

Tesis Doctoral

**GENERACIÓN Y VALIDACIÓN
DE UN MODELO ANIMAL
ORTOTÓPICO DE
CÁNCER DE ENDOMETRIO**



Memoria presentada por la Licenciada

Silvia Cabrera Díaz

**para optar al grado de Doctora en Medicina y Cirugía por la
Universitat Autònoma de Barcelona**

Septiembre de 2013



4. GENERACIÓN DE UN MODELO ANIMAL ORTOTÓPICO TRANSMIOMETRIAL DE CÁNCER DE ENDOMETRIO A PARTIR DE TEJIDO TUMORAL HUMANO

4.1 SELECCIÓN DEL TEJIDO

Se testaron diferentes tejidos de origen endometrial humano en el modelo murino. Todos los tipos histológicos presentaron desarrollo ortotópico en el animal.

- Carcinosarcoma IB G3, tumor de crecimiento muy rápido en el animal, generando grandes volúmenes de tumor ortotópico en pocos días. Infiltración local agresiva, sin presentar patrón de diseminación por la afectación rápida que produce en el animal.
- Célula clara IIB G2, tumor de crecimiento muy lento a nivel ortotópico, genera tumores de contenido quístico en el útero y no presenta diseminación a distancia.
- Endometrioide, se utilizan 8 muestras de diferentes pacientes, se seleccionan las muestras de la PACIENTE A (Estadio IA FIGO, G2) y PACIENTE B (Estadio II FIGO, G2) por ser las que presentan un perfil de crecimiento ortotópico más adecuado y por ser el tipo histológico más frecuente en la clínica.

4.2 ESTUDIO PILOTO DE GENERACIÓN TRANSVAGINAL

Después de los buenos resultados obtenidos con el modelo de células Hec1A-Fluc utilizando la vía transmiometrial, se decide testar la inoculación transvaginal para decidir si este abordaje se debe también descartar en el modelo derivado de tejido tumoral humano.

Inoculamos 5 ratones por vía transvaginal, cuatro de ellos con tumor endometrioide y uno con tumor célula clara. Sólo uno de los animales, de histología endometrioide, desarrolló tumor ortotópico endometrial infiltrante, sin afectación local ni evidencia de metástasis a distancia. Los otros cuatro animales no generaron tumor endometrial (Tabla 23).

Se decide proseguir el desarrollo del modelo mediante la técnica de inoculación transmiometrial.

V. RESULTADOS

N RATONES TÉCNICA TRANSVAGINAL	
Tumor endometrial	5
INCIDENCIA TUMORAL	20%
INCIDENCIA DE METÁSTASIS	0

Tabla 23: Resultados del experimento piloto de generación de un modelo ortotópico transvaginal a partir de tejido tumoral humano.

4.3 ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE INOCULACIÓN TRANSMIOMETRIAL

- Inoculamos **10 ratones por vía transmiometrial** con dos muestras de tejido endometrioide humano (provenientes de PACIENTE A (Estadio IA FIGO, GH2) y PACIENTE B (Estadio II FIGO, GH2), 5 animales por muestra, tras un tiempo de crecimiento subcutáneo
- El seguimiento se realiza mediante palpación abdominal y control de peso. Se realizan pruebas con el objetivo de mejorar el seguimiento con Resonancia Magnética y Ecografía transabdominal
- Los animales son sacrificados cuando presentan gran masa abdominal, pérdida de peso importante o ascitis severa.

- El tiempo medio previo a la **necropsia** fue de 62.7 días (rango 58-66). Los órganos fueron fijados y teñidos con hematoxilina-eosina
- El **90%** de los animales generados desarrollaron tumor ortotópico endometrial de histología endometrioide. El 77% de los animales presentó además diseminación en la cavidad pélvica, y el 66% implantes abdominales

Evaluación del seguimiento mediante Resonancia Magnética (RM)

Se somete a uno de los animales a estudio mediante RM. El animal es sedado y se toman imágenes del mismo durante un período de tiempo de unos 20-30 min. Las imágenes obtenidas se presentan en la figura 49.

La RM permite objetivar el tumor pélvico, localizarlo y medir su tamaño, así como la presencia de implantes extra-pélvicos en caso de que los hubiera.

Este método de seguimiento es adecuado para la evaluación *in vivo* del volumen y localización tumoral, aunque nosotros no lo realizamos durante el seguimiento de forma habitual por ser una técnica costosa y agresiva para nuestros animales. Se trata de ratones inmunodeprimidos, y la RM les somete a una sedación duradera, en una cámara fría, y sin condiciones libres de patógenos, por lo que se considera que esta técnica se puede utilizar de forma puntual pero no como método de seguimiento de elección en nuestro modelo.

V. RESULTADOS

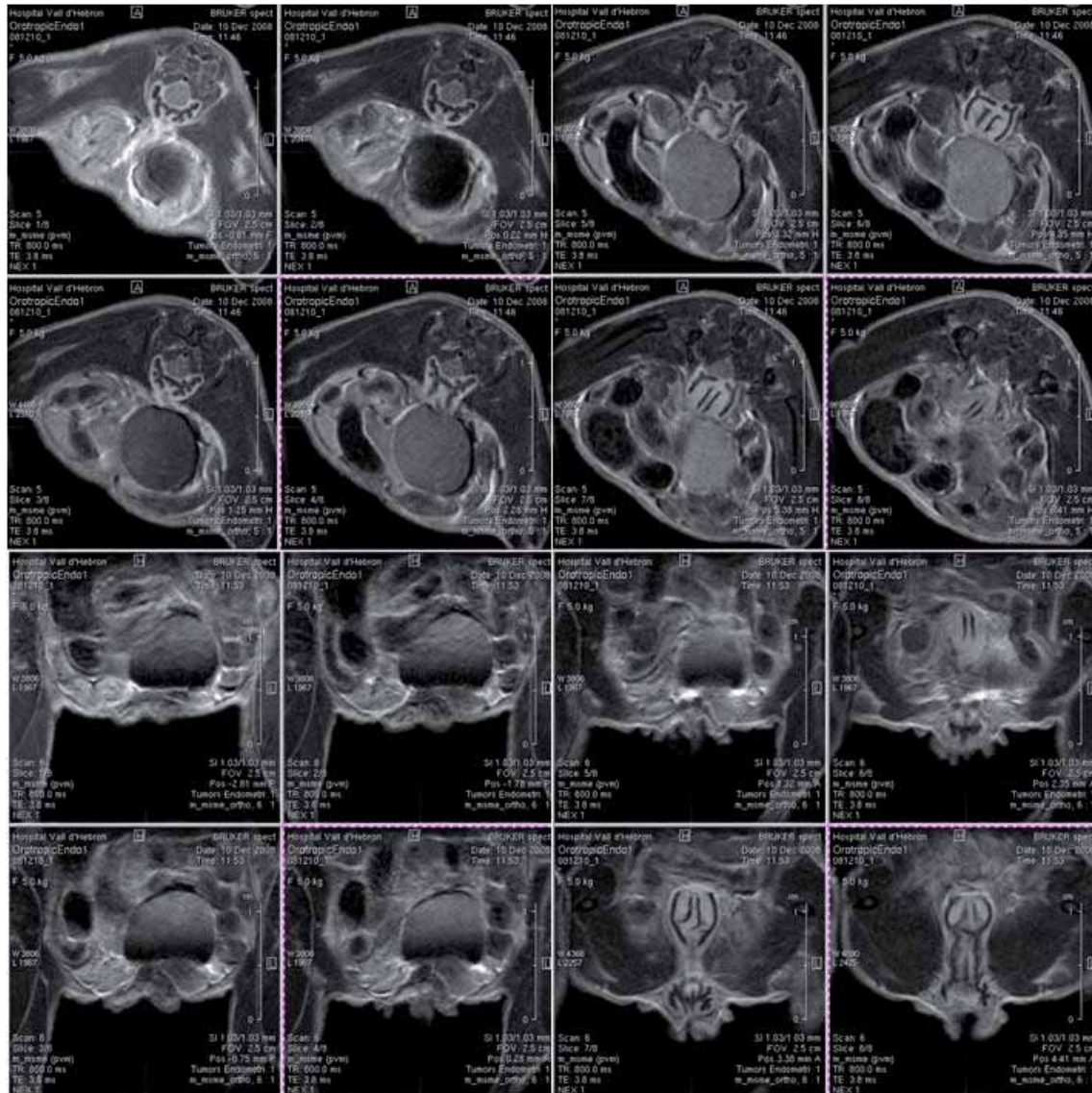


Figura 49. Imágenes de seguimiento mediante Resonancia Magnética. Corte coronal y frontal de la pelvis de un ratón portador de tumor endometrial endometriode humano. Se observa una lesión redondeada homogénea, de aspecto quístico por imagen, que corresponde al tumor endometrial generado.

Evaluación del seguimiento mediante Ecografía Transabdominal

Previamente a la necropsia se realizó un estudio ecográfico transabdominal con sonda para animal pequeño con el objetivo de determinar el diámetro máximo de tumor endometrial y compararlo con el tumor medido en la pieza de la necropsia. Como se observa en la tabla 24, no existe una buena correlación entre el diámetro máximo medido por ecografía y el tamaño real del tumor (correlación *rho de Spearman* no significativa, $p=0.92$), y la correlación

empeora en tumores de mayor tamaño. Por tanto, el método de seguimiento mediante ecografía transabdominal podría ser útil al inicio del desarrollo del tumor, cuando presenta pequeños volúmenes, pero la calidad de las medidas disminuye a medida que el tumor aumenta su tamaño (Figura 50).

RATÓN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Diámetro mayor por eco (cm)	0,46	0	0	1,6	0,69	0,6	0,53	0,91	1,1	0,78
Diámetro mayor por necropsia (cm)	0,97	0,435	0,87	3,05	0,8	0,65	-	1,09	1,72	0,13

Tabla 24. Resultados del diámetro mayor del tumor ortotópico endometrial medido por ecografía o en la pieza de necropsia. El valor de significación del índice de correlación rho de Spearman no es estadísticamente significativo ($p=0.92$), por lo que se concluye que los valores no poseen una correlación entre ellos.

V. RESULTADOS

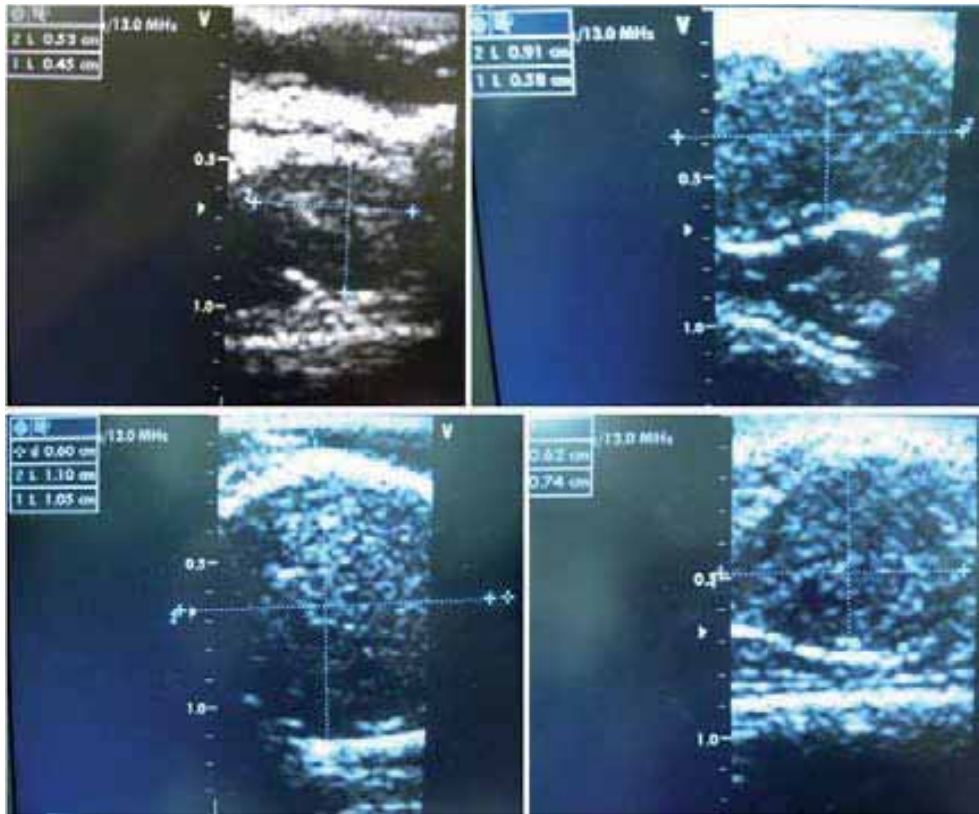


Figura 50. Imágenes de seguimiento mediante ecografía transabdominal. Se observa que cuando el tumor alcanza gran tamaño la sonda de animal pequeño no puede medirlo adecuadamente, por lo que los mayores sesgos en las medidas se producen en los tumores de mayor tamaño.

Necropsia. Análisis de resultados.

Nueve ratones (90%) desarrollaron tumor endometrial, éstos mantenían el patrón histológico de un adenocarcinoma endometriode. La infiltración miometrial se observó en todos estos animales, y ésta se desarrolló desde dentro del útero hacia afuera, del mismo modo que ocurre en la paciente.

El 77% de los animales presentó diseminación en la cavidad pélvica con afectación de la grasa pélvica, y el 66% presentó además implantes abdominales distribuidos en peritoneo parietal, páncreas e hígado. Las metástasis ganglionares se observaron en un solo ratón, y no se detectó ningún caso de metástasis por vía hematogena en esta serie. Todos los animales que presentaron diseminación extrauterina del tumor desarrollaron una *ascitis hemorrágica* muy característica, que no se había observado en los animales generados a partir de células Hec1A-Fluc (Tabla 25).

INOCULACIÓN TRANSMIOMETRIAL	n=10
Tumor endometrial	9
Eficiencia	90%
Implantes pélvicos (Grasa Pélvica)	7/9 (77.7%)
Metástasis ganglionar (G. Para-aórticos)	1/9 (11.1%)
Implantes abdominales (Peritoneo, Páncreas e Hígado)	6/9 (66.6%)
Metástasis pulmonares	0/9 (0%)

Tabla 25. Resultados de la generación de un modelo ortotópico de cáncer de endometrio a partir de tejido tumoral humano endometriode por vía transmiometrial.

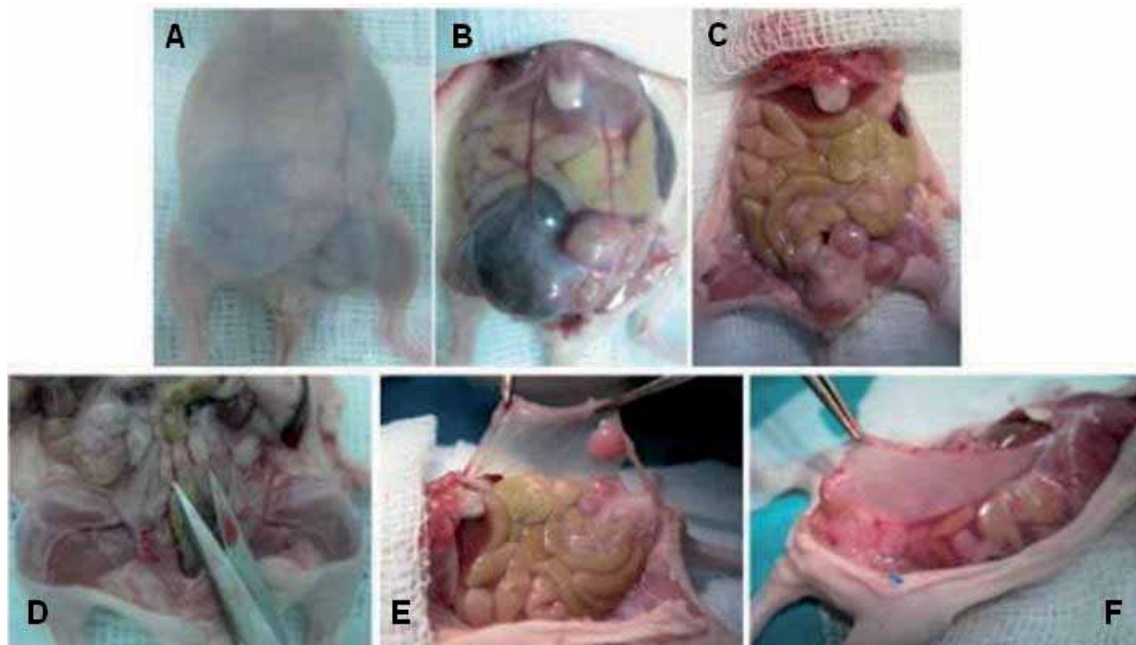


Figura 51. Imágenes de la necropsia de los animales generados por vía transmiometrial a partir de tejido tumoral humano. Se observa: A, distensión abdominal por ascitis hemorrágica, B, gran volumen tumoral a nivel pélvico y en hemiabdomen superior izquierdo del animal, C, nódulos de tumor en la grasa pélvica, D, ganglios para-aórticos aumentados de tamaño, E, nódulo en peritoneo parietal, y F, ascitis hemorrágica característica de este modelo en un animal con diseminación intra-abdominal.

5. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE AMBOS MODELOS

Se estudia la expresión de varias proteínas relacionadas con el cáncer de endometrio tipo I y tipo II mediante inmunohistoquímica. Globalmente, las proteínas p53, ER, PR, Ki67, MSH6, MSH2 y MLH1 mostraron expresión nuclear. E-cadherina se expresaba en membrana y β -catenina en membrana y débilmente en citoplasma. La intensidad de la tinción fue homogénea en todas las células tumorales de cada muestra (Tabla 26).

		p53	RE	RP	β -catenina	Ki67	E-cadherina	MSH2	MLH1	MSH6	
HEC1A-Fluc		TUMOR PRIMARIO (útero)	100%	-	-	100%	100%	100%	100%	100%	
		METÁSTASIS (pulmón)	100%	-	-	100%	100%	50%	100%	100%	100%
		METÁSTASIS (ganglio paraaórtico)	100%	-	-	80%	90%	50%	100%	100%	100%
ADENOCARCINOMA ENDOMETRIOIDE	PACIENTE A	TUMOR PRIMARIO (útero)	-	40%	40%	100%	50%	100%	-	-	5%
		METÁSTASIS (implante peritoneal)	-	40%	40%	80%	50%	100%	-	-	5%
	PACIENTE B	TUMOR PRIMARIO (útero)	-	-	50%	100%	2%	-	-	-	80%
		METÁSTASIS (implante peritoneal)	-	-	60%	80%	2%	-	-	-	80%

Tabla 26: Resultados de la inmunohistoquímica el tejido tumoral ortotópico (primario) y en las metástasis desarrolladas en el animal. Se expresa el % de células del tumor que expresa un determinado marcador.

V. RESULTADOS

El perfil molecular del **tumor derivado de células Hec1A-Fluc** fue representativo de un tumor indiferenciado y agresivo, presentando tinción para p53 intensamente positivo, receptores hormonales negativos, alto porcentaje de células Ki67 positivas, similar al tipo II de cáncer de endometrio (Figura 52). El perfil de tinción fue similar en las células metastásicas, como se observa en las imágenes de la metástasis ganglionar y pulmonar.

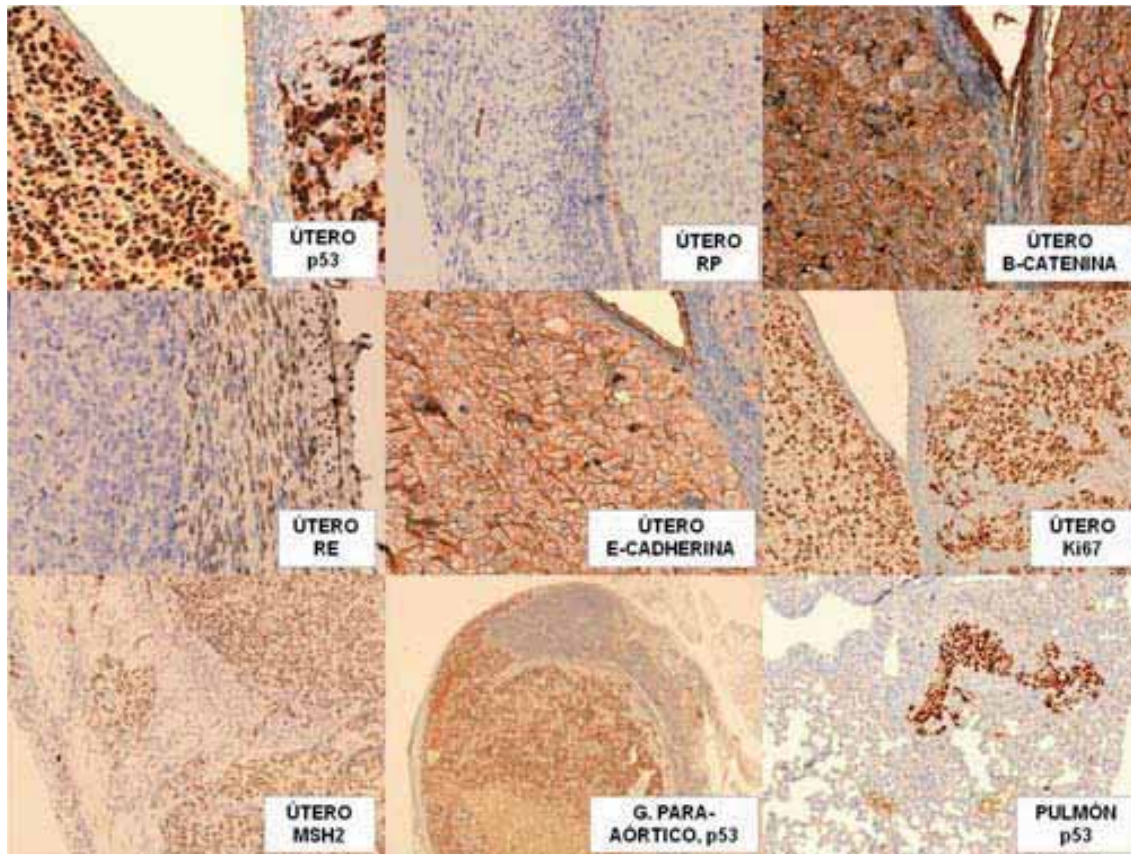


Figura 52. Imágenes de tinción IHQ de tejidos derivados del modelo animal ortotópico a partir de células Hec1A-Fluc.

El perfil molecular del **tumor de origen endometriode** era representativo de un tumor mejor diferenciado, presentando tinción para p53 negativa y presencia de receptores hormonales. Los receptores hormonales variaron en función de la muestra original. En la muestra del paciente A (estadio FIGO IA, GH2), ambos receptores (RE, receptores de estrógenos y RP, receptores de progesterona) se expresaban, mientras que en la muestra del paciente B (estadio FIGO II, GH2) solo se observaron RP. También fue diferente la tinción de Ki67, que era superior en el tejido derivado de la paciente A y en el implante peritoneal generado a partir de este tejido que en el implante B. El tejido de la paciente A

presentaba también positividad para E-cadherina, hecho diferencial con el tumor derivado de la paciente B. Este hecho demuestra una correlación en el comportamiento molecular entre el tejido original y el tejido tras el crecimiento en el animal. El patrón molecular era además similar entre el tumor primario y las metástasis (Figuras 53 y 54).

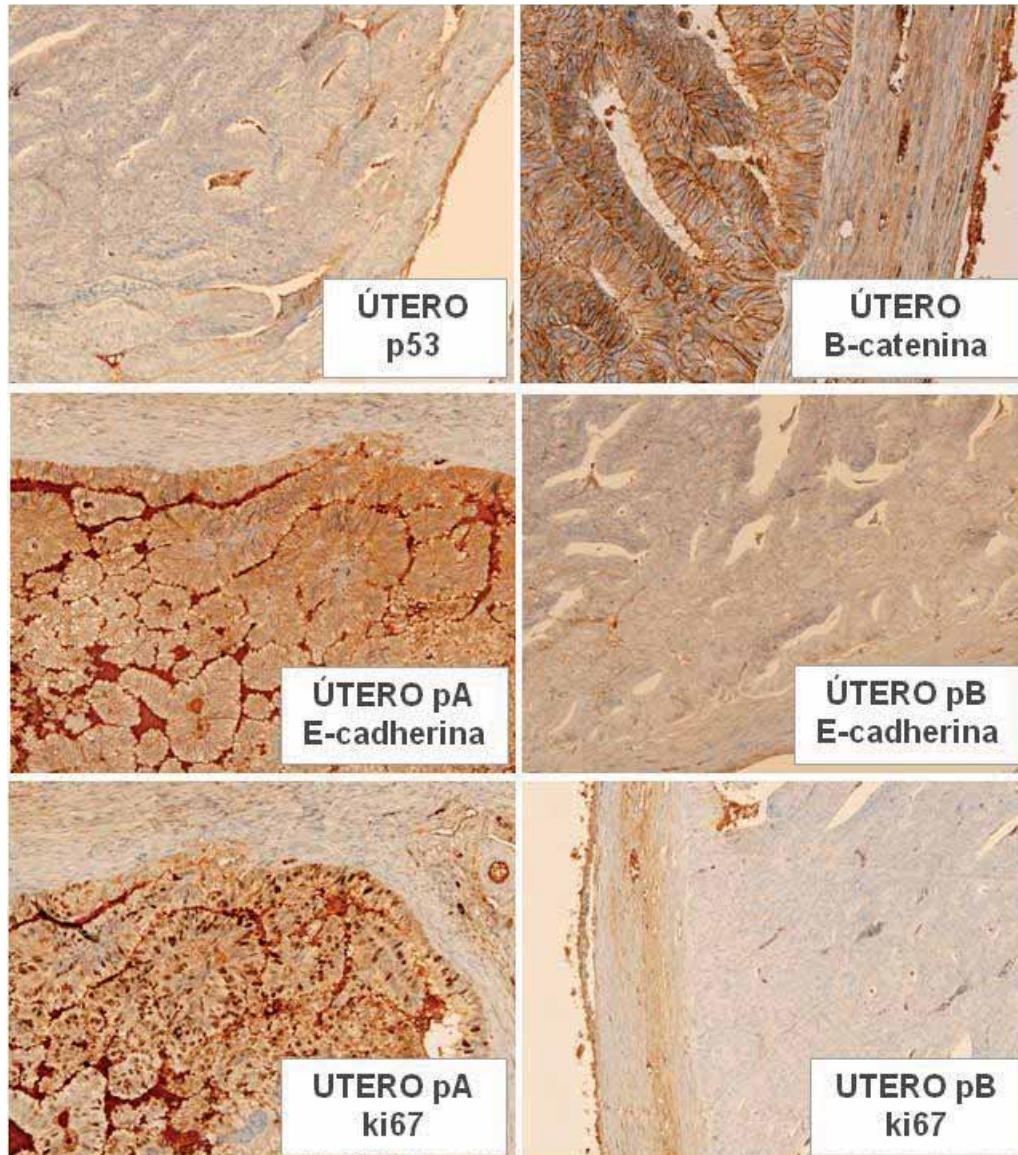


Figura 53. Imágenes de tinción inmunohistoquímica de tejidos derivados del modelo animal ortotópico generado a partir tejido tumoral humano endometriode. Se observan imágenes de la tinción con p53 (negativa), β -catenina (positiva), E-cadherina (positiva en la muestra de la paciente A y negativa en la muestra de la paciente B), y Ki-67 (positiva en la muestra de la paciente A y negativa en la muestra de la paciente B).

V. RESULTADOS

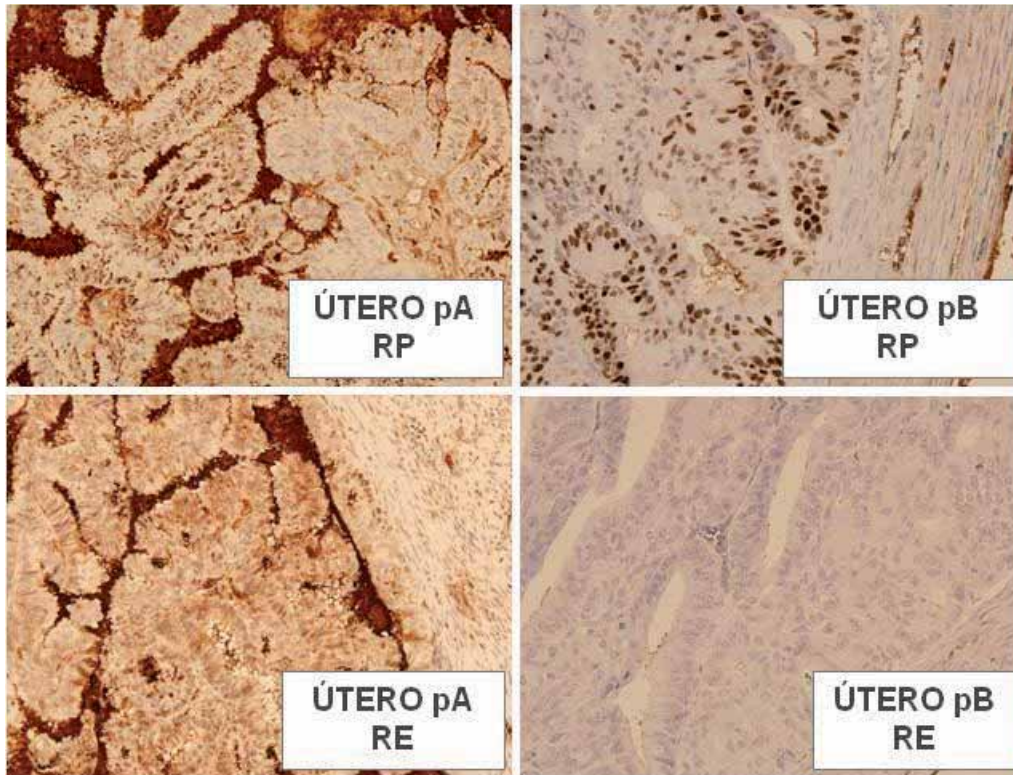


Figura 54. Imágenes de tinción inmunohistoquímica de tejidos derivados del modelo animal ortotópico generado a partir tejido tumoral humano endometriode. Se observa el diferente perfil de tinción de receptores hormonales de las muestras: la muestra de útero de la paciente A presenta expresión de receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP). La muestra de útero de la paciente B presenta expresión débil para receptores de progesterona y no presenta expresión de receptores de estrógenos.

VI. DISCUSION

Los modelos experimentales en cáncer de endometrio han sido ampliamente descritos, principalmente usando modelos subcutáneos. A pesar de que existe evidencia para asegurar que estos modelos ectópicos pueden predecir la eficacia clínica, todavía tienen limitaciones significativas, la más importante de todas es la diferencia en el microambiente del implante tumoral respecto a su localización original en la paciente. Esta diferencia de localización implica un menor aporte de vascularización que puede conllevar una necrosis central en el tumor, ausencia de invasión tumoral e incluso encapsulación del tejido implantado. Todo esto produce la ausencia de comportamiento metastásico, que es el punto de mayor debilidad de los modelos animales subcutáneos (95). A pesar de todo, estos modelos nos han ayudado a conocer la biología de los tumores y su respuesta a la administración de determinadas moléculas, y han conllevado algunos avances terapéuticos en el manejo del cáncer.

Aún así, sus limitaciones han revelado la importancia de desarrollar modelos animales viables que imiten el comportamiento clínico del cáncer. Las inyecciones ortotópicas de células de cáncer humanas se han testado en diferentes tumores, como en cáncer de colon, pulmón, páncreas, vejiga, estómago o mama, entre otros. Estos modelos han permitido el estudio del proceso metastásico, aunque una de sus principales desventajas es la dificultad para el seguimiento de los modelos *in vivo*. Se han introducido diferentes estrategias con el fin de monitorizar el crecimiento ortotópico de los tumores y para detectar la aparición de metástasis. En este sentido, la bioluminiscencia representa una herramienta poderosa para resolver este problema, ya que monitoriza la enfermedad en su desarrollo ortotópico y en su progresión a distancia a medida que esto ocurre. La bioluminiscencia *in vivo* ha permitido la observación directa de las células tumorales a medida que éstas se van diseminando desde su lugar de origen hasta llegar a lugares metastásicos de forma longitudinal en el tiempo. La bioluminiscencia *in vivo* ofrece además una manera rápida, sensible y no invasiva de monitorizar el proceso de desarrollo tumoral y de aparición de metástasis.

Este estudio genera y caracteriza **dos nuevos modelos murinos ortotópicos de cáncer de endometrio**, los cuales reflejan de forma cercana el comportamiento clínico de esta enfermedad en las pacientes.

1. Modelo murino ortotópico de cáncer de endometrio derivado de células Hec1A

Usando células de la línea Hec1A (línea celular comercial originada a partir de tejido tumoral endometriode humano), se realiza una implantación intrauterina que imita el proceso de desarrollo del cáncer de endometrio en la cavidad uterina, la infiltración miometrial y la invasión linfo-vascular que dará lugar al proceso metastásico. Las células Hec1A se pueden transfectar de forma estable con el gen de la luciferasa, conservando al mismo tiempo su perfil de comportamiento celular, como queda demostrado en varios experimentos en este trabajo.

El uso de la técnica de la inyección intrauterina representa una ventaja en el desarrollo del modelo, ya que el implante sigue el proceso infiltrativo natural *desde dentro de la cavidad uterina hacia afuera*, hacia la serosa uterina, además de ser técnicamente sencilla y bien tolerada por el animal. Para este fin hemos seleccionado a los animales Swiss Nude, que reúnen las mejores condiciones para la manipulación quirúrgica y poseen una inmunodepresión balanceada, adecuada para generar tumor ortotópico y metastásico pero con una correcta tolerancia al desarrollo tumoral.

Mediante diferentes experimentos hemos llegado a determinar que la mejor técnica de inoculación del tumor para conseguir el mayor número de ratones con tumor ortotópico y metastásico es la *transmiometrial*. A pesar de que la vía transvaginal nos parecía la ideal para la generación del modelo, por su sencillez técnica y la escasa manipulación que requiere para el animal (nosotros la realizamos con laparotomía asociada para asegurar la adecuada colocación del inóculo, pero la pretensión era poder practicarla sin laparotomía cuando fuera seleccionada como la técnica de elección), los resultados de su implementación no han sido los óptimos. Tras varias experimentales se observa que el inóculo administrado por vía transvaginal no presenta la misma capacidad de desarrollar tumor ortotópico que cuando se administra por vía transmiometrial. En el estudio con bioluminiscencia *in vivo* se aprecia que el tumor inoculado por vía transvaginal emite menor señal inicialmente que el inoculado por vía transmiometrial, probablemente debido a que la manipulación del cérvix produce la pérdida del inóculo, o a que al no haber lesión en el endometrio, como sí ocurre en la vía transmiometrial, se limita la capacidad de progresar del implante. Posteriormente el inóculo aumenta su volumen de células tumorales hasta presentar una emisión de bioluminiscencia similar al implantado por vía transmiometrial, aunque quizá este menor volumen inicial haga que la aparición de metástasis sea más lenta en el modelo transvaginal que en el transmiometrial.

En el análisis comparativo del modelo generado por vía transmiometrial y transvaginal, se observa que el 75% de los animales generados por vía transmiometrial presentan tumor ortotópico endometrial, frente al 12.5% de los generados por vía transvaginal ($p < 0.01$). La aparición de metástasis ganglionar, en los ganglios para-aórticos como primera estación ganglionar de estos tumores en el animal, aparece en todos los ratones que desarrollan tumor ortotópico endometrial, independientemente de la vía de inoculación. La incidencia de metástasis a distancia por vía transcelómica y hematógena es superior en los animales generados por vía transmiometrial, probablemente debido a que su mayor volumen tumoral desde el inicio del experimento les confiere mayor potencial metastásico.

Para validar la inoculación de células por vía transmiometrial como una técnica eficaz en la generación de tumor, así como el análisis del perfil de metástasis que se genera en nuestro modelo murino de cáncer de endometrio, se realiza un experimento mediante la inoculación transmiometrial de células Hec1A-Fluc de 17 ratones Swiss-Nude. El seguimiento mediante bioluminiscencia *in vivo* es factible y bien tolerado por los animales, y nos proporciona información de gran interés para conocer el momento en que el implante inicia el crecimiento ortotópico y el desarrollo de metástasis, para poder programar el inicio de terapias antimetastásicas.

Este experimento de validación confirma los resultados obtenidos en los preliminares, objetivándose una incidencia de generación de tumor ortotópico del 88% y un elevado índice de metástasis ganglionares (92%), intra-abdominales (78.5%) y hematógenas a pulmón (71.4%). En el estudio histológico se observa el frente de infiltración miometrial del tumor que avanza desde el endometrio hacia la serosa, y la invasión linfo-vascular, ambos similares a los primeros pasos de la diseminación tumoral en la mujer. El perfil inmunohistoquímico de estos tumores fue compatible con un tumor de tipo II o no endometriode (mutación de p53) y con elevada expresión de Ki67 asociada a su elevada agresividad. Además, en este ensayo de validación se obtiene una sensibilidad de la bioluminiscencia *ex vivo* cercana al 95%, lo que significa que esta técnica es una herramienta útil para seleccionar los tejidos susceptibles de ser metastásicos y descartar el resto, lo que permite al investigador ahorrar tiempo estudiando tejidos que no son de interés, además de disminuir los costes de la experimentación.

Kamat (143) describe en 2007 un modelo ortotópico de cáncer de endometrio derivado de las líneas celulares Ishikawa y Hec1A transfectadas con luciferasa. El objetivo de generar este modelo es demostrar que el tratamiento conjunto con antiangiogénicos mejora la eficacia de la quimioterapia convencional en el tratamiento del cáncer de endometrio, ya que postulan que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) posee un papel

VI. DISCUSIÓN

fundamental en la angiogénesis y la progresión de estos tumores. Inyectan ambas líneas celulares en concentraciones entre 1 y 4 millones de células por vía transmiometrial. Utilizan ratones atómicos, y la técnica de inoculación que describen es también intrauterina, aunque en lugar de realizar una laparotomía media hacen una incisión en la parte más inferior del flanco derecho y localizan el cuerno uterino derecho, lugar donde inyectan el inóculo tumoral.

El seguimiento de los animales lo realizan con palpación abdominal, y los animales son sacrificados cuando presentan un tamaño tumoral mayor a 1 cm. de diámetro o cuando se afecta su estado general. En su estudio realizan un experimento independiente con bioluminiscencia *in vivo*, tras la inoculación de células Ishikawa transfectadas con luciferasa en cinco animales. Realizan la detección con bioluminiscencia los días 2 y 14 tras la inoculación, principalmente para asegurar una correcta inyección y la adecuada progresión de los inóculos.

Tras estos experimentos iniciales, seleccionan el modelo generado a partir del inóculo de 4 millones de células para realizar la terapia anti-VEGF, ya que fue la concentración mínima a partir de la cual se genera tumor uterino de forma consistente.

Tanto el modelo derivado de células Hec1A como de células Ishikawa producen implantes metastásicos en el peritoneo (>75%), mesenterio (50-57%), ganglios linfáticos (43-63%), riñón (>10%) e hígado (<10%). Kamat et al. realiza cuatro grupos de tratamiento para cada línea celular: grupo control, grupo de tratamiento con bevacizumab, grupo de tratamiento con docetaxel y grupo de tratamiento combinado bevacizumab + docetaxel, todos ellos iniciando el tratamiento dos semanas tras la inyección del inóculo. Los autores observan una disminución significativa del peso del tumor ortotópico así como una disminución de la diseminación metastásica en los ratones tratados con la terapia combinada (Figura 55).

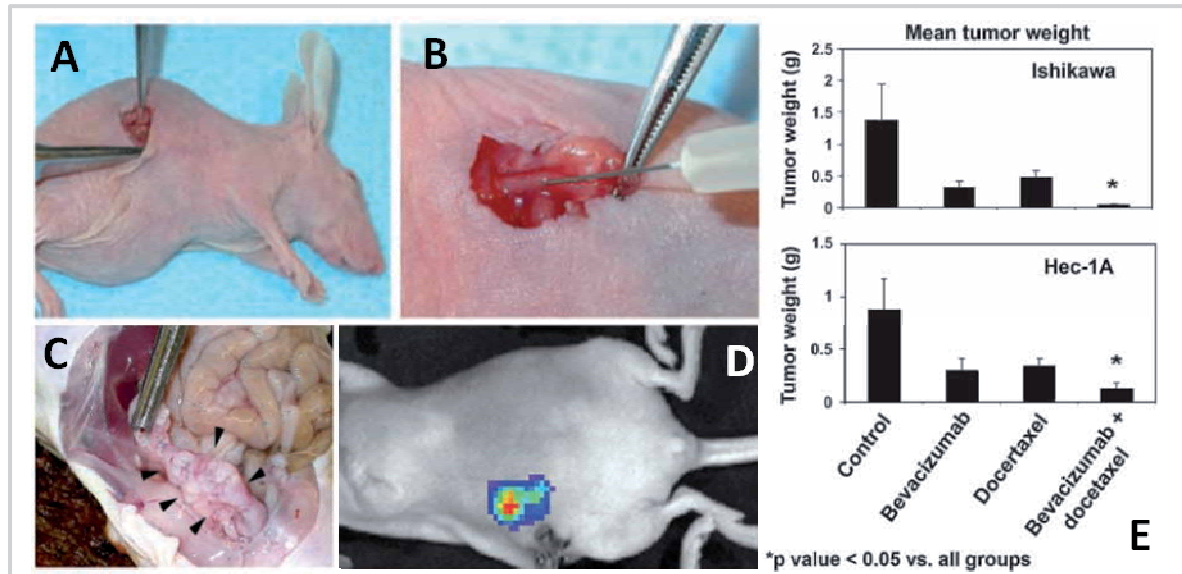


Figura 55. Figura representativa del modelo animal descrito en el artículo de Kemal et al, modificada de (143).

A. Incisión en flanco lateral derecho del ratón para localización del cuerno uterino. B. Inoculación de células tumorales a nivel del cuerno uterino derecho. C. Imagen de necropsia en la que se observa el tumor intrauterino (señalado con flechas), de localización preferente en el cuerno uterino derecho, donde se realizó la inoculación tumoral. D. Bioluminiscencia *in vivo* a los 14 días de inoculación para constatar la evolución del tumor ortotópico. E. Disminución del peso del tumor uterino, de forma significativa en los grupos tratados con terapia combinada docetaxel + antiangiogénico (bevacizumab), lo que permite concluir a los autores que la combinación de tratamientos es altamente eficaz y se debe considerar en el tratamiento del cáncer de endometrio.

En nuestro estudio caracterizamos un modelo ortotópico usando un menor número de células (1 millón en lugar de 4 millones) durante un período de tiempo similar. Esto nos lleva a un crecimiento tumoral menos explosivo y a una aparición de metástasis más progresiva, lo que convierte nuestro modelo en un modelo animal más adecuado para el ensayo de esquemas terapéuticos, ya que existe un espacio de tiempo bien definido entre la implantación celular y la aparición de metástasis, momento en el que se inician las terapias que se desean probar. La técnica quirúrgica de inoculación tumoral es ligeramente diferente, aunque nosotros inoculamos el tumor en el cuerpo del útero o en la parte más inferior del cuerno, también se observa la ocupación de los cuernos con nuestra técnica, y el riesgo de salida de fluido a la cavidad abdominal probablemente sea muy similar en ambas técnicas. Mediante el uso de la bioluminiscencia semanal a lo largo de todo el experimento podemos seguir la progresión de la enfermedad incluyendo el desarrollo de tumor ortotópico y la diseminación metastásica a diferentes órganos. Este hecho es de especial importancia

VI. DISCUSIÓN

cuando deseamos testar terapias con poder no solo frente al tumor primario, sino también frente a las metástasis, ya que podemos iniciar el tratamiento con la constancia de que el animal es metastásico antes de tratarlo.

Takahashi (164) describe en 2009 otro modelo ortotópico desarrollado para un estudio sobre terapia con cetuximab, un anticuerpo frente al receptor del factor de crecimiento epidermoide (EGFR) en el cual se precisaba de un modelo de cáncer de endometrio altamente metastásico. Para ello utilizan células de la línea Hec1A y ratones hembras Balb-c Nude. Todos los animales son tratados con cetuximab dos veces por semana.

Para generar un modelo de cáncer de endometrio con diseminación peritoneal inyectan 5 millones de células Hec1A en suspensión por vía intraperitoneal en los ratones, y cuantifican el número de implantes peritoneales y el volumen de líquido ascítico a las 8 semanas. Encuentran una disminución significativa en el número de implantes peritoneales (17,5 vs 3,7) y del volumen de líquido ascítico (4,3 ml vs 0,2 ml) en el grupo de animales tratados con cetuximab.

Para desarrollar un modelo de metástasis ganglionar se inyectan 5 millones de células Hec1A dentro de la cavidad uterina y se recuentan los ganglios para-aórticos afectos a las 8 semanas. En sus resultados observan una disminución significativa del número de ganglios aumentados de tamaño en los animales tratados frente a los no tratados (2 vs 0,25). Estos ganglios no se estudian histológicamente, se consideran metastásicos únicamente en función de su tamaño.

Para generar un modelo de metástasis pulmonar de cáncer de endometrio se inyectan 5 millones de células Hec1A directamente en la vena de la cola del ratón, y se recuentan las metástasis pulmonares a las 8 semanas. En el grupo no tratado observan una media de 3,7 metástasis por ratón, mientras que ningún animal del grupo de tratamiento presentó metástasis pulmonares.

Para desarrollar un modelo de metástasis sistémicas, se combina la inyección en la cavidad peritoneal y la inyección en la vena de la cola, y los ratones son observados hasta su muerte. Los ratones del grupo tratado presentan una supervivencia significativamente superior a los del grupo de animales no tratados (Figura 56).

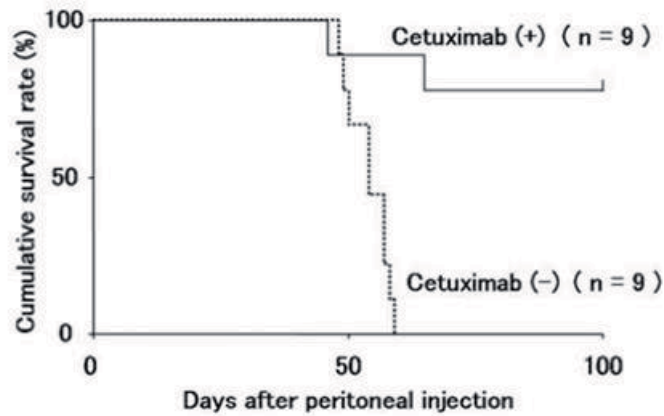


Figura 56. Curvas de supervivencia de los grupos tratados con cetuximab y control del modelo de metástasis sistémicas.

El grupo tratado con cetuximab presenta una supervivencia significativamente superior que el grupo control ($p < 0.01$). Figura modificada de Takahashi et al (164).

El modelo ortotópico descrito por Takahashi en esta publicación no presenta los mecanismo de diseminación natural que se observan en el cáncer de endometrio, y podría considerarse un *modelo de ensayo de metástasis* más que un modelo ortotópico propiamente. En el modelo que desarrollamos en nuestro trabajo el proceso de generación de metástasis se produce mediante la infiltración miometrial y la invasión de los espacios linfo-vasculares del implante ortotópico, al igual que ocurre en la paciente. De este modo, podemos estudiar las diferentes moléculas implicadas en la infiltración miometrial y la invasión linfo-vascular, que son pasos esenciales para el desarrollo de metástasis.

El mismo autor describe posteriormente un modelo ortotópico de cáncer de endometrio para generación de metástasis ganglionar (165). El objetivo de su estudio es el análisis del papel del factor VEGF-C en la linfangiogénesis. Utilizan ratones Balb-c Nude, a los que inyectan 5 millones de células en 50 microlitros en la cavidad uterina tras realizar una laparotomía media, pero con la particularidad de que realizan ligaduras en ambos cuernos uterinos y en el cérvix para evitar que el inóculo se escape a la cavidad abdominal o se pierda por la vagina. Además, reparten el inóculo en volúmenes iguales entre ambos cuernos uterinos (Figura 57).

VI. DISCUSIÓN

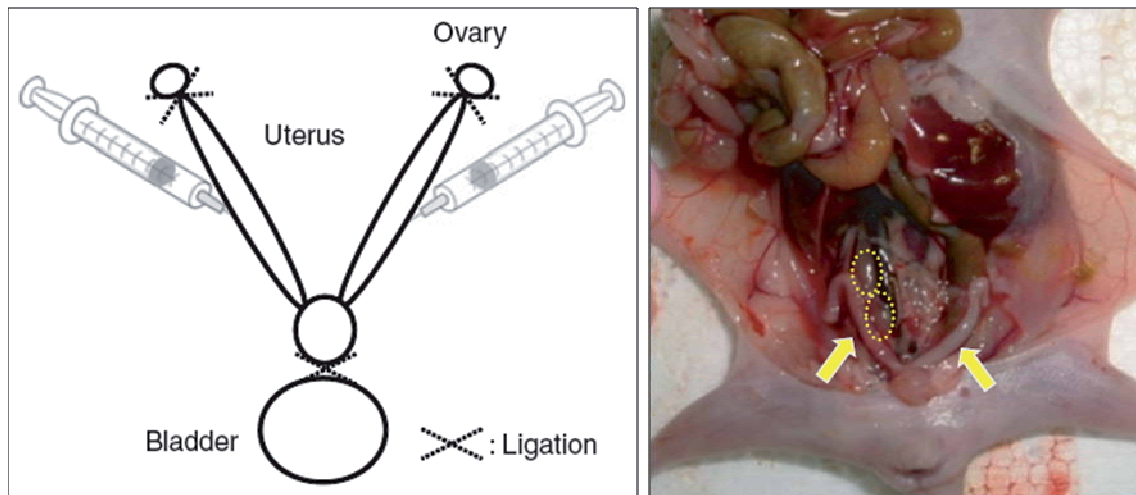


Figura 57. Figura representativa del modelo animal descrito en el artículo de Takahashi et al, modificada de (165).

Izquierda: Esquema de la técnica de generación del modelo ortotópico, inoculando en ambos cuernos las células tumorales tras ligar el cuello del útero y las trompas. Derecha: Imagen de las adenopatías para-aórticas generadas en este modelo.

Tras ocho semanas de crecimiento intrauterino, el 86.5% de los animales presentaban metástasis ganglionares, sin observarse macroscópicamente diseminación intraperitoneal. En el artículo no se describen metástasis ganglionares fuera de la región para-aórtica ni si se observan metástasis hematógenas. Los autores describen que seleccionan los ganglios a estudiar histológicamente por un criterio de tamaño, considerando éste un criterio válido para el análisis. Curiosamente, la ligadura tubárica de los ratones de este modelo elimina la diseminación intra-abdominal y las metástasis peritoneales que observamos en nuestro modelo, lo que nos sugiere que ésta es la vía de inicio de la diseminación transcelómica de las células tumorales.

El modelo que desarrollamos en el presente trabajo presenta unas tasas de infiltración ganglionar muy similar a la descrita por Takahashi. Es más, el estudio mediante bioluminiscencia *ex vivo* de los tejidos nos proporciona una ventaja añadida sobre la determinación exclusivamente por el tamaño de los ganglios que requieren estudio histológico, seleccionando de forma más precisa cuáles son los ganglios supuestamente infiltrados que requieren confirmación histológica.

Doll publica en 2009 un modelo murino ortotópico de cáncer de endometrio desarrollado por nuestro grupo de trabajo, derivado de células Hec1A transfectadas con GFP o con RUNX1 GFP, con el objetivo de constatar que este factor de transcripción confiere mayor agresividad a los tumores de endometrio (95). En primer lugar generan un modelo subcutáneo con la inyección de dos millones de células en la región subescapular de 12

ratones Swiss Nude atímicos. Posteriormente realizan un segundo pase subcutáneo para incrementar el volumen del tejido que ya se ha generado en el primer implante. Para la implantación ortotópica, se sutura 1 mm³ del tejido obtenido del modelo subcutáneo en la cara posterior del útero. Los animales son sacrificados a las 6 semanas del implante ortotópico para estudio necrópsico e histológico.

Los autores constatan en sus resultados que los tumores subcutáneos crecen de forma encapsulada y no presentan evidencia de infiltración con el tejido de alrededor. La implantación ortotópica presentó una tasa de eficacia de implantación del 96%. En el estudio histológico se observa infiltración miometrial y vascular, aunque ésta se realiza desde la serosa uterina hacia el endometrio, en sentido opuesto a como se realiza de forma natural en la mujer. El modelo genera un 75% de metástasis para-aórticas. Lo más sorprendente de este estudio es la diferencia en el perfil de metástasis pulmonares en estos animales, que pasa de ser de un 25% en el modelo generado a partir de células Hec1A y un 12,5% en el modelo generado a partir de células Hec1A-GFP, a un 100% en el modelo desarrollado a partir de células Hec1A que sobre-expresan RUNX1 (Figura 58).

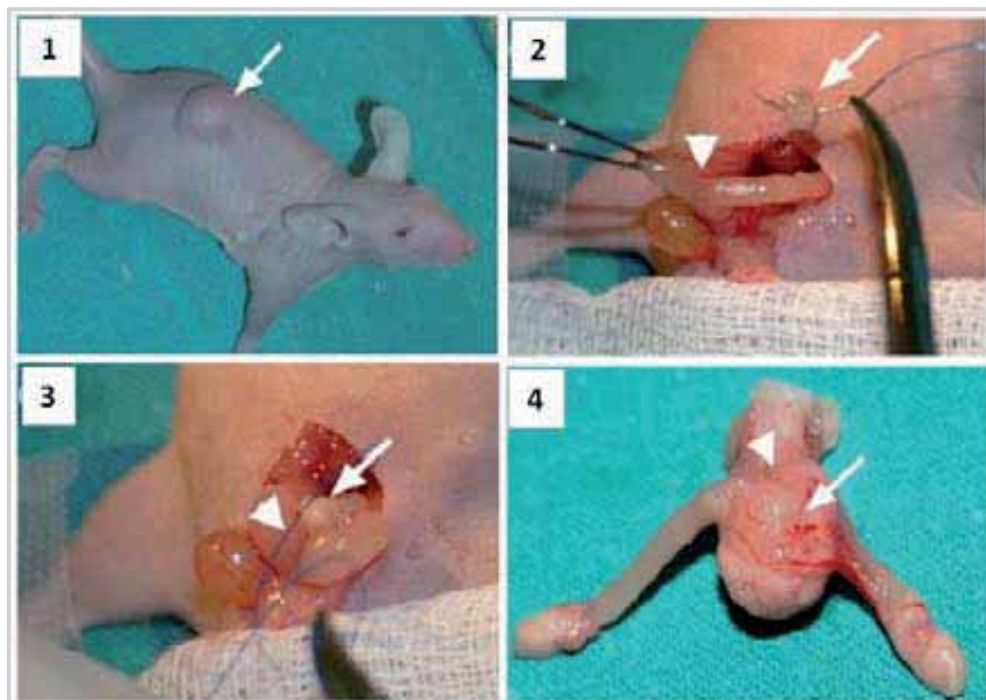


Figura 58. Figura representativa del modelo animal descrito en el artículo de Doll et al, modificada de (95).

1. Modelo subcutáneo generado a partir de células Hec1A con el objetivo de generar un tejido y aumentar su volumen previamente a la generación del modelo ortotópico. 2 y 3. Sutura del tejido a la pared posterior del útero para generar el modelo ortotópico. 4. Imagen de necropsia en la que se observa el desarrollo del tumor en la cara posterior del útero del animal

VI. DISCUSIÓN

La principal diferencia de este modelo respecto al descrito en este trabajo consiste en que el trasplante se realiza con tejido desarrollado en un modelo subcutáneo, y no se inoculan directamente las células en el útero. Este hecho impide asegurar que la cantidad de células sea idéntica en todos los animales generados, aunque se use el volumen para estimar el tamaño del inóculo. Además, el modelo generado por sutura extra-uterina produce una infiltración de fuera hacia adentro del útero, lo que podría alterar los mecanismos moleculares implicados en el proceso de infiltración y metástasis.

El modelo murino derivado de células Hec1A-Fluc que se describe en nuestro trabajo es fácil de generar, monitorizable mediante bioluminiscencia *in vivo*, rápido en el crecimiento ortotópico y en el desarrollo de metástasis. Así pues es representativo de los **estadios avanzados** del cáncer de endometrio pero muestra todas las fases implicadas en el desarrollo de la enfermedad: generación del tumor dentro de la cavidad uterina, infiltración miometrial e invasión linfo-vascular, diseminación peritoneal y aparición de metástasis ganglionares y hematógenas.

2. Modelo murino ortotópico de cáncer de endometrio derivado de tejido tumoral endometrial humano.

En este trabajo se presentan los resultados de la generación de un segundo modelo ortotópico de cáncer de endometrio generado a partir de tejido tumoral humano endometriode, con el objetivo de poder mantener la estructura tridimensional del tejido y el patrón molecular. Este tipo de modelo nunca ha sido descrito previamente.

De nuevo consideramos la vía de inoculación transvaginal como la ideal a nuestro parecer para generar el modelo, aunque los resultados no son los deseados. En este caso usamos agujas de inoculación de diámetro algo mayor a las usadas en el modelo generado con células, ya que el inóculo está formado por tejido disgregado. La tasa de generación de tumor endometrial en la inoculación transvaginal es del 20%. De igual modo que en el modelo descrito previamente, la causa de estos malos resultados podría ser la manipulación del cuello del útero que se realiza para la inoculación del tumor. Al pasar la cánula, generamos un trauma en el cuello que implica que quede abierto y que el implante se vaya perdiendo a lo largo de los días posteriores. La pérdida del inóculo no se objetivó durante el seguimiento de los animales, pero consideramos que podría ser una explicación plausible. También podría ocurrir que al no producirse un traumatismo en el endometrio (ya que no inyectamos a través de él) no se favorezca la implantación de las células del tumor.

Mediante la generación del modelo usando la vía transmiometrial se consigue una generación de tumor ortotópico del 90%. La afectación de la cavidad pélvica por contigüidad o por implantes peritoneales es la forma de diseminación más frecuente en este modelo, afectando al 77,7% de los animales. En cambio, no observamos una tasa significativa de afectación ganglionar o de diseminación hematológica.

Implantado ortotópicamente, el tejido tumoral humano endometriode produce infiltración miometrial, invasión linfo-vascular y diseminación en la cavidad pélvica. Mantiene las características moleculares e histológicas de las muestras originales, con expresión de p53 negativa, reproduciendo el patrón histológico glandular propio del carcinoma endometriode y expresando receptores hormonales.

En la revisión bibliográfica de los modelos murinos de cáncer de endometrio no se ha encontrado ninguna publicación que presente alguna modalidad de modelo murino ortotópico derivado directamente de tejido de paciente.

El modelo murino derivado de tejido humano representa la **enfermedad local y localmente avanzada** del cáncer de endometrio. Podría ser usado para testar drogas específicas frente a tumores endometrioides, y para estudios de terapias moleculares cuya diana sean moléculas implicadas en el desarrollo de la infiltración miometrial o la invasión linfo-vascular. Este modelo puede ser complementario al descrito anteriormente para testar nuevas drogas anti-cancerosas, ya que presenta la histología y el perfil molecular del tipo tumoral más frecuente en la clínica.

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRINCIPAL

Es posible generar un modelo murino ortotópico de cáncer de endometrio a partir de tejido tumoral humano endometriode. Este modelo presenta infiltración miometrial e invasión de los espacios linfo-vasculares de manera similar a la que se produce en la mujer.

Es posible generar un modelo murino ortotópico de cáncer de endometrio a partir de células Hec1A-Fluc. El patrón de diseminación metastásica de este modelo representa un tumor altamente metastásico, con diseminación por vía linfática, transcelómica y hematogena.

CONCLUSIONES SECUNDARIAS

Respecto al modelo murino ortotópico derivado de células Hec1A:

1. Es posible generar una línea celular estable Hec1A transfectada con el gen de la luciferasa cuyos clones presenten un comportamiento biológico similar a la línea celular Hec1A original, como se ha demostrado en los estudios de morfología celular, proliferación celular a 24 y 48 horas y en ensayos de invasión Transwell.
2. El ratón inmunodeprimido Swiss Nude presenta una mayor tasa de generación de tumor (desarrollo de tumor ortotópico del 100% vs 80%), una menor mortalidad asociada al procedimiento (supervivencia del 100% vs 60%) y más facilidad de manipulación que el ratón inmunodeprimido Balb-c Nude, principalmente debido a la diferencia de peso que presentan ambos animales en el momento del implante (27,06g. vs 18,68g, $p < 0.01$).
3. La inoculación por vía transmiometrial genera mayor tasa de tumor ortotópico endometrial que la inoculación por vía transvaginal. La incidencia de tumor ortotópico en el modelo desarrollado por vía transmiometrial es del 75%, frente al 12,5% en el desarrollado por vía transvaginal ($p < 0.001$). En el ensayo de validación conseguimos una incidencia de tumor ortotópico del 88% por vía transmiometrial.

VII. CONCLUSIONES

4. El sistema de seguimiento mediante bioluminiscencia *in vivo* permite el estudio del patrón de crecimiento del tumor y del perfil de desarrollo de metástasis del modelo murino ortotópico de cáncer de endometrio generado a partir de células Hec1A-Fluc. Además nos aporta información sobre la intensidad de señal bioluminiscente, que nos permite comparar ratones entre ellos, lo que es de gran utilidad para comparar grupos de animales. El estudio mediante bioluminiscencia *ex vivo* presenta una sensibilidad del 94,73% en la detección de tejidos metastásicos, lo que permitirá analizar exclusivamente los tejidos detectados por este método para ahorrar tiempo y costes en experimentos que impliquen gran número de animales.

5. El patrón de diseminación metastásica del modelo murino ortotópico de cáncer de endometrio generado a partir de células Hec1A representa a un tumor altamente metastásico, con elevada incidencia de implantes pélvicos (85,7%), diseminación por vía linfática (92,8%), transcelómica (75,8%) y hematogena a pulmón (71,4%).

6. El estudio histológico de este tumor representa un tumor de alto grado, indiferenciado y sólido. El perfil inmunohistoquímico del tumor generado a partir de células Hec1A tras crecer ortotópicamente en el animal es similar al del cáncer de endometrio tipo II, presentando tinción para p53 intensamente positivo, receptores hormonales negativos, alto porcentaje de células Ki67 positivas.

Respecto al modelo murino ortotópico derivado de tejido tumoral endometriode:

1. El ratón inmunodeprimido Swiss Nude presenta una mayor tasa de generación de tumor (desarrollo de tumor ortotópico del 100% vs 80%), una menor mortalidad asociada al procedimiento (supervivencia del 100% vs 60%) y más facilidad de manipulación que el ratón inmunodeprimido Balb-c Nude, principalmente debido a la diferencia de peso que presentan ambos animales en el momento del implante (27,06g. vs 18,68g, $p < 0.01$).

2. Se selecciona el tejido tumoral endometriode como el más adecuado para el desarrollo del tumor ortotópico, por ser el tipo histológico más prevalente y por presentar un perfil de crecimiento en el animal menos explosivo a nivel ortotópico y con capacidad de infiltración local.

3. La inoculación de tejido tumoral endometriode por vía transmiometrial genera mayor tasa de tumor ortotópico endometrial (90%) que la inoculación por vía transvaginal (20%).
4. El seguimiento del modelo murino ortotópico de cáncer de endometrio generado a partir de tejido tumoral endometriode es posible mediante Resonancia Magnética, aunque la manipulación del animal y la duración de la exploración desaconsejan esta técnica como método de seguimiento rutinario durante el experimento. La ecografía transabdominal puede determinar el volumen tumoral pélvico, aunque con mayor exactitud cuando se trata de volúmenes pequeños, ya que las medidas de volumen al final del experimento presentan una gran dispersión en sus resultados (índice de correlación rho de Spearman no significativo, $p=0.92$).
5. El modelo murino ortotópico de cáncer de endometrio generado a partir de tejido tumoral humano endometriode presenta infiltración miometrial e invasión de los espacios linfocvasculares de manera similar a como se produce en la mujer. El patrón de diseminación metastásica del modelo representa a un tumor localmente avanzado, con afectación pélvica en el 77,7% de los animales e implantes abdominales en el 66,6%. Se observa un 11,1% de metástasis ganglionar.
6. La histología del tumor endometriode tras crecer ortotópicamente en el animal es similar a la del tumor endometriode humano. El perfil inmunohistoquímico del tumor es similar al del cáncer de endometrio tipo I, presentando tinción para p53 negativa y presencia de receptores hormonales. Los receptores hormonales variaron en función de la muestra original, así como la tinción de Ki67, lo que demuestra una correlación en el comportamiento molecular entre el tejido original y el tejido tras el crecimiento en el animal.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Oncoguía SEGO. Cáncer de Endometrio 2010. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario, (2010).
2. Catalunya Gd. Estrategia y prioridades en cáncer en Cataluña. Plan director de Oncología: Objetivos 2010. In: Salut Dd, editor. Barcelona: Direcció General de Planificació i Avaluació; 2009.
3. Evans T, Sany O, Pearmain P, Ganesan R, Blann A, Sundar S. Differential trends in the rising incidence of endometrial cancer by type: data from a UK population-based registry from 1994 to 2006. *Br J Cancer*. 2011;104(9):1505-10. Epub 2011/04/28.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90. Epub 2011/02/08.
5. Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Benedet JL, Heintz AP, et al. Carcinoma of the corpus uteri. *J Epidemiol Biostat*. 2001;6(1):47-86. Epub 2001/06/02.
6. Baggish M, Valle R, Guedj H. Hysteroscopy. Visual perspectives of uterine anatomy, physiology and pathology. edition T, editor: Wolters Kluwer; 2007.
7. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277-300. Epub 2010/07/09.
8. Parslov M, Lidegaard O, Klintorp S, Pedersen B, Jonsson L, Eriksen PS, et al. Risk factors among young women with endometrial cancer: a Danish case-control study. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;182(1 Pt 1):23-9. Epub 2000/01/29.
9. Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, Jarvinen H, Lynch HT. The risk of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Med*. 1994;96(6):516-20. Epub 1994/06/01.
10. Aarnio M. Clinicopathological features and management of cancers in lynch syndrome. *Pathology research international*. 2012;2012:350309. Epub 2012/05/24.
11. Abdel-Rahman WM, Mecklin JP, Peltomaki P. The genetics of HNPCC: application to diagnosis and screening. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2006;58(3):208-20. Epub 2006/01/26.
12. Peltomaki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Disease markers*. 2004;20(4-5):269-76. Epub 2004/11/06.
13. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(23):1758-62. Epub 1997/12/10.
14. Banno K, Kisu I, Yanokura M, Masuda K, Ueki A, Kobayashi Y, et al. Epigenetics and genetics in endometrial cancer: new carcinogenic mechanisms and relationship with clinical practice. *Epigenomics*. 2012;4(2):147-62. Epub 2012/03/28.
15. Westin SN, Lacour RA, Urbauer DL, Luthra R, Bodurka DC, Lu KH, et al. Carcinoma of the lower uterine segment: a newly described association with Lynch syndrome. *J Clin Oncol*. 2008;26(36):5965-71. Epub 2008/11/13.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

16. Pinol V, Castells A, Andreu M, Castellvi-Bel S, Alenda C, Llor X, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2005;293(16):1986-94. Epub 2005/04/28.
17. Salovaara R, Loukola A, Kristo P, Kaariainen H, Ahtola H, Eskelinen M, et al. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(11):2193-200. Epub 2000/06/01.
18. R.-S. Laura RB, A. Leminen, P. lehtovirtsa, J. P., Mecklin aHJJa. Surveillance for endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *International Journal of Cancer*. 2006;120(4):821-4.
19. CatSalut. AdAdTiRM. OncoGuía del consejo y asesoramiento genéticos en el cáncer hereditario. Versión breve para la aplicación en la práctica clínica. In: Salut. Dd, editor. Generalitat de Catalunya. Barcelona2006.
20. Elwood JM, Cole P, Rothman KJ, Kaplan SD. Epidemiology of endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1977;59(4):1055-60. Epub 1977/10/01.
21. Ewertz M, Schou G, Boice JD, Jr. The joint effect of risk factors on endometrial cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1988;24(2):189-94. Epub 1988/02/01.
22. Brinton LA, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, Barrett RJ, Wilbanks GD, et al. Reproductive, menstrual, and medical risk factors for endometrial cancer: results from a case-control study. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;167(5):1317-25. Epub 1992/11/01.
23. Kalandidi A, Tzonou A, Lipworth L, Gamatsi I, Filippa D, Trichopoulos D. A case-control study of endometrial cancer in relation to reproductive, somatometric, and life-style variables. *Oncology*. 1996;53(5):354-9. Epub 1996/09/01.
24. Pettersson B, Adami HO, Bergstrom R, Johansson ED. Menstruation span--a time-limited risk factor for endometrial carcinoma. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1986;65(3):247-55. Epub 1986/01/01.
25. Wood GP, Boronow RC. Endometrial adenocarcinoma and the polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 1976;124(2):140-2. Epub 1976/01/15.
26. Voigt LF, Weiss NS, Chu J, Daling JR, McKnight B, van Belle G. Progestagen supplementation of exogenous oestrogens and risk of endometrial cancer. *Lancet*. 1991;338(8762):274-7. Epub 1991/08/03.
27. Mueck AO, Seeger H, Rabe T. Hormonal contraception and risk of endometrial cancer: a systematic review. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(4):R263-71. Epub 2010/09/28.
28. M LED, Alibrandi A, Ciancimino L, Azzerboni A, Chiofalo B, Triolo O. Endometrial pathology in breast cancer patients: Effect of different treatments on ultrasonographic, hysteroscopic and histological findings. *Oncology letters*. 2013;5(4):1305-10. Epub 2013/04/20.
29. Jones ME, van Leeuwen FE, Hoogendoorn WE, Mourits MJ, Hollema H, van Boven H, et al. Endometrial cancer survival after breast cancer in relation to tamoxifen treatment: pooled results from three countries. *Breast cancer research : BCR*. 2012;14(3):R91. Epub 2012/06/14.
30. van Leeuwen FE, Benraadt J, Coebergh JW, Kiemeneij LA, Gimbreere CH, Otter R, et al. Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast cancer. *Lancet*. 1994;343(8895):448-52. Epub 1994/02/19.
31. Bernstein L, Deapen D, Cerhan JR, Schwartz SM, Liff J, McGann-Maloney E, et al. Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(19):1654-62. Epub 1999/10/08.

32. Bergman L, Beelen ML, Gallee MP, Hollema H, Benraadt J, van Leeuwen FE. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. Comprehensive Cancer Centres' ALERT Group. Assessment of Liver and Endometrial cancer Risk following Tamoxifen. *Lancet*. 2000;356(9233):881-7. Epub 2000/10/19.
33. Curtis RE, Freedman DM, Sherman ME, Fraumeni JF, Jr. Risk of malignant mixed mullerian tumors after tamoxifen therapy for breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(1):70-4. Epub 2004/01/08.
34. Bland AE, Calingaert B, Secord AA, Lee PS, Valea FA, Berchuck A, et al. Relationship between tamoxifen use and high risk endometrial cancer histologic types. *Gynecol Oncol*. 2009;112(1):150-4. Epub 2008/10/22.
35. Soler M, Chatenoud L, Negri E, Parazzini F, Franceschi S, la Vecchia C. Hypertension and hormone-related neoplasms in women. *Hypertension*. 1999;34(2):320-5. Epub 1999/08/24.
36. Weiderpass E, Persson I, Adami HO, Magnusson C, Lindgren A, Baron JA. Body size in different periods of life, diabetes mellitus, hypertension, and risk of postmenopausal endometrial cancer (Sweden). *Cancer Causes Control*. 2000;11(2):185-92. Epub 2000/03/10.
37. Lawrence C, Tessaro I, Durgerian S, Caputo T, Richart R, Jacobson H, et al. Smoking, body weight, and early-stage endometrial cancer. *Cancer*. 1987;59(9):1665-9. Epub 1987/05/01.
38. Cust AE. Physical activity and gynecologic cancer prevention. *Recent Results Cancer Res*. 2011;186:159-85. Epub 2010/11/30.
39. Van de Graaf K. Van De Graaf: Human Anatomy. Edition S, editor: The McGraw-Hill Companies; 2001.
40. Cabero L. Tratado de ginecología, obstetricia y medicina de la reproducción. panamericana Em, editor. Madrid2003.
41. Gursipide E, Tseng L, Gusberg SB. Estrogen metabolism in normal and neoplastic endometrium. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1977;129(7):809-16. Epub 1977/12/01.
42. Fattaneh A, Devilee P. Pathology & Genetics. Tumors of the Breast and Female Genital Organs. In: Tumours WHOCo, editor. 2003.
43. Amant F, Mirza MR, Creutzberg CL. Cancer of the corpus uteri. *Int J Gynaecol Obstet*. 2012;119 Suppl 2:S110-7. Epub 2012/10/04.
44. Melhem MF, Tobon H. Mucinous adenocarcinoma of the endometrium: a clinico-pathological review of 18 cases. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 1987;6(4):347-55. Epub 1987/01/01.
45. Hendrickson M, Ross J, Eifel P, Martinez A, Kempson R. Uterine papillary serous carcinoma: a highly malignant form of endometrial adenocarcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 1982;6(2):93-108. Epub 1982/03/01.
46. Nguyen NP, Sallah S, Karlsson U, Vos P, Ludin A, Semer D, et al. Prognosis for papillary serous carcinoma of the endometrium after surgical staging. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2001;11(4):305-11. Epub 2001/08/25.
47. Jordan LB, Abdul-Kader M, Al-Nafussi A. Uterine serous papillary carcinoma: histopathologic changes within the female genital tract. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2001;11(4):283-9. Epub 2001/08/25.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

48. Wheeler DT, Bell KA, Kurman RJ, Sherman ME. Minimal uterine serous carcinoma: diagnosis and clinicopathologic correlation. *The American journal of surgical pathology*. 2000;24(6):797-806. Epub 2000/06/08.
49. Pitman MB, Young RH, Clement PB, Dickersin GR, Scully RE. Endometrioid carcinoma of the ovary and endometrium, oxyphilic cell type: a report of nine cases. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 1994;13(4):290-301. Epub 1994/10/01.
50. Carcangiu ML, Chambers JT. Early pathologic stage clear cell carcinoma and uterine papillary serous carcinoma of the endometrium: comparison of clinicopathologic features and survival. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 1995;14(1):30-8. Epub 1995/01/01.
51. Sherman ME, Bitterman P, Rosenshein NB, Delgado G, Kurman RJ. Uterine serous carcinoma. A morphologically diverse neoplasm with unifying clinicopathologic features. *The American journal of surgical pathology*. 1992;16(6):600-10. Epub 1992/06/01.
52. Rodolakis A, Papaspyrou I, Sotiropoulou M, Markaki S, Michalas S. Primary squamous cell carcinoma of the endometrium. A report of 3 cases. *European journal of gynaecological oncology*. 2001;22(2):143-6. Epub 2001/07/12.
53. Shidara Y, Karube A, Watanabe M, Satou E, Uesaka Y, Matsuura T, et al. A case report: verrucous carcinoma of the endometrium--the difficulty of diagnosis, and a review of the literature. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2000;26(3):189-92. Epub 2000/08/10.
54. Labonte S, Tetu B, Boucher D, Larue H. Transitional cell carcinoma of the endometrium associated with a benign ovarian Brenner tumor: a case report. *Human pathology*. 2001;32(2):230-2. Epub 2001/03/07.
55. Lininger RA, Ashfaq R, Albores-Saavedra J, Tavassoli FA. Transitional cell carcinoma of the endometrium and endometrial carcinoma with transitional cell differentiation. *Cancer*. 1997;79(10):1933-43. Epub 1997/05/15.
56. Huntsman DG, Clement PB, Gilks CB, Scully RE. Small-cell carcinoma of the endometrium. A clinicopathological study of sixteen cases. *The American journal of surgical pathology*. 1994;18(4):364-75. Epub 1994/04/01.
57. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. Epub 2000/01/27.
58. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1983;15(1):10-7. Epub 1983/02/01.
59. Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer Control*. 2009;16(1):8-13. Epub 2008/12/17.
60. Matias-Guiu X, Catusus L, Bussaglia E, Lagarda H, Garcia A, Pons C, et al. Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol*. 2001;32(6):569-77. Epub 2001/06/30.
61. Mutter GL. Pten, a protean tumor suppressor. *The American journal of pathology*. 2001;158(6):1895-8. Epub 2001/06/08.
62. Catusus L, Machin P, Matias-Guiu X, Prat J. Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. *Human pathology*. 1998;29(10):1160-4. Epub 1998/10/22.

63. Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene*. 1998;17(18):2413-7. Epub 1998/11/12.
64. Faquin WC, Fitzgerald JT, Lin MC, Boynton KA, Muto MG, Mutter GL. Sporadic microsatellite instability is specific to neoplastic and preneoplastic endometrial tissues. *Am J Clin Pathol*. 2000;113(4):576-82. Epub 2000/04/29.
65. Okuda T, Sekizawa A, Purwosunu Y, Nagatsuka M, Morioka M, Hayashi M, et al. Genetics of endometrial cancers. *Obstet Gynecol Int*. 2010;2010:984013. Epub 2010/04/17.
66. Engelsen IB, Akslen LA, Salvesen HB. Biologic markers in endometrial cancer treatment. *APMIS*. 2009;117(10):693-707. Epub 2009/09/25.
67. Schmitz MJ, Hendricks DT, Farley J, Taylor RR, Geradts J, Rose GS, et al. p27 and cyclin D1 abnormalities in uterine papillary serous carcinoma. *Gynecologic oncology*. 2000;77(3):439-45. Epub 2000/06/01.
68. Berchuck A, Boyd J. Molecular basis of endometrial cancer. *Cancer*. 1995;76(10 Suppl):2034-40. Epub 1995/11/15.
69. Sherman ME, Bur ME, Kurman RJ. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Human pathology*. 1995;26(11):1268-74. Epub 1995/11/01.
70. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer*. 2000;88(4):814-24. Epub 2000/02/19.
71. Kounelis S, Kapranos N, Kouri E, Coppola D, Papadaki H, Jones MW. Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2000;13(4):379-88. Epub 2000/04/29.
72. Mutter GL, Baak JP, Crum CP, Richart RM, Ferenczy A, Faquin WC. Endometrial precancer diagnosis by histopathology, clonal analysis, and computerized morphometry. *The Journal of pathology*. 2000;190(4):462-9. Epub 2000/03/04.
73. Simpkins SB, Peiffer-Schneider S, Mutch DG, Gersell D, Goodfellow PJ. PTEN mutations in endometrial cancers with 10q LOH: additional evidence for the involvement of multiple tumor suppressors. *Gynecologic oncology*. 1998;71(3):391-5. Epub 1999/01/15.
74. Salvesen HB, Stefansson I, Kretzschmar EI, Gruber P, MacDonald ND, Ryan A, et al. Significance of PTEN alterations in endometrial carcinoma: a population-based study of mutations, promoter methylation and PTEN protein expression. *International journal of oncology*. 2004;25(6):1615-23. Epub 2004/11/18.
75. Maxwell GL, Risinger JI, Gumbs C, Shaw H, Bentley RC, Barrett JC, et al. Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. *Cancer Res*. 1998;58(12):2500-3. Epub 1998/07/04.
76. Llobet D, Pallares J, Yeramian A, Santacana M, Eritja N, Velasco A, et al. Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints. *J Clin Pathol*. 2009;62(9):777-85. Epub 2008/11/04.
77. Prat J, Gallardo A, Cuatrecasas M, Catusus L. Endometrial carcinoma: pathology and genetics. *Pathology*. 2007;39(1):72-87. Epub 2007/03/17.
78. Di Cristofano A, Ellenson LH. Endometrial carcinoma. *Annu Rev Pathol*. 2007;2:57-85. Epub 2007/11/28.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

79. Hecht JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol*. 2006;24(29):4783-91. Epub 2006/10/10.
80. MacDonald ND, Salvesen HB, Ryan A, Iversen OE, Akslen LA, Jacobs IJ. Frequency and prognostic impact of microsatellite instability in a large population-based study of endometrial carcinomas. *Cancer research*. 2000;60(6):1750-2. Epub 2000/04/05.
81. Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, Jacobs IJ, Lynch ED, Akslen LA, et al. PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2001;91(1):22-6. Epub 2001/01/10.
82. Koul A, Willen R, Bendahl PO, Nilbert M, Borg A. Distinct sets of gene alterations in endometrial carcinoma implicate alternate modes of tumorigenesis. *Cancer*. 2002;94(9):2369-79. Epub 2002/05/17.
83. Hardisson D, Moreno-Bueno G, Sanchez L, Sarrio D, Suarez A, Calero F, et al. Tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair (hMLH1 and hMSH2 genes) in endometrial carcinoma and atypical endometrial hyperplasia: relationship with microsatellite instability. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2003;16(11):1148-58. Epub 2003/11/14.
84. Karamurzin Y, Rutgers JK. DNA mismatch repair deficiency in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2009;28(3):239-55. Epub 2009/07/22.
85. Marquez-Garban DC, Mah V, Alavi M, Maresh EL, Chen HW, Bagryanova L, et al. Progesterone and estrogen receptor expression and activity in human non-small cell lung cancer. *Steroids*. 76(9):910-20. Epub 2011/05/24.
86. Gong Y, Han EY, Guo M, Puszta L, Sneige N. Stability of estrogen receptor status in breast carcinoma: a comparison between primary and metastatic tumors with regard to disease course and intervening systemic therapy. *Cancer*. 117(4):705-13. Epub 2010/10/13.
87. Watanabe M, Kobayashi Y, Takahashi N, Kiguchi K, Ishizuka B. Expression of melatonin receptor (MT1) and interaction between melatonin and estrogen in endometrial cancer cell line. *J Obstet Gynaecol Res*. 2008;34(4):567-73. Epub 2008/10/22.
88. Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch*. 2004;444(3):213-23. Epub 2004/01/30.
89. Liu FS. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2007;46(1):26-32. Epub 2007/03/29.
90. Doll A, Abal M, Rigau M, Monge M, Gonzalez M, Demajo S, et al. Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;108(3-5):221-9. Epub 2007/12/07.
91. Sherman ME, Bur ME, Kurman RJ. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Hum Pathol*. 1995;26(11):1268-74. Epub 1995/11/01.
92. Abal M, Planaguma J, Gil-Moreno A, Monge M, Gonzalez M, Baro T, et al. Molecular pathology of endometrial carcinoma: transcriptional signature in endometrioid tumors. *Histology and histopathology*. 2006;21(2):197-204. Epub 2005/12/06.
93. Monge M, Colas E, Doll A, Gonzalez M, Gil-Moreno A, Planaguma J, et al. ERM/ETV5 up-regulation plays a role during myometrial infiltration through matrix metalloproteinase-2 activation in endometrial cancer. *Cancer Res*. 2007;67(14):6753-9. Epub 2007/07/20.

94. Planaguma J, Abal M, Gil-Moreno A, Diaz-Fuertes M, Monge M, Garcia A, et al. Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma. *J Pathol.* 2005;207(4):422-9. Epub 2005/09/22.
95. Doll A, Gonzalez M, Abal M, Llauro M, Rigau M, Colas E, et al. An orthotopic endometrial cancer mouse model demonstrates a role for RUNX1 in distant metastasis. *Int J Cancer.* 2009;125(2):257-63. Epub 2009/04/23.
96. van Hanegem N, Breijer MC, Khan KS, Clark TJ, Burger MP, Mol BW, et al. Diagnostic evaluation of the endometrium in postmenopausal bleeding: an evidence-based approach. *Maturitas.* 2011;68(2):155-64. Epub 2010/12/15.
97. Hacker N, Moore G, Gambone J. *Essentials of obstetrics and gynecology*: Elsevier Saunders; 2007.
98. Smith-Bindman R, Kerlikowske K, Feldstein VA, Subak L, Scheidler J, Segal M, et al. Endovaginal ultrasound to exclude endometrial cancer and other endometrial abnormalities. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 1998;280(17):1510-7. Epub 1998/11/11.
99. Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, Jemal A, Ward EM. The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis.* 2010;31(1):100-10. Epub 2009/11/26.
100. Colas E, Perez C, Cabrera S, Pedrola N, Monge M, Castellvi J, et al. Molecular markers of endometrial carcinoma detected in uterine aspirates. *Int J Cancer.* 2011;129(10):2435-44. Epub 2011/01/06.
101. Perez-Sanchez C, Colas E, Cabrera S, Falcon O, Sanchez-Del-Rio A, Garcia E, et al. Molecular diagnosis of endometrial cancer from uterine aspirates. *Int J Cancer.* 2013. Epub 2013/05/08.
102. Peungjesada S, Bhosale PR, Balachandran A, Iyer RB. Magnetic resonance imaging of endometrial carcinoma. *Journal of computer assisted tomography.* 2009;33(4):601-8. Epub 2009/07/30.
103. Selman TJ, Mann CH, Zamora J, Khan KS. A systematic review of tests for lymph node status in primary endometrial cancer. *BMC women's health.* 2008;8:8. Epub 2008/05/07.
104. Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Beller U, Benedet JL, et al. Carcinoma of the corpus uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006;95 Suppl 1:S105-43. Epub 2006/12/13.
105. Antonsen SL, Jensen LN, Loft A, Berthelsen AK, Costa J, Tabor A, et al. MRI, PET/CT and ultrasound in the preoperative staging of endometrial cancer - A multicenter prospective comparative study. *Gynecol Oncol.* 2013;128(2):300-8. Epub 2012/12/04.
106. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;105(2):103-4. Epub 2009/04/16.
107. Chan JK, Cheung MK, Huh WK, Osann K, Husain A, Teng NN, et al. Therapeutic role of lymph node resection in endometrioid corpus cancer: a study of 12,333 patients. *Cancer.* 2006;107(8):1823-30. Epub 2006/09/16.
108. Cragun JM, Havrilesky LJ, Calingaert B, Synan I, Secord AA, Soper JT, et al. Retrospective analysis of selective lymphadenectomy in apparent early-stage endometrial cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(16):3668-75. Epub 2005/03/02.
109. Todo Y, Kato H, Kaneuchi M, Watari H, Takeda M, Sakuragi N. Survival effect of para-aortic lymphadenectomy in endometrial cancer (SEPAL study): a retrospective cohort analysis. *Lancet.* 2010;375(9721):1165-72. Epub 2010/03/02.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

110. Benedetti Panici P, Basile S, Maneschi F, Alberto Lissoni A, Signorelli M, Scambia G, et al. Systematic pelvic lymphadenectomy vs. no lymphadenectomy in early-stage endometrial carcinoma: randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(23):1707-16. Epub 2008/11/27.
111. Kitchener H, Swart AM, Qian Q, Amos C, Parmar MK. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study. *Lancet.* 2009;373(9658):125-36. Epub 2008/12/17.
112. Sharma C, Deutsch I, Lewin SN, Burke WM, Qiao Y, Sun X, et al. Lymphadenectomy influences the utilization of adjuvant radiation treatment for endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205(6):562 e1-9. Epub 2011/10/28.
113. Milam MR, Java J, Walker JL, Metzinger DS, Parker LP, Coleman RL. Nodal metastasis risk in endometrioid endometrial cancer. *Obstet Gynecol.* 2012;119(2 Pt 1):286-92. Epub 2012/01/25.
114. Childers JM, Brzechffa PR, Hatch KD, Surwit EA. Laparoscopically assisted surgical staging (LASS) of endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 1993;51(1):33-8. Epub 1993/10/01.
115. Gil-Moreno A, Diaz-Feijoo B, Morchon S, Xercavins J. Analysis of survival after laparoscopic-assisted vaginal hysterectomy compared with the conventional abdominal approach for early-stage endometrial carcinoma: a review of the literature. *J Minim Invasive Gynecol.* 2006;13(1):26-35. Epub 2006/01/25.
116. Boggess JF, Gehrig PA, Cantrell L, Shafer A, Ridgway M, Skinner EN, et al. A comparative study of 3 surgical methods for hysterectomy with staging for endometrial cancer: robotic assistance, laparoscopy, laparotomy. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199(4):360 e1-9. Epub 2008/10/22.
117. Seamon LG, Bryant SA, Rheume PS, Kimball KJ, Huh WK, Fowler JM, et al. Comprehensive surgical staging for endometrial cancer in obese patients: comparing robotics and laparotomy. *Obstet Gynecol.* 2009;114(1):16-21. Epub 2009/06/24.
118. Gil-Ibanez B, Diaz-Feijoo B, Perez-Benavente A, Puig-Puig O, Franco-Camps S, Centeno C, et al. Nerve sparing technique in robotic-assisted radical hysterectomy: results. *The international journal of medical robotics + computer assisted surgery : MRCAS.* 2013. Epub 2013/01/03.
119. Creasman WT. Revised FIGO staging for carcinoma of the endometrium. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 2009;105(109).
120. Current FIGO staging for cancer of the vagina, fallopian tube, ovary, and gestational trophoblastic neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;105(1):3-4. Epub 2009/03/27.
121. Salvesen HB, Haldorsen IS, Trovik J. Markers for individualised therapy in endometrial carcinoma. *The lancet oncology.* 2012;13(8):e353-61. Epub 2012/08/01.
122. Creutzberg CL, Nout RA, Lybeert ML, Warlam-Rodenhuis CC, Jobsen JJ, Mens JW, et al. Fifteen-Year Radiotherapy Outcomes of the Randomized PORTEC-1 Trial for Endometrial Carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011. Epub 2011/06/07.
123. Creutzberg CL, van Putten WL, Koper PC, Lybeert ML, Jobsen JJ, Warlam-Rodenhuis CC, et al. 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.* 2000;355(9213):1404-11. Epub 2000/05/03.
124. Keys HM, Roberts JA, Brunetto VL, Zaino RJ, Spirtos NM, Bloss JD, et al. A phase III trial of surgery with or without adjunctive external pelvic radiation therapy in intermediate risk

- endometrial adenocarcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 2004;92(3):744-51. Epub 2004/02/27.
125. Blake P, Swart AM, Orton J, Kitchener H, Whelan T, Lukka H, et al. 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.* 2009;373(9658):137-46. Epub 2008/12/17.
126. Wright JD, Barrena Medel NI, Sehouli J, Fujiwara K, Herzog TJ. Contemporary management of endometrial cancer. *Lancet.* 2012;379(9823):1352-60. Epub 2012/03/27.
127. Scholten AN, van Putten WL, Beerman H, Smit VT, Koper PC, Lybeert ML, et al. Postoperative radiotherapy for Stage 1 endometrial carcinoma: long-term outcome of the randomized PORTEC trial with central pathology review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;63(3):834-8. Epub 2005/06/02.
128. Nout RA, Smit VT, Putter H, Jurgenliemk-Schulz IM, Jobsen JJ, Lutgens LC, et al. 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.* 2010;375(9717):816-23. Epub 2010/03/09.
129. Lee CM, Szabo A, Shrieve DC, Macdonald OK, Gaffney DK. Frequency and effect of adjuvant radiation therapy among women with stage I endometrial adenocarcinoma. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2006;295(4):389-97. Epub 2006/01/26.
130. Baekelandt MM, Castiglione M. Endometrial carcinoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2009;20 Suppl 4:29-31. Epub 2009/07/10.
131. Randall ME, Spirtos NM, Dvoretzky P. Whole abdominal radiotherapy versus combination chemotherapy with doxorubicin and cisplatin in advanced endometrial carcinoma (phase III): Gynecologic Oncology Group Study No. 122. *Journal of the National Cancer Institute Monographs.* 1995(19):13-5. Epub 1995/01/01.
132. Shepherd JH. Revised FIGO staging for gynaecological cancer. *Br J Obstet Gynaecol.* 1989;96(8):889-92. Epub 1989/08/01.
133. Susumu N, Sagae S, Udagawa Y, Niwa K, Kuramoto H, Satoh S, et al. Randomized phase III trial of pelvic radiotherapy versus cisplatin-based combined chemotherapy in patients with intermediate- and high-risk endometrial cancer: a Japanese Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 2008;108(1):226-33. Epub 2007/11/13.
134. Hogberg T, Signorelli M, de Oliveira CF, Fossati R, Lissoni AA, Sorbe B, et al. Sequential adjuvant chemotherapy and radiotherapy in endometrial cancer--results from two randomised studies. *Eur J Cancer.* 2010;46(13):2422-31. Epub 2010/07/14.
135. Hogberg T. Adjuvant chemotherapy in endometrial carcinoma: overview of randomised trials. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2008;20(6):463-9. Epub 2008/05/10.
136. Fleming GF, Filiaci VL, Bentley RC, Herzog T, Sorosky J, Vaccarello L, et al. Phase III randomized trial of doxorubicin + cisplatin versus doxorubicin + 24-h paclitaxel + filgrastim in endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Ann Oncol.* 2004;15(8):1173-8. Epub 2004/07/28.
137. Kokka F, Brockbank E, Oram D, Gallagher C, Bryant A. Hormonal therapy in advanced or recurrent endometrial cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010(12):CD007926. Epub 2010/12/15.
138. Scarabelli C, Campagnutta E, Giorda G, DePiero G, Sopracordevole F, Quaranta M, et al. Maximal cytoreductive surgery as a reasonable therapeutic alternative for recurrent endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1998;70(1):90-3. Epub 1998/08/12.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

139. Thigpen JT, Brady MF, Homesley HD, Malfetano J, DuBeshter B, Burger RA, et al. Phase III trial of doxorubicin with or without cisplatin in advanced endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol.* 2004;22(19):3902-8. Epub 2004/10/02.
140. Thigpen JT, Brady MF, Alvarez RD, Adelson MD, Homesley HD, Manetta A, et al. Oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: a dose-response study by the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol.* 1999;17(6):1736-44. Epub 1999/11/24.
141. Thigpen T, Brady MF, Homesley HD, Soper JT, Bell J. Tamoxifen in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2001;19(2):364-7. Epub 2001/02/24.
142. Temkin SM, Fleming G. Current treatment of metastatic endometrial cancer. *Cancer Control.* 2009;16(1):38-45. Epub 2008/12/17.
143. Kamat AA, Merritt WM, Coffey D, Lin YG, Patel PR, Broaddus R, et al. Clinical and biological significance of vascular endothelial growth factor in endometrial cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(24):7487-95. Epub 2007/12/21.
144. Teicher BA. Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(10):2435-43. Epub 2006/10/17.
145. Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol.* 2007;170(3):793-804. Epub 2007/02/27.
146. Key TJ, Pike MC. The dose-effect relationship between 'unopposed' oestrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. *Br J Cancer.* 1988;57(2):205-12. Epub 1988/02/01.
147. Niwa K, Tanaka T, Mori H, Yokoyama Y, Furui T, Tamaya T. Rapid induction of endometrial carcinoma in ICR mice treated with N-methyl-N-nitrosourea and 17 beta-estradiol. *Jpn J Cancer Res.* 1991;82(12):1391-6. Epub 1991/12/01.
148. Niwa K, Hashimoto M, Morishita S, Yokoyama Y, Lian Z, Tagami K, et al. Preventive effects of danazol on endometrial carcinogenesis in mice. *Cancer Lett.* 2000;158(2):133-9. Epub 2000/08/29.
149. Cespedes MV, Casanova I, Parreno M, Mangués R. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin Transl Oncol.* 2006;8(5):318-29. Epub 2006/06/09.
150. Wang H, Douglas W, Lia M, Edelmann W, Kucherlapati R, Podsypanina K, et al. DNA mismatch repair deficiency accelerates endometrial tumorigenesis in Pten heterozygous mice. *Am J Pathol.* 2002;160(4):1481-6. Epub 2002/04/12.
151. Mirantes C, Eritja N, Dosil MA, Santacana M, Pallares J, Gatus S, et al. An inducible knockout mouse to model the cell-autonomous role of PTEN in initiating endometrial, prostate and thyroid neoplasias. *Disease models & mechanisms.* 2013;6(3):710-20. Epub 2013/03/09.
152. Oh JH, Lee HS, Park SH, Ryu HS, Min CK. Syndecan-1 overexpression promotes tumor growth and angiogenesis in an endometrial cancer xenograft model. *Int J Gynecol Cancer.* 2010;20(5):751-6. Epub 2010/10/27.
153. Xu Y, Tong J, Ai Z, Wang J, Teng Y. Epidermal growth factor receptor signaling pathway involved in progestin-resistance of human endometrial carcinoma: In a mouse model. *J Obstet Gynaecol Res.* 2012;38(12):1358-66. Epub 2012/05/23.
154. Davies S, Dai D, Pickett G, Thiel KW, Korovkina VP, Leslie KK. Effects of bevacizumab in mouse model of endometrial cancer: Defining the molecular basis for resistance. *Oncol Rep.* 2011;25(3):855-62. Epub 2011/01/18.

155. Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis*. 2005;26(3):513-23. Epub 2004/09/11.
156. Decaudin D. Primary human tumor xenografted models ('tumorgrafts') for good management of patients with cancer. *Anticancer Drugs*. 2011;22(9):827-41. Epub 2011/05/31.
157. Wilmanns C, Fan D, Obrian C, Radinsky R, Bucana C, Tsan R, et al. Modulation of Doxorubicin sensitivity and level of p-glycoprotein expression in human colon-carcinoma cells by ectopic and orthotopic environments in nude-mice. *Int J Oncol*. 1993;3(3):413-22. Epub 1993/09/01.
158. Scholz CC, Berger DP, Winterhalter BR, Henss H, Fiebig HH. Correlation of drug response in patients and in the clonogenic assay with solid human tumour xenografts. *Eur J Cancer*. 1990;26(8):901-5. Epub 1990/01/01.
159. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, et al. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer*. 2001;84(10):1424-31. Epub 2001/05/18.
160. Inaba M, Kobayashi T, Tashiro T, Sakurai Y. Pharmacokinetic approach to rational therapeutic doses for human tumor-bearing nude mice. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1988;79(4):509-16. Epub 1988/04/01.
161. Kerbel RS. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer biology & therapy*. 2003;2(4 Suppl 1):S134-9. Epub 2003/09/26.
162. Kelkar M, De A. Bioluminescence based in vivo screening technologies. *Current opinion in pharmacology*. 2012;12(5):592-600. Epub 2012/09/08.
163. Kuramoto H, Tamura S, Notake Y. Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro. *Am J Obstet Gynecol*. 1972;114(8):1012-9. Epub 1972/12/15.
164. Takahashi K, Saga Y, Mizukami H, Takei Y, Machida S, Fujiwara H, et al. Cetuximab inhibits growth, peritoneal dissemination, and lymph node and lung metastasis of endometrial cancer, and prolongs host survival. *Int J Oncol*. 2009;35(4):725-9. Epub 2009/09/03.
165. Takahashi K, Saga Y, Mizukami H, Takei Y, Urabe M, Kume A, et al. Development of a mouse model for lymph node metastasis with endometrial cancer. *Cancer Sci*. 2011;102(12):2272-7. Epub 2011/09/14.

IX. ANEXOS

ANEXO 1

Autorización del Comité Ético de Experimentación Animal para realizar los experimentos de generación del modelo animal

Nº Registre: 21/08 CEEA.

MODEL NORMALITZAT PER A LA NOTIFICACIÓ DE PROCEDIMENTS

1. **Títol del procediment:** Caracterización *in vivo* de nuevas estrategias terapéuticas específicas de cáncer de endometrio.

2. **Segueix alguna línia directriu oficial*?**

Sí; especificar quina i adjuntar-ne una fotocòpia:

No, però s'adjunten fotocòpies de publicacions que utilitzen un disseny similar

No, ni existeixen publicacions que utilitzin un disseny similar

* S'entén per línia directriu oficial aquella que apareix en el DOGC, BOE, DOCE..., o altres publicacions d'administracions o organismes públics (FDA, EMEA...)

3. **Objectius**

Descriure breument i utilitzant un vocabulari no excessivament tècnic:

3.1. **Si es tracta d'un producte nou** **o ja conegut**

3.2. **Antecedents:**

El **carcinoma de endometrio** es el más frecuente de los tumores infiltrantes del tracto genital inferior femenino y el cuarto más común en mujeres en los países occidentales desarrollados. Como indicador, en Estados Unidos se estima una incidencia de unos 43,470 nuevos casos y unas 7,950 muertes en 2010 ^{1,2}.

El cáncer de endometrio tipo I o endometriode (CEE) representa el 80% de los casos y son tumores de bajo grado, asociados a un estado de hiperestrogenismo, se suelen desarrollar en mujeres peri- o post-menopáusicas y coexisten o están precedidos de hiperplasia endometrial, con o sin atipia. El tipo II o no-endometriode suele afectar a mujeres en edad avanzada, suelen ser tumores menos diferenciados y de peor pronóstico, no asociados a estimulación estrogénica, y relacionados con endometrio atrófico u, ocasionalmente, con pólipos endometriales^{3,4}.

El **diagnóstico** se realiza mediante análisis vaginal con ultrasonidos, examen histológico tras biopsia con o sin imagen por histeroscopia, y/o raspado de la cavidad uterina⁵. A pesar de que el CEE se diagnostica en el estadio I FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) en el 80% de los casos gracias a su sintomatología precoz (metrorragia postmenopáusica), correspondiendo a tumores confinados al útero y asociados a buen pronóstico, un número significativo de pacientes se presenta con enfermedad avanzada. El estadio FIGO representa el parámetro pronóstico más robusto en pacientes con CEE. El porcentaje de supervivencia a cinco años es del 96% en estadio I, 67% en estadio II, y del 17% en estadio III-IV^{1, 2}. Además, en CEE de bajo estadio, la **invasión miometrial** es un predictor independiente de pronóstico: 93.8% de supervivencia a cinco años en estadio IA, con tumor limitado al endometrio y/o con invasión < 1/2 del miometrio; y 75% en estadio IB, con invasión > 1/2 del miometrio. Asimismo, la profundidad de la invasión miometrial y por tanto el grupo de pacientes en estadio IB, se correlaciona con tumores más indiferenciados, con invasión linfo-vascular y con una afectación gangliolar del orden del 10-20%. Por su parte, la supervivencia libre de recidiva a los 5 años con ganglios pélvicos y aórticos negativos es del orden del 85%, con pélvicos positivos y aórticos negativos del orden del 70% y con ambos grupos afectados del 35%⁶.

El **tratamiento** primario de CEE consiste en **cirugía**, mediante una correcta estadificación quirúrgica, y comprende histerectomía total extrafascial, anexectomía bilateral, citologías peritoneales mediante lavados con suero fisiológico (de espacios parietocólicos, subdiafragmáticos y del espacio de Douglas), y linfadenectomía pélvica y paraaórtica⁷. La obtención del estadio FIGO definitivo, estadificación quirúrgica-patológica, estará basada en los hallazgos histopatológicos y morfológicos (invasión miometrial tumoral, grado histológico, citología peritoneales, tipo histológico, invasión de estructuras vecinas y estado de los ganglios retroperitoneales locoregionales). Tras la cirugía, las pacientes con evidencias de alto **riesgo de recurrencia** (alto grado, invasión miometrial profunda y/o afectación cervical), reciben radioterapia adyuvante. Dentro del estadio I, el IB representa un grupo de pacientes con alto riesgo de recurrencia, por lo que deberán ser tratadas con tratamiento adyuvante posterior a la cirugía⁸. En general y aunque varíe según diferentes estudios, la definición de alto riesgo se centra en los tumores IC con grado 3 (profundamente invasivos y pobremente diferenciados).

Bajo riesgo	Estadio IA, grado 1 ó 2, no seroso-papilar ni célula clara
Riesgo intermedio	Estadio I, grado 1, 2 ó 3, no seroso-papilar ni célula clara, con invasión miometrial >1/2
Alto riesgo	Estadios II, III o IV o carcinoma seroso-papilar o célula clara

Las recurrencias del CEE aparecen confinadas a la pelvis en el 50% de las pacientes, y aproximadamente la mitad de ellas limitadas a la vagina. En los casos de afectación ganglionar, pélvica y/o aórtica, estamos ante un estadio IIIc de la FIGO y el tratamiento adyuvante debe realizarse con **radioterapia**, adecuando para cada caso los campos de irradiación ⁹. El **tratamiento hormonal** se basa en la hormonodependencia de ciertos tumores en sus procesos de crecimiento, diferenciación y desarrollo celular: a mayor positividad de receptores esteroideos mayor tasa de respuestas. A pesar de que este tratamiento ha sido ampliamente utilizado anteriormente, los resultados de diversos estudios indican un escaso impacto en la supervivencia ¹⁰. Hoy en día, el fármaco de elección es el acetato de medroxiprogesterona y se utiliza básicamente en tres situaciones y casi siempre con una intención paliativa, con respuestas del 20-35%, si bien puede llegar a ser del 80% en casos de receptores esteroideos positivos: a) ante una recidiva en una paciente sin más posibilidad de tratamiento, b) ante una paciente en la que está contraindicada la cirugía o bien otro tipo de tratamiento complementario y c) enfermedad diseminada en la cual el tratamiento hormonal previo a la quimioterapia es una opción razonable, reservando dicha quimioterapia y su toxicidad para cuando haya un fallo de respuesta ¹¹.

Recientemente, se ha planteado el **tratamiento poliquimioterápico** en pacientes de riesgo elevado, con enfermedad primaria diseminada o recurrencia extrapélvica que no responde al tratamiento hormonal, obteniéndose una tasa de respuestas del orden del 15%. Partiendo de la base de que el CEE se considera un tumor quimiorresistente, los fármacos más activos, con respuestas superiores al 25%, son el platino, la adriamicina, la epirubicina, el taxol y la ifosfamida, siendo la supervivencia media con estos citostáticos de 10-15 meses. En definitiva, la quimioterapia únicamente ha demostrado una relativa utilidad en tumores avanzados que no responden a hormonas, evidenciando la necesidad de desarrollar nuevas terapias en cáncer de endometrio relacionado con metástasis ¹².

Desde el punto de vista molecular y a pesar de la caracterización de algunos eventos asociados al desarrollo del carcinoma de endometrio, su patología resta en gran medida desconocida. Entre las **alteraciones génicas** identificadas en CEE cabe destacar la inestabilidad de microsátélites asociada a deficiencias, mutaciones o hipermetilaciones en genes de la maquinaria de reparación del DNA (MLH1, MSH2 o MSH6); el silenciamiento del gen supresor de tumores PTEN, implicado en la regulación de adhesión focal, migración celular y proliferación tumoral ¹³; mutaciones en el oncogén k-RAS, relacionado con proliferación celular; y mutaciones en b-catenina, asociada a progresión tumoral ^{14, 15}. Estas

alteraciones, sin embargo, resultan poco concluyentes y presentan escasa correlación entre genotipo y fenotipo en CEE ¹⁶⁻¹⁸. La comprensión de los mecanismos moleculares relacionados con el desarrollo tumoral, la invasión del miometrio, y la aparición de recurrencias, permitirá diseñar terapias específicas del proceso de metástasis en CEE con un impacto importante en la reducción de los niveles de mortalidad y morbilidad. En esta línea, en nuestro grupo trabajamos en la identificación y caracterización de **alteraciones moleculares asociadas al proceso de invasión y diseminación a distancia en CEE** ¹⁹. Es el caso de los factores de transcripción ETV5 y RUNX1 ^{20, 21}. La sobre-expresión de ETV5 durante los inicios de la infiltración miometrial podría inducir la remodelación de la matriz extracelular mediante la activación de MMP2 ²². El incremento en la expresión de RUNX1 determina la aparición de metástasis pulmonares en modelos animales de cáncer de endometrio (Gonzalez et al., en preparación). Asimismo, estudios proteómicos relacionan el proceso de invasión con estrés oxidativo (Monge et al., en preparación), así como la mediación de la proteína LPP como sensor extracelular mediando la activación transcripcional de ETV5 durante la infiltración miometrial en cáncer de endometrio (Colás et al., en preparación).

Como continuación a los estudios de invasión en cáncer de endometrio, en el grupo nos planteamos el estudio de las metástasis tanto desde una investigación fundamental o básica que nos permita entender las bases moleculares de este proceso, como desde un punto de vista traslacional, con marcado interés terapéutico. Así, el objeto del presente proyecto es comprender las vías que fundamentan la correlación existente entre infiltración miometrial y la permeación vascular con la aparición de ganglios afectados, e identificar potenciales dianas terapéuticas específicas del proceso de **metástasis** en cáncer de endometrio y diseñar y evaluar terapias experimentales.

Es importante incidir en que en este proyecto confluyen una serie de circunstancias que acreditan su oportunidad y viabilidad: en primer lugar, la solvencia del grupo en esta línea de investigación con una trayectoria de más de diez años y una producción científica contrastada; en segundo lugar, los modelos animales generados, cercanos a la clínica y especialmente apropiados para el desarrollo de ensayos preclínicos en cáncer de endometrio; en tercer lugar, la estrecha relación de colaboración en esta línea de investigación con la empresa GEADIC Biotec, con el respaldo financiero que ello representa y su experiencia en el novedoso y exitoso campo terapéutico de los anticuerpos monoclonales; y cuarto, la implicación del Departamento de Ginecología Oncológica, potenciada con la incorporación de la doctora Berta Díaz Feijoo en la presente propuesta, que garantiza tanto la parte intelectual del proyecto acerca de las necesidades clínicas en cáncer de endometrio y que determinan en gran manera la dirección de esta línea de investigación, como la parte de cirugía y tratamiento. Por último, debe mencionarse que el firme propósito de los todos los integrantes de esta propuesta (grupo de investigación

liderado por el Investigador Principal, Departamento de Ginecología Oncológica y GEADIC Biotec), es que tenga continuación en el diseño y desarrollo de ensayos clínicos en pacientes en el seno del Hospital Vall d'Hebron y multicéntricos dentro del Sistema Nacional de Salud.

Bibliografía

1 Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2010; **19**:1893-1907.

2 Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA: a cancer journal for clinicians* 2010; **60**:277-300.

3 Lax SF, Kurman R. A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analyses. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Pathologie* 1997; **81**:228-232.

4 Caduff RF, Svoboda-Neumann SM, Johnston CM, Bartos RE, Frank TS. Molecular analysis in endometrial cancer. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Pathologie* 1997; **81**:219-227.

5 Ponce J, Torrejón R, Barahona M. Oncoguía SEGO. Cáncer de Endometrio 2010. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. In: Obstetricia SEdGy. ed.: Publicaciones SEGO 2010.

6 Benedet JL, Bender H, Jones H, 3rd, Ngan HY, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; **70**:209-262.

7 Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P *et al.* Carcinoma of the corpus uteri. FIGO 6th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 2006; **95 Suppl 1**:S105-143.

8 Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. *Lancet* 2005; **366**:491-505.

- 9 Johnson N, Cornes P. Survival and recurrent disease after postoperative radiotherapy for early endometrial cancer: systematic review and meta-analysis. *Bjog* 2007; **114**:1313-1320.
- 10 Martin-Hirsch PL, Lilford RJ, Jarvis GJ. Adjuvant progestagen therapy for the treatment of endometrial cancer: review and meta-analyses of published randomised controlled trials. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; **65**:201-207.
- 11 Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Treatment modalities in endometrial cancer. *Curr Opin Oncol* 2007; **19**:479-485.
- 12 Mariani A, Dowdy SC, Keeney GL, Long HJ, Lesnick TG, Podratz KC. High-risk endometrial cancer subgroups: candidates for target-based adjuvant therapy. *Gynecol Oncol* 2004; **95**:120-126.
- 13 Pallares J, Bussaglia E, Martinez-Guitarte JL *et al.* Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with a comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. *Mod Pathol* 2004.
- 14 Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sarrio D *et al.* Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. *J Pathol* 2003; **199**:471-478.
- 15 Palacios J, Catusus L, Moreno-Bueno G, Matias-Guiu X, Prat J, Gamallo C. Beta- and gamma-catenin expression in endometrial carcinoma. Relationship with clinicopathological features and microsatellite instability. *Virchows Arch* 2001; **438**:464-469.
- 16 Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch* 2004; **444**:213-223.
- 17 Oehler MK, Brand A, Wain GV. Molecular genetics and endometrial cancer. *J Br Menopause Soc* 2003; **9**:27-31.
- 18 Abal M, Planaguma J, Gil-Moreno A *et al.* Molecular pathology of endometrial carcinoma: transcriptional signature in endometrioid tumors. *Histol Histopathol* 2006; **21**:197-204.
- 19 Abal M, Llauro M, Doll A *et al.* Molecular determinants of invasion in endometrial cancer. *Clin Transl Oncol* 2007; **9**:272-277.

20 Planaguma J, Abal M, Gil-Moreno A *et al.* Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma. *J Pathol* 2005; **207**:422-429.

21 Planaguma J, Diaz-Fuertes M, Gil-Moreno A *et al.* A differential gene expression profile reveals overexpression of RUNX1/AML1 in invasive endometrioid carcinoma. *Cancer Res* 2004; **64**:8846-8853.

22 Monge M, Colas E, Doll A *et al.* ERM/ETV5 up-regulation plays a role during myometrial infiltration through matrix metalloproteinase-2 activation in endometrial cancer. *Cancer Res* 2007; **67**:6753-6759.

23 Abal M, Bras-Goncalves R, Judde JG *et al.* Enhanced sensitivity to irinotecan by Cdk1 inhibition in the p53-deficient HT29 human colon cancer cell line. *Oncogene* 2004; **23**:1737-1744.

24 Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 2004; **48**:365-375.

25 Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 2005; **24**:7443-7454.

26 Petit MM, Fradelizi J, Golsteyn RM *et al.* LPP, an actin cytoskeleton protein related to zyxin, harbors a nuclear export signal and transcriptional activation capacity. *Mol Biol Cell* 2000; **11**:117-129.

3.3. Objectius que es pretenen assolir:

Objetivo 1. Procesamiento de datos de expresión en muestras de carcinoma de endometrio según criterios clínicos asociados a diseminación ganglionar y riesgo de recidiva, y selección de genes relacionados con el proceso de metástasis en cáncer de endometrio.

Objetivo 2. Validación funcional *in vitro* de los genes seleccionados en relación con su posible papel en invasión y metástasis en cáncer de endometrio.

Objetivo 3. Validación *in vivo* de los genes seleccionados en relación con su posible papel en invasión y metástasis en cáncer de endometrio.

Objetivo 4. Identificación de potenciales dianas terapéuticas diseño y desarrollo de terapias experimentales en cultivos celulares, basadas en anticuerpos desarrollados en colaboración con la empresa de biotecnología Oryzon Genomics. Las terapias basadas en anticuerpos monoclonales han demostrado un elevado índice de éxito. Oryzon dispone de librerías de anticuerpos humanizados de diversos orígenes que han sido adquiridas con las correspondientes licencias de uso científico y comercial.

Objetivo 5. Evaluación del poder terapéutico de los anticuerpos desarrollados frente a las dianas seleccionadas, en los modelos animales de cáncer de endometrio.

3.4. Si es tracta de continuar en una línia d'investigació ja oberta, deixar constància dels objectius ja assolits, i de que no representa una repetició dels resultats ja obtinguts:

Este proyecto representa el impulso de la línea de investigación del grupo en cáncer de endometrio, centrada en los mecanismos moleculares de invasión y metástasis, hacia la investigación traslacional mediante una propuesta de terapias experimentales.

Como continuación a los estudios de invasión en cáncer de endometrio, en el grupo nos planteamos el estudio de las metástasis tanto desde una investigación fundamental o básica que nos permita entender las bases moleculares de este proceso, como desde un punto de vista traslacional, con marcado interés terapéutico. Así, el objeto del presente proyecto es comprender las vías que fundamentan la correlación existente entre infiltración miometrial y la permeación vascular con la aparición de ganglios afectados, e identificar potenciales dianas terapéuticas específicas del proceso de metástasis en cáncer de endometrio y diseñar y evaluar terapias experimentales. Asimismo, la presente propuesta define claramente el procedimiento terapéutico planteado en 2005 para la línea de cáncer de endometrio del grupo (proyecto 06/95). En dicho proyecto, se especulaba con la posibilidad de desarrollar terapias experimentales con los modelos animales desarrollados, punto en el que nos encontramos ahora y que es la base de este nuevo proyecto.

Como resultados preliminares y punto de partida en la identificación de potenciales dianas, hemos realizado mediante microarrays de cDNA un estudio de expresión diferencial de genes entre 60 tumores de endometrio operados en el Departamento de Ginecología Oncológica del Hospital Vall d'Hebrón, escogidos desde varios puntos de vista clínico. Por un lado, hemos agrupado carcinomas que presentaron ganglios afectados en el momento de la cirugía frente a tumores que no afectaban ganglios, y por otro lado, hemos enfrentado tumores con bajo riesgo de recurrencia frente a tumores con alto riesgo de recaer. A partir de los datos de expresión generados por el grupo en función de criterios clínicos, seleccionaremos genes relacionados con afectación ganglionar y riesgo de recidiva en

cáncer de endometrio. A continuación, estudiaremos funcionalmente el papel de los genes seleccionados en el proceso de invasión y diseminación tumorales. Por último, se diseñarán y evaluarán en modelos *in vitro* e *in vivo* terapias experimentales específicas de metástasis en cáncer de endometrio.

En paralelo hemos desarrollado la tecnología adecuada para el desarrollo de modelos animales en cáncer de endometrio próximos a la clínica, como herramienta fundamental en los estudios de terapia experimental que planteamos en la presente propuesta. Esta tecnología se basa en el implante ortotópico de tumores humanos de pacientes y de tumores generados a partir de líneas celulares. La prueba de concepto de estos modelos se ha llevado a cabo a partir de la línea celular de cáncer de endometrio Hec1A, y el resultado ha sido el desarrollo de carcinomas avanzados poco diferenciados y con niveles hormonales bajos y de marcadores ki67 y p53 elevados. Asimismo, son tumores que se desarrollan en estrecho contacto con el útero del ratón, lo que permite realizar estudios de invasión miometrial, angiogénesis y diseminación en el contexto tisular adecuado. Finalmente, estos modelos diseminan a ganglios paraaórticos, lo cual reafirma su correspondencia con la clínica y lo apropiado que resulta esta tecnología para el diseño y evaluación de terapias experimentales dado que representa un modelo equivalente a las pacientes candidatas a recibir terapia adyuvante (Doll et al., en revisión).

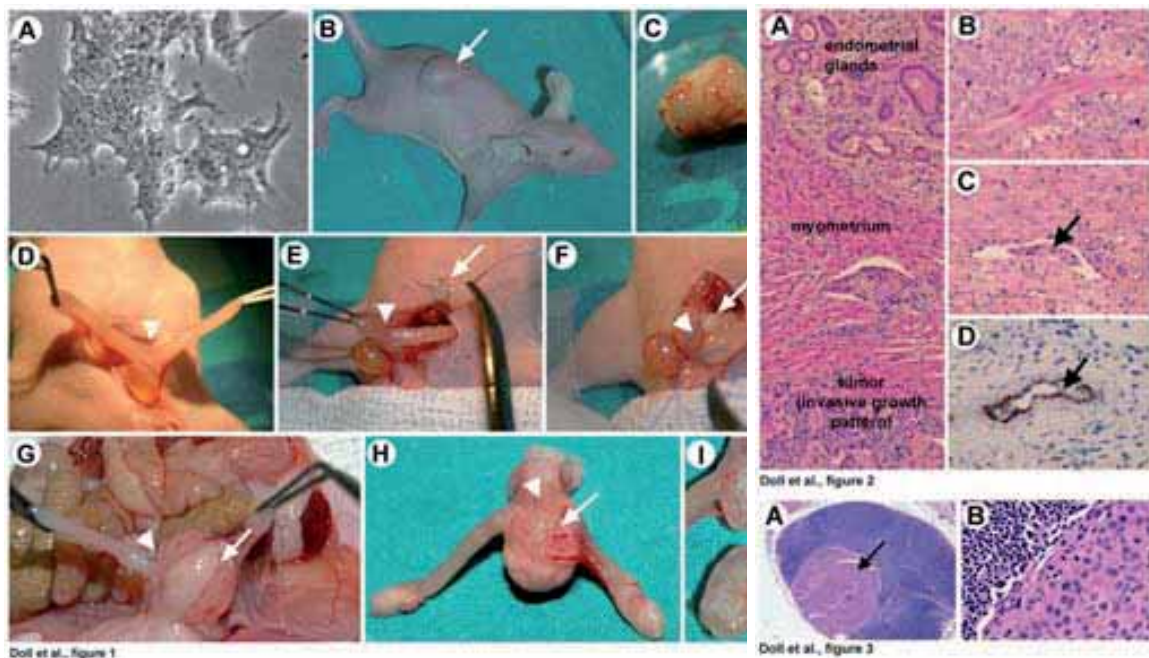


Figura 1

En la figura 1 se muestra el desarrollo del modelo animal, a partir de la inyección subcutánea de la línea celular de cáncer de endometrio humana Hec1A en un ratón nude hembra (A-C). Tras el desarrollo del tumor, se implantó un trozo del tejido tumoral en la parte posterior del útero de otro ratón (D-F), generando tumores ortotópicos (G-I). En la Figura 2 se muestra la caracterización histológica de los tumores ortotópicos, poco diferenciados y sin diferenciación glandular, y en contacto directo e interacción con el útero del ratón en el área de implante (A). Se observa asimismo infiltración tanto del miometrio como de vasos del ratón (B-D). En la figura 3 se muestra un ejemplo representativo de metástasis ganglionar.

3.5. Avantatges i beneficis que es derivarien d'aquest procediment, cas d'assolir els objectius:

Además de su evidente valor clínico, esta propuesta demuestra la firme intención del grupo por la aplicabilidad de sus resultados científicos y evidencia la apuesta a largo plazo por la investigación traslacional en el área de la ginecología oncológica. El desarrollo de este proyecto dará lugar a herramientas fundamentales para estudios futuros, como cultivos primarios o modelos animales, y a resultados susceptibles de generar patentes y propiedad intelectual. Todo esto potenciará la colaboración con empresas farmacéuticas y del entorno biotecnológico en el desarrollo conjunto de futuros estudios clínicos de terapia en cáncer de endometrio.

4. Definició i justificació del model animal seleccionat i del nombre d'animals que es proposa utilitzar

4.1. Definició

Espècie: ratón

Soca o raça: swiss nu/nu

Sexe: hembra

Edat: 6 semanas

Pes: 18-25 gr

4.2. Justificar que el model animal proposat és el de menor nivell de sensibilitat neurovegetativa que permet assolir els objectius:

4.3. Nombre total d'animals en el procediment:

El procedimiento que se propone en primer término es la validación de los genes seleccionados en relación con el proceso de metástasis en cáncer de endometrio. Para ello se modulará la expresión de 10 genes candidatos en las líneas celulares de cáncer de endometrio Hec1A e Ishikawa, con alta y baja capacidad metastásica respectivamente. Aquellos genes que hayan sido validados in vitro como implicados en el proceso de metástasis, serán validados in vivo. Para ello, se generarán tumores mediante inyección subcutánea, y el desarrollo o inhibición de metástasis será evaluado en grupos de cinco animales por línea generada. Esto implica un número máximo de animales de:

2 líneas celulares x 10 candidatos x 5 animales por grupo a evaluar: 100 animales en caso de validación de los 10 candidatos seleccionados.

En segundo lugar, para el desarrollo de dos modelos animales próximos a la clínica, generados a partir del implante subcutáneo de tumores de pacientes, se prevé un número de diez implantes de los que se seleccionarán aquellos dos que reproduzcan la invasión y diseminación clínica. Cada tumor será implantado subcutáneamente y se realizará un pase en ortotópico en tres animales con el fin de evaluar su comportamiento en relación al proceso de metástasis. En el momento en que se seleccionen los dos modelos adecuados, se interrumpirá el desarrollo de más modelos. Se prevé un número máximo de animales de: 10 modelos x 4 animales (1 subcutáneo + 3 ortotópicos): 40 animales.

En tercer lugar, se plantea la evaluación del potencial terapéutico de cinco anticuerpos monoclonales como terapia específica del proceso de metástasis en cáncer de endometrio. Para cada anticuerpo, se harán en primer lugar ensayos de concentración y toxicidad, para en segundo término realizar los ensayos terapéuticos. Estos se llevarán a cabo en cada uno de los modelos desarrollados en los puntos que se describen a continuación en el apartado de Diseño y Metodología: modelo Hec1a altamente metastásico; modelo Ishikawa metastásico debido a la sobre-expresión de cada gen en referencia a cada correspondiente anticuerpo; modelo 1 tumor humano metastásico; modelo 2 tumor humano metastásico.

Los ensayos durarán seis semanas y se realizarán en grupos de ocho animales por cada modelo y anticuerpo. A efectos prácticos, evaluaremos el potencial terapéutico de todos los anticuerpos en un determinado modelo para así poder referir los resultados a un único grupo control. Esto resultará en cuatro series de tratamiento de seis semanas en cada uno de los cuatro modelos, con un total de 48 animales por serie (8 animales por cada uno de los cinco anticuerpos más 8 animales del grupo control). Emplearemos ratones hembra inmunodeprimidos (Swiss nu/nu), de 6-8 semanas y mínimo 30 gramos de peso, bajo condiciones de mantenimiento y manipulación adecuadas según la legislación catalana, española y europea sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, y las recomendaciones del Comité Ético de Experimentación Animal

de la institución. Los animales serán randomizados en los diferentes grupos de estudio y tratados tan pronto el diámetro medio de los tumores alcance los 5 mm. El número de animales en esta fase es de:

8 animales por grupo x 6 agentes terapéuticos (5 grupos de terapia + 1 grupo control) x 4 modelos animales: 192 animales.

El total de animales es:

100 animales (fase 1) + 40 animales (fase 2) + 192 animales (fase 3): 332 animales.

4.4. Justificació del nombre d'animals per procediment

- És el nombre aconsellat en les línies directrius indicades en el punt 2
- És el nombre mínim necessari: especificar els paràmetres a analitzar i raonar el nombre d'animals en base a criteris estadístics i/o referències bibliogràfiques (aportar-ne fotocòpia) que avalin aquest nombre, o en funció del nombre d'alumnes, si es tracta d'un procediment educatiu.

A partir de las medidas periódicas de los tumores, se calculará el volumen del tumor ($V=a \times b^2$, siendo a la anchura y b la longitud del tumor en milímetros), y el volumen tumoral relativo ($RTV=\frac{V_x}{V_i}$, donde V_x es el volumen medio tumoral (de los 8 ratones por grupo) en milímetros cúbicos en un determinado momento, y V_i es el volumen tumoral medio inicial en milímetros cúbicos al inicio del tratamiento), que permite comparaciones entre grupos independientemente de diferencias iniciales de volumen. La respuesta terapéutica también se evaluará en función del retraso en el crecimiento tumoral, expresado como la diferencia en días entre el tiempo medio de los tumores tratados y los tumores control en alcanzar un volumen cinco veces mayor que el volumen al comienzo del tratamiento²³. La inhibición del desarrollo de metástasis se cuantificará tanto en función del número de ganglios afectados y de micrometástasis a distancia como en función del tamaño de los implantes evaluados mediante bioluminiscencia y ecografía, dependiendo del modelo de análisis (ver Objetivo 3 en Diseño y Metodología). La significancia estadística de las comparaciones entre grupos tratados y control se hará según el test de Mann-Whitney U no paramétrico, y se considerarán valores P significativos aquellos menores o iguales a 0.05.

5. Reutilització d'animals

Indicar si aquests animals ja havien estat utilitzats prèviament

- No

Sí; en aquest cas, omplir l'annex corresponent

6. Disseny i metodologia

Nota: si se segueix una línia directriu oficial, no serà obligatori omplir l'apartat 6.1.

6.1. Descriure, de forma seqüencial, la tècnica o tècniques previstes que impliquin la utilització de l'animal, especificant, si és el cas, el nombre d'animals que seran sotmesos a cadascuna d'elles.

Objetivo 1.- Selección de genes relacionados con el proceso de metástasis en CEE.

A partir de los listados de genes derivados de la comparación de datos de expresión diferencial en carcinomas de endometrio en relación al grado de diseminación ganglionar y al riesgo de recidiva (ver Antecedentes), se seleccionarán aquellos que sean relevantes y coincidentes en su implicación en ambos procesos, es decir, que estén bien sobre-expresados o bien inhibidos de manera equivalente en función tanto del grado de diseminación como del riesgo de recidiva. Se espera que esta primera criba resulte en un nuevo listado de 100-150 genes.

En un segundo término, se llevará a cabo un estudio exhaustivo de este nuevo listado de genes mediante el software Ingenuity Pathway Analysis, a través del cual se filtran los datos de expresión diferencial de genes en función de su significación biológica, vías de señalización implicadas, interacciones funcionales entre genes, procesos biológicos alterados, etc. Este estudio generará una nueva lista reducida de genes (10 genes), que estarán relacionados directa o indirectamente con la afectación ganglionar y con un mayor riesgo de recidiva en CEE.

Objetivo 2.- Validación *in vitro* de los genes seleccionados en relación con el proceso de metástasis en cáncer de endometrio.

Una vez identificados, los genes candidatos en relación con el proceso de metástasis en CEE serán validados a través de la modulación de su expresión en líneas celulares. En primer lugar, evaluaremos el papel de cada uno de los genes en la promoción de metástasis mediante el silenciamiento de su expresión a través de RNA de interferencia (shRNA, short hairpin RNA), en la línea celular de cáncer de endometrio Hec1A, altamente metastásica. En paralelo, sobre-expresaremos los genes candidatos de manera estable en la línea celular de cáncer de endometrio Ishikawa, con baja capacidad metastásica.

El potencial metastásico de estas líneas celulares generadas a través de la modulación de la expresión de los genes seleccionados, se analizará mediante ensayos de invasión en cámaras de Boyden, en presencia o no de una matriz extracelular (matrigel). Se analizará

asimismo la capacidad de estas líneas celulares de formación y proliferación de colonias en gel. Por último, se caracterizarán los procesos de migración, adhesión, así como de transición epitelio-mesénquima (EMT) mediante videomicroscopía e inmunofluorescencia en las líneas celulares generadas. Los ensayos de migración en líneas celulares estables mediante captación de imágenes seriadas en un microscopio adaptado a condiciones de cultivo (CO₂, temperatura, humedad) y el sistema Live Cell Imaging CellR (Olympus), han sido puestos a punto por el grupo, en relación a la sobre-expresión del factor de transcripción ETV5 y su papel en la promoción de motilidad ²². En referencia a marcadores de EMT, indicativos de cambio hacia un fenotipo más invasivo, analizaremos mediante inmunofluorescencia la expresión, regulación y localización de E-Cadherin en referencia a la interacción célula-célula ²⁴, Vimentin, citokeratinas, y vías de señalización características de fenotipo epitelial y de fenotipo mesenquimal ²⁵. Asimismo, analizaremos la adhesión celular a través de la estructura de los contactos focales (FAK, Vinculin), y de su cinética mediante videomicroscopía de fluorescencia con la proteína de contactos focales LPP en fusión con la GFP ²⁶.

Objetivo 3.- Validación *in vivo* de los genes seleccionados en relación con el proceso de metástasis en cáncer de endometrio.

Caracterizado *in vitro* el papel de los genes seleccionados, generaremos tumores ortotópicos a partir de estas líneas celulares modificadas, y analizaremos la inhibición o la promoción de metástasis ganglionares (ver modelo animal en sección Antecedentes; Doll et al., en revisión). Para la validación *in vivo* se implementará un sistema de detección mediante bioluminiscencia con vectores de expresión estable de luciferasa en las líneas celulares generadas. La detección de las metástasis ganglionares o a distancia, tanto cualitativa como cuantitativa, se realizará mediante el sistema integrado de imagen IVIS Imaging Systems 200, con aplicación de imagen espectral por bioluminiscencia y scanner láser para topografía de superficie 3D, recientemente incorporado al estabulario. Transcurridas seis semanas, tiempo necesario para la progresión tumoral y desarrollo de metástasis ganglionares en el modelo animal desarrollado, los animales serán sacrificados. El tumor primario y los tejidos diana de las metástasis, identificados mediante bioluminiscencia, serán fijados y examinados histológicamente para estudiar modificaciones en el proceso de infiltración miometrial y vascular en el útero del ratón, y confirmar la promoción o inhibición de las metástasis ganglionares y a distancia.

En paralelo, se establecerán cultivos primarios de tumores de pacientes que se hayan presentado en el momento de la cirugía con afectación ganglionar (n=4) y de tumores no metastásicos (n=6). Asimismo, se desarrollarán modelos equivalentes en ratones inmunodeprimidos, mediante el implante ortotópico de tumores de pacientes con afectación ganglionar (n=2). En estos modelos se analizará la expresión de los genes seleccionados y

la capacidad de diseminación a ganglios mediante un ecógrafo adaptado para animal pequeño, ya que en este caso no es viable la detección mediante bioluminiscencia con vectores de expresión de luciferasa. Tanto en los cultivos primarios como en los modelos animales generados a partir de muestras de pacientes, la correlación entre los niveles de expresión y el potencial metastásico nos aportarán nuevas evidencias sobre el papel de los genes seleccionados en el desarrollo de metástasis. Al mismo tiempo, estaremos generando modelos *in vitro* e *in vivo* muy próximos a la clínica, adecuados para la evaluación de las terapias experimentales a desarrollar posteriormente.

Objetivo 4.- Selección de anticuerpos específicos frente a los genes caracterizados en relación al proceso de metástasis en CEE y evaluación *in vitro*.

Una vez validados como genes implicados en el proceso de metástasis en cáncer de endometrio, analizaremos su potencial como diana terapéutica con ayuda de bases de datos. En este sentido se evaluará su drogabilidad a partir de parámetros como especificidad de tejido y de tumor, localización subcelular, accesibilidad, etc. De este estudio prevemos seleccionar 5 candidatos para desarrollar terapias experimentales, basadas en anticuerpos monoclonales seleccionados a partir de librerías de anticuerpos humanizados. La selección se realizará mediante incubación de una librería de fagos que expresa fragmentos variables de anticuerpos frente a proteínas humanas, en las líneas celulares generadas que sobre-expresen los genes seleccionados. Mediante tres series de incubaciones sucesivas, alternando en cada serie la línea celular que sobre-expresa el gen seleccionado con la línea celular control que no lo sobre-exprese, se seleccionarán anticuerpos específicos frente a la proteína sobre-expresada.

El potencial terapéutico de los anticuerpos obtenidos será evaluado en las líneas celulares desarrolladas en los puntos anteriores. En primer lugar, valoraremos la especificidad y accesibilidad de los anticuerpos mediante western-blot y microscopía de fluorescencia en las líneas celulares modificadas para cada uno de los genes seleccionados. En segundo lugar, el efecto terapéutico de estos anticuerpos se analizará mediante ensayos de proliferación, de migración y de invasión con las líneas celulares generadas a partir de la sobre-expresión e inhibición de cada uno de los genes seleccionados. Técnicamente, estos ensayos habrán sido puestos a punto en el Objetivo 2 en las líneas celulares indicadas. Por último, también se evaluará el efecto terapéutico de cada uno de los anticuerpos en los cultivos celulares primarios desarrollados en el punto anterior, representativos del comportamiento tumoral observado en la clínica en relación al desarrollo de metástasis.

Objetivo 5.- Ensayos de terapia experimental de los anticuerpos validados, en los modelos animales de cáncer de endometrio.

Una vez evaluado el potencial terapéutico *in vitro*, estas terapias experimentales se analizarán en los modelos ortotópicos *in vivo*. Por un lado, se evaluarán en los modelos animales generados a partir de las líneas celulares que sobre-expresan los genes seleccionados y desarrollan metástasis ganglionares y/o a distancia. En este caso, el seguimiento del efecto terapéutico de cada anticuerpo, evaluado en sus líneas correspondientes, se realizará mediante el sistema integrado con aplicación de imagen espectral por bioluminiscencia y scanner láser para topografía de superficie 3D. Por otro lado, en los modelos generados a partir de tumores de pacientes, próximos a la clínica en relación al desarrollo de metástasis, analizaremos la inhibición del proceso de metástasis mediante ecografía adaptada a pequeños animales.

Se analizará tanto el efecto terapéutico sobre el tumor primario como en la inhibición del desarrollo de metástasis ganglionares y a distancia. Al igual que en el Objetivo 3, tanto el tumor primario como los tejidos diana de las metástasis serán fijados y examinados histológicamente para estudiar modificaciones en el proceso de infiltración miometrial y vascular en el útero del ratón, y evaluar la inhibición de las metástasis ganglionares y a distancia. Para cada anticuerpo, se harán en primer lugar ensayos de concentración y toxicidad, para en segundo término realizar los ensayos terapéuticos. Estos se llevarán a cabo en cada uno de los modelos desarrollados en los puntos anteriores: modelo Hec1a altamente metastásico; modelo Ishikawa metastásico debido a la sobre-expresión de cada gen en referencia a cada correspondiente anticuerpo; modelo 1 tumor humano metastásico; modelo 2 tumor humano metastásico.

Los ensayos durarán seis semanas y se realizarán en grupos de ocho animales por cada modelo y anticuerpo. A efectos prácticos, evaluaremos el potencial terapéutico de todos los anticuerpos en un determinado modelo para así poder referir los resultados a un único grupo control. Esto resultará en cuatro series de tratamiento de seis semanas en cada uno de los cuatro modelos, con un total de 48 animales por serie (8 animales por cada uno de los cinco anticuerpos más 8 animales del grupo control). Emplearemos ratones hembra inmunodeprimidos (Swiss nu/nu), de 6-8 semanas y mínimo 30 gramos de peso, bajo condiciones de mantenimiento y manipulación adecuadas según la legislación catalana, española y europea sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, y las recomendaciones del Comité Ético de Experimentación Animal de la institución. Los animales serán randomizados en los diferentes grupos de estudio y tratados tan pronto el diámetro medio de los tumores alcance los 5 mm. A partir de las medidas periódicas de los tumores, se calculará el volumen del tumor ($V=a \times b^2$, siendo a la anchura y b la longitud del tumor en milímetros), y el volumen tumoral relativo ($RTV=\frac{V_x}{V_i}$, donde V_x es el volumen medio tumoral (de los 8 ratones por grupo) en milímetros cúbicos en un determinado momento, y V_i es el volumen tumoral medio inicial en milímetros cúbicos al inicio del tratamiento), que permite comparaciones entre grupos independientemente de

diferencias iniciales de volumen. La respuesta terapéutica también se evaluará en función del retraso en el crecimiento tumoral, expresado como la diferencia en días entre el tiempo medio de los tumores tratados y los tumores control en alcanzar un volumen cinco veces mayor que el volumen al comienzo del tratamiento ²³. La inhibición del desarrollo de metástasis se cuantificará tanto en función del número de ganglios afectados y de micrometástasis a distancia como en función del tamaño de los implantes evaluados mediante bioluminiscencia y ecografía, dependiendo del modelo de análisis (ver Objetivo 3). La significancia estadística de las comparaciones entre grupos tratados y control se hará según el test de Mann-Whitney U no paramétrico, y se considerarán valores P significativos aquellos menores o iguales a 0.05.

Como eventuales limitaciones de la propuesta y soluciones previstas en caso de que surjan, cabe mencionar:

En primer lugar, la posibilidad de que los análisis de bases de datos generen un número bien insuficiente o bien excesivo de genes candidatos, será solventada mediante la revisión de los criterios de selección primando los criterios clínicos.

En segundo lugar, ante la posibilidad de que la baja eficiencia de transfección ya observada en la líneas celulares de cáncer de endometrio impida validar los genes seleccionados en relación al proceso de metástasis, hemos puesto a punto la técnica de transfección mediante infección con vectores lentivirales en colaboración con el grupo del Dr. Matias-Guiu, en Lleida. Esto nos permitirá incrementar la eficiencia de transfección y desarrollar las validaciones *in vitro* e *in vivo* con las líneas generadas.

En tercer lugar, la posibilidad de que los modelos animales generados a partir de muestras de pacientes sean poco representativos de la clínica en CEE, se solventará con el esfuerzo de implantar todos aquellos tumores que se operen en el Servicio de Ginecología Oncológica desde el inicio del proyecto, y así poder garantizar el desarrollo de los dos modelos próximos a la clínica planteados en el estudio.

En cuarto lugar, la posibilidad de que la técnica de detección por bioluminiscencia planteada para los ensayos de terapias experimentales no permita la suficiente sensibilidad, será solucionada con el empleo de la técnica de detección mediante ecografía en animales pequeños, ya validada. Por su parte, la falta de sensibilidad en la detección de metástasis será compensada mediante técnicas de análisis por PCR específica de células de origen humano e histología, una vez finalizadas las series de tratamientos (Doll et al., en revisión).

Por último, la posibilidad de que la eficacia de los anticuerpos seleccionados para los ensayos terapéuticos sea escasa, será solucionada mediante la obtención de varios anticuerpos para cada uno de los genes caracterizados en relación al proceso de metástasis en cáncer de endometrio.

6.2 Durada del procediment: temps entre la primera i la darrera utilització (o sacrifici) de cada animal. (No confondre amb la durada total de l'estudi o projecte, si es realitza de forma graonada.)

Cada uno de los ensayos terapéuticos durará seis semanas y se realizarán de manera secuencial a lo largo de ocho meses.

Freqüència, nombre de vegades que es preveu realitzar aquest procediment en un any: 1

6.3. Dejuni

No, en cap moment

Sí: omplir el quadre següent

Fase	Aliment	Aigua	Hora d'inici	Hora final	Durada (h)
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			

Observacions (per exemple: suplementacions...):

6.4. Administracions de productes (excepte anestèsics, analgèsics)

No, en cap moment

Sí: omplir el quadre següent

Producte*	Via	Volum Expressat en mL/kg	Dosi Expressada en mg/kg	Concentració Expressada en mg/mL
Anticuerpos monoclonales	peritoneal	a determinar	a determinar	a determinar

* Utilitzar el nom genèric, no el comercial

Exemples: carragenina, en el test d'edema subplantar; STZ, per a la inducció de diabetis...

6.5. Extraccions de sang

No, en cap moment

Sí: omplir el quadre següent

Via d'extracció	Volum de cada extracció Expressat en mL	Freqüència d'extracció

<http://www.secal.es/word-pdf/sangre.pdf>

7. Patiment, dolor i angoixa dels animals

7.1. Descriure en quines fases del procediment es preveu que l'animal pot experimentar patiment, dolor o angoixa:

Tras la operación de implantación de las células tumorales. No se prevé sufrimiento tras la inyección de las drogas en los ensayos farmacológicos ni el desarrollo de efectos secundarios (en caso de agentes terapéuticos no ensayados con anterioridad se realizarán ensayos de toxicidad). Asimismo, se llevará a cabo un seguimiento continuo del animal para evitar cualquier tipo de sufrimiento asociado al proceso tumoral que desarrollará.

7.2. Descriure detalladament el protocol de supervisió que s'utilitzarà per a detectar les situacions anteriors, indicant:

Nota: pot obviar-se aquest punt si s'adjunta el document on s'estableix i detalla el protocol de supervisió, correcció i criteris de punt final que està previst aplicar, d'acord amb els següents apartats. ANNEX 1

Què es controlarà: descenso del 10% en el peso del animal

A partir de quin moment: desde el transplante ortotópico

Durant quant de temps: hasta el sacrificio

Amb quina freqüència es controlarà: 2 veces semanales

Quines persones faran el control: personal investigador
 personal experimentador
 personal per atendre els animals

El protocolo de cirugía y seguimiento de estos modelos animales descrito en esta propuesta ha sido puesto a punto, como se describe en la publicación Doll et al., adjunta. La supervisión realizada permite decir que los ensayos planeados no implicarán ningún tipo de afección a los animales. De todas maneras, el seguimiento del desarrollo tumoral y de metástasis, así como el efecto de las terapias a ensayar, realizado mediante técnicas de imagen, permitirá una supervisión promenorizada del animal en el curso de los ensayos.

7.3. Mesures correctores que s'han previst (excepte anestèsia i analgèsia)

En caso de sufrimiento debido al proceso tumoral, el animal será sacrificado. En caso de sufrimiento debido a ensayos farmacológicos, se parará inmediatamente el tratamiento.

7.4. Criteris de punt final

En principio, el ensayo tanto de caracterización del proceso metastásico como los ensayos preclínicos se seguirán in vivo gracias a la tecnología disponible en el estabulario (ver apartado Diseño y Metodología), que permitirá seguir el crecimiento tumoral y la aparición de metástasis por microscopía de fluorescencia. Asimismo, se plantea el sacrificio del animal a las seis semanas de haberle implantado o inyectado las células tumorales, para el análisis y caracterización del tumor primario y la validación del proceso de metástasis. Otros puntos finales serán la pérdida de peso o el fin de tratamiento.

http://www.ccac.ca/english/gui_pol/gdlines/endpts/APPOPEN.HTM

<http://www.lal.org.uk/endpoints2.html>

8. Anestèsia i analgèsia

8.1. Anestèsia

Està previst aplicar anestèsia en alguna fase del procediment?

- No, en cap moment, donat que el procediment no ho requereix
- No, en cap moment, donat que és incompatible amb el procediment
- Sí: omplir el quadre següent

Fase	Producte*	Via	Dosi Expressada en mg/kg	Concentració Expressada en mg/mL	Control de la profunditat anestèsica
implante ortotòpic	isofluorano	inhalación		2%	pinzamiento interdigital
seguimiento	Isofluorano	Inhalación		2%	pinzamiento interdigital

* Utilitzar el nom genèric, no el comercial

http://research.uiowa.edu/animal/?get=aa_regimens

8.2. Analgèsia

Està previst aplicar analgèsia en alguna fase del procediment?

- No, en cap moment, donat que el procediment no ho requereix
- No, en cap moment, donat que és incompatible amb el procediment
- Sí: omplir el quadre següent

Fase	Producte*	Via	Dosi Expressada en mg/kg	Concentració Expressada en mg/mL	Freqüència	Durada del tractament
Durante y postquirúrgica	Meloxicam 0,03mg/30gr	sc	1 mg/kg	0'5 mg /ml	24 horas	2 dias

* Utilitzar el nom genèric, no el comercial

http://research.uiowa.edu/animal/?get=aa_regimens

9. Finalització del procediment

9.1. En finalitzar el procediment, està previst:

- Mantenir els animals vius: especificar els motius:
- Sacrificar els animals: especificar els motius: Los animales serán sacrificados para el análisis de crecimiento tumoral y del desarrollo de metástasis.

9.2. Tècnica eutanàsica en finalitzar el procediment:

Mètodes físics

Mètode: dislocació cervical

Puntuació*: 4

* Si el mètode proposat no té una puntuació de 4 o 5, d'acord amb les taules de l'article: Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación: parte 2. (1997)

Laboratory Animals **31(1)**:1-32, cal justificar l'estricta necessitat d'utilitzar la tècnica proposada:

<http://www.secal.es/word-pdf/eutanasia1.pdf>

<http://www.secal.es/word-pdf/eutanasia2.pdf>

Mètodes químics

Omplir els apartats aplicables del quadre següent:

IX. ANEXOS**ANEXO 1: AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL**

Producte*	Via	Dosi Expressada en mg/kg	Concentració Expressada en mg/mL	Temps	Puntuació**

* Utilitzar el nom genèric, no el comercial

** Si el mètode proposat no té una puntuació de 4 o 5, d'acord amb les taules de l'article: Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación: parte 2. (1997) Laboratory Animals **31(1)**:1-32, cal justificar l'estricta necessitat d'utilitzar la tècnica proposada:

9.3. Tècnica eutanàsica per a sacrificar els animals descartats del procediment en base a criteris de punt final (si és diferent de l'anterior)

Mètodes físics

Mètode:

Puntuació*:

* Si el mètode proposat no té una puntuació de 4 o 5, d'acord amb les taules de l'article: Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación: parte 2. (1997) Laboratory Animals **31(1)**:1-32, cal justificar l'estricta necessitat d'utilitzar la tècnica proposada:

Mètodes químics

Omplir els apartats aplicables del quadre següent:

Producte*	Via	Dosi Expressada en mg/kg	Concentració Expressada en mg/mL	Temps	Puntuació**

Utilitzar el nom genèric, no el comercial

** Si el mètode proposat no té una puntuació de 4 o 5, d'acord amb les taules de l'article: Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación: parte 2. (1997)

Laboratory Animals **31(1)**:1-32, cal justificar l'estricta necessitat d'utilitzar la tècnica proposada:

10. Consideracions sobre mètodes alternatius

Descriure el treball realitzat per tal de garantir l'aplicació de les 3Rs a aquest procediment

Consulta amb experts en aquest tipus de procediment

Recerques bibliogràfiques

Recerques en bases de dades

Conclusions de la recerca i mesures adoptades:

Possibles webs d'interès:

http://www.nal.usda.gov/general_info/agricola/agricola.html

<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

<http://www.nal.usda.gov/awic/>

<http://www.nal.usda.gov/awic/alternatives/tips.htm>

<http://oslovet.veths.no/databasesintro.html>

<http://www.frame.org.uk/Guide/index.htm>

<http://altweb.jhsph.edu>

http://www.vetmed.ucdavis.edu/Animal_Alternatives/main.htm

11.- PERSONAL INVESTIGADOR / EXPERIMENTADOR IMPLICATS EN EL PROCEDIMENT

NOM / COGMONS	TITULACIÓ / FORMACIÓ	CERTIFICAT investigador / experimentador
Miguel Abal	Dr. en Farmàcia	I
Marta Llauradó	Llicenciada en Biologia	I
Silvia Cabrera	Licenciada en Medicina	I

I investigador

E experimentador

INVESTIGADOR RESPONSABLE O CAP DE LA UNITAT DE RECERCA

IX. ANEXOS

ANEXO 1: AUTORIZACIÓ DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓ ANIMAL

Els firmants d'aquesta memòria coneixen la normativa legal vigent que regula l'utilització d'animals per a experimentació

NOM / COGNOM: Miguel Abal Posada
SERVEI: Unitat de Recerca Biomèdica
DATA: 17 abril 2008
SIGNATURA:

12.- ANNEXOS

ANNEX 1: Proposta de protocol de supervisió per rossegadors

El protocol de supervisió es modifica segons els paràmetres específics del model i la espècie d'animal utilitzada, així avaluar i puntuar més acuradament el seu estat.

Pes (de 0 a 3)	Normal (no hi ha pèrdua de pes o l'animal creix normalment)		0	2 cops setmana
	Pèrdua de pes inferior al 10%		1	
	Pèrdua de pes entre 10 i 20%. Possible alteració en l'aspecte o quantitat de la femta.		2	
	Pèrdua de pes superior al 20%. L'animal no consumeix aigua ni aliment		3	
Observació de l'animal	Aspecte	Normal	0	Diària
		Pelatge en mal estat	1	
		Pelatge en mal estat i/o presència de secrecions oculars o nasals.	2	
		Postura anormal.	3	
	Automutilacions o vocalitzacions estranyes indicatives de dolor (0 ó 3)		SI 3 NO 0	
Conducta en resposta a estímuls	Molt agressiu o comatós? (0 ó 3)		SI 3 NO 0	Diària

Además de los criterios anteriores, el seguimiento mediante imagen del desarrollo tumoral y de las metástasis representará un criterio fundamental a la hora de supervisar a los animales

del ensayo. Debido a la localización ortotópica del implante, en la parte exterior del útero, sin alterar funciones u órganos que reflejaran el desarrollo tumoral mediante pérdida de peso o en el aspecto o conducta del animal, el seguimiento por imagen del volumen tumoral y del implante de metástasis será evaluado en la supervisión de los ensayos, deteniéndose en el momento que comprometan éticamente los modelos.

NOTA: quan un animal obté una puntuació de 3 en més de un paràmetre, tots els 3 passen a 4

Mesures correctores segons puntuació:

De 0-4	Normal
De 5-8	Supervisar acuradament (analgèsics?)
De 9-12	Patiment intens. Analgèsics (eutanàsia?)
De 13-16	Eutanasia (suprimir el procediment?)

ANEXO 2

Hoja de Consentimiento Informado para el almacenamiento y utilización del material sobrante de biopsias de proceso asistencial para Investigación Biomédica

Después de haber completado el proceso diagnóstico asistencial de las biopsias, las muestras sobrantes son útiles para Investigación Biomédica, sin que este hecho le cause molestias adicionales. De acuerdo con la normas bioéticas y la legislación vigente (Ley 14/2007 de Investigación biomédica y Ley Orgánica 15/1999 de Protección de datos personales), **solicitamos su consentimiento** para almacenar y disponer del material biológico tisular sobrante de la intervención quirúrgica que como parte del proceso asistencial le van a realizar en el Hospital Vall d'Hebron.

Las investigaciones irán dirigidas al estudio de las bases moleculares de las enfermedades oncológicas y hematológicas con la finalidad de contribuir a la mejora de su conocimiento, diagnóstico, prevención y /o tratamiento de estas enfermedades.

Este material biológico tisular sobrante pasará a formar parte del **Banco de Tumores (BT)** del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron. Este banco está autorizado por el Departament de Salut de la Generalitat y almacena colecciones organizadas de muestras tisulares en las condiciones y garantías de calidad y seguridad, de acuerdo con la legislación vigente. La investigación biomédica se realizará en las instalaciones debidamente acondicionadas bajo supervisión científica de nuestro Hospital Vall d'Hebron e Institut de Recerca Vall d'Hebron, así como aquellas otras instituciones colaboradoras o que lo soliciten oficialmente al BT. Cualquier estudio de investigación para el que se solicite la utilización de estas muestras deberá disponer de la aprobación del **Comité de Ética (CEI) del Hospital Vall d'Hebron**. Este Comité vela para que los investigadores desarrollen sus estudios siguiendo siempre las más estrictas normas éticas y legales. La identificación de las muestras biológicas en el BT será codificada. Los datos personales que se recojan serán siempre confidenciales y procesados de acuerdo con la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal. La cesión de muestras tisulares excedentes que usted realiza al Biobanco del Hospital Vall d'Hebron es gratuita y altruista, por ello no obtendrá retribución económica alguna ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales resultado de las investigaciones.

IX. ANEXOS

ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PACIENTE

En el caso de que usted lo solicite , se le podrá facilitar información acerca de los estudios de investigación en los que hayan utilizado sus muestras. Si se obtuviera información relevante que pudiera afectar a su salud o a la de su familia el **Comité de Ética e Investigación del Hospital Vall d'Hebron** habilitará los medios para contactar con usted y ofrecerle la posibilidad de conocer dicha información y transmitirla a sus familiares . En caso contrario se le respetará el derecho a que no se le comuniquen los resultados de la investigación en los que hayan sido utilizadas sus muestras. Usted podrá por tanto ejercer el derecho de acceso a sus muestras, rectificación y cancelación así como el de obtener información de los resultados de los estudios genéticos con sus muestras, con las posibles implicaciones legales que de este conocimiento se deriven.

Usted podrá obtener información sobre el uso de sus muestras, así como de revocar este consentimiento en cualquier momento y sin necesidad de expresar motivo alguno, incluyendo la posibilidad de destruir o anonimizar sus muestras, contactando con el responsable del Banco de Tumores (Servicio de Anatomía Patológica del Hospital vall d'Hebron :Tf. 932746809).

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y otorga su consentimiento para guardar muestras sobrantes en el BT en los términos antes explicados, por favor firme a continuación este **consentimiento informado en sentido afirmativo**:

El que suscribe, una vez leída y comprendida la información adjunta, en relación con el consentimiento informado para la utilización del material biológico sobrante para investigación biomédica, y tras haberlo comentado con el profesional sanitario responsable, autoriza al Hospital Vall d'Hebron y al Banco de Tumores a almacenar y utilizar científicamente el material biológico sobrante de las biopsias que se le han realizado, con la finalidad de llevar a cabo los proyectos de investigación biomédica definidos en este documento, siempre que éstos cuenten con la aprobación preceptiva del Comité de Ética de la Investigación del Hospital Vall d'Hebron.

Autorizo el almacenamiento del material biológico sobrante para investigación biomédica **SI NO**
Autorizo recibir la información relevante derivada de la investigación **SI NO**
Autorizo a ser contactado en el caso de necesitar mas información **SI NO**

Barcelona, a....., de.....de 20.....

Firma del paciente:

Firma del profesional autorizado:

Sr./Sra.....

Sr./Sra.....

DNI num:.....

DNI núm:.....

Muchas gracias por su colaboración.

Hospital Universitario Vall d'Hebron e Institut de Recerca Vall d'Hebron de Barcelona.

ANEXO 3

Artículo

“Generation and characterization of orthotopic murine models for endometrial cancer”

Cabrera S, Llauradó M, Castellví J, Fernandez Y, Alameda F, Colás E, Ruiz A, Doll A, Schwartz S Jr, Carreras R, Xercavins J, Abal M, Gil-Moreno A, Reventós J.

Clinical and Experimental Metastasis. 2012 Mar; 29(3): 217-27.

Generation and characterization of orthotopic murine models for endometrial cancer

Silvia Cabrera · Marta Llauradó · Josep Castellví · Yolanda Fernandez · Francesc Alameda · Eva Colás · Anna Ruiz · Andreas Doll · Simó Schwartz Jr. · Ramon Carreras · Jordi Xercavins · Miguel Abal · Antonio Gil-Moreno · Jaume Reventós

Received: 26 April 2011 / Accepted: 7 December 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract We describe the generation of two orthotopic murine models for endometrial cancer (EC). The first model is generated from endometrial Hec-1A cancer cells transfected with luciferase and injected directly into the uterus of female mice. This model allows a follow-up with bioluminescence imaging (BLI) along the experiment and generates abdominal dissemination and lymphatic and hematogenous metastases in high percentages, also detectable with BLI. The dissemination pattern of this model imitates the advanced stages of EC in patients, and its molecular profile corresponds to aggressive type 2 EC (p53 positive, hormone receptors negative, high percentage of Ki67 positive cells). The second model is derived from endometrioid human tissue collected from surgical pieces. By injecting this tissue inside the uterine cavity of a mouse we obtain orthotopic growth with pelvic dissemination and

lymph node metastasis. The molecular pattern observed in human type 1 endometrioid EC (p53 negative, low Ki67 index, presence of hormone receptors) is conserved after the murine growth in orthotopic tumor and metastases. This model supposes a singular pre-clinical tool to study therapeutic agents, though it mimics clinical and molecular behavior of endometrioid EC, which is the most common histology in the patient.

Keywords Endometrial cancer · Animal model · Orthotopic model · Bioluminescence · Murine model

Abbreviations

EC	Endometrial cancer
BLI	Bioluminescence imaging
Hec1A	Human endometrial carcinoma 1A
Fluc	Firefly luciferase
Hec1A-Fluc	Hec1A cells transfected with luciferase gene
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
i.p	Intraperitoneal
ROI	Region of interest

Silvia Cabrera, Marta Llauradó, Antonio Gil-Moreno and Jaume Reventós have contributed equally to this study.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10585-011-9444-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Cabrera (✉) · J. Xercavins · A. Gil-Moreno
Unit of Gynecologic Oncology, Department of Gynecology,
Hospital Vall d'Hebron, Passeig de la Vall d'Hebron 119,
08035 Barcelona, Spain
e-mail: silviacabreradiatz@hotmail.com; scabrera@vhebron.net

M. Llauradó · E. Colás · A. Ruiz · A. Doll · J. Reventós
Biomedical Research Unit, Vall d'Hebron Research Institute,
Passeig de la Vall d'Hebron 119, 08035 Barcelona, Spain
e-mail: jreventos@ir.vhebron.net

J. Castellví
Department of Pathology, Hospital Vall d'Hebron,
Barcelona, Spain

Y. Fernandez · S. Schwartz Jr.
CIBBIM-Nanomedicine, Hospital Vall d'Hebron,
Barcelona, Spain

F. Alameda
Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

R. Carreras
Department of Gynecology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

M. Abal
Translational Oncology Laboratory, Instituto de Investigación
Sanitaria de Santiago, Complejo Hospitalario Universitario
Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

ph/s	Photons/second
H&E	Hematoxylin and eosin
IHC	Immunohistochemical
ER	Estrogen receptor
PR	Progesterone receptor
MSH6	MutS homolog 6 gene
MSH2	MutS homolog 2 gene
MLH1	MutL homolog 1 gene
SEM	Standard errors of the mean
3D	Three-dimensional

Introduction

The crude incidence of endometrial carcinoma (EC) in the European Union is 16 cases/100,000 women per year (age range 13–24). The mortality rate is 4–5 cases/100,000 women per year [1]. Age-standardized incidence rates continue to rise in most developed countries. Therefore, interest has been expressed in seeking new therapeutic agents, which either alone or in combination would allow improvement in the progression to disease free and overall survival of women with this disease [2, 3]. Type 1 EC represents a majority of the sporadic cases of EC, accounting for 70–80% of all new cases. These cancers are typically of endometrioid histology, and they are primarily associated with unopposed estrogen exposure. Type 1 endometrioid lesions arise in a background of hyperplasia and commonly express estrogen and progesterone receptors. Clinically, type 1 EC most often includes low-grade tumors with a favorable prognosis. In contrast, type 2 EC is less common, accounting for 10–20% of EC cases. These are often of a non-endometrioid, high-grade histology, usually papillary serous or clear cell. Type 2 EC is unrelated to estrogen exposure and typically arises in a background of atrophic endometrium. These cases are marked by a more aggressive clinical course with early spreading and poor prognoses [4]. Aside from their morphological and clinical features, type 1 and type 2 ECs are further distinguished by molecular alterations. Endometrioid and non-endometrioid ECs are associated with mutations of independent sets of genes [5, 6]. Endometrioid EC involves mutations in PTEN, K-ras, and β -catenin, as well as defects in DNA mismatch repair. Non-endometrioid EC frequently shows aneuploidy and p53 mutations [7, 8].

Notwithstanding the good prognosis of EC, myometrial infiltration and, particularly, distant metastases are its most devastating aspects. Approximately 25% of the patients who have undergone surgical staging are found to have extra-uterine disease [9]. EC spreads primarily to the pelvic and para-aortic lymph nodes, as well as to the adnexa and pelvic viscera. Distant metastases via the hematogenous route have a low incidence. Even so, pulmonary metastases

have been reported to be one of the most common types of distant metastasis stemming from EC, and its incidence ranges from 2.3 to 4.6% [10, 11]. In EC, the precise molecular events that occur during the development, progression, invasion and metastasis generation are uncharacterized. To better understand the EC molecular mechanisms and to improve clinical treatment, the use of clinically relevant mouse models, which fulfill tumor progression, invasion and metastases, is an essential requirement. Our group has been working on the development of subcutaneous and orthotopic murine models in EC [12], and the main limitation we have encountered has been the difficulty in performing an in vivo follow-up on the models. Therefore, we have focused on the implementation of new tools, in order to resolve this handicap, especially through the use of bioluminescence imaging (BLI), a new technique that monitors and quantifies tumor growth, progression and metastases development, as well as response to therapy in a non-invasive manner [13, 14].

The objective of the present study is to present our results in the generation of two new orthotopic mouse models for EC, which are reproducible and imitate the infiltrative process and metastatic behavior of EC. By their development, we are able to provide an advanced tool for future studies dealing with tumoral physiopathology and the development of anti-cancer therapies.

Materials and methods

Cell line constructs and stable cell line generation

Human endometrial carcinoma 1A (Hec1A) cell line was cultured as described in Doll et al. [12]. Plasmid construction consisted of the full-length luciferase gene (firefly luciferase cDNA), which was inserted at the *HindIII/XbaI* position of the pcDNA3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). The correct orientation and the reading frame were confirmed by sequencing. Then, Hec1A cells were transfected with the newly constructed plasmid pcDNA3.1-firefly luciferase (Fluc) using Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). Hec1A-Fluc stably expressing cells were selected with 350 μ g/ml hygromycin B (Invitrogen). To validate the bioluminescent light production of the clones, we tested them by in vitro BLI assay using IVIS® Spectrum (Caliper Life Sciences, MA).

Cell proliferation assay

Cell proliferation assays were performed using the CellTiter 96® AQueous One Solution (MTS) (Promega, Biotech Ibérica, Madrid, Spain), which is a colorimetric method for determining the number of viable cells in proliferation. 5×10^3 cells (for the non transfected Hec-1A cell line and

clones 4, 5, 8 and 9 of the transfected Hec-1A-Fluc cells) were plated in triplicate on p96 plates in complete medium (10% FBS) and incubated 48 h. Measurements were made according to the manufacturer's protocol.

Transwell invasion assay

Cell invasion assays were performed using the Cyto-Select™ 24-Well Cell Invasion Assay kit, Fluorimetric Format (CBA-101-C; Cell Biolabs, Inc, San Diego, CA, USA). 0.5×10^6 cells (for the non transfected Hec-1A cell line and clones 4, 5, 8 and 9 of the transfected Hec-1A-Fluc cells) were plated without serum media in triplicate and were allowed to invade towards supplemented media during 48 h. Cells were quantified according to the manufacturer's protocol.

Endometrial tumor samples

Two tumor samples were obtained from surgical pieces collected from EC staging surgeries performed in the Gynecologic Oncology Unit of the Hospital Vall d'Hebron. Patients gave their informed consent before the surgical procedures. The fresh uterine tissue was evaluated by a pathologist, who indicated the best zone from which to extract a viable tumoral piece. The two selected endometrial tumor samples corresponded to endometrioid EC with histologic grade 2, in surgical stage IA for patient A and II for patient B by 2009 International Federation of Gynecology and Obstetrics classification (FIGO).

Animals

Six-week old female athymic nude mice (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA) were used in this model. The animals were housed in individually ventilated cage units and were maintained under pathogen-free conditions. Food and water were provided ad libitum. Specific pathogen-free conditions were respected during the surgery and the follow-up for the animals. The animals were sacrificed for necropsy by cervical dislocation after sedation. All the procedures regarding experimentation and animal care were performed according to the guidelines of the Spanish Council for Animal Care and the protocols of the Ethics Committee for Animal Experimentation of our Institution.

Orthotopic EC models

We generated two different orthotopic EC models by using the two types of samples described above (the Hec1A-Fluc cell line and the human endometrioid cancer tissue) and by

testing two inoculation techniques (transmyometrial and transvaginal). Mice were anesthetized with 2% isoflurane (ABBOT Laboratories, Madrid, Spain), and the lower abdomen was swabbed with 70% alcohol. A longitudinal incision (medial laparotomy) was performed and the murine uterus was exposed. EC cells or tissue were indistinctly inoculated into the uterine body and the uterine horns. Since implantation inside the endometrial cavity was the main objective in the generation of this model, both transvaginal and transmyometrial inoculation techniques were studied.

Orthotopic endometrial tumor model derived from cell line

For transmyometrial inoculation, 1×10^6 of Hec1A-Fluc cells resuspended in 50 μ l of Matrigel (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Biosciences, San Jose, CA) were injected directly into the endometrial cavity through the myometrium. A 27G insulin syringe (Myjector® 1 ml, Terumo, Somerset, NJ) was used for the injection. The strain on the endometrial cavity and the expulsion of a small quantity of fluid through the vagina ensured the correct localization of the injection.

For transvaginal inoculation, 1×10^6 of Hec1A-Fluc cells in 50 μ l of Matrigel were introduced transvaginally by means of an Abbocath®24G (ABBOCATH®-T, Venisystems™, Hospira Inc, Lake Forest, IL). Laparotomy and exposure of the uterus were performed, in order to control the intrauterine localization of the tip of the catheter. The strain on the endometrial cavity ensured the intrauterine inoculation of the cell suspension.

Orthotopic endometrial tumor model derived from human tissue samples

A tissue sample of 1 mm³ was collected from the surgical piece and immediately implanted into the sub-scapular region of a previously anesthetized mouse, in order to generate a subcutaneous model to check the viability of the tissue and to amplify the tumoral volume. To achieve our orthotopic models, we needed a tumor volume of about 1–1.5 cm³ per mouse. This tumoral piece was mechanically crumbled and injected transvaginally or transmyometrially following the previously described procedure. Since the implants in this model were not completely liquid, the needles employed to inoculate the mice had to be thicker. A 23G syringe (BD Microlance™ 3, 23G \times 1''-Nr. 16) was used to generate the transmyometrial model, and an intravenous Catheter 18G Biovalve (Vycon, Ref. 106.12, 1.2 mm diameter, Ecoen, France) was used to generate the transvaginal one.

BLI of the cell line derived model

In vivo BLI

D-Luciferin substrate (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain) at 150 mg/kg was injected intraperitoneally (i.p.) two minutes before animal sedation. Mice were placed inside the imaging chamber, and images were taken every 2 min, up to 20 min, to determine the D-luciferin kinetics of our model, which would define the suitable time it would take to get the images and compare the results over time. We imaged our model at an 8–13 min range after D-luciferin injection. Image acquisition conditions were modified during the experiment as needed. The first control of the Hec1A-Fluc orthotopic model was carried out 2–5 days after the surgical implantation of the transfected cells. This was done to ensure that there had been no spillage of tumoral cells during the intrauterine injection, which may have caused abdominal implants not to have adequate orthotopic infiltration, and also to check for the presence of pelvic signals. Subsequently, imaging was performed weekly up to six weeks to evaluate the orthotopic tumor growth and metastatic dissemination. The brightest abdominal signals were shielded, in order to detect and quantify weaker signals in the thoracic region. The light emitted from the bioluminescent cells was detected *in vivo* by the IVIS[®] Spectrum, digitalized and electronically displayed as a pseudo color overlay onto a gray scale animal image. Regions of interest (ROIs) from displayed images were drawn automatically around the primary tumor and metastatic bioluminescent signals and quantified as calibrated units photons/second (ph/s). The auto ROIs were drawn along time using the same ROI parameters (threshold = 20%, lower limit = 1.0 and minimum size = 20).

Ex vivo BLI

At day 47, 10 min before necropsy, all of the mice were i.p. injected with a D-luciferin substrate. During necropsy, a macroscopic evaluation was performed. Organs were obtained in the following order: brain, axillary lymph nodes, lungs, mediastinal and inguinal lymph nodes, peritoneum, uterus-adnexa and pelvic fat, para-aortic and mesenteric lymph nodes, pancreas, spleen, kidneys, liver, and diaphragm. Each organ was collected and immersed in a D-Luciferin 300 µg/ml PBS and maintained in cold conditions until *ex vivo* BLI was performed using the IVIS[®] Spectrum. Immediately after, the tissues were cleaned with PBS (1×) and introduced into a 3.7–4% formaldehyde solution, in order to fix them and perform the histological analysis.

Histological examination

All tissues were formalin-fixed and processed for routine histological examination. Hematoxylin–Eosin (H&E) staining was performed on 24 h formalin-fixed paraffin-embedded 4 µm sections using routine histological procedures. Histological examination was carried out by an experienced pathologist.

Immunohistochemical (IHC) analysis

Formalin-embedded sections from primary and metastatic tumor tissue were mounted on glass slides, fixed in acetone and air-dried. The following antibodies were used for tissue staining: Estrogen Receptor (1D5, Dako, Glostrup, Denmark) 1:50; Progesterone Receptor (Pgr636, Dako), 1:200; Ki-67 (MIB-1, Dako), 1:100; E-cadherin (NCH-38, Dako), 1:50; β -catenin (β -Catenin-1, Dako), 1:100; p53 (DO7, NovoCastra Lab., NewCastle, UK), 1:50; MSH6 (MSH6 44, BD Transduction, Franklin Lakes, NJ), 1:40; MSH2 (G219-1129, BD Transduction), 1:400; MLH1 (G168-15, BD Transduction) 1:40. Staining was performed as described in the customer instruction manual. All stainings were semi-automated and performed on an Autostainer Link 48 (Dako) using the flex Dako detection system, as recommended by the manufacturer. The deparaffinized tissue sections were treated with heat prior to the IHC staining procedure for epitope retrieval, using a PTLINK Dako System by immersion of tissue sections in citrate buffer pH 6.0 (ER, Ki67, β -catenin) or pH 9.0 (the other antibodies) in an autoclave at 95°C for 20 min. IHC analysis was performed by an experienced pathologist. The percentage of tumor cells expressing each molecular marker was assessed.

Statistical analyses

The mean BLI intensity, mean tumor volume, and corresponding standard errors of the mean (SEM) were determined for each experiment. Nonlinear regression plots were used to describe the relationship between BLI intensity and time after cell injection; R^2 values were reported to assess the quality of the nonlinear regression model. All of the analyses and graphs were completed using GraphPad Prism 5 software.

Results

In vitro analysis of the Hec-1A-Fluc clones

To obtain Hec-1A light-producing cells for the generation of the orthotopic Hec-1A EC mouse model, stable transfection

of the full-length luciferase gene (Fluc) into the Hec-1A cells was performed. Stable transfected Hec-1A-Fluc cells were established, and single clones were isolated and maintained in cell culture. Prior to the selection of the final clone, the morphology of the different clones were checked, however, we did not observe any difference. Moreover, to examine the behavior between the different Hec-1A-Fluc clones in vitro experiments of proliferation and invasion were performed. The results showed that both morphology and behavior of the different single clones and the non transfected cell line were similar (Supplementary Fig. S1). Hence, we believe that independent clones might perform in a similar manner when used in in vivo experiments. The production of light for each clone was assessed by in vitro BLI assay using IVIS[®] Spectrum (Caliper Life Sciences). The efficiency of light emission for each clone was linear, being proportional to the number of cells plated. Finally, the Hec1A-Fluc clone five with the highest light emission was selected for the in vivo experiments.

Efficiency of inoculation techniques in the generation of murine models

Two different approaches to inoculate Hec1A-Fluc EC cells into mouse uteri were compared, transvaginal and transmyometrial ($n = 8$ per group). In the transmyometrial group, six mice (75%) developed orthotopic tumors and all of them presented metastatic spread in the pelvic cavity, as well as lymph node metastasis. Hematogenous metastases in the lung were observed in four mice. In the transvaginal group, only one mouse (12.5%) developed an orthotopic tumor and pelvic and lymph node metastases (Table 1). From these results we concluded that the transmyometrial inoculation procedure is more efficient than the transvaginal method in generating orthotopic endometrial tumors and metastases.

Table 1 Comparative results of transmyometrial and transvaginal inoculation techniques in Hec1A cell line derived model

	Inoculation technique	
	Transmyometrial	Transvaginal
Mice used, n	8	8
Mice with endometrial tumor, n	6	1
Tumor incidence, %	75%	13%
Metastasis incidence, %		
Pelvic implants	6/6 (100%)	1/1 (100%)
Lymph node metastasis	6/6 (100%)	1/1 (100%)
Abdominal implants	5/6 (83%)	0/1 (0%)
Lung metastasis	4/6 (66%)	0/1 (0%)

Orthotopic cancer development and metastasis generation in Hec1A-Fluc murine models

Seventeen nude mice were inoculated with Hec1A-Fluc cells using the transmyometrial technique. In the first in vivo BLI performed at day 5, 16 of the mice presented orthotopic pelvic signals, and no abdominal cell spread was observed. During the follow-up, two mice were discarded: one because it had not developed any orthotopic signals 19 days after inoculation, and the other because of renal failure at day 18. In the necropsy and histological study of this last mouse, we observed that it presented an endometrial tumor, though no metastasis was detected.

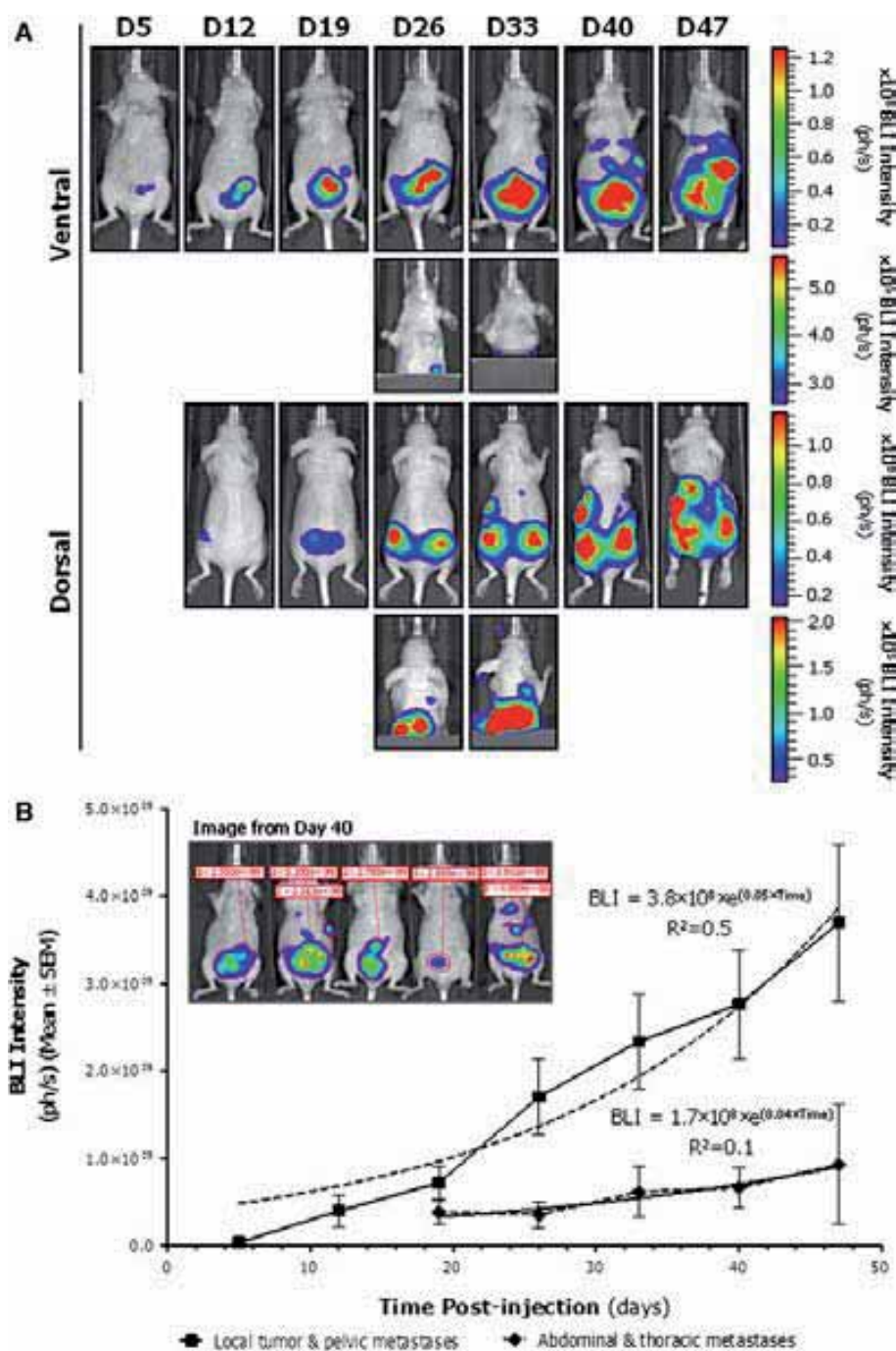
Thus, 15 mice were successfully monitored during the whole experiment. In vivo BLI images of orthotopic tumor growth and metastatic lesions of a representative mouse over time are shown in Fig. 1a. BLI signals were quantified over time (Fig. 1b). An exponential increase of orthotopic BLI signals that correspond to endometrial tumor growth and pelvic metastases was observed over time. At the end of the experiment (day 47), mice were euthanized and ex vivo BLI analysis was performed. The organs were subsequently fixed and H&E stained (Fig. 2).

Sixteen of the 17 mice (94%) generated endometrial tumors. 87% of the mice presented pelvic implants in the pelvic peritoneum, bladder or prevesical fat. Lymphatic dissemination was observed in 93.3% of the animals. Para-aortic lumbar lymph nodes were affected in 100% of these mice, which means that this was the first nodal station for the uterine tumors in these mice. Other affected lymph nodes were: para-aortic renal (86%), mediastinal (36%), mesenteric (29%), inguinal (14%) and axillary (7%). Abdominal implants were detected in 80% of the mice affecting the pancreas, liver, spleen, kidneys, diaphragm and abdominal peritoneum. Hematogenous metastases in the lungs were detected in 73% of the animals, but no intra-hepatic metastases were observed in our series. Table 2 summarizes the orthotopic endometrial primary tumors and the metastases generated.

Orthotopic cancer development and loco-regional dissemination in endometrioid murine models

We inoculated 10 mice transmyometrially with two human endometrioid tumoral samples (five animals per sample), which had been previously grown subcutaneously. As the follow-up was performed by abdominal palpation and weight control, mice were sacrificed when they presented pelvic masses or ascites. The mean time before necropsy was 62.7 days (range 58–66). Organs were fixed and H&E stained. Nine mice (90%) developed endometrial tumors, which maintained a histological pattern similar to the original endometrioid endometrial tumor. Myometrial

Fig. 1 In vivo BLI of the orthotopic Hec1A murine model. Hec1A-Fluc cells were directly injected into the endometrial cavity. Images were taken once a week for 7 weeks. **a** Selected ventral and dorsal view images from one representative mouse are shown. To check for metastases development into the upper part of the mouse, animals were imaged with the primary tumor shielded. Images from each corresponding view were set at the same pseudocolor scale to show relative BLI changes over time. **b** Primary tumors and locoregional metastasis growth rate from the ventral abdominal region was quantified weekly by means of BLI intensity (ph/s). A region of interest (ROI) for each animal ($n = 15$) was defined at every time point, and mean values \pm SEM are displayed over time. The dotted line indicates the non-linear regression fits of the exponential metastatic growth



infiltration was observed in all of these mice, and infiltration developed from the inside to the outside of the uterus, as happens in patients. 77% of the mice presented dissemination in the pelvic cavity, and 66% also had abdominal implants. Lymph node metastases were observed in one mouse. No hematogenous metastasis was found in this series. All of the mice that presented extra-uterine dissemination also developed hemorrhagic ascites (Table 3).

IHC analysis shows two different molecular patterns resembling the molecular characteristics of type 1 and type 2 EC

Globally, p53, ER, PR, Ki67, MSH6, MSH2 and MLH1 showed nuclear expression. E-cadherin was expressed in the membrane and β -catenin in membrane and weakly in cytoplasm. The intensity of the staining was homogeneous in all tumor cells of each sample. The Hec1A tumor molecular

Fig. 2 Ex vivo bioluminescence images, H&E staining and necropsy images of the orthotopic Hec1A endometrial tumor-bearing mice, showed: Endometrial tumor. H&E staining confirmed the endometrial generation of the tumor and the infiltration of myometrium from inside to outside the uterus, as happens in patients, pelvic and abdominal spread, para-aortic lymph node dissemination, and hematogenous metastasis, showing macroscopic lung metastasis

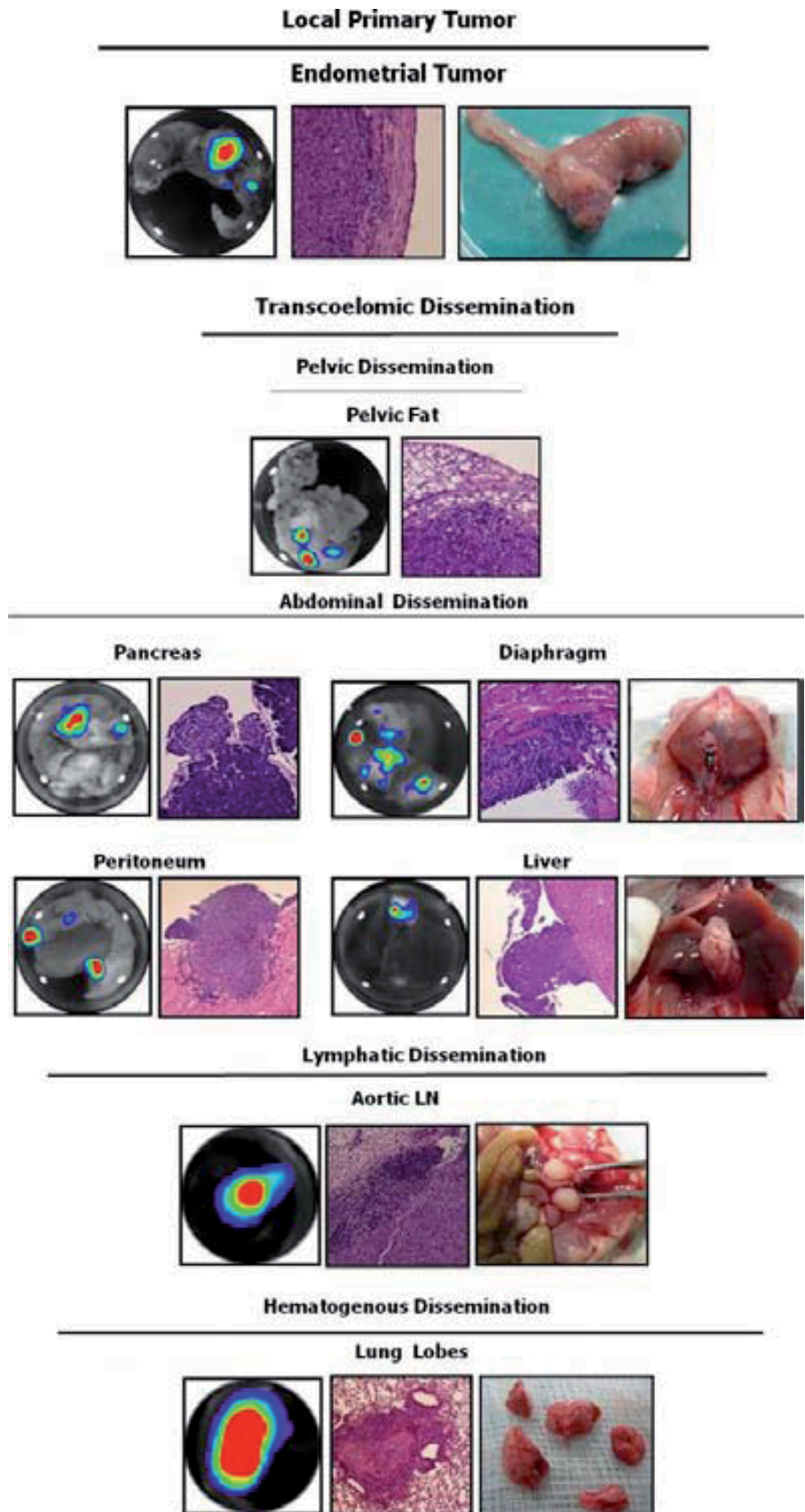


Table 2 Results of transmyometrial generation of orthotopic murine model derived from Hec1A-Fluc cell line

Mice used, <i>n</i>	17
Mice with endometrial tumor, <i>n</i>	16
Tumor incidence, %	94%
Mice finally analysed ^a , <i>n</i>	15
Metastasis incidence, %	
Pelvic implants	13/15 (87%)
Lymph node metastasis	14/15 (93%)
Para-aortic lumbar nodes	14 (100%)
Para-aortic renal nodes	12 (86%)
Mediastinal nodes	5 (36%)
Mesenteric nodes	4 (29%)
Inguinal nodes	2 (14%)
Axillary nodes	1 (7%)
Abdominal implants	12/15 (80%)
Pancreas	12 (100%)
Liver	11 (92%)
Spleen	11 (92%)
Kidneys	11 (92%)
Diaphragm	11 (92%)
Peritoneum	10 (83%)
Lung metastasis	11/15 (73%)

^a One mouse was killed at day 18 because of acute renal failure and anasarca

Table 3 Results of transmyometrial generation of orthotopic murine model derived from endometrioid tissue samples

Mice used, <i>n</i>	10
Mice with endometrial tumor, <i>n</i>	9
Tumor incidence, %	90%
Metastasis incidence, %	
Pelvic implants	7/9 (78%)
Lymph node metastasis	1/9 (11%)
Abdominal implants	6/9 (67%)
Lung metastasis	0/9 (0%)

profile was representative of an undifferentiated and more aggressive endometrial tumor (p53 positive, hormone receptors negative, high percentage of Ki67 positive cells), similar to type 2 EC. The endometrioid molecular profile was representative of a more differentiated tumor (p53 negative, low Ki67 index, presence of hormone receptors). Hormone receptors varied depending on the original samples. In the sample from patient A, both estrogen and progesterone receptors were expressed, while only progesterone receptors were observed in the sample from patient B. This fact demonstrates a correlation in molecular behavior between the original human tissue sample and the tissue after growth in a mouse. The molecular pattern was also similar in the primary and metastatic tumors (Table 4; Fig. 3).

Discussion

Experimental models based on human EC cells have been widely described [15–18], mainly using subcutaneous xenografts. Although there is evidence that these models can predict clinical efficacy, they still have significant limitations, the most important of which is the different micro-environment of the tumoral implant from its original location. These limitations can lead to a low tumor blood supply that can produce central necrosis, an absence of tumoral infiltration and encapsulation, and more importantly, a lack of metastatic behavior [12]. Nonetheless, such models have helped us to understand the biology of tumors and have led to some therapeutic approaches to human cancer. However, their handicaps have revealed to us the importance of developing a viable animal model that mimics the clinical behavior of cancer. Orthotopic injections of human cancer cells have been tested in different cancers, such as colon, lung, pancreas, bladder, stomach, and breast, among others [19–21]. These models have permitted the study of the metastatic process, although one of their most important disadvantages is the *in vivo* follow-up. The development of different strategies has been introduced, in order to monitor orthotopic tumor growth and detect the appearance of metastasis. In this respect, BLI represents a useful tool to resolve this handicap, effectively monitoring disease progression as it happens.

Our study generates and characterizes two new orthotopic models for EC, which closely reflect the clinical behavior of this illness in patients. Using Hec1A-Fluc cells, intrauterine implantation mimics the process of EC development, myometrial infiltration and metastasis generation. The use of the intrauterine injection technique represents an advantage over our previously characterized mouse model [12], because the implant follows the natural infiltrative process from inside to outside the uterus. Moreover, *in vivo* BLI has enabled the direct observation of cancer cells spreading from their site of origin and arriving at secondary sites, longitudinally in time. *In vivo* BLI also offers early reads on disease progression and a rapid, sensitive and less invasive way to monitor tumoral growth and metastases. 80% of our mice developed advanced disease with lymphatic, intra-abdominal and/or hematogenous metastasis, which would represent stage IV in the FIGO classification for EC [22]. Our results showed a strong correlation between orthotopic tumor development and the appearance of metastasis, as 14 of the 15 mice presented metastasis. The molecular pattern of this model corresponds to a more aggressive and undifferentiated tumor similar to type 2 EC.

Previously, Kamat et al. [23] described an orthotopic EC model derived from Ishikawa and Hec1A cell lines transfected with luciferase. *In vivo* BLI was performed only

Table 4 Percentage of positive cells in the immunohistochemical analysis of primary and metastatic samples in Hec1A and human endometrioid derived murine models

	p53	ER	PR	β -catenin	Ki67	E-cadherin	MSH2	MLH1	MSH6
HEC-1A									
Primary Tumor (uterus)	100%	0	0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Metastasis (lung)	100%	0	0	100%	100%	50%	100%	100%	100%
Metastasis (para-aortic lymphnode, PAN)	100%	0	0	80%	90%	50%	100%	100%	100%
Endometrioid adenocarcinoma									
Pateint A									
Primary Tumor (uterus)	0	40%	40%	100%	50%	100%	0	0	5%
Metastasis (peritoneal implant)	0	40%	40%	80%	50%	100%	0	0	5%
Pateint B									
Primary Tumor (uterus)	0	0	50%	100%	2%	0	0	0	80%
Metastasis (peritoneal implant)	0	0	60%	80%	2%	0	0	0	80%

twice during the experiment, mainly to ensure correct cell injection. Both models produced metastatic implants to the peritoneum, bowel mesentery, lymph nodes, kidney, and liver. In our study, we fully describe and better characterize the orthotopic EC model by using a lower number of cells (1×10^6 instead of 4×10^6) over a similar period of time. This fact produced less explosive tumoral growth and more progressive metastatic appearance, making this model more useful for therapeutic schemes, since there was a well-defined time between the cell implantation and the appearance of metastasis. By performing BLI weekly throughout the course of the experiment, we were able to follow all disease progression, including the orthotopic tumor growth and the metastatic dissemination to distant organs.

A similar orthotopic model derived from injection of Hec-1A, Ishikawa or SPEC-2 cells into the murine uterine horn was published by Lee et al. [24]. A higher quantity of cells resuspended in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Invitrogen) instead of Matrigel was used. Given that the main goal of their publication was to perform a therapeutic trial they do not describe the tumor and metastasis incidence. Luciferase for BLI follow-up is not used, and they do not molecularly characterize the tumor or the implants to determine their molecular profile.

A more recent model has been described by Takahashi et al. [25] in a study in which a highly metastatic model was needed. To generate a peritoneal dissemination endometrial model Hec1A tumor cells were intraperitoneally injected into nude mice. To develop a lymph node metastasis model tumor cells were injected into the uterine cavity of laparotomized mice, and to develop a lung metastasis model cells were injected into the tail vein of nude mice. In contrast, in the model that we describe the process of metastatic development derives from the myometrial infiltration and lymph-vascular invasion of the orthotopic

implant, as happens in the patient. Therefore, we can study the different molecules implicated in infiltration and lymph-vascular invasion, which are essential steps in metastatic development.

Our model is easy to generate, rapid in orthotopic development and metastasis generation, and it is easily monitored by BLI technology, while also being clinically representative of advanced disease. This means that it represents an advance in future, preclinical studies of EC, since it shows all of the phases of the disease: cancer generation inside the uterine cavity, myometrial infiltration and lymph-vascular invasion, peritoneal dissemination, and lymphatic and hematogenous metastasis.

Moreover, we have developed a second orthotopic EC model using human tumoral tissue, in order to keep the molecular phenotype and 3D structure. This type of model has never been described before in the literature. Orthotopically implanted, human endometrioid tissue produces myometrial infiltration, lymph-vascular invasion and dissemination in pelvic cavity. It maintains the molecular and histological characteristics of the original samples, reproducing glandular patterns and expressing hormone receptors. This model could be complementary to the Hec1A cell line model for testing new anti-cancerous drugs, since it presents endometrioid EC histology and immunophenotype.

In conclusion, we have generated and characterized two different orthotopic EC murine models that could be useful tools in preclinical studies. The Hec1A cell line derived model represents advanced disease and can be used to test the efficacy of anti-metastatic drugs. The human tissue derived model maintains the histological endometrioid pattern of the original tumor and represents local and locally-advanced disease. It can be used to specifically test drugs against endometrioid EC. Finally, both models could be useful for studying how the process of metastatic appearance is influenced by gene expression.

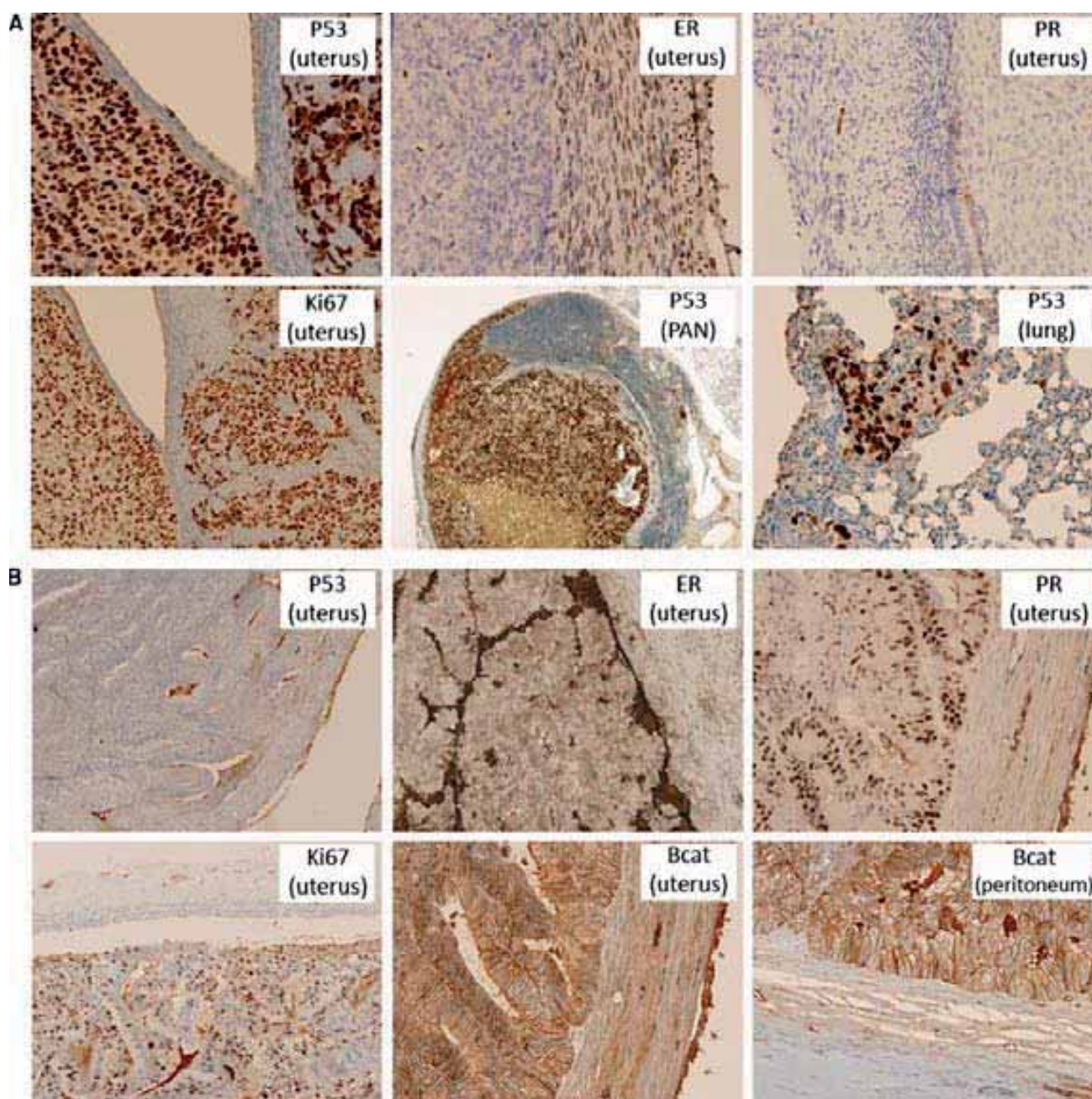


Fig. 3 Immunohistochemical characterization of the orthotopic mouse models. **a** Images of the Hec-1A cell line derived model showed positivity to p53, Ki67 with high expression and negativity to progesterone and estrogen receptors as type 2, non-endometrioid EC. **b** Immunohistochemical images of the tissue derived model, showed

glandular structure with negativity to p53 and positivity to progesterone and estrogen receptors as endometrioid, low grade EC. *ER* estrogen receptors, *PR* progesterone receptors, *Bcat* β -catenin, *PAN* para-aortic lymph node

Acknowledgments The authors would like to thank Lisa Piccione for correction of the manuscript. This work has been supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF 2005-06771; SAF 2008-03996; SAF 2010-10635-E; SAF2011-26548), the Spanish Ministry of Health (RTICC RD06/0020/0058, RD06/0020/1034; CP08/00142; PI08/0797), the Catalan Institute of Health (DURSI 2005SGR00553) and the Department of Universities and Research, Catalan Government (2009SGR00487, 2005SGR00553), the ACCIO

program (RDITSCON07-1-0001), the Foundation La Marato de TV3 (grant 050431), the IV Grant Fundació Santiago Dexeus Font for Clinical Investigation Projects 2009, the National Programme of Biotechnology (FIT-010000-2007-26), and the European Commission Program Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). M.L.L. is recipient of a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Innovation and Science (FI07/00423).

References

1. Baekelandt MM, Castiglione M (2009) ESMO Guidelines Working group. Endometrial carcinoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20(4):iv29–iv31
2. Homesley HD, Filiaci V, Gibbons SK et al (2009) A randomized phase III trial in advanced endometrial carcinoma of surgery and volume directed radiation followed by cisplatin and doxorubicin with or without paclitaxel: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 112:543–552
3. Gehrig PA, Bae-Jump VL (2010) Promising novel therapies for the treatment of endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 116:187–194
4. Bokhman JV (1983) Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 15(1):10–17
5. Hecht J, Mutter GL (2006) Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol* 24(29):4783–4791
6. Lax SF, Kendall B, Tashiro H 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):814–824
7. Doll A, Abal M, Rigau M et al (2008) Novel molecular profiles of endometrial cancer—new light through old windows. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108(3–5):221–229
8. Bansal N, Yendluri V, Robert M et al (2009) The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer Control* 16(1):8–13
9. Vardi JR, Tadros GH, Anselmo MT et al (1992) The value of exploratory laparotomy in patients with endometrial carcinoma according to the new International Federation of Gynecology and Obstetrics staging. *Obstet Gynecol* 80:204–208
10. Ballon SC, Berman ML, Donaldson RC et al (1979) Pulmonary metastases of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 7:56–65
11. Bouros D, Papadakis K, Siafakas N et al (1996) Natural history of patients with pulmonary metastases from uterine cancer. *Cancer* 78:441–447
12. Doll A, Gonzalez M, Abal M et al (2009) An orthotopic endometrial cancer mouse model demonstrates a role for RUNX1 in distant metastasis. *Int. J Cancer* 125:257–263
13. O'Neill K, Lyons SK, Gallagher WM et al (2010) Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research. *J Pathol* 220:317–327
14. Zhang C, Yan Z, Arango ME et al (2009) Advancing bioluminescence imaging technology for the evaluation of anticancer agents in the MDA-MB-435-HAL-Luc mammary fat pad and subrenal capsule tumor models. *Clin Cancer Res* 15:238–246
15. Du X, Jiang T, Sheng X et al (2009) Inhibition of osteopontin suppresses in vitro and in vivo angiogenesis in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 115:371–376
16. Dai D, Holmes AM, Nguyen T et al (2005) A potential synergistic anticancer effect of paclitaxel and amifostine on endometrial cancer. *Cancer Res* 65(20):9517–9524
17. Saidi SA, Holland CM, Charnock-Jones S et al (2006) In vitro and in vivo effects of the PPAR-alpha agonists fenofibrate and retinoic acid in endometrial cancer. *Mol Cancer* 5:13
18. Wallace AE, Sales KJ, Catalano RD et al (2009) Prostaglandin F2A-F-prostanoid receptor signaling promotes neutrophil chemotaxis via chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1 in endometrial adenocarcinoma. *Cancer Res* 69:5726–5733
19. Fidler IJ (1991) Orthotopic implantation of human colon carcinomas into nude mice provides a valuable model for the biology and therapy of metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 10:229–243
20. John CM, Leffler H, Kahl-Knutsson B et al (2003) Truncated galectin-3 inhibits tumor growth and metastasis in orthotopic nude mouse model of human breast cancer. *Clin Cancer Res* 9:2374–2383
21. Chong L, Ruping Y, Jiancheng B et al (2006) Characterization of a novel transplantable orthotopic murine xenograft model of a human bladder transitional cell tumor (BIU-87). *Cancer Biol Ther* 5(4):394–398
22. Report Meeting (2009) The new FIGO staging system for cancers of the vulva, cervix, endometrium and sarcomas. *Gynecol Oncol* 115:325–328
23. Kamat AA, Merritt WM, Coffey D et al (2007) Clinical and biological significance of vascular endothelial growth factor in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 13:7487–7495
24. Lee JW, Stone RL, Lee SJ et al (2010) EphA2 targeted chemotherapy using an antibody drug conjugate in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 16:2562–2570
25. Takahashi K, Saga Y, Mizukami H et al (2009) Cetuximab inhibits growth, peritoneal dissemination, and lymph node and lung metastasis of endometrial cancer, and prolongs host survival. *Int J Oncol* 35:725–729