	Annexin A2	-1,80	0.021	7,56	7.13-7.95	38677.00	=37	227,00	31,00	65,00
ID: 1554	P02647	APOA1	ApoA1 protein	2,12	0.036	5,56	4.73-5.34	30759.00	20-25	106,00	12,00	36,00
ID: 1516	Q8NCW5	APOA1BP	Apolipoprotein A-I-binding protein	1,71	0.020	6,82	<5.34	20646.00	=25	110,00	7,00	39,00
ID: 1585	P02794	FTH1	Ferritin heavy chain	2,00	0.021	5,52	4.73-5.34	20245.00	20-25	89,00	6,00	24,00
ID: 0141	P52272	HNRNP1M	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	-2,20	0.025	8,84	>7.95	73333.00	=75	108,00	25,00	39,00
ID: 1695	P00738	HP	Haptoglobin	-3,25	0.044	6,13	=6.27	45861.00	<20	71,00	8,00	30,00
ID: 0308	P14625	HSP90B1	Endoplasmic	-1,52	0.042	4,73	4,73	90309.00	90,30	82,00	7,00	11,00
ID: 0599	P11021	HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	-1,59	0.045	5,07	4.73-5.34	72402.00	=75	332,00	34,00	51,00
ID: 1495	P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1	2,23	0.037	5,98	5.34-6.27	22826.00	=25	113,00	11,00	56,00
ID: 1545	O00264	PGRMC1	Membrane-associated progesterone receptor component 1 (mPR)	2,41	0.001	4,56	<4.73	21772.00	20-25	89,00	6,00	31,00
ID: 0913	P14618	PKM2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	6,92	0.043	7,96	6.27-7.13	58512.00	50-75	130,00	15,00	37,00
ID: 1228	P37837	TALDO1	Transaldolase	2,05	0.014	7,67	=6.37	37778.00	=25	178,00	23,00	45,00
ID: 0441	P21980	TGM2	transglutaminase 2	2,27	0.039	5,11	4.73-5.34	78420.00	=100	59,00	11,00	19,00

B

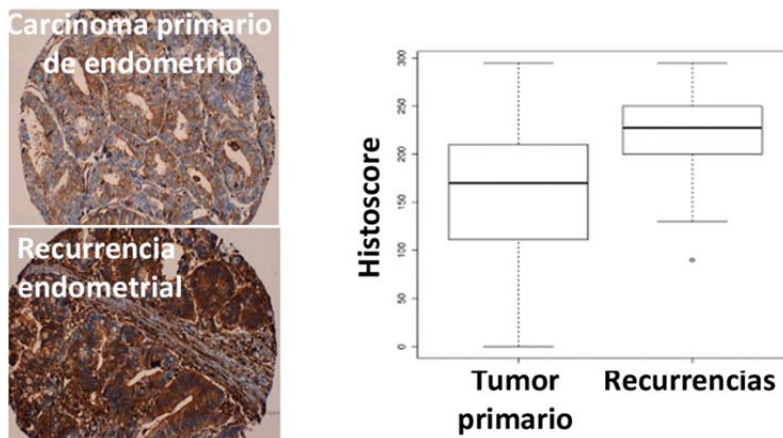


Figura 53. A, Listado de proteínas identificadas en el análisis 2D-DIGE comparando muestras de tumor primario y recurrencias de CE. **B**, Imágenes representativas del marcaje para ANXA2 mediante IH en arrays de tejido correspondientes a tumor primario y recurrencia de CE (paneles izquierdos). Evaluación estadística de ANXA2 como marcador de recurrencia en CE (panel derecho).

9.3.2 Validación *in vitro* de ANXA2 mediante RNA de interferencia: implicación en resistencia a RT y QT

Tras la selección de ANXA2 como posible marcador predictor de recurrencia en cáncer de endometrio se analizó, *in vitro*, su papel durante el proceso de metástasis. Primero se determinó si los carcinomas endometriales con mayores niveles de ANXA2 poseían una ventaja en la resistencia al tratamiento con QT o RT y ésta era la causa de la recurrencia. Para ello se silenció la expresión de ANXA2 en la línea de CE Ishikawa, mediante un RNA de interferencia (Figura 54A).

Como se observa en la figura 54B, las células Ishikawa expresando (IK-pLKO) o no ANXA2 (IK-shANXA2) no presentaron diferencias en la formación de colonias tras diferentes dosis de RT. En cuanto al tratamiento con QT, se llevó a cabo un ensayo de formación de colonias en agar en presencia de dosis tóxicas de docetaxel (DTX) y ácido zoledrónico (ZA). Como se refleja en la figura 54C, no se encontraron diferencias significativas en la formación de colonias en las líneas tratadas con QT. Por el contrario, si se observaron **diferencias en el número de colonias entre las células que expresaban ANXA2 y las que no, siendo superior el número de colonias en las primeras** (Figura 54C).

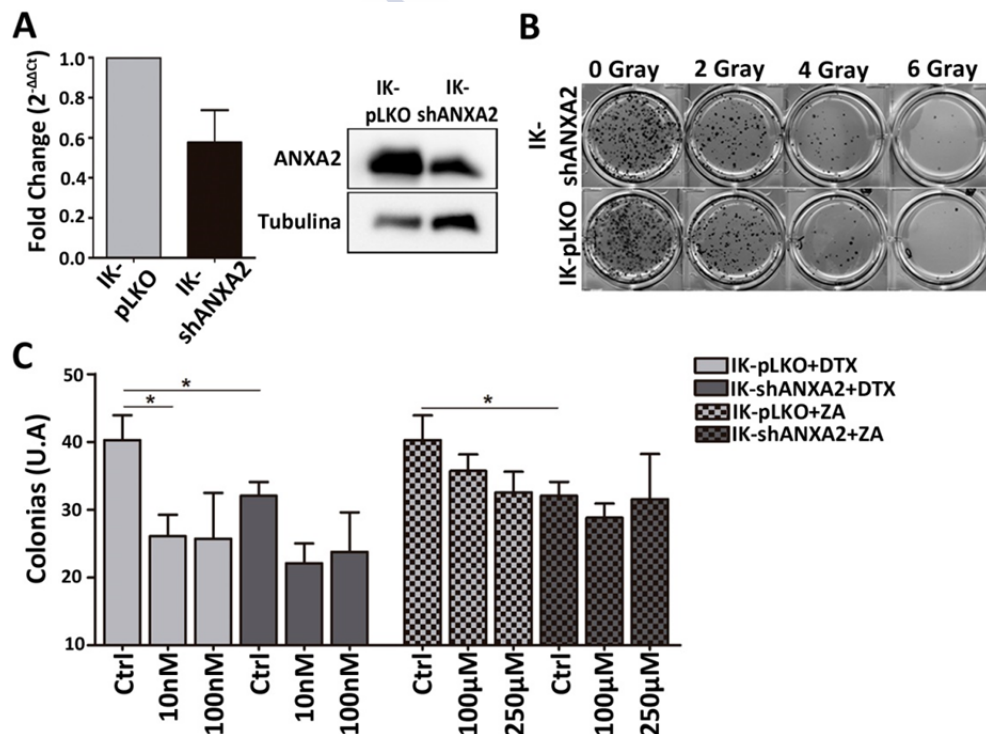


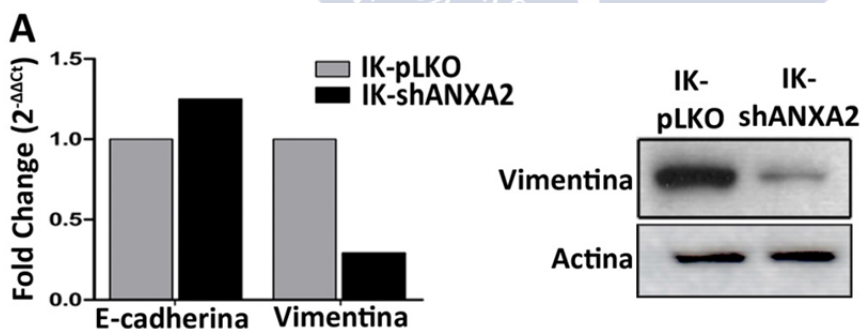
Figura 54. **A**, Niveles de expresión de *ANXA2* analizados mediante RT-q-PCR, normalizados frente a *GAPDH* como gen *housekeeping* (Test de Mann-Whitney) (histograma en panel izquierdo) y mediante western blot (panel derecho) en la línea celular Ishikawa modificada para la inhibición de *ANXA2* (IK-shANXA2) respecto a la línea control IK-pLKO. **B**, Ensayo de formación de colonias tras el tratamiento con dosis crecientes de RT, en las líneas IK-pLKO e IK-shANXA2. **C**, Ensayo de formación de colonias en agar con tratamiento o no de docetaxel (DTX) o ácido zoledrónico (ZA) (Test t-Student; * $p < 0.05$).

Estos datos sugieren que la presencia de ANXA2 favorece la **generación de implantes tumorales, y en cambio no supone una ventaja a la resistencia a quimio y radioterapia.**

9.3.3 Validación *in vitro* de ANXA2 mediante RNA de interferencia: implicación en migración celular

A continuación, se comprobó si ANXA2 estaba implicada en la adquisición de capacidades celulares relacionadas con la promoción de metástasis, analizando su papel en el proceso de migración. Como se ve en la figura 57, **la disminución de la expresión de ANXA2 va acompañada de la adquisición de un fenotipo más epitelial**, con un incremento en la expresión de E-cadherina, analizado mediante RT-q-PCR e IF (Figura 55A, C), y una disminución de Vimentina, analizado mediante RT-q-PCR y WB (Figura 55A).

A su vez, en ensayos de migración en transwell, se observó que el **silenciamiento de ANXA2 resulta en una disminución en la capacidad migratoria** de las células Ishikawa (Figura 55B).



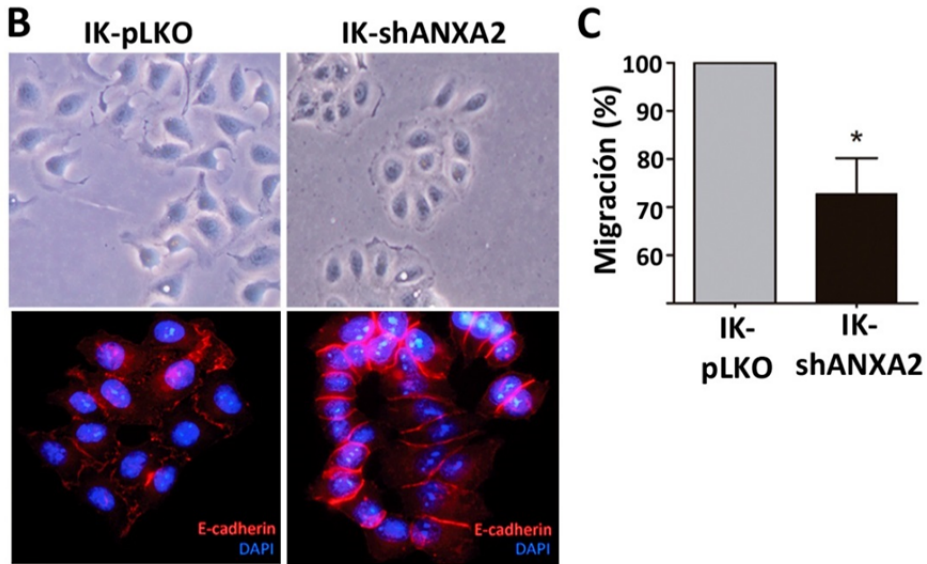


Figura 55. A, Niveles relativos de expresión de E-cadherina y Vimentina analizados mediante RT-q-PCR y normalizados frente a *GAPDH* como gen *housekeeping*, en las líneas IK-pLKO e IK-shBDNF (histograma en panel izquierdo). Análisis de western blot con anticuerpo frente a Vimentina en las líneas celulares IK-pLKO e IK-shANXA2. Se ha empleado β -actina como control de carga (panel derecho). B, Imágenes de microscopía de contraste de fases que muestran la morfología asociada a la disminución en la expresión de ANXA2 (IK-shANXA2) (paneles superiores). Inmunofluorescencia con anticuerpo frente a E-cadherina. Los núcleos celulares aparecen marcados con DAPI (paneles inferiores). C, Ensayos de migración en transwell con las líneas celulares IK-pLKO e IK-shANXA2 cuantificado como fluorescencia relativa a las células IK-pLKO (Test de Mann-Whitney; * $p < 0.05$).

9.3.4 Validación *in vivo* de ANXA2 en modelos animales de metástasis en CE

Con el objetivo de determinar la implicación de ANXA2 en la diseminación y formación de metástasis, se desarrolló un ensayo de diseminación *in vivo*. Para ello se inyectaron, en ratones inmunodeprimidos y de forma IC la línea IK-pLKO (n=5) o la línea silenciada para la expresión de ANXA2 (IK-shANXA2; n=5). Como se observa en la figura 56, la **línea con menores niveles de ANXA2 generó un patrón metastásico reducido** con respecto a los ratones inyectados con la línea control IK-pLKO. El análisis histopatológico determinó que ambos grupos experimentales presentaron un patrón de diseminación similar, con metástasis principalmente en ovarios y glándulas adrenales (Figura 56B). Sin embargo, en los ratones inoculados con

la línea IK-shANXA2 no aparecieron metástasis hematógenas ni pulmonares (Figura 56B, C).

Además, se analizó la diseminación celular mediante la cuantificación de las CTC, con el sistema CellSearch (Veridex). En el caso de **los ratones inoculados con la línea silenciada para ANXA2 (IK-shANXA2), se observó un número menor de CTC**, en comparación con los ratones inoculados con la línea IK-pLKO (Figura 56C, D).

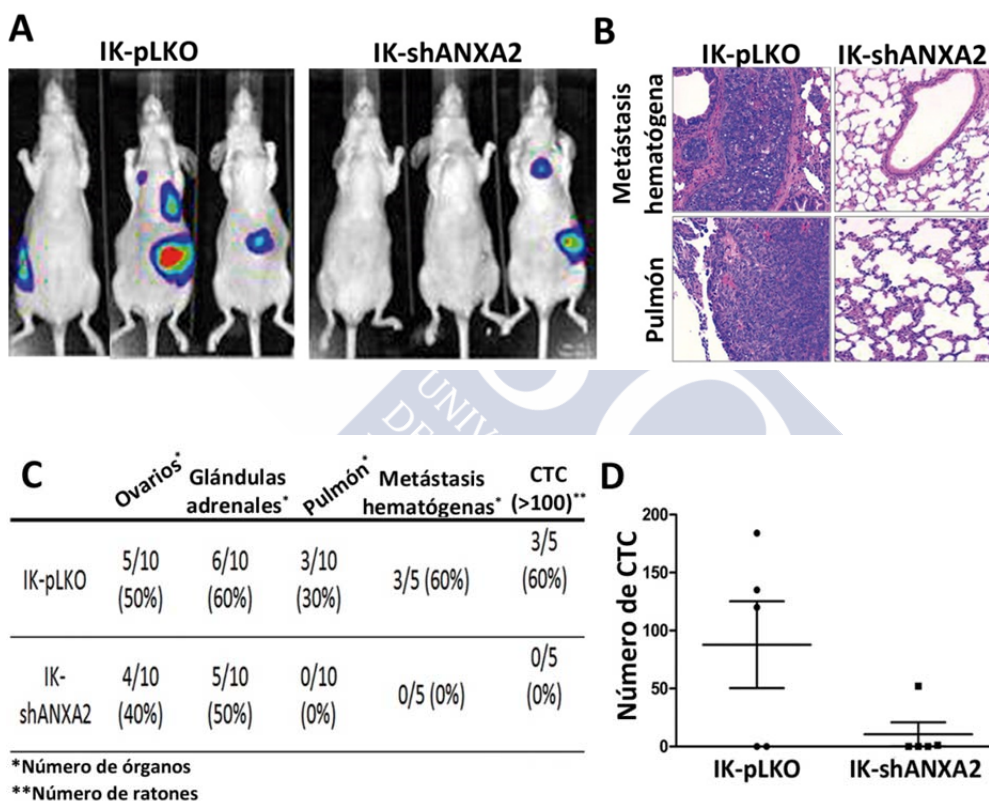


Figura 56. A, Imágenes de bioluminiscencia representativas del patrón de metastasis tras la inyección IC de las células IK-pLKO (paneles izquierdos) e IK-shANXA2 (paneles derechos). **B,** Imagen representativa de tejido con tinción hematoxilina-eosina que muestra la ausencia de metástasis hematogéna y pulmonar en ratones inoculados con células IK-shANXA2, en comparación con los ratones control inoculados con la línea IK-pLKO. **C,** Distribución de implantes tumorales en ratones inoculados con las líneas IK-pLKO e IK-shANXA2. **D,** Cuantificación del número de CTC mediante tecnología CellSearch a partir de la sangre periférica de ratones inoculados con células IK-pLKO o IK-shANXA2.

9.3.5 ANXA2 como marcador predictor de recurrencia en CE

Los resultados obtenidos se complementaron con el análisis de los niveles de *ANXA2* en las CTC de pacientes con CE de alto riesgo. Las muestras se sometieron a inmunoaislamiento con partículas magnéticas unidas a anticuerpos anti-EpCAM seguido de análisis mediante RT-q-PCR. Se encontró un **incremento gradual en los niveles de mRNA de *ANXA2* desde las muestras correspondientes a controles sanos, sometidas al mismo protocolo, a las muestras de pacientes con enfermedad no recurrente. Este incremento, aunque no resultó estadísticamente significativo, fue más pronunciado en las pacientes que habían sufrido enfermedad recurrente** (Figura 57).

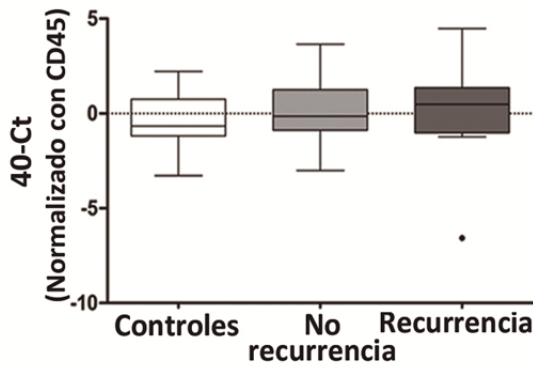


Figura 57. Niveles de mRNA de *ANXA2* analizados mediante RT-q-PCR en CTC de controles, pacientes con enfermedad no recurrente y pacientes que han sufrido recurrencia (Test de Kruskal-Wallis).

Una vez demostrado que la expresión de *ANXA2* está aumentada en muestras tumorales correspondientes a recurrencias, en comparación con lesiones primarias, así como que *ANXA2* promueve la diseminación metastásica tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, se comprobó la utilidad clínica de *ANXA* como marcador predictor de recurrencias en el CE. Primero se analizó el nivel de expresión de *ANXA2*, mediante IH, en tumores primarios correspondientes a CEE (n=93) y CENE (n=38), observándose un incremento del 17% en la inmunorreacción frente a *ANXA2* en estos últimos (p=0.005; media *histoscore* 197.42 frente 231.35, respectivamente) (Figura 58A). Para descartar que el aumento en los niveles de *ANXA2* en los carcinomas endometriales recurrentes viniese dado por una mayor frecuencia de CENE dentro de los recurrentes, se analizaron de forma independiente los niveles de *ANXA2* y el riesgo de recurrencia en los CEE. Se compararon 43

carcinomas endometriales primarios de pacientes que no sufrieron recurrencia, frente a 50 tumores primarios de pacientes que sí la sufrieron. Se encontró un **aumento del 24.76% en la expresión de ANXA2 en los CEE primarios estadios I, II o III de pacientes que sufrieron recurrencia**, frente a los tumores primarios de pacientes que no la sufrieron ($p < 0.0001$; media 217.87 frente 174.62, respectivamente; Figura 58B).

El valor de ANXA2 como marcador de enfermedad recurrente se analizó, también, en CEE estadio I y II. De un total de 62 CEE estadio I (32 no asociados con recurrencias y 30 asociados con recurrencias), se encontró un aumento del **18.29% en la inmutación de ANXA2 en los CEE estadio I y II que finalmente recurrieron respecto a los que no lo hicieron** ($p = 0.01$, media 210.37 frente 177.85 respectivamente; Figura 58C). Si estos carcinomas se analizaban junto con los CEE estadio II (77 casos; 40 no asociados con recurrencia y 37 asociados con recurrencia), los tumores que recurrieron presentaron unos niveles de ANXA2 un 25.22% más elevados que los que no recurrieron ($p = 0.0002$, media 220.51 frente 176.09, respectivamente).

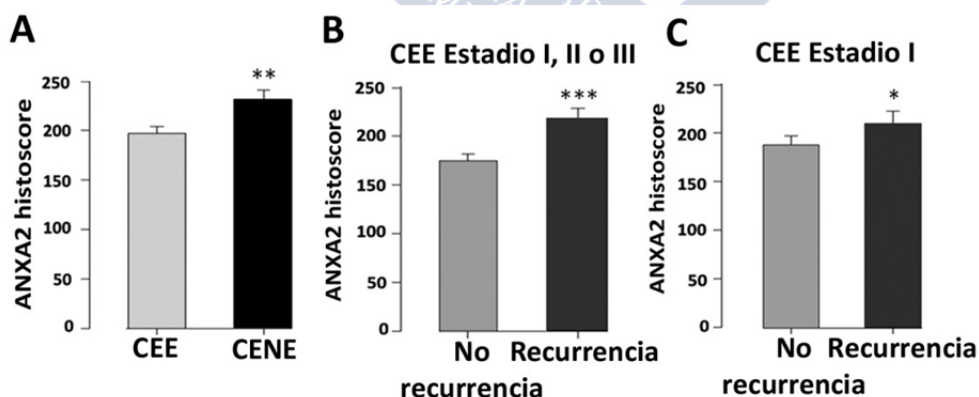


Figura 58. A, Expresión diferencial de ANXA2, mediante IH, en carcinomas endometriales endometrioides (CEE) y no endometrioides (CENE) (Test de Mann-Whitney; $**p < 0.01$). B, Expresión diferencial de ANXA2 en CEE primarios estadios I, II o III que sufrieron o no recurrencia (Test de Mann-Whitney; $***p < 0.001$). C, Expresión diferencial de ANXA2, mediante IH, en CEE estadio I (Test de Mann-Whitney; $*p < 0.05$).

Finalmente, para confirmar el valor clínico de ANXA2 como predictor de recurrencias en el CE, se determinaron valores de *threshold* en las escalas de inmunorreacción de ANXA2 (*histoscores*) en los tumores primarios correspondientes a CEE estadio I, II y III (Tabla 21). Se encontró un 73.98% de recurrencias y un riesgo incrementado de 2.5 veces de sufrir recurrencia cuando el valor de *histoscore* en el tumor primario era mayor de 190, en comparación con el 29.27% de recurrencias cuando este valor de *histoscore* era menor (OR=2.5, $p < 0.0001$). Con un valor de *threshold* de 190 se obtuvo una sensibilidad y especificidad en la predicción de recurrencias del 76% (62-87% 95% CI) y 67% (51-81% 95% CI), respectivamente. Además, se encontró un incremento en el riesgo de recurrencia dependiendo de la expresión de ANXA2 con *Odds-ratio* (OR) 1.70 y 3.07 para los intervalos de *histoscore* de 190-245 y 246-300, respectivamente (Tabla 21).

Tabla 21. Intervalos de inmunotinción de ANXA2 en muestras de CEE estadio I, II o III. Número (y porcentaje) de recurrencias y no recurrencias para cada intervalo. *Odds ratio* (OR) y p-valor para cada OR.

ANXA2 <i>histoscore</i>	Recurrencias (%)	No recurrencias (%)	Total	OR (CI 95%)	p-valor
(0-190)	12 (29.27%)	29 (70.73%)	41	1	
(190-245)	11 (50%)	11 (50%)	22	1.70 (0.91-3.22)	0.16
(246-300)	27 (90%)	3 (10%)	30	3.07 (1.88-5.02)	<0.0001
(190-300)	38 (73.98%)	14 (26.92%)	52	2.50 (1.51-4.13)	<0.0001
	50 (53.76%)	43 (46.24%)	93		

Finalmente, lo que es más importante, se encontraron resultados similares cuando se analizaron de forma específica los CEE estadio I o II, con un riesgo incrementado de 2.59 veces de sufrir recurrencia cuando la inmunorreacción del tumor primario presentaba un *histoscore* por encima de 190 (OR=2.59, $p = 0.0005$) (Tabla 22).

Tabla 22. Intervalos de inmunotinción de ANXA2 en muestras de CEE estadio I o II. Número (y porcentaje) de recurrencias y no recurrencias para cada intervalo. *Odds ratio* (OR) y p-valor para cada OR.

ANXA2 <i>histoscore</i>	Recurrencias (%)	No recurrencias (%)	Total	OR (CI 95%)	p- valor
(0-190)	9 (25.71%)	26 (74.29%)	35	1	
(190-245)	7 (38.89%)	11 (61.11%)	18	1.51 (0.67-3.39)	0.35
(246-300)	21 (87.50%)	3 (12.50%)	24	3.40 (1.90-6.10)	<0.0001
(190-300)	28 (66.67%)	14 (33.33%)	42	2.59 (1.42-4.74)	0.0005
	37 (48.05%)	40 (51.95%)	77		

Además, se obtuvo un área bajo la curva (AUC) de 0.74 en el análisis ROC, que evalúa las probabilidades obtenidas en un modelo logístico en el que ANXA actúa como predictor de recurrencias en los CEE (Figura 59A).

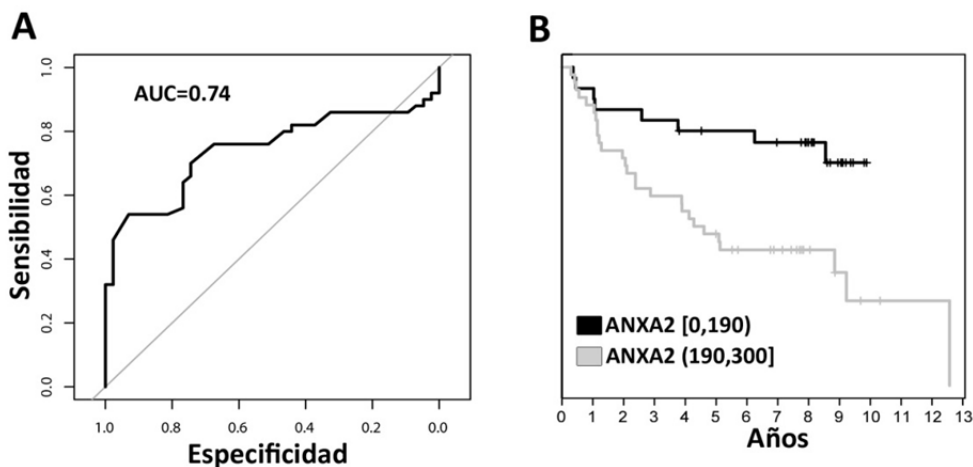


Figura 59. A, Curva ROC para la evaluación del valor pronóstico de los niveles de inmunoexpresión de ANXA2. Se muestra el AUC. B, Curvas Kaplan-Meier para el análisis de los tiempos de supervivencia libre de recidiva según los valores de inmunoexpresión de ANXA2.

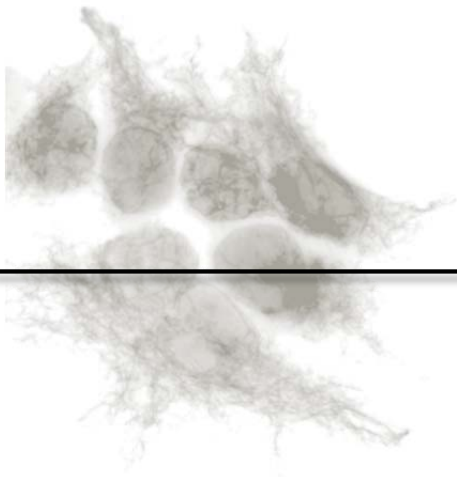
Finalmente, el análisis de supervivencia libre de recidiva indicó que el tiempo de recurrencia era mucho menor en las pacientes que presentaron un valor de inmunotinción para ANXA2 por encima de 190 unidades en la escala *Histoscore* (HR=2.99; p-valor=0.004; Tabla 23). Los intervalos (190-245) y (246-300) seguían la misma tendencia, con respecto al intervalo (0-190)

(Tabla 23). Además, las curvas de supervivencia libre de recidiva resultaron menores para las pacientes con valores de inmunotinción de ANXA2 en el rango (190-300) que para las pacientes en el rango (0-190) (Figura 59B). Los ratios de supervivencia libre de recaída a 1, 2 y 5 años fueron del 86%, 69% y 45%, respectivamente, para las pacientes con valores de ANXA en el rango 190-300. En el caso de las pacientes con valores entre 0-190, estos ratios fueron del 90%, 83% y 76% a 1, 2 y 5 años, respectivamente (Tabla 23).

Tabla 23. Análisis de supervivencia libre de recidiva según inmunotinción de ANXA2. *Hazard ratios* (HR), intervalos de confianza (CI). Ratios de supervivencia a 1, 2 y 5 años con su CI.

ANXA2 <i>histoscore</i>	HR (95% CI)	p- valor	Ratios de supervivencia (Kaplan-Meier (95% CI))		
			1 año	2 años	5 años
[0,190]	1		90% (80%,100%)	83% (71%,98%)	76% (62%,93%)
(190,245]	1.71 (0.64,4.57)	0.28	79% (63%,99%)	74% (56%,96%)	68% (50%,93%)
(245,300]	4.69 (2.00,11.03)	0.0004	87% (74%,99%)	61% (44%,84%)	22% (10%,47%)
(190,300]	2.99 (1.35,6.64)	0.004	86% (76%,97%)	69% (56%,84%)	45% (32%,63%)





DISCUSIÓN



10. DISCUSIÓN

En los países desarrollados el carcinoma endometrial (CE) es el cuarto cáncer más común en mujeres (Siegel et al. 2012), con una incidencia que aumenta asociada a la obesidad e inactividad física, así como al incremento en la esperanza de vida (Amant et al. 2012). Se han descrito dos tipos de carcinomas endometriales: el carcinoma endometrial endometriode (CEE) o tipo I y el carcinoma endometrial no endometriode (CENE) o tipo II. El CEE representa aproximadamente el 85% de todos los carcinomas endometriales diagnosticados (Matias-Guiu & Davidson 2014). La sintomatología permite un diagnóstico en estadios tempranos, cuando la enfermedad está confinada en el útero, por lo que el pronóstico es favorable (Yeramian et al. 2013). Sin embargo, en torno a un 20% de las pacientes presenta enfermedad avanzada al diagnóstico. El estadio FIGO, valorado tras el examen patológico de la muestra de histerectomía, es el factor pronóstico más potente. El grado de invasión miometrial y la presencia de afectación linfovascular son factores pronósticos adicionales.

La tasa de supervivencia a 5 años de las pacientes que presentan el tumor confinado en el útero es del 95% y disminuye al 67% en las pacientes que presentan enfermedad regional y a un dramático 17% en las pacientes con metástasis (Matias-Guiu & Davidson 2014). Además, en el caso de enfermedad metastásica, los tratamientos más activos presentan ratios de respuesta bajos, con medias de supervivencia de 12 a 15 meses (Mariani et al. 2004).

Partiendo de estos datos, las células del tumor primario que llevan a cabo la invasión de los tejidos adyacentes, así como las que logran penetrar en la circulación y serán la futura fuente de metástasis, suponen una diana para poder controlar la diseminación del CE. En este escenario nos planteamos el primer objetivo de este estudio, que radica en la importancia de frenar la progresión de la enfermedad desde las etapas más tempranas, mejorando el

conocimiento de los eventos moleculares que determinan el avance de la invasión miometrial.

El aumento en la expresión del factor de transcripción ETV5 en el frente de invasión, en comparación con las zonas superficiales de los carcinomas endometriales, sugiere que este factor puede estar regulando un programa transcripcional específico en esta zona. Planaguma J. y col. describieron previamente la sobrerregulación de ETV5 en el CEE, con un incremento significativo en los estadios tumorales asociados a invasión miometrial (Planagumà et al. 2005). Además Monge M. y col. determinaron la implicación de ETV5 en la invasión miometrial a través de la activación de la MMP2 (Monge et al. 2007). Más recientemente, Colás E. y col. confirmaron que ETV5 promueve el proceso de EMT, que tiene como resultado la localización de la proteína LPP en las adhesiones focales. En esta zona, y tras recibir el estímulo de señales extracelulares, se transloca al núcleo y activa a ETV5, generando un *loop* de amplificación que incrementa la invasión del CE (Colas et al. 2012). La EMT se ha considerado un evento clave durante la invasión, progresión y metástasis del CE (Tanaka et al. 2013; Mirantes et al. 2013).

Tras el estudio comparativo de ChIP-on-Chip, las funciones biológicas en las que se incluyeron los genes regulados por ETV5 en el frente de invasión tumoral nos indicaron una relación con procesos de interacción célula-célula, desarrollo de órganos, desórdenes del tejido conectivo y movimiento celular. Es importante señalar que como función principal, el programa transcripcional regulado por ETV5 en el frente de invasión se relacionó con el desarrollo del sistema nervioso, a través de una red de interacción génica en la que el factor neurotrófico *BDNF* (*brain-derived neurotrophic factor*) tenía un papel central. Estudios previos ya habían relacionado a ETV5 y diferentes factores neurotróficos, en procesos como el crecimiento y señalización de axones en respuesta a NGF (*nerve growth factor*), o como mediador de la señalización por GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) actuando

como regulador de diferentes genes esenciales en la renovación de las células madre de las espermatogonias (Fontanet et al. 2013; Wu et al. 2011).

En cuanto a BDNF, pertenece a un grupo de factores de crecimiento denominados neurotrofinas, estando implicado en el desarrollo, mantenimiento y plasticidad del sistema nervioso (Devin K Binder, Growth Factors 2004). El aumento en la expresión de *BDNF* en la zona invasiva, con respecto a la zona superficial, refuerza el mecanismo de regulación propuesto. Okugawa Y. y col. también describieron un incremento en la expresión de BDNF en el frente de invasión de tumores gástricos, al compararlo con el centro del tumor o la mucosa normal y esta sobreexpresión correlacionaba significativamente con la metástasis a ganglios linfáticos y diseminación peritoneal (Okugawa et al. 2013).

Es interesante mencionar que también se encontró un incremento en los niveles del receptor de BDNF, *TrkB* (*tropomyosin-related kinase B*), en el frente de invasión tumoral. Específicamente, la activación de TrkB por BDNF promueve el crecimiento celular y la resistencia a terapia en neuroblastomas (Aoyama et al. 2001), sin embargo, recientemente se ha descrito la sobreexpresión de ambos en otros tumores sólidos (Schneider et al. 2001; Ricci et al. 2001; Desmet & Peeper 2006; Moon et al. 2011). Más concretamente, Kupferman y col. relacionaron la sobreexpresión de TrkB con la expresión de mediadores moleculares del proceso de EMT (Kupferman et al. 2010).

A nivel celular, el eje BDNF/TrkB actúa en diferentes procesos, incluyendo la activación de vías de proteína-quinasa clásicamente implicadas en cáncer, como PI3K, PKC y MAPK (Roesler et al. 2011). En nuestro estudio la quinasa ERK1/2 tiene una posición central en la red de interacción génica formada por las dianas de regulación de ETV5, lo que nos sugiere una posible cascada de activación BDNF/TrkB/ERK1/2 durante la progresión del CE. Esto se confirma al observar un incremento en la fosforilación de la quinasa en el frente de invasión tumoral. En línea con estos

resultados, Montserrat N. y col. describieron el incremento en la fosforilación de ERK1/2 en el frente de invasión de los carcinomas endometriales, sugiriendo una contribución a la invasión mediante la implicación de mediadores del proceso de EMT (Montserrat et al. 2012).

La sobreexpresión de ETV5 en las líneas celulares de CE conlleva una sobre-regulación de la expresión de BDNF y un incremento en la activación de ERK1/2, lo que refuerza la hipótesis de la acción del eje ETV5/BDNF/TrkB/ERK1/2 durante la invasión tumoral en el cáncer de endometrio. Diferentes autores han descrito la activación de la vía de ERK1/2 mediada por el eje BDNF/TrkB en procesos normales del desarrollo del sistema nervioso y la plasticidad sináptica (Leal et al. 2014) y también en procesos neoplásicos como el desarrollo del mieloma múltiple (Pearse et al. 2005). En nuestro trabajo está pendiente la comprobación del estado de fosforilación de la quinasa TrkB para confirmar esta cascada de activación.

Con el fin de determinar si BDNF podía estar actuando, al menos en parte, en la promoción de la EMT mediada por ETV5, evaluamos tanto *in vitro* como *in vivo* el resultado de su inhibición mediante un RNA de interferencia. A nivel molecular, el estado de activación de la quinasa ERK1/2, así como las alteraciones asociadas a la adquisición de un fenotipo mesenquimal, incluyendo las capacidades de migración e invasión promovidas por ETV5, revertían con el silenciamiento de BDNF y volvían a recuperarse en presencia de BDNF recombinante. Estos datos sugieren que el proceso de EMT y la migración e invasión inducida por ETV5 durante la infiltración miometrial pueden estar mediados por BDNF, a través de la vía de ERK1/2. Distintos estudios relacionan a BDNF y TrkB y la capacidad de migración e invasión tumoral (Hecht et al. 2005; Au et al. 2009; Guo et al. 2011), y en la promoción de la EMT mediada por ERK1/2 durante la progresión del cáncer de pulmón (Zhang et al. 2010) y del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Smit et al. 2009). Es importante mencionar que recientemente BDNF y TrkB se han relacionado con la progresión tumoral del CE, como promotores de la EMT y la resistencia a anoikis, y se ha descrito una correlación entre los

niveles de TrkB y la metástasis en ganglios linfáticos o la afectación linfovascular (Bao et al. 2013).

Mediante un modelo *in vivo* de diseminación sistémica demostramos que la sobreexpresión de ETV5 tiene como resultado un patrón agresivo de diseminación tumoral que regresa a los niveles mínimos de la línea parental con la inhibición de BDNF. Estos resultados proporcionan evidencias funcionales para el papel de ETV5 y la promoción de la EMT mediada por BDNF en la progresión del CE. Hay que señalar que quizás el modelo más adecuado en el que validar la implicación del eje ETV5/BDNF en el proceso de invasión miometrial sea un modelo ortotópico. Sin embargo, es el modelo ideal para mimetizar la diseminación que llevan a cabo las células tumorales circulantes (CTC). El perfil génico encontrado en las CTC de las pacientes con CE, principalmente basado en la expresión de marcadores del proceso de EMT, entre los que se encuentra ETV5, refleja la continuidad del fenotipo invasivo que caracteriza el frente de invasión tumoral.

La propagación de las células tumorales desde la lesión primaria es un evento clave en el proceso de metástasis y un reto en oncología, ya que la diseminación temprana suele ser indetectable mediante técnicas rutinarias de diagnóstico. En nuestro estudio presentamos evidencias de la presencia de CTC en pacientes con CE de alto riesgo. Estudios previos incluyen el análisis de un panel de 6 genes en muestras de sangre de pacientes con CE (Obermayr et al. 2010). Además, podemos afirmar que el inmunoaislamiento basado en EpCAM, seguido de análisis mediante RT-q-PCR es un método efectivo para el aislamiento de las CTC de pacientes con CE de alto riesgo, y que potencialmente permitiría distinguirlas de las pacientes de bajo riesgo. El enriquecimiento basado en la selección positiva con anticuerpo anti-EpCAM es utilizado por muchos grupos ya que se ha demostrado que esta molécula está sobreexpresada y funciona como oncogén en algunos tumores epiteliales (Munz et al. 2009), pero hay que tener en cuenta que la expresión varía entre tipos tumorales (Pantel et al. 2008). Asimismo, la detección de CTC basada en RT-q-PCR es muy sensible, pudiendo detectar una sola célula entre una

población de 2×10^7 células sanguíneas (Pantel et al. 2008). Una de las limitaciones de este sistema es que no permite la cuantificación del número de CTC. Niveles elevados de un transcrito determinado pueden venir dados por la presencia de varias CTC o por la sobreexpresión de los mismos a partir de una única célula. Además, se ha visto que la expresión de los genes marcadores varía entre tumores de diferentes pacientes e incluso entre células de un mismo paciente (Xi et al. 2007), por lo que la estrategia utilizada, empleando el análisis de expresión de múltiples mRNAs, parece adecuada.

El perfil de expresión génica de las CTC de pacientes con CE señala posibles rutas relevantes en el proceso de metástasis que podrían ser dianas terapéuticas. Por ejemplo, la expresión de *STS*, asociada a una mayor disponibilidad de estrógenos por las células tumorales puede suponer una ventaja en el crecimiento de las CTC (Lépine et al. 2010), y su bloqueo podría disminuir el riesgo de recurrencias. La expresión de *PIK3CA* en las CTC confirma el papel de esta quinasa como diana potencial en enfermedad de alto riesgo y metastásica (Salvesen et al. 2013). Pero como se ha comentado anteriormente, la principal característica observada corresponde a un fenotipo de EMT, con un incremento en los niveles de mRNA de casi la totalidad de genes analizados en relación con el proceso de plasticidad celular (*ETV5*, *NOTCH1*, *SNAI1*, *TGFB1*, *ZEB1*, *ZEB2*). Es interesante mencionar que diversos autores han afirmado que la presencia de marcadores mesenquimales en las CTC, en lugar de únicamente la expresión de CK, predice un peor pronóstico (Königsberg et al. 2011; Raimondi et al. 2011), por lo que es un factor relevante a tener en cuenta.

Las células mesenquimales están mejor equipadas para intravasarse, para lo que necesitan tener la flexibilidad de usar los factores mesenquimales de forma temprana en el proceso metastásico, y posteriormente, una vez que llegan a su destino, volver a presentar características epiteliales, por ejemplo mediante la represión llevada a cabo por el miR-200. Por ello en la circulación

aparecerá una mezcla de fenotipos, incluyendo mesenquimales, híbridos y epiteliales (Bednarz-Knoll et al. 2012).

En lo que respecta a *ALDH* y *CD44*, como genes marcadores de célula madre encontrados en el perfil molecular de las CTC, todavía es necesario demostrar si estas CTC incluyen una subpoblación de células tumorales con fenotipo de célula madre (células iniciadoras de tumores) o toda la población debería considerarse responsable de las recurrencias con mayor o menor eficiencia (Visvader & Lindeman 2008). Estudios recientes en CTC de cáncer de mama han demostrado que parte de estas CTC expresan marcadores de células madre iguales a los analizados en nuestro estudio (Aktas et al. 2009; Theodoropoulos et al. 2010).

La relación entre el proceso de EMT y las características de célula madre durante el proceso de diseminación tumoral también ha sido descrita en el CE, principalmente representada por el descenso en la expresión de los miembros de la familia miR-200 (Castilla et al. 2011). El equilibrio entre la expresión de los factores ZEB y miR-200 se considera un motor molecular de la plasticidad celular, con una función particular en la progresión metastásica mediante el control del estado de las células madre (Brabletz & Brabletz 2010). Los resultados obtenidos en las muestras pareadas de carcinomas primarios de endometrio y ganglios afectados demuestran el potencial de *ZEB2* en el fenotipo de las CTC y refuerzan la necesidad de nuevas investigaciones centradas en las características de célula madre de las CTC, con el fin de obtener información relevante sobre esta población responsable de las metástasis.

En cuanto a la cuantificación de CTC llevada a cabo con el sistema CellSearch, hay que señalar que diversos estudios han demostrado su utilidad como indicador del diagnóstico y pronóstico en pacientes con enfermedad metastásica. Actualmente es la única tecnología aprobada por la FDA para la detección de CTC en pacientes con metástasis de mama, próstata y colon (Cristofanilli et al. 2004; Danila et al. 2007; Sastre et al. 2008). Sin embargo, la

diferencia en sensibilidad observada, al compararla con la metodología de pre-amplificación y RT-q-PCR, puede ser debida a los criterios restrictivos fijados para confirmar la existencia de CTC. La identificación de CTC con la tecnología CellSearch se basa en el marcaje de citoqueratinas (CK8, 18 y/o 19) y en la localización del núcleo (señal de DAPI), que debe ser $\geq 4\mu\text{m}$ y estar, por lo menos un 50%, dentro de la señal de CK. De acuerdo a estos parámetros tenemos la hipótesis de que los fragmentos de células tumorales o los cuerpos multivesiculares que transportan RNA, se descartan. Además, se ha descrito que algunos tumores durante la progresión metastásica cambian el patrón de CK (Bednarz-Knoll et al. 2012), de forma que una proporción significativa de CTC que exprese CK diferentes a las empleadas por el sistema CellSearch también se descartarían, y por el contrario sí se estarían teniendo en cuenta en el análisis de RT-q-PCR.

La inclusión de marcadores que no se repriman durante el proceso de EMT, como por ejemplo la proteína Anexina 2 (ANXA2), supondría una optimización en los métodos de detección de CTC. La proteína ANXA2 es la candidata escogida tras el análisis proteómico cuyo fin era identificar un biomarcador que pronostique la recurrencia en pacientes con CE. ANXA2 es una proteína de superficie celular que se une tanto a proteasas (catepsina B, Plg, tPA) como a proteínas de matriz extracelular (tenascina C), implicadas en la invasión tumoral y metástasis. Los niveles de expresión de ANXA2 se han relacionado con el desarrollo, invasión y metástasis de diferentes tumores (Zhang et al. 2012). Asimismo, se ha descrito una sobreexpresión de ANXA2 en el CE estadio I en comparación con el endometrio normal (Maxwell et al. 2011), y también en correlación con marcadores del proceso de EMT en pacientes con adenomiosis (Zhou et al. 2012). Además, la inhibición de ANXA2 provoca una disminución significativa en la adhesión del embrión, estando implicada en la migración de las células epiteliales endometriales (Garrido-Gómez et al. 2012).

En modelos *in vitro* hemos demostrado como la expresión de ANXA2 está asociada a la promoción del proceso de EMT, mejorando la capacidad de

migración celular. En el modelo animal de inyección intracardiaca se observó como la presencia de metástasis hematógenas, evaluadas mediante histología y cuantificación de CTC, se redujeron en ausencia de ANXA2, lo que sugiere un papel para ANXA2 en la adquisición, por parte de la célula tumoral, de un fenotipo agresivo durante los procesos de infiltración y diseminación del CE. Recientemente se ha descrito la implicación de ANXA2 en los procesos de invasión, migración y metástasis en tumores de mama, cerebro e hígado (Sharma et al. 2006; Zhai et al. 2011; Zhang et al. 2013).

Finalmente, el análisis de supervivencia libre de recidiva indicó que el tiempo de recurrencia era mucho menor en las pacientes que presentaron los valores más altos de inmunotinción para ANXA2. Además, en un estudio retrospectivo se demostró el valor clínico del análisis de ANXA2 en carcinomas endometriales primarios como predictor de enfermedad recurrente, incluso en pacientes con tumores en estadios tempranos.

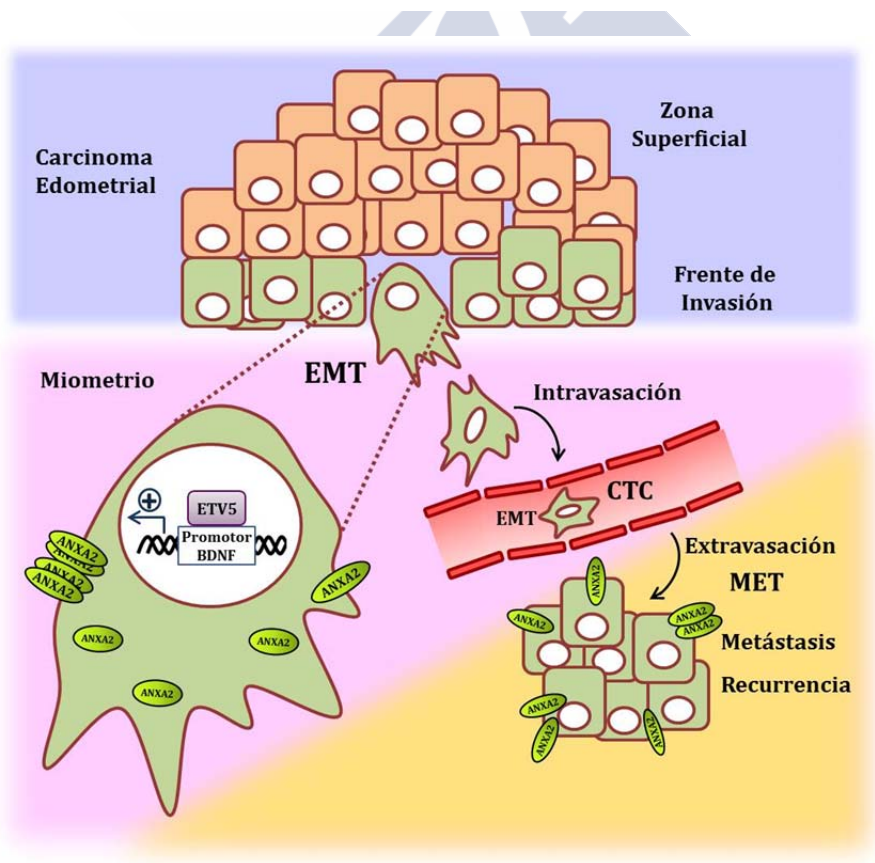
En conclusión, el conocimiento de las bases moleculares del CE contribuye a la mejora en el diagnóstico de esta neoplasia y a la identificación de dianas para el abordaje con nuevas estrategias terapéuticas, que solas o en combinación con los agentes citotóxicos convencionales permitan incrementar el beneficio para las pacientes.

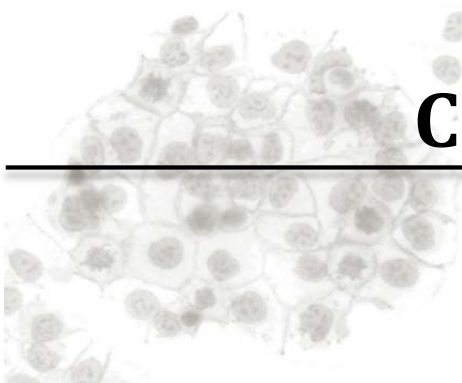
Tras el descubrimiento de la importancia del eje BDNF/TrkB en la biología del cáncer, es lógico pensar que la inhibición de la actividad de TrkB pudiera tener un beneficio clínico en oncología (Roesler et al. 2011). Recientemente se ha descrito que el inhibidor K252a frena la proliferación celular e induce la muerte por apoptosis en leiomioma de útero (Makino et al. 2012). La presencia de inhibidores tirosina quinasa en ensayos clínicos fase I y II (Desmet & Peepers 2006; Thiele et al. 2009; Minturn et al. 2011) representa una posibilidad terapéutica para el tratamiento de los carcinomas endometriales. Asimismo, es necesario llevar a cabo nuevos estudios que permitan el desarrollo de compuestos que actúen como antagonistas de TrkB, o anticuerpos monoclonales frente a BDNF o TrkB. Sin embargo, dado el papel

crucial de BDNF en el correcto funcionamiento del sistema nervioso debe establecerse si el efecto del bloqueo de esta vía puede ser clínicamente aceptable.

En cuanto a las CTC, aunque su valor clínico está siendo reconocido, representan una potente herramienta en oncología y su implementación en el la clínica permitiría la monitorización a tiempo real de la evolución de la enfermedad y de la eficacia de la terapia en las pacientes con CE.

Finalmente, hemos presentado a ANXA2 como un prometedor biomarcador de recurrencia que permita la óptima estratificación de las pacientes susceptibles de recibir cirugía radical y radio/quimioterapia. Actualmente, se ha registrado bajo patente y se está validando en un estudio multicéntrico a nivel europeo.





CONCLUSIONES



11. CONCLUSIONES

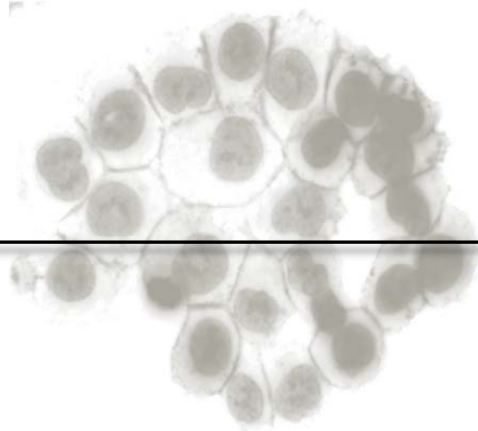
1. El programa transcripcional asociado a ETV5 en el frente de invasión de los carcinomas endometriales indica la participación de genes relacionados con procesos de plasticidad neuronal, y en particular del factor neurotrófico BDNF.
2. ETV5 se une al promotor de BDNF e incrementa su expresión, desencadenando la activación de la vía de ERK1/2 en líneas celulares y en el frente de invasión de los carcinomas endometriales.
3. El eje BDNF-TrkB-ERK1/2 participa en la adquisición de un fenotipo mesenquimal y de capacidades de migración e invasión promovidas por la sobreexpresión de ETV5 en el carcinoma endometrial.
4. La sobreexpresión de ETV5 genera un patrón de diseminación tumoral masivo en un modelo *in vivo*, que se revierte con el silenciamiento de BDNF.
5. Nuestros resultados confirman la presencia de CTC en pacientes con carcinoma endometrial de alto riesgo.
6. La caracterización molecular de las CTC de pacientes con carcinoma endometrial de alto riesgo, definida por un patrón de genes clásicos del proceso de transición epitelio-mesénquima, muestra una continuidad con el fenotipo invasivo dirigido por ETV5 en el frente de invasión.
7. La expresión de *ALDH* y *CD44* en las CTC de pacientes con carcinoma endometrial de alto riesgo revela una asociación con características de célula madre, mientras que la expresión de *CTNNB1*, *STS*, *GDF15*, *RELA*, *RUNX1*, *BRAF* y *PIK3CA* sugiere potenciales dianas terapéuticas.
8. La sobreexpresión de ETV5 en una línea celular de carcinoma endometrial recapitula el fenotipo de plasticidad caracterizado en las CTC de pacientes y desencadena una mayor diseminación tumoral.

9. La comparación proteómica entre lesiones primarias y recurrencias de pacientes con carcinoma endometrial identificó a ANXA2 como biomarcador de enfermedad recurrente.

10. La validación funcional de ANXA2 tanto *in vitro* como *in vivo* sugiere un papel principal en el proceso de diseminación y metástasis en el carcinoma endometrial.

11. A nivel clínico, ANXA2 ha demostrado un valor predictivo de recurrencia incluso en pacientes con carcinomas endometriales de bajo riesgo. Las pacientes con niveles de expresión más altos de ANXA2 han mostrado tiempos de supervivencia libre de recidiva menores.





ANEXO



12. ANEXO

Publicaciones derivadas de la presente tesis doctoral:

Alonso-Alconada, L., Muínelo-Romay, L., Madisoo, K., Díaz-López, A., Krakstad, C., Trovik, J., Wik, E., Hapangama, D., Coenegrachts, L., Cano, A., Gil-Moreno, A., Chiva, L., Cueva, J., Vieito, M., Ortega, E., Mariscal, J., Colas, E., Castellvi, J., Cusido, M., Dolcet, X., Nijman, H.W., Bosse, T., Green, J.A., Romano, A., Reventos, J., López-López, R., Salvesen, H.B., Amant, F., Matias-Guiu, X., Moreno-Bueno, G., Abal, M. Molecular Profiling of Circulating Tumor Cells links Plasticity to the Metastatic Process in Endometrial Cancer (Enviado).

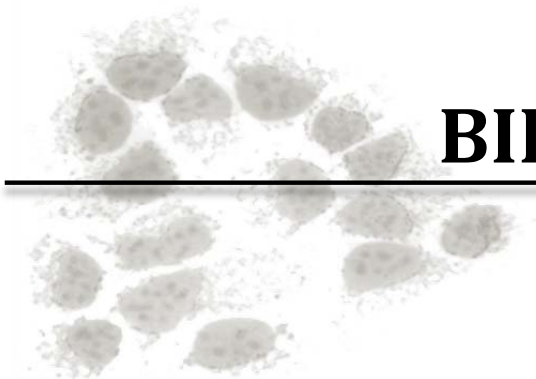
Alonso-Alconada L., Santacana M., García-Sanz P., Muínelo-Romay L., Colás E., Mirantes C., Monge M., Cueva J., Oliva E., A Soslow R., López M.A., Palacios J., Prat J., Valls J., Krakstad C., Salvesen H., Gil-Moreno A., López-López R., Dolcet X., Moreno-Bueno G., Reventós J., Matias-Guiu X., Abal M. Annexin-A2 as predictor biomarker of recurrent disease in endometrial cáncer (Enviado).

Alonso-Alconada L., Eritja N., Muínelo-Romay L., Barbazán J., López-López R., Matias-Guiu X., Gil-Moreno A., Dolcet X., Abal M. ETV5 transcription program links BDNF and promotion of EMT at invasive front of endometrial carcinomas (Enviado).





BIBLIOGRAFÍA





13. BIBLIOGRAFÍA

- Abal, M. et al., 2007. Molecular determinants of invasion in endometrial cancer. *Clinical & translational oncology*, 9(5):272–7.
- Aktas, B. et al., 2009. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, 11(4):R46.
- Altaras, M.M. et al., 2002. Detection of tumor circulating cells by cytokeratin-20 in the blood of patients with granulosa cell tumors. *Gynecologic oncology*, 86(3):330–6.
- Amant, F., Mirza, M.R. & Creutzberg, C.L., 2012. Cancer of the corpus uteri. *International journal of gynaecology and obstetrics*, 119 Suppl 2:S110–7.
- Antonsen, S.L. et al., 2013. HE4 and CA125 levels in the preoperative assessment of endometrial cancer patients: a prospective multicenter study (ENDOMET). *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 92(11):1313–22.
- Aoyama, M. et al., 2001. Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer letters*, 164(1):51–60.
- Au, C.W.H. et al., 2009. Tyrosine kinase B receptor and BDNF expression in ovarian cancers - Effect on cell migration, angiogenesis and clinical outcome. *Cancer letters*, 281(2):151–61.
- Baggish M.S, Valle R.F, G.H., 2007. *Hysteroscopy: visual perspectives of uterine anatomy, physiology and pathology* 3rd ed., L. W. Wilkins.
- Bansal, N., Yendluri, V. & Wenham, R.M., 2009. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer control*, 16(1):8–13.
- Bao, W. et al., 2013. Upregulation of TrkB promotes epithelial-mesenchymal transition and anoikis resistance in endometrial carcinoma. *PloS one*, 8(7):e70616.
- Barrow, E., Hill, J. & Evans, D.G., 2013. Cancer risk in Lynch Syndrome. *Familial cancer*, 12(2):229–40.
- Bednarz-Knoll, N., Alix-Panabières, C. & Pantel, K., 2011. Clinical relevance and biology of circulating tumor cells. *Breast cancer research*, 13(6):228.
- Bednarz-Knoll, N., Alix-Panabières, C. & Pantel, K., 2012. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer metastasis reviews*, 31(3-4):673–87.

- Benedetti Panici, P. et al., 2008. Systematic pelvic lymphadenectomy vs. no lymphadenectomy in early-stage endometrial carcinoma: randomized clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(23):1707–16.
- Blake, P. et al., 2009. Adjuvant external beam radiotherapy in the treatment of endometrial cancer (MRC ASTEC and NCIC CTG EN.5 randomised trials): pooled trial results, systematic review, and meta-analysis. *Lancet*, 373(9658):137–46.
- Boeing, H., 2013. Obesity and cancer--the update 2013. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 27(2):219–27.
- Bokhman, J. V, 1983. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic oncology*, 15(1):10–7.
- Bonnomet, A. et al., 2010. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 15(2):261–73.
- Brabletz, S. & Brabletz, T., 2010. The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO reports*, 11(9):670–7.
- Brabletz, T. et al., 1999. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *The American journal of pathology*, 155(4):1033–8.
- Bray, F. et al., 2005. Endometrial Cancer Incidence Trends in Europe : Underlying Determinants and Prospects for Prevention. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 14(5):1132–1142.
- Brennan, D.J. et al., 2014. Serum HE4 as a prognostic marker in endometrial cancer - A population based study. *Gynecologic oncology*, 132(1):159–65.
- Brinton, L.A. et al., 1992. Reproductive, menstrual, and medical risk factors for endometrial cancer: results from a case-control study. *American journal of obstetrics and gynecology*, 167(5):1317–25.
- Browne, A.S. et al., 2012. Proteomic identification of neurotrophins in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertility and sterility*, 98(3):713–9.
- Cabero L, C.E., 2003. *Tratado de Ginecología, obstetricia y medicina de la reproducción*, 2 ed., E. M. Panamericana.
- Calle, E.E. & Kaaks, R., 2004. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature reviews. Cancer*, 4(8):579–91.
- Cancer Facts & Figures 2013. American Cancer Society. Atlanta: American Cancer Society; 2013.

- Carmeliet, P. & Jain, R.K., 2011. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, 10(6):417–27.
- Castilla, M.Á. et al., 2011. Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma. *The Journal of pathology*, 223(1):72–80.
- Cervelló, I. et al., 2011. Stem cells in human endometrium and endometrial carcinoma. *International journal of gynecological pathology*, 30(4):317–27.
- Cesarman-Maus, G. & Hajjar, K.A., 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British journal of haematology*, 129(3):307–21.
- Chambers, A.F., Groom, A.C. & MacDonald, I.C., 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews. Cancer*, 2(8):563–72.
- Chao, M. V & Bothwell, M., 2002. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron*, 33(1):9–12.
- Chao, M. V, Rajagopal, R. & Lee, F.S., 2006. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clinical science*, 110(2):167–73.
- Charlot, C. et al., 2010. A review of post-translational modifications and subcellular localization of Ets transcription factors: possible connection with cancer and involvement in the hypoxic response. *Methods in molecular biology*, 647:3–30.
- Chen, C. et al., 2005. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature*, 436(7053):1030–4.
- Colas, E. et al., 2012. ETV5 cooperates with LPP as a sensor of extracellular signals and promotes EMT in endometrial carcinomas. *Oncogene*, 31(45):4778–88.
- Colas, E. et al., 2011. Molecular markers of endometrial carcinoma detected in uterine aspirates. *International journal of cancer*, 129(10):2435–44.
- Cramer D.W, 2013. The Epidemiology of Endometrial and Ovarian Cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*, 26(1):1–12.
- Creutzberg, C.L. et al., 2000. Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. PORTEC Study Group. Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma. *Lancet*, 355(9213):1404–11.
- Cristofanilli, M. et al., 2004. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine*, 351(8):781–91.

- Danila, D.C. et al., 2007. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research*, 13(23):7053–8.
- Decruze, S.B. & Green, J.A., 2007. Hormone therapy in advanced and recurrent endometrial cancer: a systematic review. *International journal of gynecological cancer*, 17(5):964–78.
- Denschlag, D., Ulrich, U. & Emons, G., 2010. The diagnosis and treatment of endometrial cancer: progress and controversies. *Deutsches Ärzteblatt international*, 108(34-35):571–7.
- Desmet, C.J. & Peeper, D.S., 2006. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy?. *Cellular and molecular life sciences*, 63(7-8):755–9.
- Doll, A. et al., 2008. Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 108(3-5):221–9.
- Douma, S. et al., 2004. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature*, 430(7003):1034–9.
- Du, H. & Taylor, H.S., 2010. Stem cells and reproduction. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 22(3):235–41.
- Eo, J. et al., 2011. Complex ovarian defects lead to infertility in Etv5^{-/-} female mice. *Molecular human reproduction*, 17(9):568–76.
- Eo, J. et al., 2008. Etv5, an ETS transcription factor, is expressed in granulosa and cumulus cells and serves as a transcriptional regulator of the cyclooxygenase-2. *The Journal of endocrinology*, 198(2):281–90.
- Eo, J., Song, H. & Lim, H.J., 2012. Etv5, a transcription factor with versatile functions in male reproduction. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 39(2):41–5.
- Esteller, M. et al., 1999. hMLH1 Promoter Hypermethylation Is an Early Event in Human Endometrial Tumorigenesis. *The American Journal of Pathology*, 155(5):1767–1772.
- Fehm, T. et al., 2006. Detection of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers. *Gynecologic oncology*, 103(3):942–7.
- Festuccia, C. et al., 2007. Tyrosine kinase inhibitor CEP-701 blocks the NTRK1/NGF receptor and limits the invasive capability of prostate cancer cells in vitro. *International journal of oncology*, 30(1):193–200.
- Fisher, B. et al., 1994. Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *Journal of the National Cancer Institute*, 86(7):527–37.

- Flood, E.C. & Hajjar, K.A., 2011. The annexin A2 system and vascular homeostasis. *Vascular pharmacology*, 54(3-6):59–67.
- Fontanet, P. et al., 2013. Pea3 transcription factor family members Etv4 and Etv5 mediate retrograde signaling and axonal growth of DRG sensory neurons in response to NGF. *The Journal of neuroscience*, 33(40):15940–51.
- Friberg, E. et al., 2007. Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Diabetologia*, 50(7):1365–74.
- Fung-Kee-Fung, M. et al., 2006. Follow-up after primary therapy for endometrial cancer: a systematic review. *Gynecologic oncology*, 101(3):520–9.
- Gargett, C.E. & Ye, L., 2012. Endometrial reconstruction from stem cells. *Fertility and sterility*, 98(1):11–20.
- Garrido-Gómez, T. et al., 2012. Annexin A2 is critical for embryo adhesiveness to the human endometrium by RhoA activation through F-actin regulation. *FASEB journal*, 26(9):3715–27.
- Géral, C., Angelova, A. & Lesieur, S., 2013. From molecular to nanotechnology strategies for delivery of neurotrophins: emphasis on brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmaceutics*, 5(1):127–67.
- Gerke, V. & Moss, S.E., 2002. Annexins: from structure to function. *Physiological reviews*, 82(2):331–71.
- Graaf, V. de, 2001. *Human Anatomy* 6th ed., T. M. H. Companies.
- Guo, D. et al., 2011. More expressions of BDNF and TrkB in multiple hepatocellular carcinoma and anti-BDNF or K252a induced apoptosis, suppressed invasion of HepG2 and HCCLM3 cells. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 30:97.
- Gupta, G.P. & Massagué, J., 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4):679–95.
- Gutierrez-Hartmann, A., Duval, D.L. & Bradford, A.P., 2007. ETS transcription factors in endocrine systems. *Trends in endocrinology and metabolism*, 18(4):150–8.
- Hansen, M.D.H., Ehrlich, J.S. & Nelson, W.J., 2002. Molecular mechanism for orienting membrane and actin dynamics to nascent cell-cell contacts in epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(47):45371–6.
- Hecht, M. et al., 2005. The neurotrophin receptor TrkB cooperates with c-Met in enhancing neuroblastoma invasiveness. *Carcinogenesis*, 26(12):2105–15.
- Hill, E.K. & Dizon, D.S., 2012. Medical therapy of endometrial cancer: current status and promising novel treatments. *Drugs*, 72(5):705–13.

- Holcomb, K. et al., 2002. E-cadherin expression in endometrioid, papillary serous, and clear cell carcinoma of the endometrium. *Obstetrics and gynecology*, 100(6):1290–5.
- Hsieh, H. Ben et al., 2006. High speed detection of circulating tumor cells. *Biosensors & bioelectronics*, 21(10):1893–9.
- Hubbard, S.A. & Gargett, C.E., 2010. A cancer stem cell origin for human endometrial carcinoma?. *Reproduction*, 140(1):23–32.
- Hurt, E.M. et al., 2008. Expression of the ZEB1 (deltaEF1) transcription factor in human: additional insights. *Molecular and cellular biochemistry*, 318(1-2):89–99.
- Ito, K. et al., 1996. K-ras point mutations in endometrial carcinoma: effect on outcome is dependent on age of patient. *Gynecologic oncology*, 63(2):238–46.
- James, D. et al., 2005. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*, 132(6):1273–82.
- Jamsai, D. et al., 2013. A Missense Mutation in the Transcription Factor ETV5 Leads to Sterility, Increased Embryonic and Perinatal Death, Postnatal Growth Restriction, Renal Asymmetry and Polydactyly in the Mouse. *PloS one*, 8(10):e77311.
- Ji, X.-Q. et al., 2006. Real-time quantitative RT-PCR detection of disseminated endometrial tumor cells in peripheral blood and lymph nodes using the LightCycler System. *Gynecologic oncology*, 100(2):355–60.
- Jones, M.E. et al., 2012. Endometrial cancer survival after breast cancer in relation to tamoxifen treatment: Pooled results from three countries. *Breast Cancer Research*, 14(3):R91.
- Jung, R.T., 1997. Obesity as a disease. *British medical bulletin*, 53(2):307–21.
- Kang, Y. & Massagué, J., 2004. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, 118(3):277–9.
- Kawamura, K. et al., 2009. Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival. *Endocrinology*, 150(8):3774–82.
- Keys, H.M. et al., 2004. A phase III trial of surgery with or without adjunctive external pelvic radiation therapy in intermediate risk endometrial adenocarcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology*, 92(3):44–51.

- Kim, J.J., Kurita, T. & Bulun, S.E., 2013. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocrine reviews*, 34(1):130–62.
- Kitchener, H. et al., 2009. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study. *Lancet*, 373(9658):125–36.
- Königsberg, R. et al., 2011. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta oncologica*, 50(5):700–10.
- Konopka, B. et al., 2007. Molecular genetic defects in endometrial carcinomas: microsatellite instability, PTEN and beta-catenin (CTNNB1) genes mutations. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 133(6):361–71.
- Kopp, J.L. et al., 2004. Unique and selective effects of five Ets family members, Elf3, Ets1, Ets2, PEA3, and PU.1, on the promoter of the type II transforming growth factor-beta receptor gene. *The Journal of biological chemistry*, 279(19):19407–20.
- Kupferman, M.E. et al., 2010. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 29(14):2047–59.
- Kyo, S. et al., 2006. High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. *Human pathology*, 37(4):431–8.
- Laget, M.P. et al., 1996. Two functionally distinct domains responsible for transactivation by the Ets family member ERM. *Oncogene*, 12(6):1325–36.
- De Launoit, Y. et al., 2006. The Ets transcription factors of the PEA3 group: transcriptional regulators in metastasis. *Biochimica et biophysica acta*, 1766(1):79–87.
- Lax, S.F. et al., 2000. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer*, 88(4):814–24.
- Leal, G., Comprido, D. & Duarte, C.B., 2014. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 76 Pt C:639–56.
- Lee, K.R., Vacek, P.M. & Belinson, J.L., 1994. Traditional and nontraditional histopathologic predictors of recurrence in uterine endometrioid adenocarcinoma. *Gynecologic oncology*, 54(1):10–8.
- Lépine, J. et al., 2010. Circulating estrogens in endometrial cancer cases and their relationship with tissular expression of key estrogen biosynthesis and metabolic pathways. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95(6):2689–98.

- Liang, J. & Shang, Y., 2013. Estrogen and cancer. *Annual review of physiology*, 75:225–40.
- Lindemann, K., Vatten, L.J. & Eskild, A., 2008. Body mass, diabetes and smoking, and endometrial cancer risk: a follow-up study. *British journal of cancer*, 98(9):1582–1585.
- Liu, Q.-R. et al., 2005. Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics*, 134B(1):93–103.
- Llauradó, M. et al., 2012. Molecular bases of endometrial cancer: new roles for new actors in the diagnosis and the therapy of the disease. *Molecular and cellular endocrinology*, 358(2):244–55.
- Llobet, D. et al., 2009. Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints. *Journal of clinical pathology*, 62(9):777–85.
- Lobo, N.A. et al., 2007. The biology of cancer stem cells. *Annual review of cell and developmental biology*, 23:675–99.
- Lokman, N.A. et al., 2011. The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression. *Cancer microenvironment*, 4(2):199–208.
- Lu, B.C. et al., 2009. Etv4 and Etv5 are required downstream of GDNF and Ret for kidney branching morphogenesis. *Nature genetics*, 41(12):1295–302.
- Lukanova, A. et al., 2004. Circulating levels of sex steroid hormones and risk of endometrial cancer in postmenopausal women. *International journal of cancer*, 108(3):425–32.
- Luo, M. & Hajjar, K.A., 2013. Annexin A2 system in human biology: cell surface and beyond. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 39(4):338–46.
- Makino, K. et al., 2012. Inhibition of uterine sarcoma cell growth through suppression of endogenous tyrosine kinase B signaling. *PLoS one*, 7(7):e41049.
- Mani, S.A. et al., 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4):704–15.
- Marchetti, M. et al., 2002. The role of hysteroscopy in early diagnosis of endometrial cancer. *European journal of gynaecological oncology*, 23(2):151–3.
- Mariani, A. et al., 2004. High-risk endometrial cancer subgroups: candidates for target-based adjuvant therapy. *Gynecologic oncology*, 95(1):120–6.

- Marini, A.M. et al., 2004. Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype. *Restorative neurology and neuroscience*, 22(2):121-30.
- Marosi, K. & Mattson, M.P., 2013. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends in endocrinology and metabolism*, 25(2):89-98.
- Martin-Hirsch, P.L., Lilford, R.J. & Jarvis, G.J., 1996. Adjuvant progestagen therapy for the treatment of endometrial cancer: review and meta-analyses of published randomised controlled trials. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 65(2):201-7.
- Matias-Guiu, X. & Davidson, B., 2014. Prognostic biomarkers in endometrial and ovarian carcinoma. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, 464(3):315-31.
- Matsuda, A. et al., 1999. Identification and immunohistochemical localization of annexin II in rat cornea. *Current eye research*, 19(4):368-75.
- Maxwell, G.L. et al., 2006. Progesterin and estrogen potency of combination oral contraceptives and endometrial cancer risk. *Gynecologic oncology*, 103(2):535-40.
- Maxwell, G.L. et al., 2011. Proteomic analysis of stage I endometrial cancer tissue: identification of proteins associated with oxidative processes and inflammation. *Gynecologic oncology*, 121(3):586-94.
- Mell, L.K. et al., 2004. Prognostic significance of E-cadherin protein expression in pathological stage I-III endometrial cancer. *Clinical cancer research*, 10(16):5546-53.
- Minturn, J.E. et al., 2011. Phase I trial of lestaurtinib for children with refractory neuroblastoma: a new approaches to neuroblastoma therapy consortium study. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 68(4):1057-65.
- Mirantes, C. et al., 2013. Epithelial-to-mesenchymal transition and stem cells in endometrial cancer. *Human pathology*, 44(10):1973-81.
- Mizrak, D., Brittan, M. & Alison, M.R., 2008. CD133: molecule of the moment. *The Journal of pathology*, 214(1):3-9.
- Monge, M. et al., 2007. ERM/ETV5 up-regulation plays a role during myometrial infiltration through matrix metalloproteinase-2 activation in endometrial cancer. *Cancer research*, 67(14):6753-9.
- Monge, M. et al., 2009. Subtractive proteomic approach to the endometrial carcinoma invasion front. *Journal of proteome research*, 8(10):4676-84.

- Monté, D. et al., 1994. Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors. *Oncogene*, 9(5):1397–406.
- Montgomery, B.E., Daum, G.S. & Dunton, C.J., 2004. Endometrial hyperplasia: a review. *Obstetrical & gynecological survey*, 59(5):368–78.
- Montserrat, N. et al., 2012. Epithelial to mesenchymal transition in early stage endometrioid endometrial carcinoma. *Human pathology*, 43(5):632–43.
- Moon, A. et al., 2011. Expression of BDNF, TrkB, and p53 in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathology*, 43(5):453–8.
- Moreno-Bueno, G., Portillo, F. & Cano, A., 2008. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene*, 27(55):6958–69.
- Munz, M., Baeuerle, P.A. & Gires, O., 2009. The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling. *Cancer Research*, 69(14):5627–5629.
- Musgrove, E. a et al., 2011. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 11(8):558–72.
- Mylonas, I. et al., 2009. Immunohistochemical labelling of steroid receptors in normal and malignant human endometrium. *Acta histochemica*, 111(4):349–59.
- Nakagawara, A. et al., 1994. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Molecular and cellular biology*, 14(1):759–67.
- Nout, R.A. et al., 2010. Vaginal brachytherapy versus pelvic external beam radiotherapy for patients with endometrial cancer of high-intermediate risk (PORTEC-2): an open-label, non-inferiority, randomised trial. *Lancet*, 375(9717):816–23.
- Obermayr, E. et al., 2010. Assessment of a six gene panel for the molecular detection of circulating tumor cells in the blood of female cancer patients. *BMC cancer*, 10:666.
- Oh, S., Shin, S. & Janknecht, R., 2012. ETV1, 4 and 5: an oncogenic subfamily of ETS transcription factors. *Biochimica et biophysica acta*, 1826(1):1–12.
- Oikawa, T., 2004. ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer science*, 95(8):626–33.
- Okuda, T. et al., 2010. Genetics of endometrial cancers. *Obstetrics and gynecology international*, 2010:984013.
- Okugawa, Y. et al., 2013. Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B pathway in gastric cancer. *British journal of cancer*, 108(1):121–30.

- Oza, A.M. et al., 2011. Phase II study of temsirolimus in women with recurrent or metastatic endometrial cancer: a trial of the NCIC Clinical Trials Group. *Journal of clinical oncology*, 29(24):3278–85.
- Pang, P.T. et al., 2004. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, 306(5695):487–91.
- Pantel, K. & Brakenhoff, R.H., 2004. Dissecting the metastatic cascade. *Nature reviews. Cancer*, 4(6):448–56.
- Pantel, K., Brakenhoff, R.H. & Brandt, B., 2008. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature reviews. Cancer*, 8(5):329–40.
- Parazzini, F. et al., 1999. Diabetes and endometrial cancer: an Italian case-control study. *International journal of cancer*, 81(4):539–42.
- Pearse, R.N. et al., 2005. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood*, 105(11):4429–36.
- Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A., 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nature reviews. Cancer*, 7(6):415–28.
- Peinado, H., Portillo, F. & Cano, A., 2004. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International journal of developmental biology*, 48(5-6):365–75.
- Planagumà, J. et al., 2005. Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma. *The Journal of pathology*, 207(4):422–9.
- Polyak, K. & Weinberg, R.A., 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature reviews. Cancer*, 9(4):265–73.
- Ponce J, Torrejón R, B.M., 2010. *Oncoguía SEGO. Cáncer de Endometrio 2010. Guía de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario* SEGO Publicaciones.
- Prat, J., 2004. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Human pathology*, 35(6):649–62.
- Pruunsild, P. et al., 2007. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics*, 90(3):397–406.
- Raimondi, C. et al., 2011. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*, 130(2):449–55.

- Randall, M.E. et al., 2006. Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of clinical oncology*, 24(1):36–44.
- Reichardt, L.F., 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 361(1473):1545–64.
- Renoir, J.-M., Marsaud, V. & Lazennec, G., 2013. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochemical pharmacology*, 85(4):449–65.
- Ricci, A. et al., 2001. Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 25(4):439–46.
- Robbins S, Cotran R, K. V, 2003. *Robbins, Patología Humana* 8th ed. E. España.
- Roesler, R. et al., 2011. BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. *Expert review of anticancer therapy*, 11(10):1473–5.
- Rowlands, T.M. et al., 2000. Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. *Reviews of reproduction*, 5(1):53–61.
- Rutella, S. et al., 2009. Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. *Clinical cancer research*, 15(13):4299–311.
- Sakuragi, N. et al., 1994. Decreased E-cadherin expression in endometrial carcinoma is associated with tumor dedifferentiation and deep myometrial invasion. *Gynecologic oncology*, 53(2):183–9.
- Sakuragi, N. et al., 2005. Functional analysis of p53 gene and the prognostic impact of dominant-negative p53 mutation in endometrial cancer. *International journal of cancer*, 116(4):514–9.
- Salvesen, H.B. et al., 2009. Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12):4834–9.
- Salvesen, H.B., MacDonald, N., et al., 2000. Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas. *Clinical cancer research*, 6(9):3607–13.
- Salvesen, H.B. et al., 2001. PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *International journal of cancer*, 91(1):22–6.

- Salvesen, H.B., Das, S. & Akslen, L.A., 2000. Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis. *Clinical cancer research*, 6(1):153–9.
- Salvesen, H.B., Haldorsen, I.S. & Trovik, J., 2012. Markers for individualised therapy in endometrial carcinoma. *The lancet oncology*, 13(8):e353–61.
- Salvesen, H.B., Werner, H.M. & Krakstad, C., 2013. PI3K pathway in gynecologic malignancies. *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO. American Society of Clinical Oncology. Meeting*.
- Samarntjai, N., Hall, K. & Yeh, I.-T., 2010. Molecular profiling of endometrial malignancies. *Obstetrics and gynecology international*, 2010:162363.
- Sánchez, M.J. et al., 2010. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Annals of oncology*, 21 Suppl 3:iii30–36.
- Sandles, L.G. et al., 1992. Endometrial adenocarcinoma: genetic analysis suggesting heritable site-specific uterine cancer. *Gynecologic oncology*, 47(2):167–71.
- Sankaranarayanan, R. & Ferlay, J., 2006. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 20(2):207–225.
- Saso, S. et al., 2011. Endometrial cancer. *BMJ*, 343:d3954.
- Sastre, J. et al., 2008. Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables. *Annals of oncology*, 19(5):935–8.
- Savouret, J.F. et al., 1994. The progesterone receptor. Biological effects of progestins and antiprogestins. *Human reproduction*, 9 Suppl 1:7–11.
- Schneider, M.B. et al., 2001. Expression of nerve growth factors in pancreatic neural tissue and pancreatic cancer. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 49(10):1205–10.
- Sclabas, G.M. et al., 2005. Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. *Clinical cancer research*, 11(2 Pt 1):440–9.
- Seth, A. & Watson, D.K., 2005. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *European journal of cancer*, 41(16):2462–78.
- Shafiee, M.N. et al., 2013. Reviewing the molecular mechanisms which increase endometrial cancer (EC) risk in women with polycystic ovarian syndrome (PCOS): Time for paradigm shift?. *Gynecologic oncology*, 131(2):489–92.

- Shao, R., 2013. Progesterone receptor isoforms A and B: new insights into the mechanism of progesterone resistance for the treatment of endometrial carcinoma. *Ecancermedalscience*, 7:381.
- Sharma, M.R. et al., 2006. Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. *Experimental and molecular pathology*, 81(2):146-56.
- Sharrocks, A.D., 2001. The ETS-domain transcription factor family. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(11):827-37.
- Shih, H.-C. et al., 2003. Nuclear localization of beta-catenin is correlated with the expression of cyclin D1 in endometrial carcinomas. *Anticancer research*, 23(5A):3749-54.
- Siegel, R. et al., 2013. Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(4):220-41.
- Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A., 2012. Cancer Statistics, 2012. . *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(1):10-29.
- Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J, P.A., 2009. *El Endometio Humano. Desde la investigación a la clínica* E. M. Panamericana.
- Slomovitz, B.M. et al., 2010. A phase 2 study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor, everolimus, in patients with recurrent endometrial carcinoma. *Cancer*, 116(23):5415-9.
- Smit, M.A. et al., 2009. A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis. *Molecular and cellular biology*, 29(13):3722-37.
- Smith, C.J. et al., 2007. Efficacy of routine follow-up in patients with recurrent uterine cancer. *Gynecologic oncology*, 107(1):124-9.
- Soler, M. et al., 1999. Hypertension and Hormone-Related Neoplasms in Women. *Hypertension*, 34(2):320-325.
- Sun, C. et al., 2010. Brain-derived neurotrophic factor induces proliferation, migration, and VEGF secretion in human multiple myeloma cells via activation of MEK-ERK and PI3K/AKT signaling. *Tumour biology*, 31(2):121-8.
- Tanaka, Y. et al., 2013. Prognostic impact of EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression in endometrial cancer. *Cancer biology & therapy*, 14(1):13-9.
- Theodoropoulos, P.A. et al., 2010. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer letters*, 288(1):99-106.

- Thiele, C.J., Li, Z. & McKee, A.E., 2009. On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clinical cancer research*, 15(19):5962-7.
- Thiery, J.P. et al., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5):871-90.
- Thompson, E.W., Newgreen, D.F. & Tarin, D., 2005. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?. *Cancer research*, 65(14):5991-5.
- Valastyan, S. & Weinberg, R.A., 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2):275-92.
- Van den Bosch, T. et al., 2012. Screening for uterine tumours. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 26(2):257-66.
- Vanhecke, E. et al., 2011. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. *Clinical cancer research*, 17(7):1741-52.
- Vidal, F. & Rafii, A., 2013. Lymph Node Assessment in Endometrial Cancer: Towards Personalized Medicine. *Obstetrics and gynecology international*, 2013:892465.
- Visvader, J.E. & Lindeman, G.J., 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews. Cancer*, 8(10):755-68.
- Wang, C. et al., 2011. Estrogen induces c-myc gene expression via an upstream enhancer activated by the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Molecular endocrinology*, 25(9):1527-38.
- Westermarck, J. & Kähäri, V.M., 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB journal*, 13(8):781-92.
- Wik, E. et al., 2013. High phospho-Stathmin(Serine38) expression identifies aggressive endometrial cancer and suggests an association with PI3K inhibition. *Clinical cancer research*, 19(9):2331-41.
- Wright, J.D. et al., 2012. Contemporary management of endometrial cancer. *Lancet*, 379(9823):1352-60.
- Wu, X. et al., 2011. Spermatogonial stem cell self-renewal requires ETV5-mediated downstream activation of Brachyury in mice. *Biology of reproduction*, 85(6):1114-23.
- Xi, L. et al., 2007. Optimal markers for real-time quantitative reverse transcription PCR detection of circulating tumor cells from melanoma, breast, colon, esophageal, head and neck, and lung cancers. *Clinical chemistry*, 53(7):1206-15.

- Yang, X., Martin, T.A. & Jiang, W.G., 2013. Biological influence of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on colon cancer cells. *Experimental and therapeutic medicine*, 6(6):1475–1481.
- Yeremian, A. et al., 2013. Endometrial carcinoma: molecular alterations involved in tumor development and progression. *Oncogene*, 32(4):403–13.
- Yu, X. et al., 2008. Suppression of anoikis by the neurotrophic receptor TrkB in human ovarian cancer. *Cancer science*, 99(3):543–52.
- Zaino, R.J. et al., 1995. The utility of the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics histologic grading of endometrial adenocarcinoma using a defined nuclear grading system. A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*, 75(1):81–6.
- Zannoni, G.F. et al., 2013. The expression ratios of estrogen receptor α (ER α) to estrogen receptor β 1 (ER β 1) and ER α to ER β 2 identify poor clinical outcome in endometrioid endometrial cancer. *Human pathology*, 44(6):1047–54.
- Zeimet, A.G. et al., 2013. L1CAM in early-stage type I endometrial cancer: results of a large multicenter evaluation. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(15):1142–50.
- Zhai, H. et al., 2011. Annexin A2 promotes glioma cell invasion and tumor progression. *The Journal of neuroscience*, 31(40):14346–60.
- Zhang, H.-J. et al., 2013. Annexin A2 silencing inhibits invasion, migration, and tumorigenic potential of hepatoma cells. *World journal of gastroenterology*, 19(24):3792–801.
- Zhang, S. et al., 2010. TrkB is highly expressed in NSCLC and mediates BDNF-induced the activation of Pyk2 signaling and the invasion of A549 cells. *BMC cancer*, 10:43.
- Zhang, X. et al., 2012. The association of annexin A2 and cancers. *Clinical & translational oncology*, 14(9):634–40.
- Zheng, S. et al., 2007. Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. *Journal of chromatography. A*, 1162(2):154–61.
- Zhou, C. et al., 2013. Estrogen induction of telomerase activity through regulation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) dependent pathway in human endometrial cancer cells. *PLoS one*, 8(2):e55730.
- Zhou, S. et al., 2012. Proteomics identification of annexin A2 as a key mediator in the metastasis and proangiogenesis of endometrial cells in human adenomyosis. *Molecular & cellular proteomics*, 11(7):M112.017988.

Ziel, H.K., Finkle, W.D. & Greenland, S., 1998. Decline in incidence of endometrial cancer following increase in prescriptions for opposed conjugated estrogens in a prepaid health plan. *Gynecologic oncology*, 68(3):253-5.



