



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

**ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA
DE NANOTOXINAS DIRIGIDAS A CÉLULAS CXCR4⁺
EN UN NUEVO MODELO MURINO
DE CÁNCER DE ENDOMETRIO AVANZADO**

TESIS DOCTORAL
ESPERANZA MEDINA GUTIÉRREZ
2021



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

DOCTORADO EN BIOLOGÍA CELULAR

**ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA
DE NANOTOXINAS DIRIGIDAS A CÉLULAS CXCR4⁺
EN UN NUEVO MODELO MURINO
DE CÁNCER DE ENDOMETRIO AVANZADO**

Memoria presentada por **Esperanza Medina Gutiérrez** para optar al título de Doctora por la Universidad Autònoma de Barcelona.

Directores:

Dr. Ramon Mangues Bafalluy

Dra. M^a Virtudes Céspedes Navarro

Doctoranda:

Esperanza Medina Gutiérrez

Tutora:

Dra. Raquel Moral Cabrera

ESPERANZA MEDINA GUTIÉRREZ

2021

A mi madre, por enseñarme el camino.

A mi abuela, por esperarme en la meta.

*"He competido en la noble competición,
he llegado a la meta en la carrera:
he conservado la fe."*

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS	7
RESUMEN EN CASTELLANO	9
RESUM EN CATALÀ	11
SUMMARY IN ENGLISH	13
I. INTRODUCCIÓN	15
1. EL CÁNCER DE ENDOMETRIO.....	17
1. 1. Introducción general	17
1. 2. Epidemiología	18
1. 3. Etiopatogenia y factores de riesgo	20
2. DIAGNÓSTICO, ESTADIAJE Y CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO	23
2. 1. Clasificación tradicional o dualista	25
2. 2. Clasificación histológica	26
2. 3. Clasificación molecular	30
3. PROGRESIÓN TUMORAL Y RIESGO DE RECURRENCIA DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO	32
3. 1. Bases moleculares de la progresión tumoral en CE	33
3. 2. Clasificación del riesgo de recurrencia	36
4. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO	38
4. 1. Cirugía	38
4. 2. Tratamiento adyuvante	39
4. 3. Tratamiento del CE en estadios avanzados	42
5. EL RECEPTOR CXCR4 Y EL CÁNCER	44
5. 1. CXCR4 en cáncer de endometrio	47
5. 2. Terapia oncológica dirigida a CXCR4	48
6. ENTREGA SELECTIVA DE AGENTES TERAPÉUTICOS MEDIANTE NANOPARTÍCULAS	50
6. 1. Propiedades fisicoquímicas y moleculares de las nanopartículas terapéuticas.....	51
6. 2. El nanotransportador T22-GFP-H6 dirigido al receptor CXCR4	54
6. 3. Nanopartículas terapéuticas basadas en la estructura de T22-GFP-H6	55
7. MODELOS ANIMALES DE CÁNCER DE ENDOMETRIO	61
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
HIPÓTESIS.....	69
OBJETIVOS	69
Objetivo principal	69

Objetivos específicos	69
III. MATERIAL Y MÉTODOS	71
1. EXPRESIÓN DE CXCR4 EN MUESTRAS DE PACIENTES CON CÁNCER DE ENDOMETRIO	73
1. 1. Estudio de la presencia y el patrón de expresión de CXCR4 en pacientes y su asociación con parámetros clínicos.....	73
1. 2. Estudio de la asociación entre los niveles de ARNm de CXCR4 y parámetros clinicopatológicos y de evolución de las pacientes	73
1. 3. Análisis estadísticos con muestras de pacientes	74
2. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE ENDOMETRIO.....	75
2. 1. Cultivo celular	75
2. 2. Estrategias para la sobreexpresión de CXCR4 y Luciferasa en líneas celulares de CE....	77
2. 3. Determinación de la expresión de las moléculas diana	82
2. 4. Ensayos funcionales con nanopartículas en líneas celulares de CE	83
2. 5. Análisis estadísticos	86
3. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> EN MODELOS XENÓGRAFOS DE CÁNCER DE ENDOMETRIO	87
3. 1. Cepas de ratón.....	87
3. 2. Generación de los modelos xenógrafos de CE	87
3. 3. Seguimiento <i>in vivo</i> del crecimiento tumoral.....	90
3. 4. Necropsia y registro <i>ex vivo</i> de bioluminiscencia y fluorescencia.....	91
3. 5. Determinación de metástasis a distancia	91
3. 6. Ensayos con nanopartículas en modelos animales de CE	92
3. 7. Procesamiento de muestras parafinadas	95
3. 8. Análisis estadísticos	98
IV. RESULTADOS	101
1. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR CXCR4 EN PACIENTES CON CE	103
1. 1. Expresión en membrana de CXCR4 en muestras de pacientes con CE	103
1. 2. Estudio de correlación entre la expresión de CXCR4 en tumores de CE y parámetros clinicopatológicos	104
2. DESARROLLO DE MODELOS ANIMALES DE CE CON SOBREENPRESIÓN DE CXCR4.....	108
2. 1. Generación de líneas celulares de CE con expresión constitutiva de CXCR4 en membrana y actividad Luciferasa.....	108
2. 2. Desarrollo de un modelo murino subcutáneo con sobreexpresión de CXCR4	110
2. 3. Desarrollo de un modelo murino ortotópico con elevada capacidad tumorigénica y metastática a partir de las líneas celulares derivadas de AN3CA.....	111
3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL NANOTRANSPORTADOR T22-GFP-H6 EN MODELOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE CE CXCR4 ⁺	118

3. 1. Internalización dependiente de CXCR4 del nanotransportador T22-GFP-H6 en las líneas celulares AN3CA CXCR4 ⁺ y HEC1A CXCR4 ⁺	118
3. 2. Ausencia de citotoxicidad <i>in vitro</i> del nanotransportador T22-GFP-H6 en las células AN3CA CXCR4 ⁺ y HEC1A CXCR4 ⁺	121
3. 3. Estudio <i>in vivo</i> de la biodistribución y toxicidad del nanotransportador T22-GFP-H6 en el modelo subcutáneo de CE CXCR4 ⁺	121
4. ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS TERAPÉUTICAS DERIVADAS DE T22-GFP-H6 EN LÍNEAS CELULARES DE CE CXCR4 ⁺	125
4. 1. Internalización dependiente de CXCR4 de los nanoconjugados terapéuticos T22-GFP-H6-FdU y T22-GFP-H6-AUR	125
4. 2. Efecto citotóxico dependiente de CXCR4 de las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 en la línea celular AN3CA CXCR4 ⁺	127
4. 3. Estudio del mecanismo de muerte celular inducida por las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6	129
5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y ANTIMETASTÁTICA DE LAS NANOTOXINAS BACTERIANAS DIRIGIDAS A CXCR4 EN MODELOS ANIMALES DE CE CXCR4 ⁺	134
5. 1. Efecto antitumoral de las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 en el modelo xenógrafo de implantación subcutánea en la cepa <i>Swiss nude</i>	134
5. 2. Estudio del mecanismo de muerte celular inducida por T22-DITOX-H6 o T22-PE24-H6 en el modelo xenógrafo subcutáneo	137
5. 3. Efecto antimetastático de T22-DITOX-H6 en el modelo murino de implantación ortotópica en la cepa NSG	138
V. DISCUSIÓN	147
1. PREVALENCIA DE LA EXPRESIÓN DE CXCR4 EN CÁNCER DE ENDOMETRIO	150
2. DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO DE CE AVANZADO CXCR4 ⁺ CON ELEVADA DISEMINACIÓN METASTÁTICA	153
3. DEMOSTRACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DEL NANOTRANSPORTADOR PROTEICO DIRIGIDO A CÉLULAS DE CE CXCR4 ⁺ <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	156
4. ELECCIÓN DE LAS NANOTOXINAS BACTERIANAS DIRIGIDAS A CÉLULAS TUMORALES CXCR4 ⁺ COMO TRATAMIENTO PARA CE AVANZADO	157
Cribado de nanoconjugados y nanopartículas polipeptídicas <i>in vitro</i> y selección de las candidatas a evaluar <i>in vivo</i>	157
Demostración del efecto antitumoral e identificación del mecanismo de acción citotóxica de las nanotoxinas seleccionadas, T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6	158
Efecto antimetastático de la nanotoxina T22-DITOX-H6 en un modelo ortotópico de CE avanzado CXCR4 ⁺	159
5. COMPARACIÓN DE LA TERAPIA DIRIGIDA A CÉLULAS TUMORALES CXCR4 ⁺ MEDIANTE LA NANOTOXINA T22-DITOX-H6, CON LOS FÁRMACOS EN DESARROLLO CLÍNICO PARA EL TRATAMIENTO DE CE AVANZADO	161
T22-DITOX-H6 incrementa el margen terapéutico respecto a la terapia clásica o en desarrollo	161

Ventajas de la natotoxina T22-DITOX-H6 en relación a otros abordajes basados en nanopartículas.....	162
6. CONTRIBUCIÓN DE LA NANOTOXINA T22-DITOX-H6, DIRIGIDA A CÉLULAS TUMORALES CXCR4 ⁺ , AL TRATAMIENTO DE CE AVANZADO	169
VI. CONCLUSIONES.....	173
VII. BIBLIOGRAFÍA	178
VIII. ANEXOS.....	209
1. APROBACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL POR LA GENERALITAT DE CATALUNYA	211
2. PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN APLICADO EN LOS MODELOS ANIMALES.....	213

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADC:** *antibody-drug conjugate*, conjugado anticuerpo-fármaco
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ARID1A:** *AT-Rich Interacting Domain-containing protein 1A*, dominio de interacción rico en AT de la proteína A1
- ARN:** ácido ribonucleico
- ARNm:** ARN mensajero
- ARNi:** ARN interferente
- AUR:** monometil auristatina E
- CDK:** *cyclin-dependent kinase*, ciclina dependiente de quinasa
- CE:** cáncer de endometrio
- CMV:** citomegalovirus
- CXCL12:** *chemokine ligand 12*, quimiocina ligando 12
- CXCR4:** *CXC chemokine receptor 4*, receptor de quimiocinas CXC 4
- D.R.:** dosis repetidas
- DITOX:** exotoxina de *Corynebacterium diphtheriae*
- DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- E1:** estrona
- E2:** 17- β -estradiol
- eEF-2:** *eukaryotic elongation factor 2*, factor de elongación eucariota 2
- EPR:** *enhanced permeability and retention*, aumento de permeabilidad y retención
- ESGO:** *European Society of Gynaecology and Obstetrics*, Sociedad Europea de Ginecología y Obstetricia
- ESMO:** *European Society for Medical Oncology*, Sociedad Europea de Oncología Médica
- ESTRO:** *European Society for Radiotherapy and Oncology*, Sociedad Europea de Radioterapia y Oncología
- FDA:** *Food and Drug Administration*, Administración de Medicamentos y Alimentos
- FdU:** floxuridina
- FIGO:** Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
- FPKM:** *fragments per kilobase of transcript per million mapped reads*, fragmentos por kilobase de transcrito por millón de lecturas mapeadas
- GFP:** *green fluorescent protein*, proteína verde fluorescente

GOM: gomesina

GPCRs: *G protein-coupled receptors*, receptores asociados a proteínas G

H&E: hematoxilina-eosina

H6: cola de seis histidinas

HER2: *human epidermal growth factor receptor 2*, factor de crecimiento epidérmico humano 2

i.v.: intravenosa

IGF-1: *insulin-like growth factor 1*, factor de crecimiento insulínico 1

IHQ: inmunohistoquímica

IL2-RY: cadena gamma del receptor de interleucina 2

IMS: inestabilidad de microsatélites

KRAS: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene*

MAPK: *mitogen-activated protein kinases* proteínas quinasas activadas por mitógenos

MEL: melitina

MIG-6: *mitogen-inducible gene 6*, gen inducible por mitógenos 6

MMR: *mismatch repair*, reparación de errores

mTOR: *mammalian target of rapamycin*, diana de rapamicina en células de mamífero

NOD/Scid: *non-obese diabetic/severe combined immune deficiency*

NSG: NOD/Scid deficientes para IL2-RY

OMS: Organización Mundial de la Salud

PARP: *poly (ADP-ribose) polymerase*, poli ADP-ribosa polimerasa

PD-1: *programmed cell death protein-1*, proteína de muerte celular programada

PE24: exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*

PEG: polietilenglicol

PI3K: *phosphatidyl inositol 3-kinase* fosfoinositol 3-quinasa

PIK3CA: *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*

POLE: *polymerase epsilon*, ADN polimerasa ϵ

PTEN: *phosphatase and tensin*

RAGE: *receptor for advanced glycation end products*, receptor para productos finales de glicación avanzada

SDF1 α : *stromal-derived factor 1 α* , factor derivado del estroma 1 α

SPF: *specific pathogen free*, limpia de patógenos definidos

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TNF- α : *tumor necrosis factor α* , factor de necrosis tumoral α

VEGF: *vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento del endotelio vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Histología del útero y esquema de los cambios hormonales e histológicos durante el ciclo menstrual	18
Figura 2. Tasa estimada de incidencia estandarizada por edad del cáncer de endometrio	19
Figura 3. Histopatología de varios tipos histológicos de carcinoma de endometrio	29
Figura 4. Algoritmo diagnóstico para la clasificación histomolecular integrada del cáncer de endometrio.....	31
Figura 5. Diagrama de un mecanismo propuesto para el desarrollo y progresión de la neoplasia intraepitelial endometrial.....	32
Figura 6. Modelo de progresión del cáncer de endometrio de tipo endometriode y no endometriode.....	35
Figura 7. Esquema de la clasificación y tratamiento adyuvante del cáncer de endometrio en estadios avanzados.....	42
Figura 8. Esquema de las vías de señalización reguladas por el eje CXCL12/CXCR4.	45
Figura 9. Modelo propuesto para el bucle autocrino positivo entre los receptores de estrógenos y la vía CXCL12/CXCR4.....	46
Figura 10. Aumento de la eficacia en el tratamiento del cáncer a través del empleo de nanopartículas con direccionamiento activo	51
Figura 11. Gráfico resumen de las nanopartículas desarrolladas como transportadores de agentes terapéuticos en oncología	53
Figura 12. Caracterización de las nanopartículas T22-GFP-H6	55
Figura 13. Síntesis y caracterización del nanoconjugado T22-GFP-H6·FdU	57
Figura 14. Síntesis, caracterización y mecanismo de acción del nanoconjugado T22-GFP-H6·AUR.. ..	58
Figura 15. Representación esquemática de la estructura de las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6	59
Figura 16. Mecanismo de acción las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 en células diana CXCR4 ⁺ mediante la inhibición de la síntesis proteica	60
Figura 17. Modelos animales de cáncer de endometrio.....	62

Figura 18. Mapas de los plásmidos diana y víricos empleados para la transfección liposomal y transducción lentiviral.....	78
Figura 19. Procedimiento de la inoculación ortotópica de líneas celulares humanas en la cepa de ratones NSG para la obtención de un modelo metastático de cáncer de endometrio	89
Figura 20. Diseño del experimento de biodistribución de la nanopartícula T22-GFP-H6.....	92
Figura 21. Diseño experimental del estudio in vivo empleado para evaluar el efecto antitumoral de las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6	93
Figura 22. Diseño del experimento empleado para evaluar el efecto antimetastático de la nanotoxina T22-DITOX-H6.....	94
Figura 23. Representación esquemática del análisis y procesamiento de muestras para la evaluación de parámetros relacionados con actividad antitumoral o antimetastática en los distintos modelos animales tras el sacrificio.....	95
Figura 24. Expresión de CXCR4 en <i>tissue microarrays</i> obtenidos a partir de muestras de pacientes con cáncer de endometrio.....	103
Figura 25. Análisis de los niveles de expresión de CXCR4, mediante el parámetro H-score, obtenido en inmunohistoquímicas de <i>tissue microarrays</i> de tumores de pacientes con cáncer de endometrio en relación a variables clínicas	105
Figura 26. Estudio de asociación entre la expresión de CXCR4 y tipo histológico, grado histológico, subtipo molecular o estadio en una cohorte de 529 pacientes con cáncer de endometrio.....	106
Figura 27. Estudio de asociación entre la expresión de CXCR4 y la supervivencia total, la supervivencia libre de enfermedad o la progresión de la enfermedad en una cohorte de 529 pacientes con cáncer de endometrio.....	107
Figura 28. Análisis de la expresión de CXCR4 en líneas celulares de cáncer de endometrio AN3CA, HEC1A y ARK-2 parentales, transfectadas y transducidas	109
Figura 29. Análisis de la expresión de Luciferasa en las líneas celulares de cáncer de endometrio AN3CA, HEC1A y ARK-2 transducidas.....	109
Figura 30. Evolución del crecimiento tumoral y caracterización histopatológica del modelo de cáncer de endometrio subcutáneo generado.....	111
Figura 31. Emisión de bioluminiscencia en el modelo xenógrafo ortotópico de cáncer de endometrio generado	112
Figura 32. Histología y nivel de expresión de CXCR4 en tumor primario, ovario y carcinomatosis peritoneales en el modelo ortotópico de cáncer de endometrio avanzado.....	114

Figura 33. Patrón de diseminación del modelo xenógrafo ortotópico de cáncer de endometrio avanzado generado en la cepa NSG	115
Figura 34. Evaluación de la internalización de la nanopartícula T22-GFP-H6 en las líneas celulares AN3CA y HEC1A, de cáncer de endometrio	119
Figura 35. Evaluación de la internalización de la nanopartícula T22-GFP-H6 dependiente de CXCR4 en las líneas AN3CA CXCR4 ⁻ y AN3CA CXCR4 ⁺ , con y sin pretratamiento con el antagonista de CXCR4 AMD3100	120
Figura 36. Evaluación del efecto citotóxico del nanotransportador T22-GFP-H6 en las líneas celulares de cáncer de endometrio AN3CA CXCR4 ⁺ y HEC1A CXCR4 ⁺	121
Figura 37. Biodistribución del nanotransportador T22-GFP-H6 en el modelo xenógrafo subcutáneo AN3CA CXCR4 ⁺ generado en la cepa <i>Swiss nude</i>	122
Figura 38. Evaluación de la toxicidad tras la administración de T22-GFP-H6 en el modelo xenógrafo subcutáneo AN3CA CXCR4 ⁺ generado en la cepa <i>Swiss nude</i>	123
Figura 39. Internalización de los nanoconjugados T22-GFP-H6-FdU y T22-GFP-H6-AUR en la línea AN3CA CXCR4 ⁺ y su dependencia de CXCR4.	126
Figura 40. Evaluación del efecto citotóxico de distintas nanopartículas en líneas celulares de cáncer de endometrio	128
Figura 41. Estudio de la muerte celular inducida por las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 a 4 nM en células AN3CA CXCR4 ⁺	130
Figura 42. Evaluación de la inducción de la condensación de núcleos y cuerpos apoptóticos por las nanotoxinas en células AN3CA CXCR4 ⁺	131
Figura 43. Estudio de la expresión de los marcadores de apoptosis caspasa-3 activada y PARP proteolizada.....	132
Figura 44. Análisis del crecimiento tumoral tras la administración de T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 en el modelo subcutáneo de CE derivado de AN3CA CXCR4 ⁺ en la cepa <i>Swiss nude</i>	135
Figura 45. Efecto del tratamiento con T22-DITOX-H6 o T22-PE24-H6 sobre la supervivencia de los ratones portadores de tumores subcutáneos derivados de la línea AN3CA CXCR4 ⁺	136
Figura 46. Evaluación de la toxicidad tras la administración de T22-DITOX-H6 o T22-PE24-H6 en el modelo xenógrafo subcutáneo AN3CA CXCR4 ⁺ generado en la cepa <i>Swiss nude</i>	137
Figura 47. Apoptosis inducida por las nanotoxinas a dosis altas en tumores subcutáneos derivados de la línea de CE AN3CA CXCR4 ⁺	138
Figura 48. Emisión de bioluminiscencia registrada <i>in vivo</i> a lo largo del tiempo y <i>ex vivo</i> en los órganos relevantes clínicamente, en el modelo ortotópico derivado de AN3CA CXCR4 ⁺	139

Figura 49. Inhibición de la carcinomatosis peritoneal tras la administración de T22-DITOX-H6 en el modelo xenógrafo de cáncer de endometrio avanzado derivado de la línea AN3CA CXCR4 ⁺ en la cepa de ratón NSG	141
Figura 50. Evaluación del efecto antimetastático de la administración de T22-DITOX-H6 en el modelo xenógrafo de cáncer de endometrio avanzado derivado de la línea AN3CA CXCR4 ⁺ en la cepa NSG	142
Figura 51. Evaluación de la toxicidad tras la administración de T22-DITOX-H6 en el modelo xenógrafo de cáncer de endometrio avanzado derivado de la línea AN3CA CXCR4 ⁺ en la cepa de ratón NSG	145

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de casos y tasa de incidencia y mortalidad de los diez cánceres principales en mujeres en España	19
Tabla 2. Estadíaje actual del CE según la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, junto con la clasificación TMN y la supervivencia asociada a cada estadio	24
Tabla 3. Clasificación de Bokhman, dualista o tradicional, del cáncer de endometrio	25
Tabla 4. Relación de las clasificaciones tradicional (de Bokhman) e histológica del cáncer de endometrio.....	26
Tabla 5. Alteraciones genómicas de las líneas celulares más empleadas de cáncer de endometrio tipos I y tipo II	65
Tabla 6. Condiciones de los anticuerpos primarios utilizados para las tinciones por inmunohistoquímica.....	98
Tabla 7. Patrón de diseminación a hígado y pulmón del modelo xenógrafo ortotópico de cáncer de endometrio generado en la cepa NSG	116
Tabla 8. Evaluación del efecto antimetastático de T22-DITOX-H6 en el modelo ortotópico derivado de la línea AN3CA CXCR4 ⁺ en la cepa NSG	144

RESUMEN EN CASTELLANO

El **cáncer de endometrio (CE)** es el **más frecuente** de los tumores infiltrantes del **tracto genital** femenino, y el **tercer cáncer más prevalente** entre las mujeres europeas. Aunque la **supervivencia** a cinco años es del 80%, ésta **disminuye** drásticamente hasta el 56% si existen **metástasis** regionales, y hasta solo el 20% si las metástasis son distales. Por tanto, es necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren el tratamiento actual y consigan una mayor inhibición de la diseminación metastática, así como una reducción significativa de su toxicidad sistémica asociada a efectos adversos severos.

En colaboración con el grupo de **Nanobiotecnología** de la Universidad Autónoma de Barcelona, nuestro grupo ha desarrollado **nanopartículas proteicas autoensamblables**, basadas en el diseño y la estructura **T22-GFP-H6**, que incorporan el ligando T22, capaz de dirigirse específicamente a células con expresión del receptor de quimiocinas **CXCR4** (células CXCR4⁺). Este receptor está **sobreexpresado** a nivel de ARN y proteína en tejido tumoral de **CE**. Su sobreexpresión correlaciona con **mal pronóstico** en varios tipos de cáncer, siendo en algunos de ellos un **marcador de células madre tumorales** y una diana terapéutica. El análisis por inmunohistoquímica de biopsias tumorales de una cohorte de 79 pacientes del *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* afectadas de **CE** demostró sobreexpresión de CXCR4 en más del **90%** de los casos, con un patrón predominantemente **membranal**. Esto sugiere que podría ser una buena **diana terapéutica** en este tipo tumoral, siendo susceptible de ser tratado con nanopartículas terapéuticas dirigidas a células tumorales CXCR4⁺.

La evaluación preclínica de la eficacia y toxicidad de nuevos agentes terapéuticos implica el uso de **modelos *in vitro* e *in vivo*** adecuados. Debido a la falta de líneas celulares de CE CXCR4⁺, generamos **nuevas líneas** con sobreexpresión de **CXCR4** y de **Luciferasa**, para desarrollar modelos animales más agresivos y que permitieran el seguimiento de las células tumorales. De entre las líneas celulares transducidas, seleccionamos la línea **AN3CA CXCR4⁺**, generando **modelos xenógrafos** de implantación **subcutánea**, en ratones *Swiss nude*, y **ortotópica**, en ratones NSG. Este último modelo replicó las **características clinicopatológicas** del CE en estadios avanzados, con una **tasa** de implantación de **tumor primario** y desarrollo de **metástasis** distales en el **100% de los animales**. Demostramos, a su vez, que la sobreexpresión de **CXCR4** ejerció un gran **efecto** de aumento de la **diseminación** metastática.

RESUMEN

La detección de la **fluorescencia** emitida por el nanotransportador proteico **T22-GFP-H6** gracias a su dominio GFP (*Green Fluorescent Protein*), demostró su gran eficiencia de **internalización** y dependencia de CXCR4 en ausencia de citotoxicidad *in vitro*, especialmente en la línea celular de CE AN3CA. En el **modelo subcutáneo in vivo**, T22-GFP-H6 se biodistribuyó principalmente (más del **60%** de la dosis administrada) en el **tejido tumoral CXCR4⁺**, con un pico de fluorescencia a las 5 horas tras la administración, sin observarse acumulación o alteraciones histopatológicas en órganos no tumorales.

Por otro lado, tras un **cribaje** de diversas **nanopartículas** portadoras de distintos agentes terapéuticos, observamos que las que incorporaban toxinas bacterianas, **T22-DITOX-H6** y **T22-PE24-H6**, ejercían en la línea AN3CA CXCR4⁺ un **gran efecto citotóxico**, con una IC₅₀ en el rango nanomolar bajo, que era **dependiente de CXCR4** y estaba mediado por inducción de **apoptosis**. Esta vía de muerte celular fue confirmada *in vivo* en el modelo subcutáneo CXCR4⁺ tras la administración de las nanotoxinas. También demostramos que ambas nanopartículas, cuando se administraban a dosis repetidas en el modelo **subcutáneo**, **inhibían el crecimiento** tumoral, aumentando la **supervivencia** de los ratones, en **ausencia de toxicidad** sistémica y de acumulación en órganos no tumorales.

Por último, la nanotoxina **T22-DITOX-H6**, que obtuvo un **mayor efecto antitumoral** en el modelo subcutáneo, fue administrada a dosis repetidas también en el modelo **ortotópico CXCR4⁺**, demostrando **inhibir el desarrollo de metástasis** peritoneales, linfáticas, hepáticas y pulmonares. En el caso de las metástasis hematógenas, disminuyó drásticamente tanto el número como el área de los focos metastáticos en hígado, así como el porcentaje de tejido invadido por células tumorales en el pulmón. Este potente efecto antimetastático tuvo lugar a una dosificación baja (5 µg q3d x 14 dosis) y en **ausencia de toxicidad** sistémica.

Nuestra nanopartícula **T22-DITOX-H6** muestra múltiples **ventajas** respecto a otras terapias oncológicas, en cuanto a su **direccionamiento activo** a células CXCR4⁺, su **tamaño nanométrico** (que evita su eliminación renal y hepática), y su **naturaleza proteica** (que evita la formación de la corona proteica en el torrente sanguíneo y su opsonización y pérdida del direccionamiento), así como su **singular mecanismo de acción** (la inhibición de la síntesis de proteínas). Todo ello conlleva un **elevado efecto antineoplásico en ausencia de toxicidad** sistémica, como ha sido demostrado en los modelos animales de CE CXCR4⁺ desarrollados en esta tesis. Creemos que esta nanopartícula puede ser un **excelente abordaje terapéutico**, tras el pertinente desarrollo preclínico, prometiendo contribuir a solucionar la falta de tratamiento efectivo para las pacientes de **CE CXCR4⁺ avanzado**, recurrente o con alto riesgo de recaída.

RESUM EN CATALÀ

El **càncer d'endometri (CE)** és el **més freqüent** dels tumors infiltrants del **tracte genital femení**, i el **tercer càncer més prevalent** entre les dones europees. Malgrat que la **supervivència** a cinc anys és del 80%, aquesta **disminueix** ràpidament, essent del 56% quan presenten **metàstasis** regionals, i del 20% quan són distals. Cal desenvolupar noves estratègies terapèutiques que puguin millorar el tractament actual aconseguint una major inhibició de la disseminació metastàtica, així com una reducció significativa de la seva toxicitat sistèmica associada a efectes adversos.

En col·laboració amb el grup de **Nanobiotecnologia** de la Universitat Autònoma de Barcelona, el nostre grup ha desenvolupat **nanopartícules proteiques autoensamblables**, basades en el disseny i la estructura T22-GFP-H6, que inclouen el lligand T22, per a dirigir-les específicament a cèl·lules que expressen el receptor de quimiocines **CXCR4** (cèl·lules CXCR4⁺). Aquest receptor està **sobreexpressat**, a nivell d'ARN i proteïna, en el **teixit tumoral en CE**. La seva sobreexpressió correlaciona amb **mal pronòstic** en molts càncers, en alguns dels quals ha sigut descrit com a marcador de **cèl·lules mare tumorals** i com a **diana terapèutica**. El seu anàlisi per immunohistoquímica de biòpsies tumorals d'una cohort de 79 pacients, de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, afectades per CE, va demostrar la seva sobreexpressió en més del **90%** de les pacients, presentant un patró d'expressió en **membrana**. Això suggereix que es tracta d'una **bona diana terapèutica** també en aquest tipus tumoral, fent-lo susceptible d'esser tractat amb nanopartícules terapèutiques dirigides a cèl·lules tumorals CXCR4⁺.

L'avaluació preclínica de l'eficàcia i toxicitat de nous agents terapèutics requereix l'ús de **models in vitro e in vivo** adequats. Per assolir aquest objectiu, i davant la manca de línies cel·lulars de CE CXCR4⁺, vam generar **noves línies de CE** amb sobreexpressió de **CXCR4** i de **Luciferasa**, per desenvolupar models animals més agressius i que permetessin el seguiment i detecció de les cèl·lules tumorals. D'entre les línies cel·lulars que vam transduir, vam seleccionar la línia **AN3CA CXCR4⁺** pel desenvolupament de **models xenògrafs** d'implantació **subcutània**, en ratolins de la soca *Swiss nude*, i **ortotòpica**, en ratolins NSG. Amb aquests últims vam aconseguir replicar les característiques clinicopatològiques del CE en estadis avançats, assolint una **tassa** d'implantació de **tumor primari** i de desenvolupament de **metàstasis** distals del **100%** dels animals. A més, vam demostrar que la sobreexpressió de **CXCR4** va exercir un gran **efecte** d'augment de la **disseminació** metastàtica.

RESUM

La detecció de la **fluorescència** emesa pel nanoportador **T22-GFP-H6** gràcies al seu domini GFP (*Green Fluorescent Protein*) va demostrar una gran eficiència **d'internalització** dependent de CXCR4 sense citotoxicitat *in vitro*, especialment en la línia cel·lular de CE AN3CA. En el **model subcutani in vivo**, T22-GFP-H6 va ser captada principalment pel **teixit tumoral** (més del **60%** de la dosi administrada), CXCR4⁺, amb un pic de fluorescència a les 5 hores després de l'administració, sense acumulació o alteracions histopatològiques en òrgans no tumorals.

D'altra banda, després del **cribratge** amb diverses nanopartícules terapèutiques, vam observar que les basades en toxines bacterianes, **T22-DITOX-H6** i **T22-PE24-H6**, exercien *in vitro*, a la línia AN3CA CXCR4⁺, un **major efecte citotòxic** amb una IC₅₀ en el rang nanomolar baix, que era **dependent de CXCR4** i estava mediat per inducció d'**apoptosi**. Aquesta via de mort cel·lular va ser confirmada *in vivo* després de l'administració de les nanotoxines en el model subcutani CXCR4⁺. També vam demostrar que ambdues nanopartícules, quan s'administraven a dosis repetides en el model **subcutani**, **inhibien el creixement tumoral** i augmentaven la **supervivència** dels ratolins en absència de toxicitat sistèmica i d'acumulació en òrgans no tumorals.

Per últim, l'administració repetida de **T22-DITOX-H6**, la nanotoxina que va demostrar un **efecte antitumoral** més potent, en el model **ortotòpic** CXCR4⁺ va **inhibir el desenvolupament de metàstasis** peritoneals, limfàtiques, hepàtiques i pulmonars. Pel que fa a les metàstasis hematògenes, va disminuir dràsticament tant el nombre com l'àrea dels focus metastàtics en fetge, així com l'àrea de teixit envaït en el pulmó. Aquest potent efecte antimetastàtic va tenir lloc amb una dosificació baixa (5 µg q3d x 14 dosis) i **en absència de toxicitat** sistèmica.

La nostra nanopartícula **T22-DITOX-H6** presenta múltiples **avantatges** respecte d'altres teràpies oncològiques pel que fa al seu **direccionament actiu** a cèl·lules CXCR4⁺, la seva **mida nanomètrica** (que evita l'eliminació renal i hepàtica) i la seva **naturalesa proteica** (evitant la formació d'una corona proteica a la sang i la seva opsonització i pèrdua de direccionament), així com el seu **singular mecanisme d'acció** (inhibició de la síntesi proteica). Totes aquestes propietats contribueixen a aconseguir un **gran efecte antineoplàstic sense toxicitat** inespecífica associada, com hem demostrat en els models animals CXCR4⁺ que hem generat en aquesta tesi. Creiem que aquesta nanopartícula pot ser una **excel·lent alternativa terapèutica**, després del pertinent desenvolupament preclínic, i promet contribuir a solucionar la manca de tractament efectiu per a les pacients de **CE CXCR4⁺ avançat**, recurrent o amb alt risc de recaiguda.

SUMMARY IN ENGLISH

Endometrial cancer (EC) is the **most common cancer** in the **female genital tract**, and the **third leading cancer** in European women. Even though EC has a five-year **survival** of 80%, it **decreases** dramatically to a 56% or 20% when locoregional or distal **metastasis** occur, respectively. Thus, there's an unmet medical need calling for developing new therapeutic approaches that improve current treatment by achieving a higher inhibition of metastatic dissemination, as well as a significant reduction of its associated systemic toxicity and severe adverse effects.

In collaboration with the **Nanobiotechnology** group at *Universitat Autònoma de Barcelona*, our group has developed **self-assembling protein nanoparticles**, based on **T22-GFP-H6** design and structure, that incorporate the T22 ligand to specifically target cells which express chemokine receptor CXCR4 (CXCR4⁺ cells). This receptor is **overexpressed** at the **RNA** and **protein** levels in **EC tumor tissue**. Its overexpression is also related to **poor prognosis** and metastasis development in **several cancers**; in some of which it has been defined as a **cancer stem cell marker** and a **therapeutic target**. Immunohistochemical analysis of tumor biopsies from 79 **EC patients** of the *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* showed its overexpression in more than **90%** of the cases, with predominantly **membrane** localization. This suggests CXCR4 could be a **good therapeutic target** in this tumor type, which could be treated using therapeutic nanoparticles targeted to CXCR4⁺ cells.

The preclinical development of new therapeutic agents to assess their efficacy and toxicity requires the use of appropriate **in vitro** and **in vivo** models. Due to the lack of CXCR4⁺ EC cell lines, we generated new **CXCR4⁺ EC** cell lines, which also overexpressed **luciferase** to allow cell tracking. Among them, we selected the **CXCR4⁺ AN3CA** cell line to develop **xenograft** models of **subcutaneous** and **orthotopic** implantation, in *Swiss nude* or NSG mice, respectively. Our orthotopic models mimicked the **clinicopathological features** of EC in advanced stages, having a rate of **tumor implantation** and **metastasis** development of **100%**. Moreover, **CXCR4** overexpression showed a large **effect** by increasing metastatic **dissemination**.

The fluorescence emission by the green **fluorescent** protein domain (GFP) incorporated to the **T22-GFP-H6** nanocarrier allowed us to detect a high and **CXCR4-dependent internalization**, especially in the AN3CA cell line, without associated cytotoxicity. Moreover, in our **subcutaneous model**, more than **60%** of the total injected T22-GFP-H6 dose was uptaken by

SUMMARY

CXCR4⁺ cells in the **tumor**, reaching its peak after 5 hours from administration. Non-tumor organs showed no histopathological alterations or nanoparticle accumulation.

Besides, a **screening** of multiple **nanoparticles** carrying different therapeutic agents identified those incorporating bacterial toxins, **T22-DITOX-H6** and **T22-PE24-H6**, as the ones exerting a **higher cytotoxic effect** in CXCR4⁺ AN3CA cell line, with an IC₅₀ in the nanomolar range. This effect was **CXCR4-dependent** and mediated by **apoptosis** induction, a cell death mechanism that was also confirmed in our **subcutaneous model** after the intravenous administration of the nanotoxins. In addition, the repeated administration of both nanotoxins in the same model, achieved **inhibition of tumor growth**, leading to increased mice **survival** in the **absence of side toxicity** or nanoparticle accumulation in non-tumor organs.

Finally, we used **T22-DITOX-H6**, which showed the **highest antitumor effect**, on a repeated dose schedule, to assess its antimetastatic effect on our **orthotopic CXCR4⁺** model. This nanotoxin **inhibited the development** of peritoneal, lymph node, liver and lung **metastasis**. Regarding hematogenous metastasis, it dramatically reduced both the number and the area of metastatic foci in liver, as well as the percentage of the area occupied by metastatic cells in the lung. This powerful antitumor effect was exerted at a low dosage (5 µg q3d x 14 doses), **without systemic toxicity**.

To summarize, our nanoparticle **T22-DITOX-H6** shows many **advantages** over other oncological therapies, including its **active targeting** to CXCR4⁺ cells, its **nanometric size** (preventing it from renal and hepatic clearance), and its **proteic nature** (which avoids proteic corona formation in blood and loss of targeting), as well as its unique **mechanism of action** (inhibiting protein synthesis). All of these nanoparticle properties lead to a **high antineoplastic effect** in the **absence of systemic toxicity**, as we have shown using our newly developed CXCR4⁺ EC mice models. We believe that this nanoparticle could represent an **excellent therapeutic approach** for CXCR4⁺ EC patients in advanced stages, with high risk of progression or recurrent tumors, once its proper preclinical development has been completed, since no effective treatments are currently available.

I. INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER DE ENDOMETRIO

1. 1. Introducción general

El **cáncer de endometrio** (CE) se presenta como un crecimiento anormal y descontrolado de las células epiteliales que forman el endometrio, la capa más interna del útero.

El **útero** es el órgano hueco donde crece y se desarrolla el feto. Está situado en la pelvis femenina y unido a los ovarios a través de las trompas de Falopio, formando así parte del sistema reproductor femenino. Sirve como **fuentes hormonal**, autocrina y paracrina, por lo que la presencia de receptores hormonales en las diferentes capas que lo forman es variable a lo largo del ciclo menstrual. Está formado por dos estructuras: el **cuello del útero**, más estrecha y de unión a la vagina, y el **cuerpo del útero**, la parte más ancha, cuya pared está compuesta por tres capas (**Figura 1.A.**)¹:

- La **tunica serosa** o perimetrio es el peritoneo visceral, la capa serosa externa. Su extensión en la parte lateral constituye el ligamento ancho, que conecta ambas caras del útero con las paredes y el suelo de la pelvis.
- La **tunica muscularis** o **miometrio** está compuesta a su vez por tres capas de músculo liso poco diferenciadas entre sí: una capa longitudinal, una circular muy vascularizada, y una fina capa de paquetes musculares.
- La **tunica mucosa** o **endometrio** es la capa más interna, compuesta por **células epiteliales endometriales** secretoras de glucógeno dispuestas en **glándulas**, y **células estromales**, las cuales aumentan durante la gestación dando lugar a las células deciduales. Todas ellas embebidas en tejido conectivo, coexisten con una amplia variedad de células del sistema inmune, especialmente en la fase menstrual². A su vez, el endometrio se diferencia en dos capas: la **capa funcional** superficial, compuesta por epitelio columnar con glándulas secretoras, sensible a estímulos hormonales, y la **capa basal**, más profunda y vascularizada, que regenera la capa funcional superficial tras cada menstruación³.

En el endometrio sano, los **estrógenos** (particularmente, la estrona y el 17 β -estradiol, conocidos como E1 y E2 respectivamente) juegan un **papel mitógeno**, impulsando el crecimiento del tejido como parte de la anticipación del embarazo durante el ciclo menstrual, en concreto durante la fase folicular tardía. Por el contrario, la segunda ola de estrógenos, que tiene lugar durante la fase lútea media y tardía, no induce la proliferación de células endometriales. Esto se debe a la presencia de progestágenos, particularmente la progesterona, que inhibe el crecimiento del

INTRODUCCIÓN

endometrio y provoca su transición a un estado receptivo, preparándose para la implantación del blastocisto^{3,4} (Figura 1.B.).

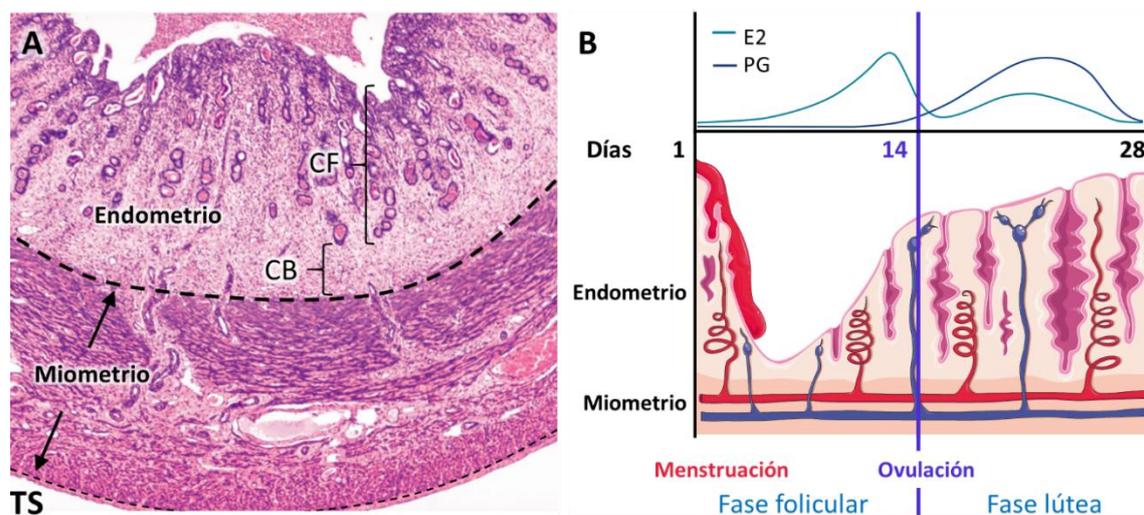


Figura 1. Histología del útero y esquema de los cambios hormonales e histológicos durante el ciclo menstrual. A. Corte histológico de útero humano en fase proliferativa teñido con hematoxilina-eosina. CF: capa funcional. CB: capa basal. TS: tunica serosa. Adaptada de⁵. B. Niveles de estrógenos y progesterona y estado del endometrio durante las distintas fases del ciclo menstrual. E2: 17β-estradiol. PG: progesterona.

El equilibrio entre estrógenos y progesterona a menudo está dominado por los estrógenos, de modo que, si sus niveles son altos y no son contrarrestados por la progesterona, aumenta la proliferación celular, influyendo así en los primeros estadios de la formación del CE, como se ha observado en modelos animales^{6,7}.

1. 2. Epidemiología

El CE es el más frecuente de los tumores infiltrantes del tracto genital inferior femenino, y el tercer cáncer más prevalente entre las mujeres europeas, tras el de mama y el colorrectal. A nivel global, es la sexta neoplasia más frecuente en mujeres, la segunda ginecológica tras el cáncer de cérvix. En 2018 se diagnosticaron más de 380.000 nuevos casos y se registraron alrededor de 90.000 muertes⁸. En España, su tasa de incidencia en 2018 fue de casi 29 casos por cada 100.000 mujeres. Según la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (OMS), ese mismo año fue el cáncer del tracto genital con mayor incidencia en nuestro país, y con una tasa de mortalidad en mujeres semejante a la de la leucemia (Tabla 1)⁹.

Tabla 1. Número de casos nuevos y tasa de incidencia y mortalidad de los diez cánceres principales en mujeres en España en 2018. Adaptada de GLOBOCAN, 2018⁹.

Incidencia			Mortalidad		
Cáncer	Número	Tasa cruda	Cáncer	Número	Tasa cruda
Todos los cánceres	114.392	483,9	Todos los cánceres	44.665	188,9
Mama	32.825	138,8	Colorrectal	6.645	28,1
Colorrectal	14.428	61,0	Mama	6.421	27,2
Pulmón	6.914	29,2	Pulmón	5.337	22,6
Endometrio	6.784	28,7	Páncreas	3.571	15,1
Páncreas	3.777	16,0	Estómago	2.196	9,3
Tiroides	3.764	15,9	Ovario	2.123	9,0
Linfoma no Hodgkin	3.751	15,9	Hígado	1.697	7,2
Vejiga	3.475	14,7	Leucemia	1.685	7,1
Ovario	3.427	14,5	Endometrio	1.660	7,0
Melanoma	3.091	13,1	Cerebro, SNC	1.451	6,1

*SNC: Sistema nervioso central. Tasa cruda: número de casos por cada 100.000 mujeres

Su tasa de incidencia y mortalidad es mayor en los países **desarrollados (Figura 2)**, con 14,7 casos y 2,3 muertes por cada 100.000 mujeres⁹. En estos países, la supervivencia a 5 años es del 80%¹⁰, aunque **disminuye** drásticamente si existen metástasis regionales o distales, siendo del 56% y del 20% respectivamente^{11,12}. Por tanto, el **factor pronóstico** más importante en el CE es **la extensión de la enfermedad** en el momento del diagnóstico¹³.

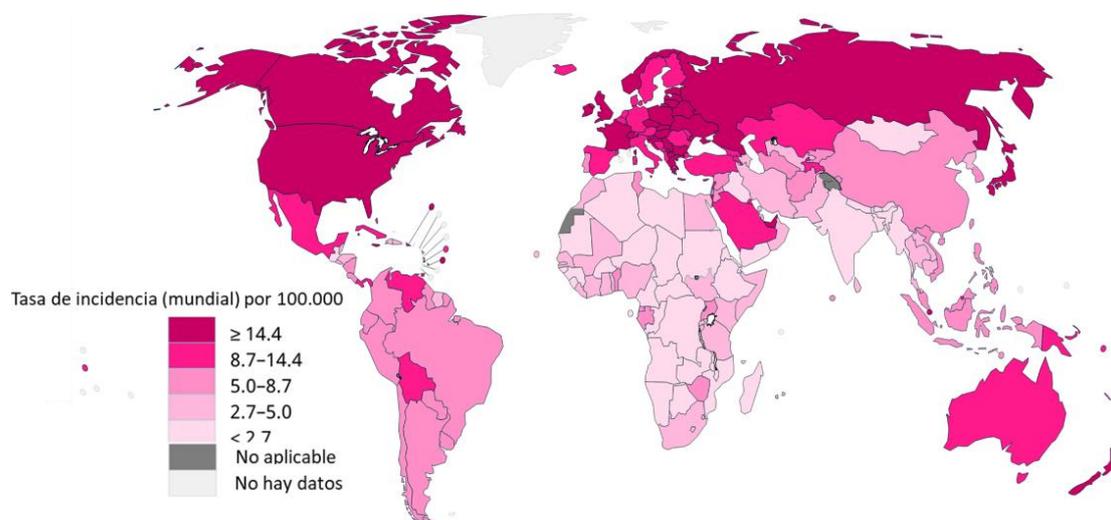


Figura 2. Tasa estimada de incidencia estandarizada por edad del cáncer de endometrio a nivel global por cada 100.000 mujeres en el año 2018. Adaptada de GLOBOCAN 2018⁹.

INTRODUCCIÓN

Más del 90% de los casos de CE ocurren en mujeres mayores de 50 años, siendo la edad media de diagnóstico de 63 años, afectando mayoritariamente a mujeres peri y postmenopáusicas^{12,14}. Sin embargo, en un 14% de los casos se da en mujeres en edad reproductiva¹⁵, y alrededor del 5% de las pacientes son menores de 40 años^{16,15}. En los últimos años, la **incidencia del CE ha aumentado** a la par que la esperanza de vida, la obesidad y sus patologías asociadas como diabetes e hipertensión¹⁷. Este aumento ha ocurrido de manera especialmente drástica en mujeres jóvenes en los últimos 10 años como resultado del desarrollo temprano de obesidad¹⁸.

1. 3. Etiopatogenia y factores de riesgo

Aunque la etiología del CE no está clara, ha sido posible identificar varios factores que influyen en el desarrollo de esta neoplasia.

a. Factores hormonales

El factor más asociado a una mayor incidencia de CE es la **exposición a estrógenos sin la adecuada oposición** de progesterona. Los estrógenos aumentan el grosor del endometrio al activar la proliferación de sus células e inhibir su apoptosis (a través, entre otros mecanismos, de la modulación de las funciones de genes supresores tumorales). Esta proliferación descontrolada aumenta el riesgo de errores en la replicación del ADN y mutaciones al azar. Todos estos cambios pueden dar lugar a la **hiperplasia del endometrio** y, por tanto, a CE¹⁹.

Con respecto a la **exposición a estrógenos endógenos**, las situaciones fisiológicas en las cuales existe una mayor exposición a estrógenos son las siguientes:

- La **edad**: los estrógenos tienen un efecto prolongado después de la menopausia debido a la desaparición de la progesterona que equilibraba sus niveles, producida por los ovarios. Esto explica que el CE afecte especialmente a mujeres de alrededor de 65 años²⁰.
- La **menarquía** precoz y la **menopausia** tardía se han relacionado en múltiples estudios con el riesgo de padecer CE²¹. Cuando la menstruación se presenta durante un tiempo mayor a 39 años, el riesgo es 4,2 veces superior que si se presenta durante menos de 25 años²⁰.
- La **nuliparidad** también se asocia con un incremento del riesgo del CE, así como la **infertilidad**, al no tener embarazo ni lactancia; el riesgo disminuye a medida que aumenta el número de hijos por disminución del número de ciclos menstruales²².

- El **síndrome de ovarios poliquísticos** es una alteración ovulatoria que se caracteriza por un déficit de progesterona, por lo que estas mujeres, especialmente las jóvenes, tienen 3 veces más riesgo de desarrollar CE²³. De forma relacionada, el tratamiento con anticonceptivos hormonales ejerce una protección en el riesgo de desarrollar CE, que dura varios años después de haber abandonado el tratamiento²⁵.

Los **estrógenos exógenos** suelen ser utilizados como tratamiento para la menopausia o el cáncer de mama, e inciden sobre el riesgo de desarrollar CE de las siguientes maneras:

- La **terapia estrogénica**, empleada para reducir los síntomas de la menopausia, se ha asociado con un aumento de la incidencia de hiperplasia de hasta el 50% tras un año de su uso sin progesterona y aumenta el riesgo de CE 5 veces, al retrasar la edad de la menopausia. El riesgo es proporcional a la dosis y duración del tratamiento²⁶.
- El **tamoxifeno** es un modulador selectivo de los receptores de estrógenos. A pesar de que en cáncer de mama bloquea la acción de los estrógenos, resultando ser un tratamiento efectivo, en el endometrio estimula su desarrollo, lo que incrementa el riesgo de desarrollar patología endometrial, tanto benigna (pólipos e hiperplasia) como maligna, y de los tipos de CE más agresivos²⁷.

b. Factores metabólicos

La **obesidad** en mujeres postmenopáusicas está asociada con el desarrollo de hiperplasia endometrial y CE en países occidentales¹⁵. Esto se debe a una mayor conversión de precursores adrenales en E1 y E2 en el tejido adiposo. Los elevados niveles de **enzimas aromatasas** presentes en este tejido convierten en estrógenos los andrógenos producidos en la corteza adrenal y en los ovarios postmenopáusicos. Por otro lado, la acumulación de grasa está asociada con altos niveles del factor de necrosis tumoral α (*Tumor Necrosis Factor α* , TNF- α), que estimula la síntesis de estrógenos *de novo*²⁹. Además, la obesidad está relacionada con altos niveles de insulina y de IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*), que son ligandos en la vía de señalización de la fosfoinositol 3-quinasa (*Phosphatidyl Inositol 3-Kinase*, PI3K), pudiendo activarla y estimular procesos de proliferación y supervivencia celular²⁹.

También se ha descrito la relación entre el CE y otros factores metabólicos como la **hipertensión arterial** y la **diabetes mellitus**, acentuando además el riesgo en las pacientes obesas^{30,31}.

INTRODUCCIÓN

c. Factores hereditarios

El componente hereditario representa solo el 5-10% de los casos de CE, y parece estar asociado a un mayor riesgo en mujeres jóvenes, de edad inferior a los 50 años^{32,33}.

El **síndrome de Cowden** es una enfermedad rara autosómica dominante que forma parte de un grupo de patologías denominado “síndrome tumoral hamartomatoso asociado a *PTEN*”, con mutaciones germinales del gen supresor *PTEN*, cuyas pacientes muestran un riesgo elevado de desarrollarm tumores de mama, tiroides, colorrectales, piel y endometrio (14%)³⁴.

El **síndrome de Lynch**, también denominado “cáncer colorrectal hereditario no polipósico”, es también una enfermedad autosómica dominante. Afecta a alguno de los genes reparadores del ADN (*mismatch repair*), en el 95% de los casos MLH1, MLH2 o MSH6. Debido a que la función de estos genes consiste en eliminar los errores producidos durante la replicación del ADN, su disfunción da lugar a inestabilidad de microsatélites (IMS). Aunque la IMS también se encuentra presente en el 15-25% de los cánceres esporádicos, en los tumores asociados a Lynch se observa en más del 60% de los casos³⁵. Los tumores más frecuentes de este síndrome son el cáncer de colon y el de endometrio, el cual en estas pacientes se produce en una edad más temprana que en la población general³⁶.

d. Factores ambientales

Tanto el **ejercicio físico** como el consumo de **tabaco** han demostrado tener un efecto antiestrogénico y, por tanto, **protector** del desarrollo de CE. Este efecto puede estar relacionado con la absorción y el metabolismo hormonal, así como con la pérdida de peso^{37,38}.

2. DIAGNÓSTICO, ESTADIAJE Y CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO

El **cribado** rutinario en la población general del CE para su detección precoz no está contemplado salvo en casos de **Síndrome de Lynch**, que ya poseen un riesgo del 27-71% de padecer esta neoplasia. En ellas se realiza un estudio periódico con biopsia endometrial, considerando la posibilidad de realizar una cirugía profiláctica^{39,40}.

En el resto de las pacientes, el estudio se iniciará a partir del descubrimiento de los primeros **síntomas**. La evaluación del endometrio está indicada ante todo sangrado vaginal (metrorragia) en mujeres mayores de 40 años, y en menores de 40 años cuando existan factores de riesgo⁴¹. Si bien el tratamiento con estrógenos y la atrofia endometrial o vaginal, así como la presencia de pólipos cervicales o endometriales, son condiciones que generan metrorragia de forma benigna, este sangrado sí que se asocia con CE en hasta un 15% de los casos⁴².

Aunque las **citologías cervicovaginales** no son pruebas específicas para el diagnóstico de este tipo de cáncer, en el 50% de las pacientes de CE se hallan células anormales. La presencia de células endometriales, la atipia de células glandulares o la presencia de células compatibles con adenocarcinoma obligan a realizar un estudio en la cavidad endometrial.

Tras la realización del examen pélvico habitual, en el cual generalmente no se ven anormalidades en forma, tamaño y consistencia del útero a menos que el estadio sea avanzado, en el estudio de la metrorragia postmenopáusica es fundamental llevar a cabo una **ecografía transvaginal**. En ella se valoran diversos parámetros respecto al endometrio: su grosor, morfología, vascularización e infiltración miometrial y cervical, pero su especificidad es del 61%, por lo que es necesario complementarla con biopsia en caso de pacientes asintomáticas para evitar los falsos negativos⁴³. La **biopsia endometrial** tiene una sensibilidad cercana al 90% y puede realizarse de forma dirigida bajo por histeroscopia en quirófano o bien por aspiración (aunque en este caso pueden producirse falsos negativos por tomar una cantidad de muestra insuficiente)⁴⁴. Esta prueba debe informar tanto del tipo histológico como del grado de diferenciación. Finalmente, en la última década se desarrolló un kit de diagnóstico molecular, **GynEC-Dx**, capaz de detectar la presencia de una combinación de 20 genes asociados al cáncer de endometrio en aspirado endometrial, con un valor predictivo negativo del 99%, una sensibilidad del 92% y una especificidad del 96%^{45,46}.

Para conocer la invasión del miometrio y la afectación del cérvix, la prueba más sensible es la **resonancia magnética**, en comparación con la tomografía computerizada y la ecografía

INTRODUCCIÓN

transvaginal⁴⁷; también es la mejor prueba de imagen para el estudio de la afectación ganglionar, aunque su sensibilidad es menor.

Con respecto a la **evaluación de los ganglios linfáticos** pélvicos, es necesaria para recomendar la terapia coadyuvante con radio y/o quimioterapia, y provee importante información pronóstica. En casos seleccionados, se lleva a cabo mediante **linfadenectomías** pélvicas y paraaórticas; no obstante, en la última década se ha demostrado que el **mapeo de los ganglios centinela** por contraste permite la evaluación rigurosa de la posible infiltración a ganglios proximales en tumores aparentemente confinados al útero, permitiendo al cirujano identificar las vías linfáticas del útero, y aumentando la probabilidad de encontrar metástasis⁴⁸.

En este sentido, la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (**FIGO**) desarrolló en 1958 un sistema de clasificación y **estadaje**, que se actualiza periódicamente para mejorar su reproducibilidad y precisión, otorgando información muy relevante para evaluar la diseminación tumoral. Esta clasificación emplea un estadaje quirúrgico independiente del grado histológico^{49,50}, para el que se tiene en cuenta el tamaño y la localización del tumor, su extensión a órganos anejos (trompas de Falopio y ovarios), profundidad de la invasión miometrial y cervical, la invasión del espacio linfovascular y el estado de los ganglios linfáticos. Por el contrario, el **estadaje TNM** se basa en la clasificación clínica y/o patológica (**Tabla 2, Figura 3**)⁵¹.

Tabla 2. Estadaje actual del CE según la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, junto con la clasificación TMN y la supervivencia asociada a cada estadio. Adaptada de^{11,50,51}.

Clasificación TMN	Estadio FIGO		Supervivencia a 5 años (%)
TX		Tumor primario que no puede ser evaluado	
T0		Sin evidencias de tumor primario	
T1	I	Tumor confinado al cuerpo uterino	
T1a	IA	Ausencia de invasión miometrial, o menor del 50%	90
T1b	IB	Invasión miometrial mayor del 50%	78
T2	II	Invasión del estroma cervical pero no más allá del útero	74
T3	III	Diseminación local o regional	
T3a	IIIA	Invasión de la serosa del cuerpo uterino y órganos anejos	56
T3b	IIIB	Afectación vaginal y/o parametrial	36
N1, N2	IIIC	Afectación metastática de ganglios pélvicos y/o paraaórticos	
N1	IIIC1	Ganglios pélvicos positivos	57
N2	IIIC2	Ganglios paraaórticos positivos independientemente de los pélvicos	48
T4	IV	Invasión de la mucosa vesical y/o rectal, y/o metástasis distales	
M0	IVA	Invasión de vejiga y/o recto	22
M1	IVB	Metástasis distales, incluyendo intraabdominales y/o en ganglios inguinales	21

2. 1. Clasificación tradicional o dualista

El carcinoma de endometrio se ha diagnosticado clásicamente en base a su morfología. Así, de acuerdo a Bokhman y de forma tradicional, se clasifica en dos amplios tipos (**Tabla 3**)⁵²:

Tabla 3. Clasificación de Bokhman, dualista o tradicional, del cáncer de endometrio. Adaptada de⁵².

Características	Tipo I	Tipo II
Edad	Pre-perimenopáusica	Postmenopáusicas
Prevalencia	80-90%	10-20%
Estadio en el diagnóstico	Temprano	Avanzado
Relación con hiperestrogenismo	Sí	No
Lesión precursora	Hiperplasia endometrial	—
Progresión	Lenta	Rápida
Pronóstico	Bueno	Malo

- **Tipo I o endometriode:** representa alrededor del 80% de los cánceres endometriales⁴⁹ y está relacionado con un estado hiperestrogénico. Por este motivo, se asocia a factores de riesgo tales como la obesidad, anovulación, nuliparidad y tratamiento con estrógenos exógenos no compensado con progesterona. Se desarrolla en mujeres peri y postmenopáusicas relativamente jóvenes, con expresión de receptores de estrógeno y de progesterona, por lo que se considera que su precursor histológico es la hiperplasia endometrial, con o sin atipia. Suelen diagnosticarse en estadios iniciales y bajo grado, y tienen buen pronóstico.
- **Tipo II no endometriode:** sin relación con estímulos hormonales, son menos frecuentes representando alrededor del 20% de los casos. Aparece en mujeres de mayor edad, generalmente sobre una base de endometrio atrófico. En estos casos, suelen diagnosticarse en estadios más avanzados, presentando diseminación temprana y un peor pronóstico⁵³.

INTRODUCCIÓN

Tabla 4. Relación de las clasificaciones tradicional e histológica del cáncer de endometrio.

Clasificación tradicional	Clasificación histológica
Tipo I Relacionado con estrógenos	Adenocarcinoma endometriode
Tipo II No relacionado con estrógenos	Carcinoma seroso Adenoarcinoma de célula clara Carcinoma indiferenciado y desdiferenciado Adenocarcinoma mixto
Otros tipos	Carcinoma escamoso Carcinoma mucinoso de tipo gastrointestinal Adenocarcinoma mesonéfrico y <i>mesonefric-like</i>

Esta clasificación es interesante desde el punto de vista patogenético, pero en ocasiones difícil de aplicar en la clínica, ya que el CE incluye mecanismos patogénicos muy heterogéneos que deben ser que sean reflejados en los sistemas de clasificación, presentando características intermedias entre los tipos I y II. Por este motivo, la más empleada es la **clasificación histológica** (Tabla 4), aunque la caracterización y **clasificación molecular** de los tumores de CE está ganando cada vez mayor importancia.

2. 2. Clasificación histológica

La **OMS** ha clasificado tradicionalmente los diferentes CE en base a su histología y características celulares⁵¹. Sin embargo, en su nueva clasificación, incluye nuevos tipos tumorales, definidos a partir de la integración de las **características microscópicas y las moleculares**, como aproximación para optimizar la estratificación de las pacientes y predecir su pronóstico.

De esta manera, los diferentes tipos histológicos de CE descritos en la actualidad son los siguientes:

Carcinoma endometriode

Corresponde al CE de tipo I en la clasificación de Bokhman, y representa alrededor del **80% de todos los CE**. Se trata de un adenocarcinoma en el endometrio, que muestra típicamente una **arquitectura similar a la del endometrio sano**, glandular o villoglandular, formada por un epitelio columnar estratificado con una arquitectura compleja y ramificada. Las células alineadas suelen ser columnares y comparten el borde apical con las células adyacentes, lo

que resulta en un lumen glandular. Las células neoplásicas presentan un **citoplasma eosinofílico y granular**, y una **atipia nuclear de leve** a moderada, salvo en carcinomas mal diferenciados; el índice mitótico es variable ⁵¹. Por otro lado, las **proliferaciones endometriales** pueden presentar una variedad de tipos epiteliales diferenciados, como células escamosas, mucinosas, ciliadas o eosinófilas, y variaciones arquitecturales, incluyendo formaciones papilares. Cuando estas variedades predominan en un adenocarcinoma endometrioide, éste se denomina “variante especial”: variante con diferenciación escamosa, variante villoglandular, variante de células ciliadas y variante secretora ⁵⁴.

De esta manera, en este subtipo se incluye un **amplio espectro de diferenciación histológica**, que se valora con el **grado nuclear y arquitectural**, y define la **agresividad** histológica del tumor.

Su **grado histológico** depende principalmente de su arquitectura:

- **Grado 1:** adenocarcinoma con un patrón glandular reconocible y un 5% o menos de crecimiento sólido (**Figura 3.A.**).
- **Grado 2:** glándulas bien formadas con láminas sólidas de células neoplásicas intercaladas, con entre 6 y 50% de crecimiento sólido.
- **Grado 3:** con más del 50% de crecimiento sólido, glándulas prácticamente irreconocibles y células tumorales con atipia nuclear y elevada actividad mitótica (**Figura 3.B.**).

La presencia de núcleos de grado 3 que involucren más del 50% del tumor está asociado con un comportamiento más agresivo, y por tanto justifica el aumento en un punto en el grado histológico ⁵⁷.

Carcinoma seroso

Es el tipo de CE no endometrioide más frecuente. Su **arquitectura es papilar, compleja**, con papilas primarias, secundarias y terciarias que se presentan con un centro fibrovascular y en el 30% de los casos, contienen **cuerpos de Psammoma** (calcificaciones concéntricas laminadas). Las células son predominantemente redondeadas en lugar de columnares, y frecuentemente multinucleadas (**Figura 3.C.**). Los **núcleos** pierden la orientación perpendicular a la membrana basal, localizándose en la zona apical y siendo **poco diferenciados, grandes**, y con **nucleolos eosinófilos**. Las **mitosis** son numerosas, y generalmente **atípicas** y aberrantes. También hay nidos celulares y focos de necrosis.

INTRODUCCIÓN

Al contrario que los adenocarcinomas endometrioides, los de tipo seroso siempre se consideran de **alto grado**⁵¹ y suelen diagnosticarse en **estadios avanzados**. Aunque si el tumor está confinado al endometrio el pronóstico es excelente, cualquier difusión extrauterina casi siempre resultará en recurrencia y muerte. De hecho, aunque este subtipo se diagnostica en menos del 10% de todas las pacientes, es responsable del 40% de las muertes por CE⁵¹.

Carcinoma de célula clara

En este caso, las células son poligonales o con forma de clavo, con un **citoplasma claro** o (menos frecuentemente) eosinófilo y ocasionalmente granular, organizadas en **patrones** papilares, túbulo-quísticos, sólidos o mixtos. La **atipia** nuclear es de alto grado, al menos de forma focal, y el índice mitótico es, generalmente, alto. Este tipo tumoral es poco común (menos del 10% de los casos)⁵¹, y tiene peor pronóstico que el endometrioide, pero no que el seroso en el mismo estadio. Suele ser diagnosticado en estadios avanzados en pacientes mayores⁵⁴.

Carcinoma indiferenciado y desdiferenciado

El carcinoma endometrial **indiferenciado** es una neoplasia epitelial sin diferenciación celular evidente (**Figura 3.D.**). El carcinoma **desdiferenciado** está formado por un componente de carcinoma indiferenciado y un componente diferenciado, habitualmente un carcinoma endometrioide de grado 1 o 2, cuya proporción puede variar; la interfase entre los dos componentes puede ser abrupta o mezclada. En la mayoría de los casos, forman grandes masas polipoides, intraluminales, con frecuencia necróticas. Aunque representan menos del 2% de los casos de CE, suelen ser tumores altamente agresivos, con recurrencia o mortalidad en el 55-95% de los casos⁵¹.

Carcinoma mixto

Compuesto por una **mezcla de carcinomas** de dos o más tipos histológicos, donde al menos uno de ellos es seroso o de célula clara, por lo que puede haber características superpuestas y cierta ambigüedad molecular. Los más habituales presentan componentes endometrioide y seroso, que representan el 10% de los carcinomas de endometrio. El comportamiento de estos tumores está dictado por el componente de mayor grado, de modo que se consideran de grado alto independientemente de los porcentajes relativos de carcinoma seroso o de célula clara⁵¹.

Carcinoma escamoso

Compuesto exclusivamente por células con **diferenciación escamosa** y muestran características típicas de los carcinomas escamosos en otras localizaciones, pero pueden tener una **aparición engañosamente blanda**, compuesta de **epitelio glucogenado** y con un frente de **invasión** amplio. Están relacionados con **condiciones inflamatorias crónicas**, piometra prolongada e ictiosis uterina. Constituyen el 0,5% de los carcinomas endometriales, y su agresividad depende del estadio ⁵¹.

Carcinoma mucinoso de tipo gastrointestinal

Este carcinoma es extremadamente **infrecuente**, con características mucinosas gástricas o gastrointestinales. Está formado por **glándulas epiteliales secretoras de mucina**. Los **núcleos** son generalmente de **bajo grado** y su comportamiento también depende del estadio en el momento del diagnóstico ⁵¹.

Adenocarcinoma mesonéfrico y mesonefric-like

El adenocarcinoma **mesonéfrico** es un adenocarcinoma originado a partir de restos mesonéfricos, por lo que pueden originarse en la pared uterina. Se trata de tumores muy **infrecuentes**, y negativos para receptores hormonales. En el caso del “**mesonefric-like**”, es un adenocarcinoma similar a la diferenciación mesonéfrica, que representan el 1% de los carcinomas de endometrio. Se trata de subtipos tumorales **recientemente** descritos; los pocos datos de los que se dispone indican que su comportamiento es agresivo ⁵¹.

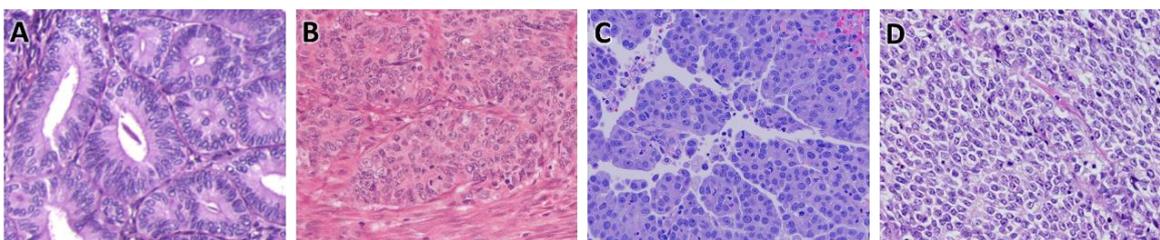


Figura 3. Histopatología de varios tipos de carcinoma de endometrio. A. Endometrioides de bajo grado. B. Endometrioides de alto grado. C. Seroso. D. Indiferenciado. Adaptada de ^{51,58}.

INTRODUCCIÓN

2. 3. Clasificación molecular

También como respuesta a las limitaciones derivadas de la **falta de precisión de la clasificación** dualista, ya que no contempla la heterogeneidad molecular del CE, la red de investigación de **The Cancer Genome Atlas** (TCGA) propuso una nueva clasificación, independiente de la histológica. A través de la integración de técnicas de genómica, transcriptómica y proteómica, se caracterizaron molecularmente 373 casos y se describieron cuatro subtipos moleculares, (**Figura 4**), identificando también similitudes con otros tipos de cáncer ^{59,60}:

- **Grupo 1 o POLE (ultramutado) (7%)**: con mutaciones somáticas inactivantes en el dominio exonucleasa de la ADN polimerasa ϵ (*POLymerase Epsilon*, POLE) y altas tasas de mutación (232×10^6 mutaciones/Mb), que tienen lugar en *PTEN* (94%), *PIK3CA* (71%), *PIK3R1* (65%), *FBXW7* (82%), *ARID1A* (76%), *KRAS* (53%), y *ARID5B* (47%). Este grupo incluye carcinomas endometrioides de bajo y alto grado. Aunque la mayor proporción son de grado 3, los tumores de este grupo están asociados a un buen pronóstico.
- **Grupo 2 o de inestabilidad de microsatélites (28%)**: con IMS, frecuente hipermetilación del promotor de MLH1 y altas tasas de mutación (18×10^6 mutaciones/Mb) y mutaciones en *PTEN* (88%), *RPL22* (33%), *KRAS* (35%), *PIK3CA* (54%), *PIK3R1* (40%), y *ARID1A* (37%). También suelen ser carcinomas endometrioides, en este caso de alto grado; su pronóstico es intermedio.
- **Grupo 3 o de bajo número de copias (39%)**: en este caso con baja alteración en el número de copias, tienen una baja tasa de mutación ($2,9 \times 10^6$ mutaciones/Mb), con mutaciones en *PTEN* (77%), *CTNNB1* (52%), *PIK3CA* (53%), *PIK3R1* (33%), y *ARID1A* (42%). Suelen ser endometrioides de cualquier grado histológico, o con histologías mixtas. Su pronóstico también es intermedio.
- **Grupo 4 o de alto número de copias y mutaciones en TP53 o serous-like (26%)**: muestra bajas tasas de mutación ($2,3 \times 10^6$ mutaciones/Mb), pero frecuentes **mutaciones en TP53** (92%), *PPP2R1A* (22%) y *PIK3CA* (47%). También tienen inestabilidad cromosómica, con amplificaciones recurrentes (*MYC*, *ERBB2*, *CCNE1*, *FGFR3*, *SOX17*). Este tipo molecular está asociado con CE de tipo seroso (94%), mixto (62%) y endometrioide de alto grado (12%). Presenta el peor pronóstico.

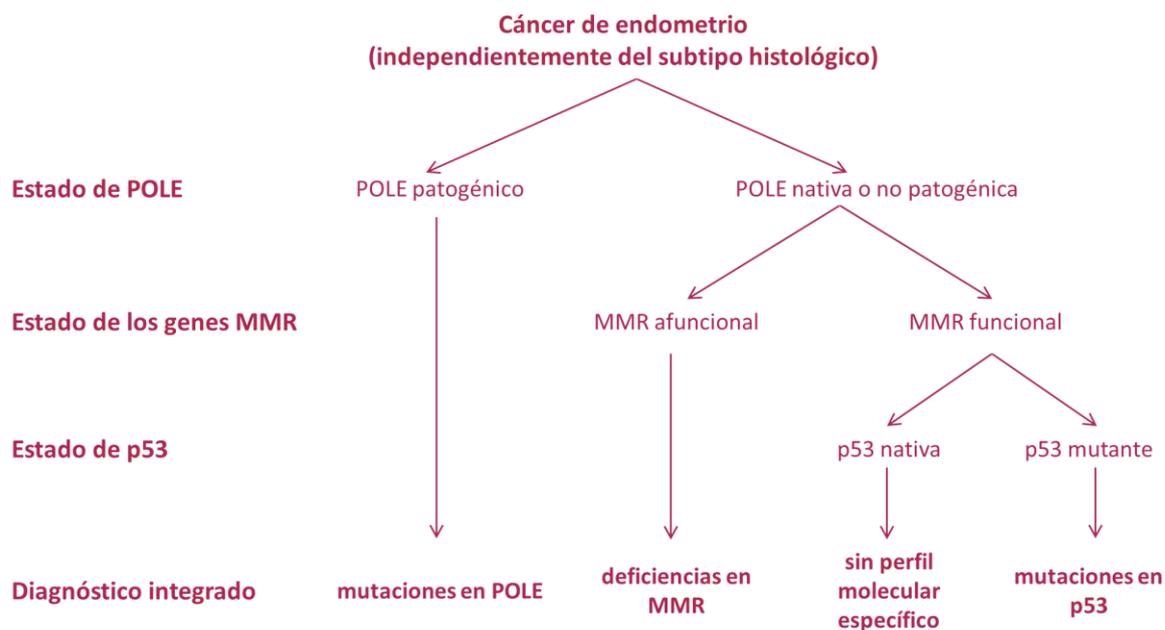


Figura 4. Algoritmo diagnóstico para la clasificación histomolecular integrada del cáncer de endometrio, aplicable a todos los tipos histológicos. Las deficiencias en MMR se definen por la pérdida de una o más proteínas de MMR (MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6). MMR: *mismatch repair*. Adaptada de ⁵¹.

Debido a que esta clasificación es independiente de la histología tumoral, los datos moleculares obtenidos demostraron que alrededor del 25% de los tumores clasificados como **endometrioides de alto grado** tenían **similitudes** con carcinomas **serosos**, incluyendo mutaciones en *TP53* y alto número de copias ⁶⁰. **Profundizar en la caracterización** de los diversos subtipos de CE tendrá un impacto en la **elección de la terapia** de las pacientes y permitirá el desarrollo de tratamientos personalizados.

INTRODUCCIÓN

3. PROGRESIÓN TUMORAL Y RIESGO DE RECURRENCIA DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO

Además del CE, existen otras **lesiones uterinas**, tanto benignas (pólipos endometriales, leiomiomas, entre otras) como malignas, relacionadas con desequilibrios hormonales ⁶¹, como es el caso de la **hiperplasia endometrial**. Se trata de un crecimiento anormal del endometrio, con un aumento en la ratio glándula/estroma mayor de 1. Implica múltiples grados de complejidad y características celulares y nucleares atípicas, por lo que las hiperplasias endometriales se han clasificado tradicionalmente según el patrón arquitectónico simple o complejo de las glándulas endometrioides, y la presencia o ausencia de atipia nuclear (núcleos grandes y redondeados, pérdida de polaridad) ⁶². No obstante, **recientemente la OMS ha simplificado esta clasificación**, distinguiendo únicamente entre la hiperplasia endometrial sin atipia y la hiperplasia endometrial atípica o neoplasia intraepitelial endometrial ⁵¹.

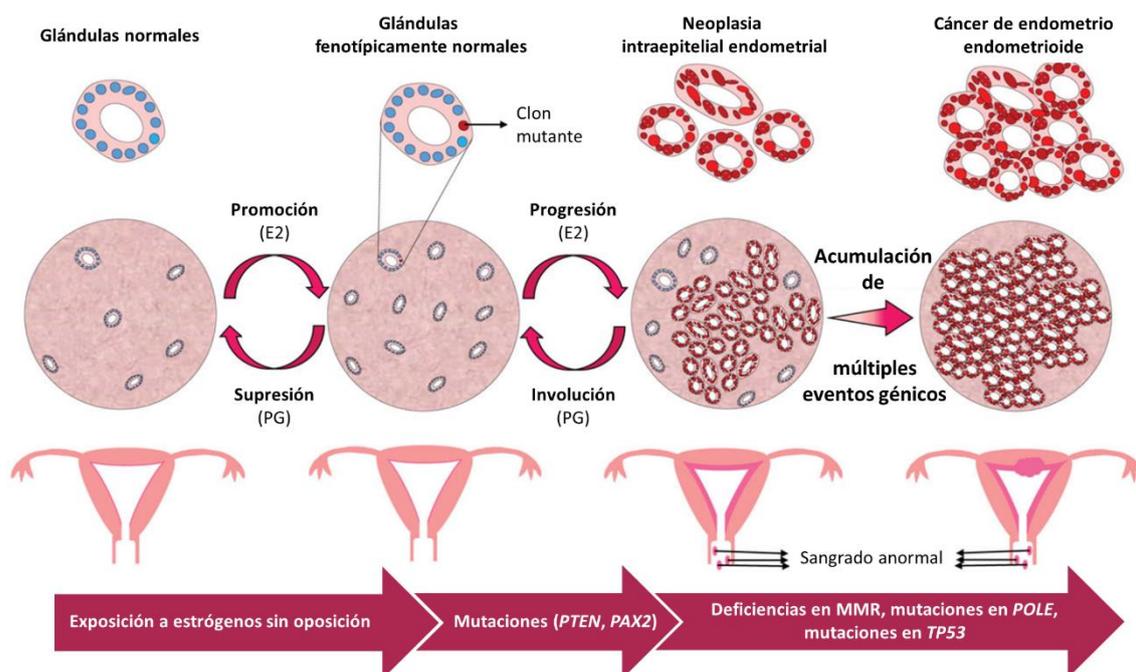


Figura 5. Diagrama de un mecanismo propuesto para el desarrollo y progresión de la neoplasia intraepitelial endometrial. El endometrio está expuesto a estrógenos (E2) sin oposición de progestinas (PG), los cuales inducen la proliferación de las glándulas endometriales, dando lugar a hiperplasia endometrial. En pacientes con riesgo, es posible que se desarrolle un clon mutante, fenotípicamente normal, pero progresa debido a los estrógenos. Por acumulación de defectos genéticos, aún no dilucidados, es posible que el clon mutante proliferara, dando lugar a una neoplasia intraepitelial endometrial, que puede ser diagnosticada mediante tinción de hematoxilina-eosina. La paciente puede presentar síntomas de sangrado uterino anormal y un endometrio engrosado. Si se continúan acumulando daños genéticos, la lesión puede progresar a cáncer de endometrio. Imagen adaptada de ⁶³.

Las **hiperplasias endometriales sin atipia** se generan como resultado de la exposición prolongada a estrógenos, sin la oposición adecuada de progesteronas, lo que da lugar a que las mujeres con este diagnóstico tengan 3-4 veces más riesgo de desarrollar CE. En el caso de la **neoplasia intraepitelial endometrial**, el hiperestrogenismo es un factor de riesgo, pero surge como una proliferación glandular clonal, que comienza como una lesión localizada y puede expandirse, ocupando la totalidad del compartimento endometrial (**Figura 5**). Entre un cuarto y un tercio de las mujeres con neoplasia intraepitelial endometrial serán diagnosticadas con CE durante el primer año después del diagnóstico. De hecho, en esta lesión ya se pueden observar muchas de las alteraciones genéticas observadas en CE, incluyendo IMS y mutaciones en *PTEN*, *KRAS* y *CTNNB1*⁵¹.

3. 1. Bases moleculares de la progresión tumoral en CE

El **desarrollo de un tumor** implica múltiples **cambios** genéticos, epigenéticos y funcionales en las células, modificándose la regulación de la expresión de genes y el metabolismo y la división celular. Las alteraciones génicas que dan lugar a los **oncogenes**, y aquellas en los genes supresores de tumor juegan un papel fundamental en el desarrollo del cáncer. La tumorigenicidad está promovida por la lesión en los **genes supresores**, cuya pérdida de función en los dos alelos permite el crecimiento tumoral mediante el escape de la muerte celular. En cuanto a los **proto-oncogenes**, están involucrados en procesos de crecimiento y mantenimiento de tejidos y órganos, estimulando la división celular, bloqueando la apoptosis y controlando la diferenciación celular. Las mutaciones de ganancia de función convierten a los proto-oncogenes en **oncogenes**. A nivel celular, los oncogenes actúan de manera **dominante**: un único alelo mutado es suficiente para alterar el fenotipo de la célula.

La estructura cromosómica se mantiene gracias a los **microsatélites**, situados en varios lugares del genoma. Se trata de **secuencias repetitivas** que constituyen la mitad de las secuencias del ADN no codificante (que incluye el 98,5% del total) en el ADN humano, y que están implicadas también en la evolución de genes y genomas⁶⁴. Son susceptibles de sufrir errores en la replicación, y cuando estas mutaciones se acumulan junto con defectos en el sistema de reparación del ADN (*mismatch repair*), que incluye proteínas como MLH1, MSH2, PMS2 y MSH6, se produce la **inestabilidad de microsatélites**. Dicha inestabilidad se observa hasta en el 20% de los carcinomas de endometrio de tipo I^{65,66}.

El gen alterado con mayor frecuencia en CE endometriode es **PTEN**, en el 83% de los cánceres y el 55% de las lesiones precancerosas⁶⁷. Se trata de un gen de tipo **supresor**: codifica para una

INTRODUCCIÓN

proteína con función tirosina quinasa (*Phosphatase and TENsin*, PTEN) de modo que cuando su actividad disminuye se produce un incremento de proliferación y supervivencia por la alteración de su papel en la vía de PI3K/AKT, así como la migración y diseminación celular. Por otro lado, Mig-6, codificada por el gen supresor **MIG-6** (*Mitogen-inducible gene 6*), promueve apoptosis celular a través de la *downregulación* de inhibidores de apoptosis inducidos por estrógenos y la inhibición de la fosforilación de ERK2⁶⁸ y AKT⁶⁹, que pertenecen, respectivamente, a la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPK), y a la vía PI3K/AKT, ambas implicadas en mecanismos de proliferación y diferenciación celular. Sus alteraciones actúan de manera sinérgica con las deficiencias de PTEN en la progresión del CE⁶⁸.

Otro gen supresor de tumor frecuentemente alterado en CE, especialmente en el de tipo II, es el gen **TP53**, codificante para la proteína p53, que tiene una función crucial en el arresto del ciclo celular e inducción de apoptosis tras el daño en el ADN, impidiendo así la proliferación de células con alteraciones⁷⁰. Tras su mutación, la proteína no funcional se acumula dentro de la célula y actúa como inhibidor doble negativo de la p53 nativa⁵³.

Otra proteína codificada por un gen supresor, el gen **CDKN2A**, es la proteína **p16**, la cual se une a las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (*Cyclin-Dependent Kinases*; CDK4 y CDK6), bloqueando la capacidad que tienen para estimular la progresión del ciclo celular. Por ello, su inactivación da lugar al crecimiento celular descontrolado^{53,65}.

El gen supresor de tumor **ARID1A** codifica para una proteína con actividad helicasa y ATPasa (*AT-Rich Interacting Domain-containing protein 1A*, ARID1A) que forma parte del complejo SNF/SWI de remodelación de la cromatina, necesario para la activación transcripcional de genes normalmente reprimidos por la estructura de la cromatina. La pérdida de la función supresora de ARID1A activa la vía PI3K/AKT de supervivencia celular, y, además, puede estar relacionada con IMS mediante la silenciamiento epigenético de genes de *mismatch repair* en CE⁷¹. Este gen aparece mutado en los estadios tempranos de la carcinogénesis, en el paso de la hiperplasia endometrial atípica a carcinoma endometriode en CE, encontrándose en el 47% de los CE endometrioides de bajo grado, en el 60% de los endometrioides de alto grado y en el 11% de los adenocarcinomas de tipo seroso⁷².

El oncogén más relevante en CE es **KRAS** (*Kirsten RAt Sarcoma viral oncogene*), el cual codifica para la proteína KRAS, que actúa en el inicio de la vía de las MAPK. Las mutaciones en **KRAS** resultan en una activación de las vías, dando lugar a una proliferación descontrolada y una disminución de la diferenciación celular⁷³. Se han encontrado mutaciones en este gen en hasta el 30% de los CE, especialmente de tipo endometrioides^{74,75}. Su presencia en el 16% de los casos

de hiperplasia endometrial ⁷⁶ indica que es un evento relativamente temprano en la progresión del cáncer de endometrio.

HER2/neu es un **oncogén** que codifica para el factor de crecimiento epidérmico humano 2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*, HER2). Se trata de una glicoproteína transmembrana que actúa como receptor con actividad tirosina quinasa en su dominio intracitosólico. Tiene un papel en el crecimiento celular, supervivencia, adhesión, migración y diferenciación ⁷³. La amplificación de *HER2/neu* ha sido descrita frecuentemente en CE seroso ⁷⁷.

Otra proteína frecuentemente alterada en CE es **PIK3CA** (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic subunit Alpha*) que pertenece a la vía de señalización PI3K/AKT y está relacionada con la supresión de la apoptosis y el aumento de la proliferación. También son frecuentes las alteraciones en genes codificantes para moléculas de adhesión, como la del gen **CTNNB1**, que codifica para la **β-catenina**, y la del gen **CDH1**, que codifica para la **E-cadherina**. Las alteraciones de los genes que codifican para proteínas relevantes en el mantenimiento de la arquitectura tisular, diferenciación celular y transducción de señales están relacionadas con una **disminución en la adhesión** intercelular, y se considera un paso previo en la **migración** celular. Además, la β-catenina, forma parte de la cascada de señalización de Wnt, relacionada con embriogénesis y tumorigénesis. De esta manera, también se considera que las mutaciones en *CTNNB1* están relacionadas con eventos tempranos en la carcinogénesis endometrial ^{78,79}.

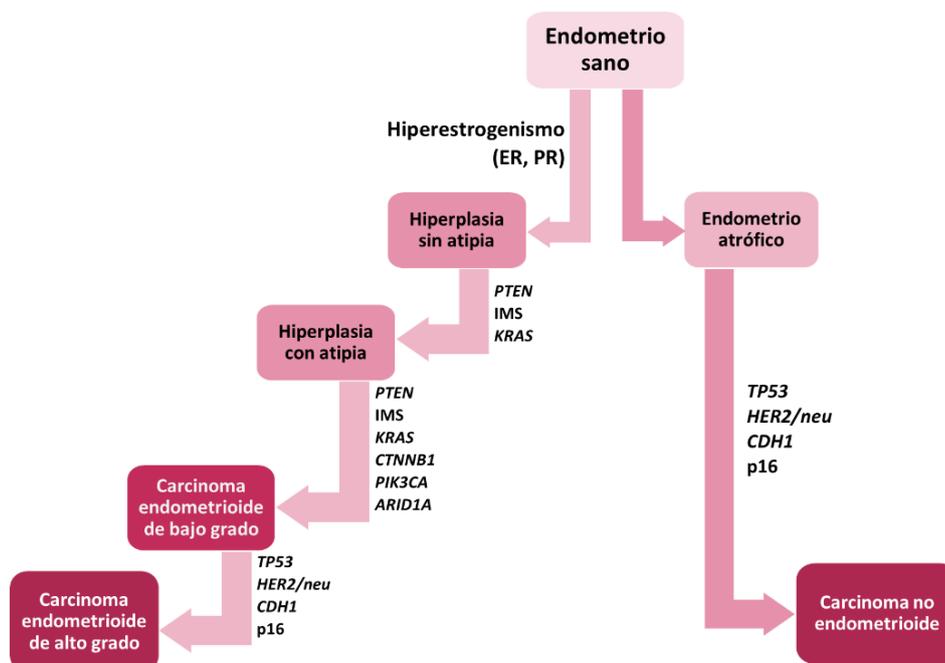


Figura 6. Modelo de progresión del cáncer de endometrio de tipo endometriode y no endometriode, representando las alteraciones genéticas en cada caso. A la izquierda, el modelo para el cáncer de tipo I, endometriode. A la derecha, el del cáncer de tipo II (no endometriode). IMS: inestabilidad de microsatélites. Adaptado de ⁸⁰.

INTRODUCCIÓN

Por último, los **receptores de estrógenos y de progesterona**, receptores nucleares expresados en el endometrio sano, actúan como factores de transcripción uniéndose a zonas específicas del ADN. Existen dos isoformas de cada uno de los dos tipos de receptores, y la pérdida de su equilibrio es crucial durante la tumorigénesis endometrial ⁸¹. La falta de expresión de receptores hormonales está relacionada con una mayor agresividad y con mal pronóstico ⁸².

Como se ha descrito, la mayoría de las hiperplasias, y el CE tipo I están relacionados con estados hiperestrogénicos, con lo cual responden a terapias hormonales. Sin embargo, en la progresión del CE, las mutaciones en *PTEN* y *KRAS* parecen ocurrir al principio del proceso de carcinogénesis. Posteriormente se produce la inactivación de E-cadherina. En momentos más tardíos del desarrollo, en CE endometriode de alto grado y mal pronóstico, aparecen mutaciones en *TP53* y *HER2/neu*, típicas de los carcinomas de tipo II, que también podrían ser eventos *de novo*, sin formar parte de la progresión, en el CE de tipo I mal diferenciado. Las mutaciones en p16 y *HER2/neu*, y la inactivación de E-cadherina, también parecen afectar a la progresión a carcinoma no endometriode (**Figura 6**), que progresa mediante transición epitelio-mesénquima ^{80,83,84}.

3. 2. Clasificación del riesgo de recurrencia

Las pacientes de CE presentan **diferente riesgo de recurrencia** de la enfermedad según su estadio quirúrgico, histología tumoral y factores de riesgo adversos, entre los cuales se encuentra la edad avanzada, presencia de invasión linfoscavular, tamaño y grado del tumor, e invasión del segmento inferior del útero. La evaluación de su riesgo de es fundamental para la elección de los tratamientos idóneos para cada paciente.

Los **CE de bajo riesgo** incluyen mujeres con histologías endometrioides de grado 1 o grado 2 y **tumores confinados al útero**, en estadio IA. La probabilidad general de recurrencia en esta población es muy baja tras el tratamiento quirúrgico, y su pronóstico excelente, por lo que no suele recomendarse terapia adyuvante. Existe un **bajo riesgo de recurrencia local** en la zona vaginal (menor al 5%), de modo que todas las pacientes deberían recibir seguimiento con exámenes pélvicos ⁴².

Los **CE de riesgo intermedio** se definen como **tumores confinados** al útero, pero con invasión del **miometrio** (estadio IA o IB) o con invasión del **estroma cervical** (estadio II). Esta población puede ser dividida a su vez en riesgo intermedio-bajo o intermedio-alto, según edad y factores patológicos: presencia de invasión de más del 50% del miometrio, histología endometriode grado 2 o 3, invasión del espacio linfoscavular.

Así, se consideran **de riesgo intermedio-alto** las mujeres mayores de 70 años con uno de esos factores de riesgo, mujeres entre los 59 y los 69 años con dos factores de riesgo, o mayores de 18 con todos los factores de riesgo ⁸⁵. En estos casos, se debe considerar el tratamiento con radioterapia, que puede reducir el riesgo de recurrencia a nivel local, aunque no a nivel distal y tampoco parece mejorar la supervivencia general ⁸⁶. En el caso de que el **riesgo sea intermedio-bajo** (si no se cumplen los criterios mencionados), dado el buen pronóstico de las pacientes, se recomienda realizar un seguimiento, ya que los riesgos de la radioterapia son mayores que sus beneficios en este caso.

Los **CE de alto riesgo** incluyen todas las **histologías no endometrioides**, así como el **CE endometrioide muy invasivo de grado 3**, y cualquier histología en **estadios III y IV**. Debido a su naturaleza agresiva y a la posibilidad de desarrollar **metástasis tempranas**, se recomienda un tratamiento multimodal, incluso si el estadio es bajo. Sin embargo, **no hay aproximaciones uniformes** a su tratamiento por la pluralidad de estadios que incluye, los cuales son claves para la decisión.

Las **mujeres en alto riesgo y estadio IA sin invasión miometrial**, pueden mantenerse en observación o ser tratadas con braquiterapia vaginal ⁸⁷. En el caso de mujeres con estadios invasivos IA, IB o II, se recomienda administrar quimioterapia con o sin radioterapia (externa o braquiterapia vaginal). A las mujeres en estadio III o IV se les recomienda quimioterapia adyuvante, combinada con radioterapia en algunos casos.

Por otro lado, en pacientes con estadios III o IV y enfermedades no resecables o con **comorbilidades médicas significativas**, es posible ofrecer un **tratamiento no quirúrgico** como radioterapia primaria con o sin quimioterapia, o únicamente quimioterapia, aplicando radioterapia dependiendo de la carga tumoral y su localización. También se emplea terapia hormonal en casos inoperables o pacientes que no desean cirugía, radioterapia o quimioterapia citotóxica ⁴². La terapia hormonal también puede ser una opción en un grupo selecto de mujeres premenopáusicas (con grado 1 y estadio IA, en enfermedades no invasivas) con el objetivo de mantener la fertilidad gracias a un tratamiento conservador ⁸⁸.

INTRODUCCIÓN

4. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO

El tratamiento del CE se decide siguiendo las **recomendaciones** consensuadas por la Sociedad Europea de Oncología Médica (*European Society for Medical Oncology*, **ESMO**), la Sociedad Europea de Ginecología y Obstetricia (*European Society of Gynaecology and Obstetrics*, **ESGO**) y la Sociedad Europea de Radioterapia y Oncología (*European Society for Radiotherapy and Oncology*, **ESTRO**). Para ello se lleva a cabo un **estudio diagnóstico extenso**, que incluya los antecedentes familiares, la evaluación de comorbilidades, ecografía transvaginal o transrectal, y la evaluación de la patología incluyendo el tipo y el grado histológico obtenidos a través de una biopsia endometrial o un legrado ⁴⁹.

4. 1. Cirugía

El tratamiento fundamental en la mayoría de las pacientes con CE es quirúrgico, mediante la **histerectomía total** (extirpación de útero y cérvix) **con salpingooforectomía bilateral** (extirpación de los órganos anejos). Es el primer tratamiento del CE cuando está aparentemente confinado al útero ⁸⁸, e incluye, además, la resección de ganglios linfáticos para su evaluación.

Es imprescindible realizar una exploración muy rigurosa del **abdomen** para descartar la posibilidad de **metástasis extrauterinas**. Este procedimiento las superficies serosas de los órganos abdominales, peritoneo y diafragma, de modo que cualquier anormalidad ha de ser biopsiada. Las biopsias del **epiplón** a menudo se realizan en casos de histología de alto riesgo (CE seroso, de células claras o carcinosarcoma). También se realizan **lavados peritoneales**, aunque no tienen impacto en el estadiaje de la enfermedad.

Tradicionalmente, el estadiaje quirúrgico del CE determina a través de una incisión abdominal vertical (**laparotomía**), aunque los avances en las técnicas quirúrgicas han permitido la exploración y extirpación de útero, cérvix, anejos, ganglios linfáticos y biopsias de epiplón con aproximaciones mínimamente invasivas, como la **laparoscopia tradicional o robótica**. La cirugía mínimamente invasiva ha sido asociada con la disminución de la estancia postoperatoria, así como un menor grado de complicaciones (menos infecciones en la cicatriz, transfusiones de sangre y tromboembolias venosas). Sin embargo, puede recomendarse una laparotomía abierta cuando hay una elevada implicación del cérvix o un tumor de gran tamaño, para evitar la morcelación o fragmentación del tumor al tejido circundante ⁸⁹. En casos de diseminación peritoneal o invasión extensa del epiplón, puede considerarse además una **cirugía**

citorreductora, con el objetivo de extirpar cualquier tejido canceroso remanente, incluyendo el epiplón y del intestino ⁴².

La **linfadenectomía**, eliminación de los ganglios linfáticos, permite la evaluación de los ganglios de drenaje del útero (incluyendo los pélvicos), con o sin los ganglios paraaórticos, los cuales deberían ser evaluados en el caso de mujeres con histología de alto riesgo. Cualquier ganglio anormalmente grande debería ser retirado para descartar metástasis ⁴⁸.

4. 2. Tratamiento adyuvante

El objetivo de la terapia adyuvante en el CE recién diagnosticado es **reducir el riesgo de recurrencia** de la enfermedad. Por este motivo no suele recomendarse a mujeres de bajo riesgo, y suele aumentar con el grado del tumor, invasión miometrial y la implicación cervical, debido a que en estos casos aumenta el riesgo de recaída.

Los criterios que se siguen para la evaluación del riesgo y la elección de terapia adyuvante se han descrito en el subapartado **3.2**. En el apartado actual se describen con más detalle las terapias adyuvantes de uso habitual en CE.

a. Radioterapia

La **radioterapia** es el tratamiento adyuvante más habitual para el CE, y puede ser administrada de forma **externa** o local (**braquiterapia pélvica o vaginal**). La radioterapia puede emplearse de forma adyuvante o bien como tratamiento principal en pacientes inoperables, con recurrencia local, o como tratamiento paliativo ⁴². Debido a que la radioterapia externa suele tener secuelas a corto y largo plazo, en forma de diarrea, dolor abdominal, linfedema pélvico y en las extremidades inferiores, enteritis, colitis y formación de fístulas, habitualmente se recomienda la braquiterapia vaginal, que actúa de forma similar a la radioterapia pélvica produciendo menos efectos secundarios, al liberar la dosis directamente en la superficie de la vagina y vasos linfáticos próximos ^{47,90}.

b. Quimioterapia

A pesar de que los CE suelen responder favorablemente a la radioterapia, la quimioterapia tiene un papel **importante** en el caso de enfermedades **metastáticas irresecables**, enfermedades **avanzadas ya reseca**das quirúrgicamente y enfermedades **recurrentes**. En el caso de pacientes con tumores de alto riesgo pero en estadios tempranos, los beneficios que este tratamiento puede aportar aún están siendo estudiados. Actualmente se recomienda

INTRODUCCIÓN

quimioterapia adyuvante (más radioterapia) para estadios IB- IV; en histolofías de tipo II, por su agresividad, se recomienda una terapia multimodal ⁹¹.

Se recomiendan **regímenes de quimioterapia multiagente** que incluyen carboplatino/paclitaxel, cisplatino/doxorubicina, cisplatino/doxorubicina/paclitaxel, carboplatino/docetaxel. Al régimen de carboplatino/paclitaxel se le añade en algunos casos bevacizumab (anticuerpo monoclonal antiangiogénico), o bien trastuzumab si los carcinomas son positivos para HER2⁹².

Las terapias de **agente único** se consideran en aquellos casos en los que los regímenes multiagente no son tolerados o estén contraindicados. Estas opciones incluyen paclitaxel, abraxane, cisplatino, carboplatino, doxorubicina, doxorubicina liposomal, topotecan y docetaxel ⁹³.

c. Terapia hormonal

Está especialmente indicada para pacientes con carcinoma endometriode de grado 1 y estadio IA no invasivo **con expresión de receptores de estrógenos o de progesterona**, que desean **mantener la fertilidad** ⁹⁴. Se ha observado una respuesta total en el 50% de las pacientes ⁹³, aunque se recomienda realizar un seguimiento mediante biopsias del endometrio cada 3-6 meses, así como tratamiento quirúrgico completo después del parto, que también es recomendado para las pacientes cuya enfermedad progresa o se mantiene tras 6-12 meses de terapia basada en progestinas ⁹⁵.

Los agentes hormonales más destacados son antagonistas de estrógenos, como el **fulvestrant** o el **tamoxifeno**, e inhibidores de la aromatasa como el **letrozol**. Sin embargo, la más habitual es la terapia basada en progestinas, entre las que se encuentra el acetato de **medroxiprogesterona** y el **acetato de megestrol** ⁹⁶.

d. Terapia molecular

Esta aproximación terapéutica se basa en la **inhibición directa de moléculas diana** implicadas en la iniciación, mantenimiento y progresión del cáncer de endometrio. El término **terapia molecular** se suele aplicar a nuevas terapias con **diana farmacológica definida**, aunque en sentido estricto debería utilizarse también para los agentes anti-estrógenos, o las progestinas. Las moléculas diana varían desde genes mutados, ARNs, proteínas, lípidos e incluso metabolitos de bajo peso molecular que, además de servir como dianas terapéuticas, sirven como biomarcadores que describen la progresión de la enfermedad. Tanto la **inmunoterapia** como la **terapia dirigida** ha sido un foco de investigación en los últimos años ^{97,98}. Se trata de

medicamentos dirigidos a **procesos específicos de cáncer** como la angiogénesis, la reparación del ADN, la apoptosis o el control del crecimiento tumoral mediante la activación del sistema inmune de la paciente frente al tumor.

La vía más desregulada en el caso del CE es la **vía de PI3K-AKT-mTOR**. El silenciamiento o la disminución de la transcripción de *PTEN* da lugar a una disminución de la inhibición de PI3K, y al aumento de la actividad de AKT y mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*, diana de rapamicina en células de mamífero)⁹⁹. Ya se han probado algunos **inhibidores de mTOR (temsirolimus, deforolimus, everolimus)** en ensayos de fase II y se ha observado que estabilizan la enfermedad en el 44% de las pacientes metastáticas o recurrentes^{100,101}.

Uno de los procesos clave en el cáncer es la **angiogénesis**, la formación de vasos sanguíneos y el reclutamiento de células de soporte gracias a factores proangiogénicos liberados por las propias células tumorales. De hecho, la sobreexpresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) está asociada con mal pronóstico en la mayoría de los cánceres (incluyendo el de endometrio)¹⁰². Por ello, se está estudiando la función de los fármacos dirigidos a inhibir la angiogénesis, como bevacizumab o inhibidores de tirosina quinasas (**lenvatinib**), aunque sin resultados prometedores¹⁰³, a excepción del **bevacizumab**. Se trata de un anticuerpo dirigido a VEGF- α que en un ensayo en fase II estabilizó la enfermedad en el 13,5% de las pacientes con CE recurrente y en el 40,4% de las pacientes con CE persistente¹⁰⁴. También se ha descrito su **combinación** con paclitaxel y cisplatino o temsirolimus en pacientes con enfermedad avanzada o con recaídas^{105,48,106}.

Otro de los procesos importantes del crecimiento tumoral es la **desregulación del ciclo celular**. El **palbociclib** es un medicamento oral que inhibe CDK4/6. Actualmente, se está llevando a cabo un ensayo europeo de fase II combinando este fármaco con **letrozol**⁵⁰. También se está explorando en ensayos clínicos el papel de los inhibidores de la proteína de muerte celular programada 1 (*Programmed Cell Death Protein-1*, PD-1) debido a su alta expresión en el CE, que participa en el *checkpoint* de respuesta inmune frente al tumor⁴⁸.

Por último, también se han estudiado **terapias dirigidas a HER2/neu**, como el trastuzumab, cuyo empleo está recomendado en pacientes de CE positivas para HER2¹⁰⁷. Otras estrategias terapéuticas recién aprobadas o que están estudiándose actualmente a nivel de ensayos clínicos son **inhibidores del checkpoint inmunológico** (pembrolizumab, dostarlimab), **inhibidores de PARP** [*Poly (ADP-Ribose) Polymerase*, poli ADP-ribosa polimerasa], **inhibidores de receptores tirosina quinasa** y **terapias biológicas** mediante virus, células dendríticas y células NK autólogas.

INTRODUCCIÓN

4. 3. Tratamiento del CE en estadios avanzados

Aunque la mayoría de las pacientes con tumores localizados tienen un excelente pronóstico, existe un **subgrupo de pacientes** que ya en el momento del **diagnóstico** presentan **diseminación** metastática, o bien **progresan** después del tratamiento del tumor primario. Por este motivo, ya que las pacientes en este punto de la enfermedad tienen muy mal pronóstico, los tratamientos siguen un enfoque más **paliativo** que terapéutico, aunque a las mujeres que no responden a los tratamientos convencionales pero mantienen un buen estado físico en general se les recomienda que participen en **ensayos clínicos**.

El tratamiento principal de estas pacientes es la **citoreducción quirúrgica**, a pesar de que solo aumenta la supervivencia de las mujeres con diseminación pélvica o intraabdominal ¹⁰⁸, junto con terapias adyuvantes (quimioterapia o terapia hormonal). Sin embargo, cuando la paciente es inoperable o se trata de un caso de recurrencia metastática tras el tratamiento del tumor primario, se recomienda limitarse a la **terapia sistémica (Figura 7)**.

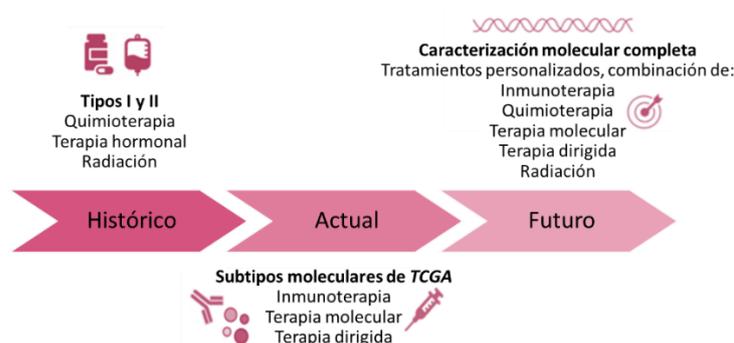


Figura 7. Esquema de la clasificación y tratamiento adyuvante del cáncer de endometrio en estadios avanzados. TCGA: *The Cancer Genome Atlas*. Adaptada de ¹⁰⁹.

Los dos regímenes de **quimioterapia** más empleados en el tratamiento del CE metastático en pacientes naïve son **carboplatino/paclitaxel** o **cisplatino/paclitaxel/doxorubicina**. Aunque el régimen triple mejora la respuesta de las pacientes, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia general, el de elección en general es carboplatino/paclitaxel por sus tasas de respuesta (40-62%) y supervivencia (13 a 29 meses) y mostrar menor toxicidad sistémica de grado 2 y 3. Aunque se toleran mejor que otros agentes quimioterapéuticos, el porcentaje de desarrollo de neuropatía sensorial de grado 2 es del 19%, de trombocitopenia el 12%, emesis 4%, diarrea en un 2% y alteraciones metabólicas en un 8% ¹¹⁰.

Algunas pacientes son candidatas a **terapia hormonal**, cuando el tumor es de grado 1 o 2, **positivos para receptores hormonales**. Generalmente, son tratadas con acetato de megestrol alternado con tamoxifeno, aunque solo el 15-30% responden al tratamiento ¹⁰⁷. Los inhibidores

de aromatasa se evaluaron en ensayos clínicos de fase II, pero obtuvieron tasas de respuesta menores al 10% ¹¹¹. Por otro lado, la expresión de receptores hormonales **no es un marcador predictivo** del efecto del tratamiento hormonal, como mostró un ensayo clínico con letrozol en el que el 86% de las pacientes fueron positivas para receptores de estrógenos y/o progesteronas, pero la tasa de respuesta fue del 9% ¹¹².

Cuando las pacientes no responden a quimioterapia, ni a terapia hormonal, y muestran **alta carga mutacional en tumor, alta IMS y deficiencias en genes de mismatch repair**, el tratamiento de segunda línea preferente es la inmunoterapia, con **inhibidores del checkpoint inmunológico** ¹¹³. Actualmente existen dos inhibidores de PD-1 aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA): pembrolizumab y, más recientemente, dostarlimab. Estos tratamientos tienen una eficacia similar, con una tasa de respuesta del 57% en el caso de pembrolizumab ¹¹⁴ y del 42% en el caso de dostarlimab ¹¹⁵. Sin embargo, los inhibidores del *checkpoint* están asociados con eventos adversos relacionados con el sistema inmune, normalmente transitorios, pero en ocasiones severos o letales (hematológicos, digestivos, hepáticos, pneumonitis, endocrinopatías, entre otros). Se cree que derivan del aumento de la respuesta inmune en general, por lo que la inmunosupresión con agentes como glucocorticoides, antagonistas de TNF- α entre otros, puede ser un tratamiento efectivo en la mayoría de los casos ¹¹⁶.

En ausencia de alta IMS o deficiencias en genes de *mismatch repair*, el tratamiento depende del tiempo que las pacientes hayan estado sin recibir carboplatino/paclitaxel. Cuando son menos de seis meses se recomienda pembrolizumab y lenvatinib, aunque solo el 30% de las pacientes con IMS responden a estos tratamientos, mientras que el 67% sufren toxicidad sistémica de grado 3 o superior ¹¹⁷. Si son más de seis meses sin recibir quimioterapia, habitualmente vuelven a recibir carboplatino/paclitaxel o se les administra pembrolizumab/lenvatinib ¹⁰⁷.

Como **terapia de tercera línea**, además de la terapia hormonal en pacientes positivas en receptores de estrógenos que no toleren los efectos secundarios, se opta por **agentes quimioterapéuticos en régimen único**, como se describe en el subapartado **4.2.b.**, o bevacizumab, aunque la tasa de respuesta es baja en estas pacientes y no mejoran la supervivencia libre de progresión ^{118,119}.

Por último, se han evaluado varios **inhibidores de mTOR**, como temsirolimus, que no demostró asociación con una mejora de la supervivencia ¹¹⁹. Por el contrario, everolimus, en combinación con letrozol, sí mostró beneficio clínico en el 40% de las 38 pacientes que participaron en un ensayo en fase II, pero se necesitan más datos antes de iniciar ensayos clínicos de fase III ¹²⁰.

5. EL RECEPTOR CXCR4 Y EL CÁNCER

La proteína **CXCR4** es un receptor de quimiocinas CXC. Las quimiocinas son un tipo de citoquinas de naturaleza proteica, de bajo peso molecular (8-12 kDa), con funciones fisiológicas de regulación que incluyen varias familias. En concreto, las **quimiocinas** CXC son citoquinas quimiotácticas proinflamatorias que se unen a receptores asociados a proteínas G (*G protein-coupled receptors*, GPCRs) y tienen un reconocido papel en la mediación del tráfico de células inmunes y el desarrollo del tejido linfoide.

CXCR4 es un receptor acoplado a proteínas G de la familia de la Rodopsina, también conocido como **fusina** o **CD184**. En condiciones fisiológicas normales, se encuentra en células con movilidad, tanto en el sistema inmune como en el hematopoyético. También se expresa en células madre necesarias durante la embriogénesis ¹²¹.

Como los demás receptores de quimiocina, su principal característica es la **quimiotaxis**: la capacidad de inducir la migración dirigida de células hacia un gradiente de citoquinas quimiotácticas, secretadas por células dañadas o infectadas (es correceptor en la infección por VIH) ¹²², así como endoteliales, tumorales o estromales (por ejemplo, fibroblastos activados), propiciándose la movilidad y la angiogénesis. Su papel vital en la migración celular tanto en la vida embrionaria como en la adulta ha dado lugar a que su estructura de 352 aminoácidos se encuentre altamente conservada entre especies ¹²³, encontrándose en el organismo en forma de monómero, homodímeros y heterodímeros con CCR2, CCR4 o CXCR7, participando en diferentes mecanismos metabólicos ¹²⁴. Su sola homodimerización activa la vía de JAK/STAT de forma independiente de la proteína G a la que está acoplado ¹²⁵.

Su ligando natural es la quimiocina CXC ligando 12 (**CXCL12**), también denominada Factor Derivado del Estroma 1 α (*Stromal-Derived Factor 1 α* , **SDF1 α**), una quimiocina peptídica de bajo peso molecular que también se une a CXCR7 y que se encuentra mayoritariamente en las células del estroma de la médula ósea, con un papel importante en la proliferación de precursores hematopoyéticos. Al contrario que la mayoría de las quimiocinas, que se producen en células activadas en momentos puntuales (no tienen un lugar de producción constante), CXCL12 se produce de manera constitutiva en las células y órganos especializados (como la médula ósea, el hígado, el cerebro), siendo sobreexpresado cuando ocurre una infección o un ataque externo ¹²⁶.

La unión de CXCL12 a CXCR4 a través de su extremo N-terminal provoca un cambio de conformación en el receptor que activa la proteína G heterotrimérica acoplada. El extremo C-terminal del receptor es el responsable de optimizar la **especificidad**, la **selectividad** y la

duración de la señal ¹²⁵. Este extremo también es fosforilado por las quinasas receptoras de proteínas G (GRK), lo cual produce la captación de β -arrestina permitiendo la internalización del receptor a través de **endocitosis mediada por clatrina** ¹²⁷, y la β -arrestina a su vez activa la vía de las MAPK, promoviendo la migración celular. En paralelo, la disociación de la proteína G inicia diferentes vías de señalización (**Figura 8**) dirigidas a remodelar el citoesqueleto de actina (responsable de la motilidad y cambios de forma de la célula) y con él funciones biológicas relacionadas con supervivencia, proliferación y migración ¹²⁸. Las más importantes son:

- **La vía PI3K/AKT**, que da lugar a supervivencia celular y proliferación, o la expresión de genes de transcripción por el factor nuclear NF κ B.
- **La cascada de señalización de las MAPK** (Ras, Raf, MEK y ERK) causando cambios en la expresión génica, la progresión del ciclo celular y la quimiotaxis.
- **La vía de la fosfolipasa C (PLC)**, que induce la hidrólisis de fosfatidinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). En paralelo, DAG activa la proteína quinasa C (PKC), que a su vez activa la vía de las MAPK. Por otro lado IP₃ moviliza iones de calcio de reservorios intracelulares para promover la quimiotaxis y migración.

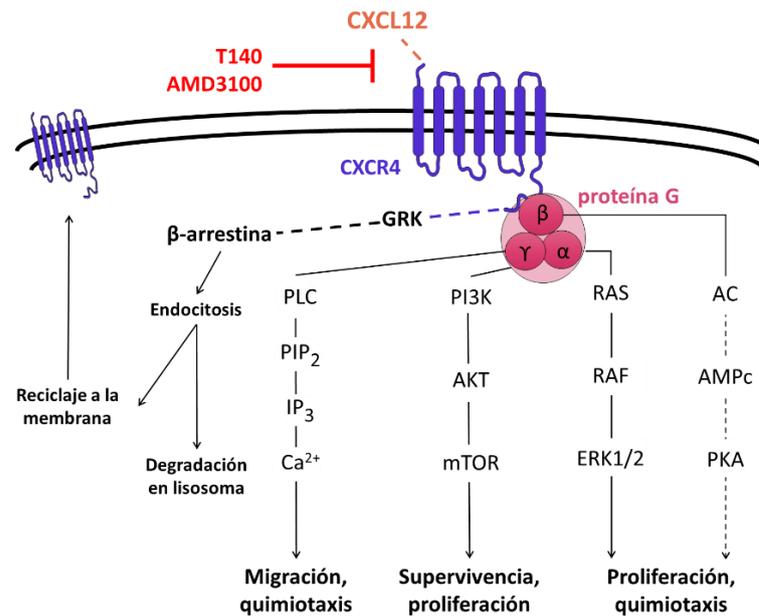


Figura 8. Esquema de las vías de señalización reguladas por el eje CXCL12/CXCR4. La unión de CXCL12 al receptor CXCR4 activa las vías de la PLC, la vía PI3K/AKT/mTOR y la de las MAPK quinasas, que regulan tanto la proliferación y la supervivencia como la migración y la metástasis en tumores. GRK: *G protein-coupled receptor kinase*, quinasa de receptor acoplado a proteína G; PLC: *phospholipase C*, fosfolipasa C; PIP₂: fosfatidilinositol bifosfato; IP₃: inositol trifosfato; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa; mTOR: *mammalian Target Of Rapamycin*, diana de rapamicina en células de mamífero; ERK: *extracellular signal-regulated kinases*, quinasas reguladas por señales extracelulares; AC: adenilil ciclasa; AMPC: AMP cíclico; PKA: proteína quinasa A. AMD3100 y T140 son antagonistas de CXCR4. Adaptada de ¹²⁹.

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, la vía CXCR4/CXCL12 produce la **activación de los receptores de estrógenos**, que a su vez inducen la expresión de CXCL12 (**Figura 9**)¹³⁰, aunque por el momento no se conoce el mecanismo exacto. La importancia de la vía CXCL12/CXCR4 en el efecto protumoral de los estrógenos ya se ha demostrado, a día de hoy, en cáncer de mama positivo para receptores de estrógenos¹³⁰ y en cáncer de pulmón^{131,132}.

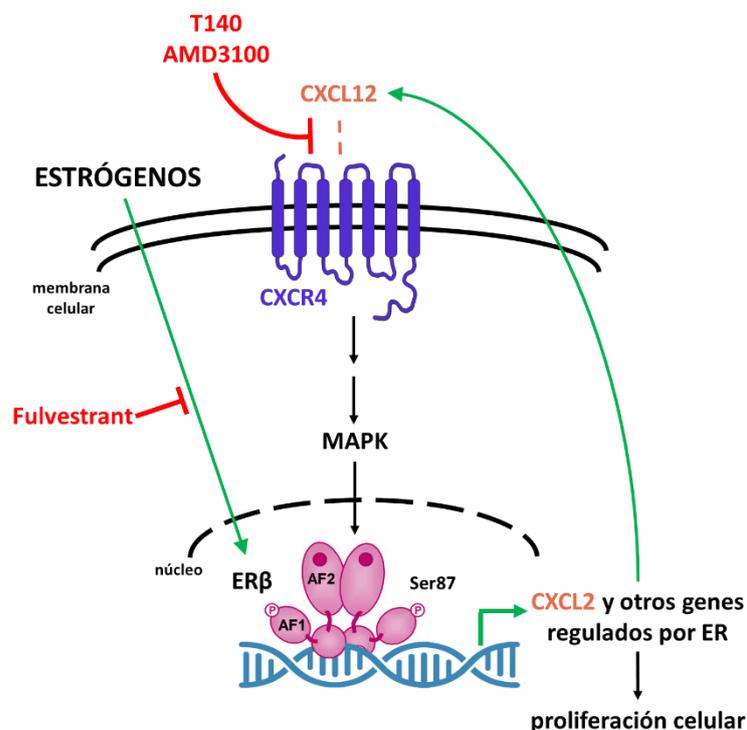


Figura 9. Modelo propuesto para el bucle autocrino positivo entre los receptores de estrógenos y la vía CXCL12/CXCR4, en cáncer de mama. La activación del receptor de estrógenos (ER) en su isoforma ER α o ER β induce la expresión del gen de CXCL12, que a su vez dispara la activación de ERK1/2 mediante su interacción con CXCR4. En el caso de ER β , el aumento de la actividad Erk resulta en la fosforilación de la serina 87 en el dominio AF-1, y la consecuente activación del receptor transcripcional. La retroalimentación positiva está inhibida por antagonistas de CXCR4 (AMD3100 y T140) y de receptores de estrógenos (Fulvestrant). Adaptada de¹³³.

El **microambiente tumoral** es el entorno inmediato del tumor, lo cual incluye el sistema vascular, el sistema inmune y el tejido estromal de soporte. En él tiene lugar la interacción directa entre las células tumorales y los fibroblastos y las células inmunes mediante moléculas de adhesión o de señalización. En este contexto, las quimiocinas pueden ser expresadas tanto por las células tumorales como las no tumorales, incluyendo las inmunes y estromales. Todas ellas también pueden ser diana de las quimiocinas, por lo que éstas regulan la infiltración linfática en el tumor, la angiogénesis, la proliferación tumoral, invasividad, metástasis y el mantenimiento de fenotipos celulares similares a los de células madre de cáncer (**Cancer Stem Cells, CSCs**), poblaciones descritas en múltiples cánceres, incluido el de endometrio, con una función en la autorrenovación celular tumoral, diseminación y resistencia a tratamientos convencionales^{84,134-}

¹³⁸. Se han descrito **marcadores de membrana comunes** en las CSCs de diferentes tipos de cáncer, entre los que se encuentran las glicoproteínas CD133 y CD24 y la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH1), asociados con funciones de autorrenovación y de diferenciación ^{139,136}, aunque las CSCs de cada tipo de cáncer expresan diferentes moléculas de superficie.

De la misma manera, diferentes tipos tumorales expresan también diferentes quimiocinas y receptores de quimiocinas vitales para su desarrollo. En general, la interacción de quimiocinas y sus receptores se caracteriza por una considerable promiscuidad, ya que la mayor parte de los receptores conocidos interactúan con diversos agonistas, y la mayor parte de los agonistas interaccionan con más de un receptor. Esto da lugar a que, mientras que las quimiocinas no son **buenas dianas terapéuticas**, sí lo sean los **receptores de quimiocinas** ¹⁴⁰.

En este caso, el **receptor CXCR4** está presente en la gran mayoría de los tipos de cáncer ^{141,142}, con una expresión 10-200 veces mayor que en los tejidos normales ^{143,144}, incluido el cáncer de endometrio ¹³⁶. Tiene capacidad de mantener la supervivencia, inhibiendo las vías de muerte celular, y el crecimiento de las células cancerosas, así como de promover la angiogénesis del tumor para mantenerlo irrigado, y de modular la migración celular, contribuyendo a la formación de metástasis a distancia ¹²⁵.

Durante la **carcinogénesis**, las células tumorales expresan CXCR4 como resultado de mutaciones activantes o en respuesta a las condiciones del microentorno tumoral a las que se encuentran sometidos, como la hipoxia. Gracias a ello, adquieren la capacidad de movilizarse hacia tejidos que expresan CXCL12 de manera abundante, a través de un gradiente de esta quimiocina ¹⁴⁵, de modo que tienen un papel crítico en la **diseminación metastática** a hígado, médula ósea y pulmones ^{146,147}. CXCR4 está más expresado en metástasis que en tumores primarios ¹⁴⁸, y se ha descrito como **marcador de CSCs** en varios cánceres ^{136,138,149-152}.

5. 1. CXCR4 en cáncer de endometrio

CXCR4 está sobreexpresado a nivel de ARNm y proteína en CE en comparación con la hiperplasia y el endometrio normal, y se ha sugerido que el eje que forma con su ligando CXCL12 tiene un papel en la progresión tumoral en este cáncer ¹⁵³⁻¹⁵⁵. Los estudios con líneas celulares apoyan este rol, así como en la invasión y migración ^{153,156,157}, y se ha confirmado también mediante estudios de la capacidad tumorigénica en **modelos animales subcutáneos** ^{136,154,158,159}.

No obstante, la **heterogeneidad clínica del CE** es un reflejo de las diversas alteraciones moleculares subyacentes. Su patogénesis y pronóstico están estrechamente relacionados con la

INTRODUCCIÓN

citoquinas y quimiocinas del **microentorno tumoral**, que podrían influir sobre la extensión y el fenotipo de los infiltrados inmunes, así como la angiogénesis, crecimiento tumoral, supervivencia y migración celular. Esta compleja **red de citoquinas**, unida a la importante carga hormonal del útero, implica una mayor dificultad a la hora de dilucidar el papel del receptor CXCR4 en el CE, más controvertido que en otros tipos de cáncer como el de colon y el melanoma¹⁶⁰, cuya expresión, como se ha descrito previamente, parece modulada en cierta medida por receptores de estrógenos, también en el tejido endometrial¹⁶¹.

En este sentido, la asociación de la expresión de CXCR4 con factores de mal pronóstico en muestras de pacientes con CE es **contradictoria** de modo que, mientras algunos estudios señalan una clara correlación entre mayor expresión de CXCR4 y peor pronóstico^{162,163}, para otros autores esta relación es inexistente^{145,164} o inversa^{165,166}. Estos estudios están limitados por el **tamaño muestral**, menor de 45 en muchos casos y la presencia de una gran mayoría de CE de tipo endometriode, generalmente de buen pronóstico^{163,165,166}.

Por otra parte, esta contradicción podría explicarse por la elección de **diferentes factores pronósticos** en cuanto a su relación con la sobreexpresión de CXCR4: grado histológico^{165,166}, estadio FIGO^{162,145,164}, profundidad de invasión del miometrio^{162,163} y del cuello del útero, metástasis en ovario, en peritoneo y en ganglios linfáticos¹⁶². A pesar de que en las distintas publicaciones sí que se han estudiado factores comunes (como el grado histológico), se agruparon combinando distintos grados (por ejemplo tumores de grado 1 y grado 2¹⁶⁵ o los de grado 2 y 3¹⁶⁶). Aunque estos parámetros sean indicadores de agresividad, es posible que, en CE, **CXCR4 esté asociado de forma diferente con cada uno** de ellos según el subtipo.

Por último, para explicar la posible falta de asociación se ha de tener en cuenta el **tipo de muestras** (mayoritariamente tumor, pero también sangre periférica¹⁶⁷), nivel de **expresión** (proteína o ARN) y **tipo de análisis** (inmunohistoquímico, qPCR) que se llevó a cabo en cada estudio. La inmunohistoquímica es la técnica de referencia para la detección y localización de antígenos en muestras de tejidos, aunque tiene la desventaja de que está sujeta a múltiples puntos de optimización, dificultando la replicación de los estudios¹⁶⁸, y a la falta de estandarización de los **criterios de evaluación** de la tinción empleados, diferente en cada uno de los artículos citados.

5. 2. Terapia oncológica dirigida a CXCR4

Dada la relevancia clínica de CXCR4, tanto en cáncer como en otras enfermedades (en especial la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, VIH), se han diseñado fármacos

inhibidores de CXCR4 para bloquear la migración de las células que expresan este receptor o inducir su muerte. Estos inhibidores se clasifican en los siguientes grupos ¹⁶⁹:

- **Antagonistas no peptídicos:** moléculas pequeñas que bloquean la unión entre CXCR4 y su ligando natural. El AMD3100 (también conocido como plerixafor o Mozobil) es el mejor inhibidor de CXCR4 conocido de una serie de compuestos sintetizados a principios de los años 90, así como AMD070 y KRH-1636, ambos en fases clínicas ¹⁷⁰.
- **Antagonistas peptídicos:** péptidos con capacidad de inhibición del receptor y de bloqueo de su unión con CXCL12, como T140, el cual, al ser poco estable en disolución, se fue modificando para aumentar su estabilidad, surgiendo una serie de derivados peptídicos que llegaron a fases clínicas ¹⁷¹.
- **Anticuerpos anti-CXCR4:** el tratamiento con el anticuerpo 12G5 de CXCR4 neutraliza su interacción con CXCL12 de forma significativa y específica, en la infección por VIH ¹⁷².
- **Agonistas y antagonistas modificados de CXCL12,** como los péptidos CTCE-9908 o CTCE-0214, ambos aprobados por la FDA para el tratamiento del osteosarcoma ¹⁷³.

Sin embargo, la mayoría de los compuestos diseñados para bloquear CXCR4 son **poco selectivos**, creándose inhibiciones cruzadas con otros receptores. Por otro lado, el problema de combinar AMD3100 con quimioterapia es que, además de movilizar las células neoplásicas para exponerlas al tratamiento, también moviliza las células madre hematopoyéticas de la médula ósea, no tumorales, haciéndolas más susceptibles de ser atacadas por los mismos agentes quimioterapéuticos, aumentando los efectos secundarios ¹⁶⁹. Una buena aproximación terapéutica sería, además de inhibir la función de CXCR4, eliminar aquellas células que lo sobreexpresan.

INTRODUCCIÓN

6. ENTREGA SELECTIVA DE AGENTES TERAPÉUTICOS MEDIANTE NANOPARTÍCULAS

Los principales problemas clínicos para las pacientes con CE son la **quimiorresistencia** y la **diseminación** metastática, así como la elevada **toxicidad asociada** a la terapia ^{107,174,175}. Los tratamientos actuales persiguen **la erradicación del tumor primario** y la **prevención no específica** de las recaídas, a pesar de que el 90% de las muertes en pacientes con cáncer se producen a causa de las metástasis, para las que no hay fármacos específicos aprobados. Por estos motivos, la **mejora de los tratamientos** antineoplásicos pasa por el **aumento de su efecto** antitumoral y antimetastático con respecto a los disponibles en la actualidad, unido a la inducción de una **menor toxicidad** sistémica asociada a su administración.

En base a estos objetivos, uno de los abordajes terapéuticos más relevantes en cáncer en la actualidad es la **entrega selectiva de fármacos** a las células tumorales, mediante dos estrategias: las **nanopartículas** y los **conjugados anticuerpo-fármaco** (*Antibody-Drug Conjugates*, ADCs).

Los **ADCs** tienen un tamaño de alrededor de 150 kDa y están formados por un anticuerpo monoclonal unido mediante un enlace químico a un fármaco citotóxico potente, para conseguir una mayor efectividad en la entrega del mismo, al ser internalizados tras su unión a antígenos específicos, expuestos en la superficie celular. Sin embargo, solo ofrecen una unión a su diana de tipo monovalente o bivalente, y requieren que el agente terapéutico sea muy potente. Esto se debe a la baja captación que tienen por las células diana, que es menor del 1% de la dosis administrada, a pesar de que, por su tamaño, sí que se evita la filtración renal ¹⁷⁶. Actualmente no existen ADCs aprobados para el tratamiento del CE, y hay muy pocas referencias de su uso en ensayos clínicos para este tipo tumoral, aunque sí para el cáncer de mama, el de ovario y neoplasias hematológicas ¹⁷⁷.

Con respecto a las **nanopartículas**, su diseño forma parte del campo de la química y la biotecnología, un área muy versátil y en continua evolución. Se trata de partículas de tamaño nanométrico (1-1000 nm), aunque las desarrolladas para aplicaciones oncológicas, que incluyen fármacos antitumorales, que deben ser menores de 100 nm, ya que para acceder al tejido tumoral es necesario que pasen entre las uniones gap de la vasculatura tumoral ¹⁷⁸.

Las nanopartículas, como vehículos para la entrega de fármacos al tejido tumoral, utilizan dos mecanismos distintos: el direccionamiento pasivo y el direccionamiento activo.

El **direccionamiento pasivo** de las nanopartículas aprovecha las diferencias anatómicas y fisiológicas del sistema vascular tumoral, con vasos altamente fenestrados, carentes de músculo

liso, y vasos linfáticos defectuosos. Esto permite una elevada permeabilidad en el tumor, a través de un fenómeno conocido como el efecto de aumento de permeabilidad y retención (*Enhanced Permeability and Retention, EPR*)¹⁷⁹.

El efecto EPR asociado al crecimiento tumoral es explotado, debido a su tamaño, por todas las nanopartículas, incluyendo también aquellas **dirigidas de forma activa**. El diseño de estas nanopartículas incluye ligandos que se unen específicamente a receptores de membrana, que permiten su internalización en las células diana tumorales. Así, la entrega del fármaco se produce de forma selectiva, lo cual implica la reducción de los efectos adversos, y un aumento de la captación del fármaco por el tejido tumoral (**Figura 10**)^{180,181}.

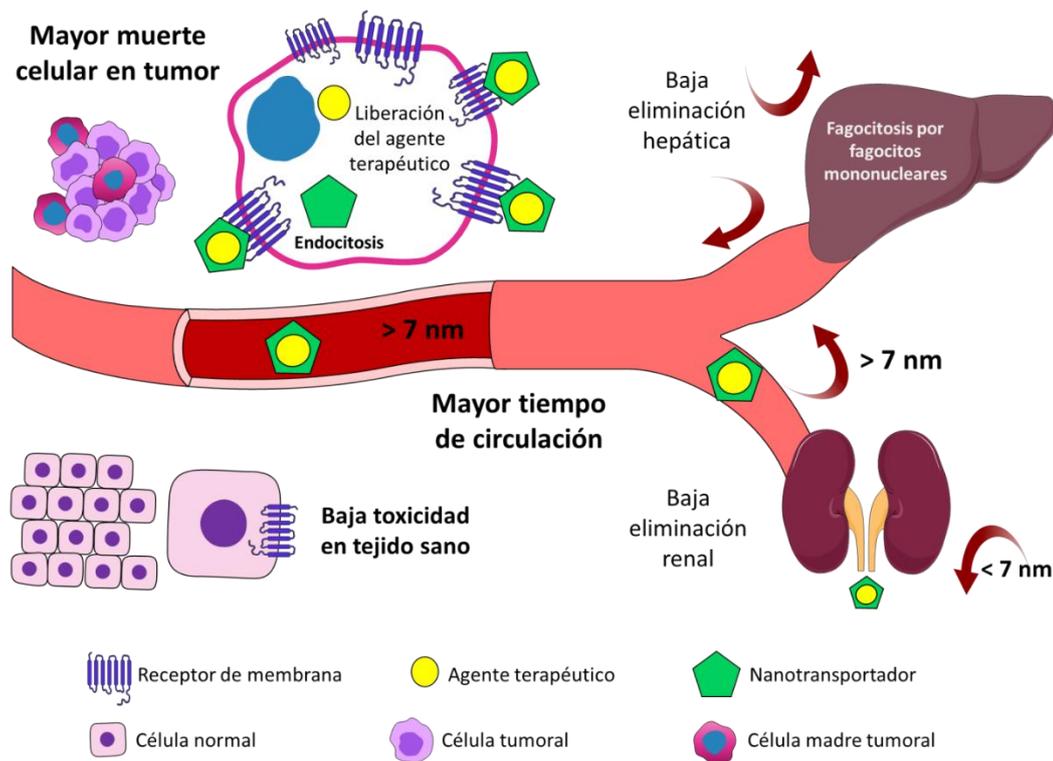


Figura 10. Aumento de la eficacia en el tratamiento del cáncer a través del empleo de nanopartículas con direccionamiento activo, que mejoran la biodistribución y la entrega de los agentes terapéuticos en las células tumorales diana. Diagrama adaptado de¹⁸¹.

6. 1. Propiedades fisicoquímicas y moleculares de las nanopartículas terapéuticas

Las **nanopartículas**, sean o no dirigidas, poseen una serie de **propiedades** que determinan su solubilidad, recircularización y tránsito desde la ruta de administración hasta la célula diana¹⁸², superando el nivel sistémico (filtración renal, acumulación en tejidos secundarios), el celular

INTRODUCCIÓN

(eficacia y vía de internalización) y el intracelular (llegada al compartimento subcelular diana). En conjunto, la especificidad, biodistribución, biodisponibilidad, farmacocinética y seguridad de las nanopartículas están determinadas por sus **propiedades fisicoquímicas** (tamaño, forma, carga superficial) y el **material** del que están compuestas.

De entre estas propiedades, una de las más relevantes es el **tamaño**, ya que afecta de manera fundamental a la biodistribución de las nanopartículas en el organismo, y su interacción con el sistema inmune y con las células diana en cuanto a la internalización, tráfico intracelular y toxicidad (procesos en los cuales también es relevante la **geometría** de la nanopartícula)¹⁸³. Con respecto a la interacción con las células diana, se ha descrito que el tamaño que permite la internalización más eficiente de las nanopartículas es de alrededor de 50 nm¹⁸⁴. Un tamaño inferior a 6-8 nm implica la filtración renal de las nanopartículas y su eliminación en la orina, mientras que las nanopartículas mayores de 200 nm son acumuladas en el hígado y el bazo poco después de su administración debido a la presencia fisiológica del endotelio fenestrado (200-500 nm) en estos órganos. En el hígado, además, las nanopartículas mayores de 150 nm son eliminadas por macrófagos residentes en los sinusoides hepáticos, las células de Kupffer, y cuando son mayores de 200 nm tienen mayor probabilidad de ser opsonizadas y reconocidas por el sistema del complemento para su eliminación una vez en el torrente sanguíneo¹⁸⁵.

Su **carga superficial** también es determinante en cuanto a su interacción con el medio fisiológico, ya que puede activar el sistema de fagocitos mononucleares¹⁸³. Para evitar dicha activación del sistema inmune, las nanopartículas pueden ser recubiertas mediante diferentes estrategias, como son su funcionalización con ligandos, su unión a proteínas, o a través de una cubierta de polietilenglicol (PEG) o ácido poliacrílico¹⁸³. La carga superficial también es relevante en cuanto a la interacción con las células diana, en especial con respecto a su tráfico intracelular, ya que para su internalización en el citoplasma, las nanopartículas son endocitadas¹⁸⁶. En el caso de que estén cargadas con agentes terapéuticos, es necesario que ocurra primero su **escape endosomal** hasta el compartimento celular donde ejercen su función, para evitar ser degradadas en los lisosomas¹⁸⁵.

Por otro lado, las nanopartículas pueden ser clasificadas según la **naturaleza del material** del que están formadas (**Figura 11**)¹⁸⁷. Actualmente existen nanopartículas con aplicaciones muy interesantes a nivel electrónico, medioambiental y médico basadas en **lípidos**, en **polímeros**, en **proteínas**, metálicas y con **nanomateriales de carbono**, aunque la mayoría de ellas no son adecuadas por su baja biocompatibilidad, debido a su escasa solubilidad en agua y alta inmunogenicidad¹⁸⁸. De hecho, algunas pueden producir alergias, modular la producción de

citoquinas e inducir efectos proinflamatorios. Además, pueden ser difíciles de degradar enzimáticamente y tienden a acumularse en los lisosomas, produciendo enfermedades lisosomales. Estas desventajas pueden ser resueltas si se emplean **materiales biodegradables**, como polímeros naturales o proteínas, aunque también se ha descrito acumulación de polímeros biodegradables en algunos órganos¹⁸⁹.

Así, las **nanopartículas basadas en proteínas** parecen ser óptimas para el transporte y direccionamiento de fármacos debido a su alta biocompatibilidad y biodegradabilidad, su papel estructural natural, su producción biológica simple, rentable y efectiva y su versatilidad funcional, que se consigue mediante ingeniería genética¹⁹⁰.

El **diseño racional de novo** permite la creación de nuevas nanopartículas proteicas más potentes y con diseño inteligente. Muestran una arquitectura altamente ordenada, con estabilidad estructural a nivel nanométrico, y una forma y tamaño uniformes debido a la oligomerización controlada de motivos proteicos, dando lugar a disposiciones supramoleculares complejas. Los motivos de oligomerización proteicos **naturales** han permitido el diseño predictivo de nuevas nanoestructuras proteicas.

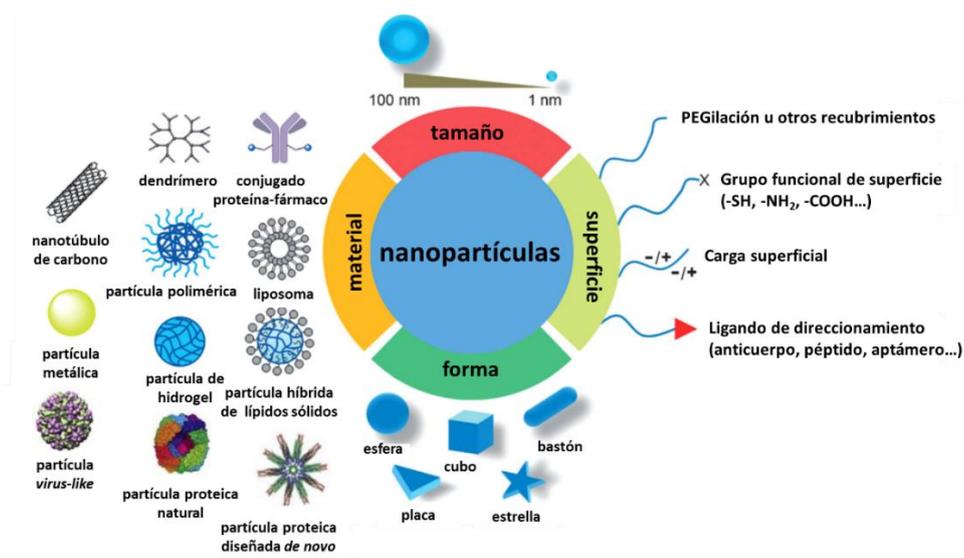


Figura 11. Gráfico resumen de las distintas nanopartículas desarrolladas como transportadores de agentes terapéuticos en oncología, junto con sus propiedades fisicoquímicas. Adaptada de¹⁸⁷.

En este sentido, los avances de las técnicas de **ingeniería genética** han permitido la creación de proteínas multifuncionales autoensamblables, de arquitectura altamente ordenada. Su diseño quimérico presenta **alta versatilidad funcional**, y **alta rentabilidad** de producción por su simpleza y bajo coste mediante sistemas recombinantes en bacterias, levaduras, células de mamíferos y animales o plantas transgénicos¹⁹¹. La **versatilidad funcional** puede obtenerse ensamblando los diferentes componentes necesarios en una cadena polipeptídica simple. Estos

INTRODUCCIÓN

componentes confieren dominios de **oligomerización**, de **estabilidad** en el torrente sanguíneo, de **interacción** con fármacos, proteínas o ácidos nucleicos, de direccionamiento celular y de capacidad de internalización, escape endosomal, movilidad citosólica, localización nuclear y de pase a través de la barrera hematoencefálica¹⁸¹. Los **fármacos** se pueden incorporar mediante procedimientos químicos simples, pero también es posible la incorporación de los dominios funcionales de **proteínas citotóxicas** que actúen como agentes terapéuticos (tras su deinmunización y humanización) en el diseño de las nanopartículas, de modo que presenten una actividad citotóxica intrínseca sin necesidad de conjugaciones químicas¹⁹².

Por otro lado, se han desarrollado **nanopartículas proteicas autoensamblables**, especialmente para la entrega dirigida de fármacos y ácidos nucleicos. El autoensamblaje de proteínas, incluso en forma de jaulas para el almacenamiento del fármaco, es un hecho que se encuentra en la naturaleza (en virus, bacterias, plantas, células de mamífero), pero presentan una baja flexibilidad funcional y su geometría es difícil de controlar. Por este motivo, en la actualidad se están diseñando proteínas ensamblables *de novo*¹⁸¹.

6. 2. El nanotransportador T22-GFP-H6 dirigido al receptor CXCR4

Nuestro laboratorio colabora estrechamente con el grupo de **Nanobiotecnología de la Universidad Autónoma de Barcelona**, liderado por el Dr. Villaverde, con gran experiencia en el diseño, producción y caracterización de nanopartículas proteicas. Conociendo las ventajas del empleo de CXCR4 como diana terapéutica en cáncer, por estar sobreexpresado en células malignas, se hizo un cribaje de ligandos específicos de CXCR4 con el objetivo de diseñar **nanopartículas proteicas con capacidad de internalización en dichas células CXCR4⁺**.

De todos los ligandos evaluados, el **péptido T22** mostró la mayor eficiencia de internalización específica. Se trata de una versión modificada de una porción de la polifemusina II, aislada de hemocitos del cangrejo cerradura, en la cual tres sustituciones en los residuos Tyr5, Lys7 y Tyr12 provocaron un aumento drástico de su afinidad por el receptor CXCR4¹⁹³.

T22 es un péptido catiónico que, unido a la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, **GFP**) y a una cola de histidinas (**H6**), da lugar a una proteína nanométrica, denominada **T22-GFP-H6**, de unos 13 nm aproximadamente, autoensamblables con una media de 11 monómeros proteicos (30,67 kDa/monómero) incorporados a cada nanopartícula (**Figura 12**)¹⁹⁴.

La combinación de T22 y H6 en los extremos C y N terminal, respectivamente, permitió su **autoensamblaje** de manera **estable** de forma **plana** y **cíclica**, gracias a la combinación de fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals¹⁹⁵. Además, el dominio **H6**

permite la **purificación** de la nanopartícula por cromatografía de afinidad y coopera en el **escape endosomal** de la nanopartícula. Por otro lado, la emisión de fluorescencia por la **GFP** permite su **seguimiento**, tanto *in vitro* como *ex vivo*, a la par que coopera en su **estabilidad**, sirviendo de **andamiaje** para el transporte de fármacos¹⁹⁴.

El uso de las nanopartículas T22-GFP-H6 implica múltiples ventajas tanto por su **tamaño**, evitando la filtración renal y la eliminación hepática por macrófagos, como su **autoensamblaje**, su elevada **estabilidad** en suero humano y su gran **especificidad** en su internalización, dependiente de CXCR4. Nuestro grupo ha demostrado, además, su acumulación intracelular en líneas celulares humanas CXCR4⁺ de cáncer colorrectal y linfoma, tanto *in vitro* como *in vivo*, de forma estable, mostrando una elevada captación en tumor en modelos animales, sin citotoxicidad asociada ni acumulación en células negativas para CXCR4^{196,197}.

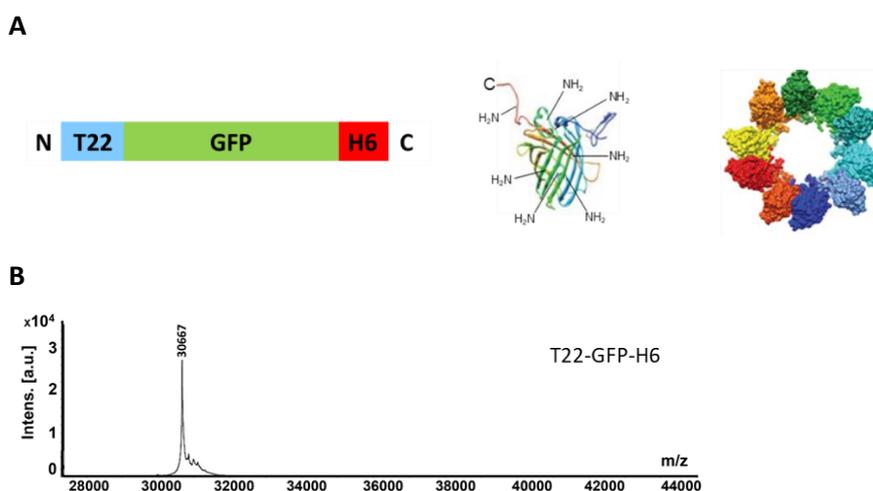


Figura 12. Caracterización de las nanopartículas T22-GFP-H6. A. Esquema de la estructura de las nanopartículas formadas por el autoensamblaje de 10 monómeros de T22-GFP-H6. B. Espectrometría de masas de T22-GFP-H6. Adaptada de¹⁹⁸.

6. 3. Nanopartículas terapéuticas basadas en la estructura de T22-GFP-H6

Dado el gran potencial de las nanopartículas proteicas, nuestro grupo empleó varias estrategias para desarrollar nanopartículas terapéuticas basadas en la estructura de T22-GFP-H6, ya fuera mediante la **conjugación** del nanotransportador a fármacos o bien a través de la incorporación en su estructura de **dominios citotóxicos de toxinas**, así como **proteínas proapoptóticas** humanas (PUMA, BAX, BAK)¹⁹⁹. Las toxinas incorporadas eran de origen bacteriano (DITOX de *C. diphtheriae*, PE24 de *P. aeruginosa*)¹⁹², animal (el veneno Clip71 de serpiente, gomesina de araña, melitina de abeja, clorotoxina de escorpión²⁰⁰) o vegetales (ricino²⁰¹).

INTRODUCCIÓN

a. Nanoconjugados dirigidos a CXCR4

El excelente potencial como transportador de la nanopartícula T22-GFP-H6 fue confirmado mediante su **conjugación a fármacos** que ya habían demostrado previamente capacidad antitumoral, ya fuera con un compuesto químico de bajo peso molecular, la **floxuridina**, o una toxina, la **monometil auristatina E**, empleada por otros grupos en forma de ADC.

En primer lugar, la **floxuridina** (FdU), empleada frecuentemente como tratamiento del cáncer colorrectal metastático, es similar al 5-fluorouracilo, ya que fue desarrollada para aumentar la capacidad terapéutica de este fármaco. Se trata de un análogo de la pirimidina con función antineoplásica al **interferir en la síntesis de ácidos nucleicos**, evitando la unión de los nucleótidos de timidina a la cadena, generando roturas de doble cadena, lo cual induce la muerte celular. Ha sido empleado como terapia de diversos cánceres, incluido el CE en estadios avanzados, aunque actualmente no está en uso^{202,203}.

Para la obtención del nanoconjugado **T22-GFP-H6-FdU**, la floxuridina fue conjugada de forma covalente al nanotransportador, tras la funcionalización del nucleótido oligo-FdU con tiol y la unión de T22-GFP-H6 mediante un enlace maleimido (**Figura 13**). Con el nanoconjugado resultante, nuestro grupo ha obtenido resultados muy prometedores en cáncer colorrectal, ya que es capaz de eliminar de forma selectiva las células CXCR4⁺ y bloqueo de la diseminación en un modelo animal metastático de esta enfermedad²⁰⁴.

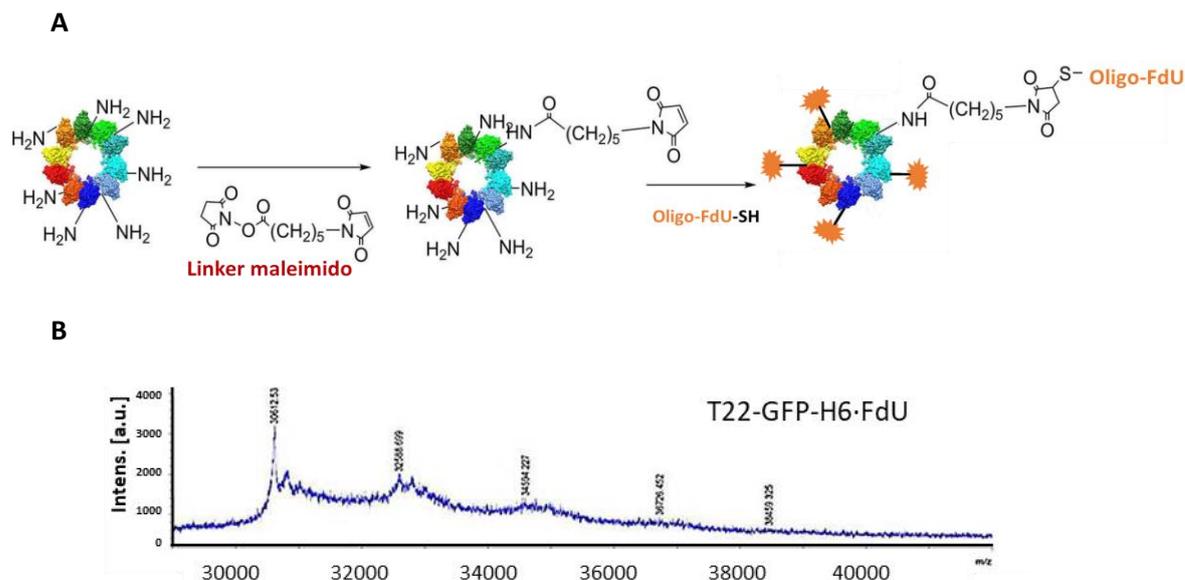
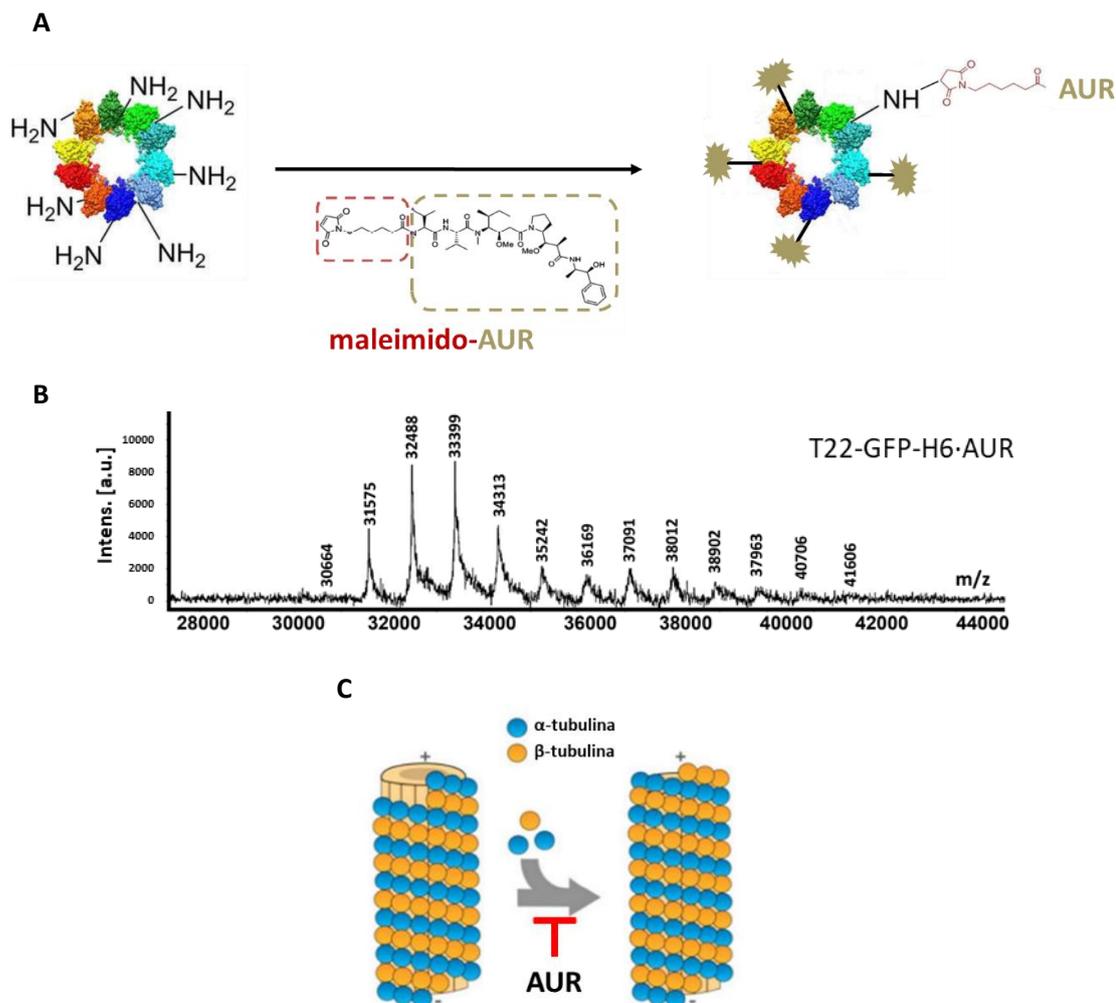


Figura 13. Síntesis y caracterización del nanoconjugado T22-GFP-H6-FdU. A. Representación esquemática de la síntesis química clásica de T22-GFP-H6-FdU a través de la adición de un grupo maleimido a la proteína y posterior adición del conjunto oligonucleótido-tiol mediante reacción de Michael. B. Espectrometría de masas del nanoconjugado T22-GFP-H6-FdU. El número de fármacos unido a las nanopartículas es solo ilustrativo. Adaptada de ²⁰⁵.

Por otro lado, se decidió conjugar el T22-GFP-H6 con **monometil auristatina E**, a la cual nos referimos de forma simplificada como “auristatina” (AUR). En este caso, la síntesis del nanoconjugado, que denominamos **T22-GFP-H6-AUR**, se llevó a cabo funcionalizando la auristatina con un enlace maleimido, que posteriormente se unió a las lisinas externas del nanotransportador (**Figura 14**).

La auristatina es una potente toxina **inhibidora de microtúbulos** (**Figura 14.C**). A través de su unión a la tubulina, inhibe la polimerización de los mismos y provoca la parada del ciclo celular en la fase G2/M, lo que conduce a la muerte de las células tumorales en división. Se trata de un análogo sintético de la dolastatina 10, un péptido marino natural, siendo tan potente que no puede administrarse como agente terapéutico en solitario, por lo que ha sido empleada unida a un anticuerpo direccionador para generar **ADCs**, como tisotumab vedotin, o brentuximab vedotin. Este último se emplea actualmente como tratamiento de cánceres hematológicos. En el caso de nuestro nanoconjugado, T22-GFP-H6-AUR ha demostrado inducir un potente efecto antineoplásico en modelos animales de leucemia y linfoma, resultados que han sido recientemente publicados por nuestro grupo ^{198,206}.

INTRODUCCIÓN



b. Nanopartículas polipeptídicas derivadas de toxinas bacterianas dirigidas a CXCR4

Las terapias basadas en **toxinas**, y específicamente las **inmunotoxinas** con actividad antitumoral, forman parte de un campo de investigación muy dinámico que se está explotando cada vez más, a pesar de los **desafíos** que entraña su paso a la práctica clínica. Las inmunotoxinas son similares a los ADC, ya que consisten en la unión química de un anticuerpo monoclonal o una citoquina con el dominio citotóxico de toxinas bacterianas, vegetales o animales. Actualmente existen **múltiples ensayos clínicos** oncológicos en los que se evalúan terapias basadas en toxinas, aunque **aún son pocas las aprobadas** por la FDA, siendo

solamente utilizadas en el tratamiento de **cánceres hematológicos**. Entre ellas, se encuentran las inmunotoxinas denileukin diftotox, tagraxofusp y moxetumomab pasudotox^{208,209}.

En este contexto, otra de las estrategias empleadas por nuestro grupo para la obtención de nanopartículas terapéuticas dirigidas a CXCR4 fue la generación de **nanopartículas proteicas autoensamblables** que contuvieran el dominio catalítico de **toxinas** procedentes de las bacterias *Corynebacterium diphtheriae* (DITOX) y *Pseudomonas aeruginosa* (PE24), y, en el caso de la toxina diftérica, también su dominio de traslocación natural. Ninguna de las dos nanopartículas incluyó el dominio de unión a sus receptores celulares naturales, y, además, las toxinas están **deinmunizadas**. Para conseguirlo, una de las estrategias empleadas consiste en la identificación y **eliminación de los epítomos** que puedan ser **reconocidos** por **células B o T**, disminuyendo la respuesta inmune en el organismo, una vez administradas^{209,210}.

Los dominios de cada toxina fueron fusionados, en el laboratorio del grupo de nuestro colaborador, el doctor Villaverde, al ligando T22 y a la cola de polihistidinas, manteniendo el **autoensamblaje** de T22-GFP-H6 y formando las nanopartículas **T22-DITOX-H6** y **T22-PE24-H6**, que pesan 29,2 kDa y 46,8 kDa, respectivamente, y miden entre **30 y 60 nanómetros** de diámetro. Entre T22 y cada toxina se insertaron sitios de **proteólisis por furina** y, en el caso de la nanopartícula T22-PE24-H6 se incluyó además un **dominio KDEL** en el extremo C-terminal (**Figura 15**)¹⁹².



Figura 15. Representación esquemática de la estructura de las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6. La secuencia T22 aparece en color celeste y el dominio H6 en rojo; las regiones de unión de los dominios aparecen en amarillo y los dominios de corte por furina en naranja; en T22-PE24-H6 aparece, en gris, la secuencia KDEL de escape del aparato de Golgi. Adaptada de¹⁹².

Su mecanismo de acción replica el de las toxinas naturales de *C. diphtheriae* y *P. aeruginosa*, ambas **inhibidoras** del factor de elongación eucariota 2 (*eukaryotic elongation factor 2*, **eEF-2**), **inactivando la síntesis de proteínas** a nivel de ribosoma, lo cual conlleva la muerte celular^{211,212}. Sin embargo, una vez endocitadas a través del receptor CXCR4, al que se une el dominio T22, cada una de las dos nanopartículas emplea diferentes vías de llegada al citosol, donde tiene lugar la acción inhibidora de eEF-2 (**Figura 16**).

INTRODUCCIÓN

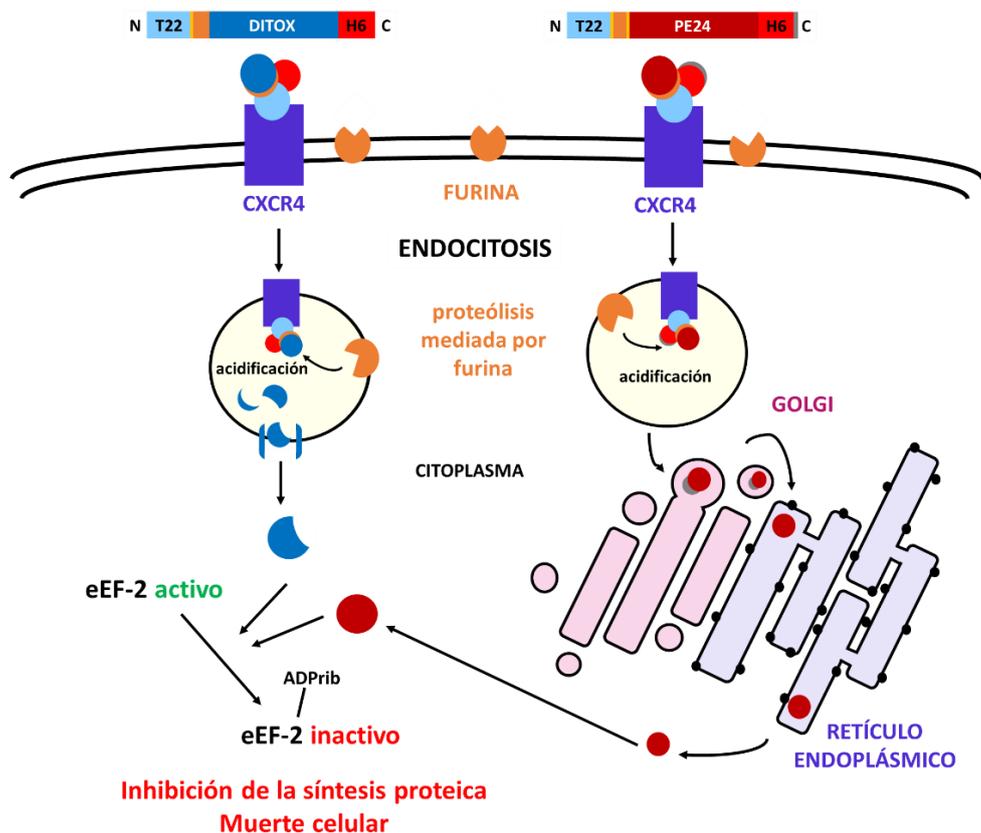


Figura 16. Mecanismo de acción de las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 en células diana CXCR4+ mediante la inhibición de la síntesis proteica a través de la inactivación de eEF-2 por ADP-ribosilación en el citoplasma. En el endosoma las nanotoxinas son proteolizadas por furinas en las secuencias específicas de corte. En T22-DITOX-H6, el dominio de traslocación de la toxina sufre cambios conformacionales por la acidificación del endosoma y se inserta en la membrana formando un poro para la salida del dominio catalítico al citosol. T22-PE24-H6 pasa del endosoma al aparato de Golgi, donde se reconoce la secuencia KDEL por su receptor, y es llevada al retículo endoplásmico, desde donde el dominio catalítico es traslocado al citoplasma. eEF-2: factor de elongación-2. Adaptada de ^{192,213}.

La nanopartícula **T22-DITOX-H6** cambia su **conformación** en el interior del **endosoma temprano**, debido a su acidez. Esto lleva a la inserción del dominio de traslocación de DITOX en la membrana endosomal, formando un poro por el que el dominio catalítico es liberado al **citosol**.

En el caso de **T22-PE24-H6**, la nanopartícula pasa del **endosoma** temprano al aparato de **Golgi**, donde su secuencia **KDEL** es reconocida. De allí, la toxina es llevada al lumen del **retículo endoplásmico** por transporte retrógrado, donde finalmente es translocada y liberada al **citosol** ²¹³.

7. MODELOS ANIMALES DE CÁNCER DE ENDOMETRIO

El uso de **modelos animales** en investigación biomédica preclínica permite obtener información sobre patologías específicas, tanto a nivel de desarrollo como de prevención, diagnóstico y tratamiento, de manera extrapolable a la especie humana. Son la herramienta principal para la evaluación de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas antes de su paso a ensayos clínicos en humanos ²¹⁴.

Los **modelos murinos** (rata y ratón) son los más apreciados como modelos animales estándar para investigación traslacional, tanto oncológica como de otras disciplinas, principalmente porque son asequibles, de fácil **mantenimiento** y permiten la **evaluación rápida** de fármacos, debido a que necesitan **poco tiempo** para generar resultados ²¹⁵. Además, comparten con el ser humano aproximadamente el 95% de sus genes ²¹⁶. En este sentido, es interesante la observación de que el **riesgo de desarrollar cáncer** a lo largo de la vida, es **comparable** en roedores y humanos: el 30% de los ratones de laboratorio desarrollan cáncer hacia el final de su vida, y el 30% de humanos lo desarrollan a los 70-80 años de edad ²¹⁷.

Sin embargo, se conoce que al menos algunos de los mecanismos antineoplásicos descritos son específicos de humano, implicando posibles diferencias en la respuesta a carcinogénesis y agentes quimiopreventivos ^{218,219}. El mayor tamaño y supervivencia de los humanos con respecto a los roedores implica que los humanos sufren muchas más divisiones celulares, y, por tanto, los tumores pueden desarrollarse y evolucionar de manera diferente ²²⁰. Además, cuando se identifican medicamentos con actividad clínica antineoplásica pueden no ser directamente extrapolables a humanos, por diversos factores, entre los cuales se incluye la **diferencia en la eficacia o metabolismo** de los fármacos entre ratones y humanos, o el hecho de que el **modelo animal** suele elegirse en función de la **facilidad de manipulación o rapidez en el crecimiento** y no siempre buscando correlación con la clínica ²²¹.

La utilidad del modelo animal en el estudio del cáncer dependerá de su capacidad para **replicar la enfermedad** humana. Un modelo ideal debería:

- Presentar las **características histopatológicas** del tumor humano
- **Progresar** a través de los mismos estadios y causar los mismos efectos fisiológicos y sistémicos
- **Involucrar** los mismos genes y vías para su iniciación y progresión
- **Reflejar** de forma cercana la **respuesta** del humano a una **terapia** determinada
- **Predecir la eficacia** terapéutica en ensayos clínicos

INTRODUCCIÓN

De esta manera, cuanto más cerca esté el modelo de estudio de este ideal, mejor se entenderán las alteraciones que conducen a la formación del tumor, así como las dianas de prevención o tratamiento y los mecanismos de resistencia a fármacos²¹⁴.

En el caso del CE más agresivo, para que el modelo sea **relevante clínicamente** debe ser **metastático**, sobrepasando las restricciones del órgano de implantación, y diseminando mediante procesos de invasión, intravasación e invasión vascular, supervivencia en el torrente sanguíneo, colonización y neovascularización, imitando el complejo mecanismo de interacción que se produce entre el estroma del tejido y las células tumorales²²².

Diversos modelos de CE se han desarrollado utilizando ratones (**Figura 17**). Es posible **inducir la formación de tumores** con **agentes alquilantes** de ADN, ARN y proteínas, frecuentemente en combinación con **estrógenos**, induciendo la formación y progresión tumoral de CE tanto en rata como en ratón. Estos modelos han sido empleados como modelos traslacionales para investigar los efectos de agentes quimiopreventivos como el danazol, tamoxifeno y el indol-3-corbinol dietético. Sin embargo, la **exposición a compuestos químicos** puede alterar el **funcionamiento** metabólico de **otros órganos**, modificando de esta manera el metabolismo de los fármacos estudiados²¹⁵.

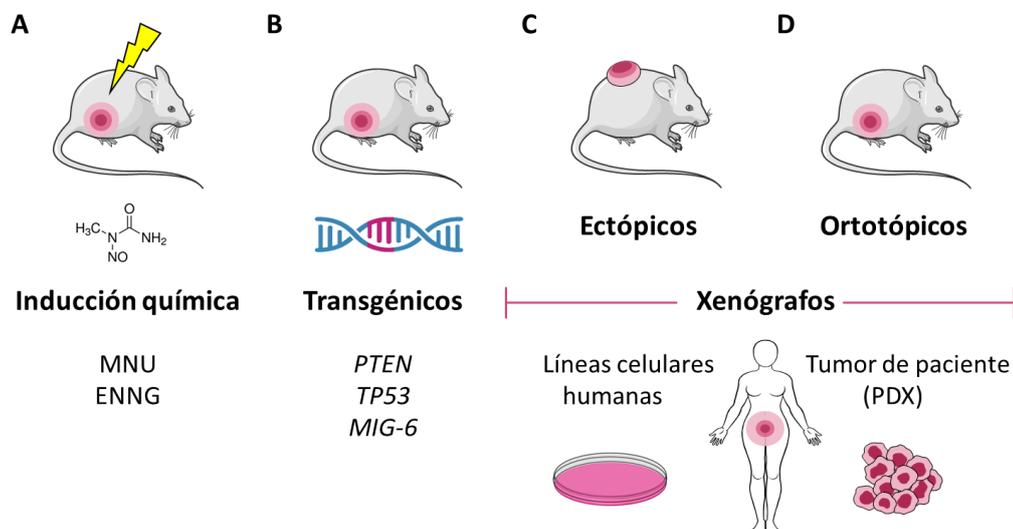


Figura 17. Modelos animales de cáncer de endometrio. **A)** Los carcinógenos químicos MNU y ENNG son capaces de inducir tumorigénesis en el endometrio. **B)** Los modelos transgénicos son aquellos en los que el genoma ha sido modificado, alterando genes implicados en la carcinogénesis endometrial como *PTEN*, *TP53*, o *MIG-6*. **C y D)** Los modelos xenógrafos se generan implantando un fragmento tumoral o células en suspensión, procedente directamente de una paciente o bien a partir de líneas celulares establecidas, en zonas del animal accesibles a nivel subcutáneo (modelos **ectópicos**) o en el útero, origen del cáncer de endometrio (**ortotópicos**). MNU: N-methyl-N-nitrosourea; ENNG: N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine.

También existen diferentes modelos de **ratones transgénicos knock-out** para genes relevantes en la carcinogénesis de CE, como *PTEN*²²³, *TP53*^{224,225} y *MIG-6*²²⁶. Estos modelos se utilizan para investigar **mecanismos biológicos** relacionados con el desarrollo del cáncer²¹⁵, y, en muchos casos, para **evaluar el efecto de la dieta en la** tumorogénesis²²⁷, o validar inhibidores de PARP, de AKT y mTOR²²⁸, de estrógenos²²⁹ y de CDK4/6²³⁰. No obstante, muestran limitaciones para determinar la respuesta al tratamiento de nuevos fármacos por la dispersión en la generación de tumores en los distintos animales, y la falta de heterogeneidad tumoral, de modo que no son representativos de los tumores de CE en el ser humano²¹⁹.

Por otro lado, los modelos animales más empleados en la investigación del cáncer son los **modelos xenógrafos**, establecidos por la implantación de un fragmento de tumor o una suspensión celular directamente en ratones inmunodeprimidos, la cual puede llevarse a cabo de forma ortotópica o ectópica²³¹.

Entre los **modelos xenógrafos heterotópicos**, en los que la implantación se lleva a cabo en órganos distintos al de desarrollo del tumor primario de estudio, destacan los **modelos ectópicos**. En ellos, los puntos de inoculación son accesibles de forma **subcutánea**, como los flancos, la almohadilla de grasa mamaria, la almohadilla de grasa interescapular y la cápsula renal²³². Se trata de los modelos más empleados para demostrar *in vivo* la **implicación de vías de señalización** en el crecimiento tumoral, el **mecanismo de resistencia** a un compuesto particular o el **efecto de fármacos** en fase experimental. Sin embargo, su relevancia en clínica es discutida por razones tales como la necrosis central del tumor debido a la baja vascularización en el subcutis, el crecimiento tumoral aislado (incluso pueden encapsularse) y, el más importante, la ausencia de comportamiento metastásico, que es la principal causa de muerte por cáncer en la clínica. Por otro lado, se ha demostrado que incluso la **respuesta a la quimioterapia** es extremadamente **dependiente de la localización** del tumor²¹⁵.

Por este motivo, se recurre a **modelos ortotópicos**, en los que la implantación sí se realiza en el órgano donde se desarrolla el tumor primario en pacientes. Este procedimiento tiene como principal ventaja el hecho de que el tumor se desarrolla en el ambiente anatómico de interés, de forma relacionada con su fisiopatología. Sin embargo, implican desafíos técnicos y la necesidad de utilizar sistemas de imagen que monitoricen el seguimiento del tumor, por lo que en ellos es difícil controlar los criterios de punto final.

A su vez, en función del tipo de muestra de tumor implantada, los modelos **xenógrafos** pueden ser **derivados de pacientes** o derivados **de líneas celulares humanas**. En ambos casos, las cepas de ratón empleadas son diversas, según el grado de inmunosupresión necesario para la

INTRODUCCIÓN

adecuada implantación y el nivel de eficiencia requerida en la diseminación metastática de las células. Así, existen ratones atímicos (*Swiss nude*), ratones no obesos diabéticos con inmunodeficiencia severa combinada (*non-obese diabetic/severe combined immune deficiency*, NOD/Scid) y ratones NOD/Scid deficientes para la cadena gamma del receptor de interleucina 2(IL2-R γ) (NSG)^{231,232}.

Los modelos **xenógrafos derivados de pacientes** (*Patient-derived xenograft models*, PDXs) se establecen por la implantación de una pieza fresca de tumor de paciente²³¹. Su gran ventaja es el **mantenimiento de la heterogeneidad histológica**, molecular y funcional original que presentaba el tumor en el paciente²³², lo que les convierte en ideales para **validar medicamentos y terapias personalizadas**, incluso de forma co-clínica para desarrollar medicina personalizada y seleccionar el tratamiento ideal para el paciente donador (en “paneles de xenógrafos”)²¹⁴. También pueden emplearse células derivadas de estos modelos para el estudio de biomarcadores y de mecanismos de resistencia a medicamento, ya que son más comparables a nivel clínico que las líneas celulares convencionales^{233,234}. Sin embargo, muestran una gran desventaja: la **baja tasa de implantación y diseminación**, que depende del tipo de tumor, el grado de inmunosupresión del hospedador y el método de implantación²³⁵.

En cuanto a los modelos **xenógrafos derivados de líneas celulares**, han tenido tradicionalmente un papel fundamental en el desarrollo de fármacos antitumorales²³⁶, aunque puede que pierdan cierta relevancia clínica debido a los procesos de inmortalización y adaptación inducidos por su crecimiento en cultivo *in vitro* y a la falta de interacción con un microambiente semejante al fisiopatológico, con niveles de oxígeno y nutrientes alterados.

En el caso del CE, se han establecido **múltiples líneas celulares humanas**, siendo las más empleadas aquellas derivadas de tumores de tipo endometriode y con alteraciones en la vía PI3K/AKT, por lo que son representativas de la mayoría de tumores observados en la clínica (**Tabla 5**). Estas líneas mantienen perfiles únicos y consistentes con los tumores originales de los cuales derivan, aunque la obtención de varias líneas celulares a partir de la misma muestra de tumor (por ejemplo, HEC1A y HEC1B) indican la imposibilidad de mantener la heterogeneidad intratumoral *in vitro*²¹⁵.

Otra de las ventajas de trabajar con líneas celulares es la posibilidad de **manipularlas genéticamente**, ya que la introducción en ellas de material genético exógeno (ADN, ARN) puede dar lugar a la ganancia o pérdida de expresión de genes, lo cual facilita el estudio de su implicación en mecanismos biológicos, también de forma traslacional a través de su implantación en animales.

Tabla 5. Alteraciones genómicas de las líneas celulares más empleadas de cáncer de endometrio tipos I y tipo II. Adaptada de ²¹⁵.

Línea celular	Localización del tumor	Tipo	<i>PTEN</i>	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>	Alteraciones en las vías de PI3K/Akt	Inestabilidad de microsatélites
AN3CA	Metástasis	I	Delección	wt	Mutación de cambio de sentido	Sí	Alta
ARK-1	Primario	II	ND	ND	ND	Sí	ND
ARK-2	Primario	II	ND	ND	ND	ND	ND
HEC1A	Primario	I	wt	Mutación de cambio de sentido	Mutación de cambio de sentido	Sí	Baja
HEC1B	Primario	I	wt	Mutación de cambio de sentido	Mutación de cambio de sentido	Sí	Alta
Ishikawa	Primario	I	Delección	wt	Mutación de cambio de sentido	No	Baja
KLE	Metástasis	ND	wt	wt	Mutación de cambio de sentido	Sí	Baja
MFE-280	Primario	I	wt	wt	Mutación del lugar de splicing	Sí	Baja
RL-95-2	Primario	I	Mutación de cambio de sentido	wt	Delección	Sí	Baja

*ND: no disponible; wt: *wild type*, estado nativo.

Una de las aplicaciones más relevantes en el campo de la oncología traslacional, mediante la introducción de material genético en líneas celulares, es la posibilidad de realizar un seguimiento de la progresión de la enfermedad mediante **bioluminiscencia**. A través de la incorporación del gen de la **Luciferasa**, en la presencia de su **sustrato** (D-luciferina) en las células tumorales transducidas tiene lugar una reacción química inocua que producirá la **emisión de luz**. Este hecho permite la monitorización y cuantificación de la actividad celular dentro del organismo a tiempo real, de forma **muy específica y sensible**, ya que los animales de experimentación no emiten luminiscencia de forma natural, lo que hace que el ruido de fondo sea nulo, aunque existe cierta limitación debido a que la resolución espacial depende de la profundidad de la fuente bioluminiscente ²³⁷.

A pesar de las limitaciones descritas, la inoculación *in vivo* de líneas celulares es una estrategia muy eficiente para el estudio del efecto de fármacos y mecanismos moleculares gracias a su asequibilidad, bajo **coste** y mejor **reproducibilidad** que los modelos PDX.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El **tratamiento del cáncer de endometrio** (CE) en **estadios avanzados** supone un gran **desafío** biomédico debido a la **baja tasa de respuesta** de las pacientes y a los **efectos secundarios** asociados a los tratamientos administrados a día de hoy.

CXCR4 es un receptor de quimiocinas sobreexpresado y asociado con parámetros de mal pronóstico en varios tipos de cáncer. Adicionalmente, la **vía de señalización** en la que participa CXCR4 junto a su ligando, CXCL12, ha sido definida como **crucial en la progresión del carcinoma de endometrio**.

Sobre esta base, proponemos que la **eliminación selectiva de células CXCR4⁺** en CE, mediante **nanopartículas proteicas direccionadas**, capaces de entregar agentes citotóxicos, supondrá una estrategia terapéutica con **potente efecto antineoplásico** y **reducida toxicidad sistémica** en modelos animales, con probable traslación clínica e impacto beneficioso para estas pacientes.

OBJETIVOS

Objetivo principal

Evaluar el efecto antineoplásico de nanopartículas terapéuticas dirigidas a células tumorales con sobreexpresión del receptor de membrana CXCR4 (células CXCR4⁺) en modelos animales de cáncer de endometrio en estadios avanzados.

Objetivos específicos

1. Evaluar la expresión de CXCR4 en biopsias tumorales de pacientes afectadas de CE.
2. Generar modelos animales xenógrafos de CE en ratón, subcutáneos y ortotópicos, con expresión de CXCR4, que reflejen las características clinicopatológicas de la enfermedad en estadio avanzado y sean útiles para la evaluación de nuevos fármacos antineoplásicos.
3. Evaluar la dependencia de CXCR4 para la internalización, y la actividad citotóxica del nanotransportador T22-GFP-H6 en líneas celulares de CE, así como su biodistribución y toxicidad en el modelo subcutáneo de CE CXCR4⁺.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4. Realizar un cribado *in vitro* de la citotoxicidad y dependencia de CXCR4 de nanoconjugados y nanopartículas polipeptídicas derivadas de T22-GFP-H6, en líneas celulares de CE CXCR4⁺, para seleccionar aquellas con mayor potencial terapéutico.
5. Estudiar *in vitro* el mecanismo de muerte celular inducido por las nanopartículas con un mayor efecto citotóxico dependiente de CXCR4.
6. Estudiar el efecto antitumoral de las nanopartículas terapéuticas seleccionadas sobre la tasa de crecimiento tumoral y la supervivencia, tras su administración a dosis repetidas en el modelo subcutáneo de CE CXCR4⁺ y su mecanismo de muerte celular.
7. Estudiar el efecto antimetastático de la nanopartícula terapéutica con mayor actividad antineoplásica, administrada a dosis repetidas, en el modelo ortotópico y metastático de CE CXCR4⁺ generado.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. EXPRESIÓN DE CXCR4 EN MUESTRAS DE PACIENTES CON CÁNCER DE ENDOMETRIO

1. 1. Estudio de la presencia y el patrón de expresión de CXCR4 en pacientes y su asociación con parámetros clínicos

La determinación de la **expresión proteica de CXCR4** en pacientes de CE se llevó a cabo con **106 muestras parafinadas**, procedentes de 79 pacientes con CE confirmado patológicamente y sin tratar, recogidas entre 2004 y 2010 en el *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*. De estas muestras, 79 procedían de tejido tumoral y 27 de tejido sano. Todas ellas fueron incluidas en *tissue microarrays* y se les realizó una tinción inmunohistoquímica de CXCR4 siguiendo el protocolo especificado en el subapartado **3.7.c**.

Su evaluación se realizó, con el asesoramiento y validación de un patólogo clínico, cuantificando el porcentaje de células tumorales positivas para CXCR4, así como su intensidad, puntuada del 1 al 3 (de menor a mayor expresión). La valoración se expresó como **H-score** (intensidad × porcentaje).

A continuación, se llevaron a cabo **análisis estadísticos** para estudiar la relación entre la expresión de CXCR4 y los siguientes parámetros clínicos: estadio FIGO, invasión miometrial, implicación de cérvix, invasión vascular e invasión ganglionar.

1. 2. Estudio de la asociación entre los niveles de ARNm de CXCR4 y parámetros clinicopatológicos y de evolución de las pacientes

Para el estudio de la relación de la **expresión a nivel de ARNm** del receptor CXCR4 con parámetros clinicopatológicos, se empleó una cohorte de **529 pacientes** con CE obtenida de la base de datos pública de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), en concreto del proyecto TCGA-UCEC. Los niveles de expresión de ARNm secuenciado se expresan como fragmentos por kilobase de transcrito por millón de lecturas mapeadas (*Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads, FPKM*).

El proyecto TCGA-UCEC incluye información referente tanto al diagnóstico como a la evolución clínica de las pacientes. De entre los parámetros clínicos, se incluyeron en el estudio el tipo histológico, subtipo molecular y estadio FIGO, así como la supervivencia libre de enfermedad, supervivencia global y progresión de la enfermedad. Se llevaron a cabo **análisis estadísticos** para

MATERIAL Y MÉTODOS

determinar el grado de asociación entre el nivel de ARNm de CXCR4 y cada uno de los parámetros descritos.

1. 3. Análisis estadísticos con muestras de pacientes

Para analizar las diferencias entre dos grupos en relación a variables categóricas (por ejemplo, presencia o ausencia de CXCR4 en distintos estadios FIGO), se realizaron tablas de contingencia y se aplicó el **test de Fisher** o el test Chi-cuadrado.

El análisis de las diferencias en el valor de una variable entre grupos, se realizó conociendo, en primer lugar, la normalidad de la muestra mediante el **test de Shapiro-Wilk** y posteriormente mediante el test paramétrico de la **t de Student** o **ANOVA** para comparar las medias de los valores de dos o de más de dos grupos, respectivamente. Las diferencias se consideraron significativas para una $p < 0,05$. Las curvas de **Kaplan Meier** y el **test Log-Rank** se utilizaron para representar y comparar, respectivamente, la supervivencia entre grupos.

Todos los análisis descritos se llevaron a cabo utilizando el programa *IBM SPSS Statistics v.23*.

2. EXPERIMENTOS *IN VITRO* EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE ENDOMETRIO

2. 1. Cultivo celular

a. Líneas celulares humanas de CE

Todas las líneas celulares de cáncer de endometrio se cultivaron en su correspondiente **medio específico suplementado** con 10% de suero bovino fetal (FBS), glutamina 2 mM y penicilina a 100 µg/ml (Life Technologies). Las condiciones de cultivo eran estándar, con incubación a 37°C y en atmósfera al 5% de CO₂.

A continuación, se describen las líneas celulares empleadas en este estudio, su caracterización molecular y condiciones de cultivo:

- **AN3CA:** línea celular procedente de una metástasis linfática producida por un adenocarcinoma endometrial en una mujer caucásica de 55 años (HTB-111, ATCC)²³⁸. Muestra alta IMS, mutaciones heterocigóticas para *MAPK3*, *PIK3R1* y *TP53*, y homocigóticas para *PTEN*. Se cultivó en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco) y medio Ham's F-12 Nutrient Mix (F12, Gibco) en proporción 1:1 suplementado.
- **HEC1A:** línea celular procedente del adenocarcinoma endometrial de una mujer del nordeste asiático de 71 años (HTB-112, ATCC)²³⁹. Muestra baja IMS, y es una línea con variaciones heterocigóticas para *KRAS* y homocigóticas para *TP53*. Se cultivó en medio DMEM alto en glucosa (4,5 g/l; Gibco) suplementado.
- **USPC-ARK-2:** procede de un adenocarcinoma endometrial de tipo seroso, de una mujer de 63 años. No se ha descrito IMS ni variaciones en ninguna secuencia. Se cultivó en medio DMEM alto en glucosa suplementado. Esta línea fue cedida por el doctor Xavier Matias-Guiu, del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (Barcelona).
- **HEK293T:** derivada de la línea celular HEK, establecida a partir de células renales embrionarias humanas, transfectada para la expresión del antígeno T grande de *Simian Virus 40* (SV40), lo cual permite la replicación con elevado número de copias de plásmidos de ADN con origen de replicación SV40 (ATCC). En esta tesis fueron empleadas únicamente para la producción de partículas lentivirales. Se cultivaron en medio DMEM alto en glucosa sin antibióticos, con un 1% de Glutamina y 10% de FBS inactivado por calor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todas estas líneas presentan un **crecimiento celular en adhesión**, por lo que, para manipularlas (ampliar su cultivo a un nuevo flascón, sembrarlas para los experimentos o congelarlas) se retiraba el medio, se hacía un lavado con **PBS** atemperado y se añadían, en flascos de 75 cm², 3 ml de **tripsina** (0,05% *Trypsin-EDTA*, Life Technologies). Las células eran incubadas a 37°C durante 2-7 min dependiendo de la línea, tras los cuales se desprendían y eran resuspendidas en medio completo. Luego, eran centrifugadas durante 5 min a 400 g y el pellet se resuspendía homogéneamente en medio completo para su siembra o pase, o bien en 1 ml de una solución de FBS con 10% de dimetildulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) para su **congelación** en criotubos a -80°C o en tanques de nitrógeno líquido.

Para usar células congeladas, los criotubos eran introducidos en un baño a 37°C para su descongelación rápida. Una vez descongeladas, eran homogeneizadas, resuspendidas en medio completo específico de cada línea y sembradas en un flascón de 75 cm² de superficie.

Para el **contaje** de células en suspensión se empleaba el contador automático Scepter 2.0 con puntas de 60 µm (Merck Millipore), que permite discriminar células viables del debris celular según el principio de Coulter.

b. Detección de *Mycoplasma sp.*

La presencia de *Mycoplasma sp.* en el cultivo celular es una de las contaminaciones bacterianas más frecuentes, y provoca varias alteraciones a nivel funcional y morfológico en las líneas de estudio, por lo que cada cierto tiempo (3-6 meses) se analizaba su posible presencia en el medio de cultivo de células confluyentes (90-100%). Para ello se utilizaba el kit *LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit* (Sigma-Aldrich), un ensayo de PCR que amplifica específicamente la región codificante del RNA ribosómico 16S, altamente conservada en el género *Mycoplasma sp.*, identificando si existe contaminación en el cultivo.

c. Obtención de pellets celulares

Para conocer la **presencia y el patrón de expresión de marcadores celulares** en líneas en cultivo, tanto de proteínas por inmunocitoquímica, como la condensación del ADN por tinción con DAPI, se obtuvieron **pellets celulares** a partir de flascos de 150 cm². Los flascos fueron lavados con PBS, tripsinizando las células y centrifugándolas en tubos de 50 ml durante 5 min a 400 g. Después de otro lavado con PBS para retirar posibles restos de medio de cultivo, se añadió al pellet resultante 3 gotas de **plasma** humano. Tras pipetear suavemente, se añadieron 3 gotas de **trombina** humana (Sigma Aldrich) y se mezcló moviendo el tubo en círculos hasta su coagulación. Una vez formado el coágulo, se volvió a centrifugar durante 5 min a 400 g para su

concentración, se vertió sobre papel absorbente y se introdujo, en un casete, en formaldehído al 4%, para su fijación y procesamiento como se explica en el apartado 3.7.

2. 2. Estrategias para la sobreexpresión de CXCR4 y Luciferasa en líneas celulares de CE

Aquellas líneas celulares humanas de CE que no expresaban el receptor de membrana CXCR4 de forma constitutiva (células “parentales” o “CXCR4⁻”), mediante el ensayo que se describe en el subapartado 2.3.a, fueron sometidas a dos estrategias de **introducción de material genético exógeno** en su interior con el objetivo de obtener líneas celulares de CE con sobreexpresión sostenida de CXCR4 membranal, y de la enzima Luciferasa.

a. Construcciones plasmídicas

Las diferentes estrategias de introducción de las secuencias codificantes para CXCR4 y Luciferasa en las células parentales requirieron el uso de diferentes plásmidos (**Figura 18**).

Para la transfección liposomal se usó:

- **pPK-CMV-F3-CXCR4** (Promokine): con resistencia a ampicilina en bacterias a una concentración de 25 µg/ml y a geneticina (G418, Gibco) en células eucariotas, y permitiendo la expresión de CXCR4 bajo el promotor de citomegalovirus (CMV).

Para la transducción lentiviral se usaron:

- **pLentIII-UbC-CXCR4-Luciferasa** (ABM): con resistencia a kanamicina en bacterias a una concentración de 25 µg/ml, y a puromicina en células eucariotas. Contiene los genes codificantes para el receptor CXCR4 y para la enzima Luciferasa bajo el promotor ubiquitina (UbC).
- **pLentIII-UbC-Luciferasa**: obtenido a partir del clonaje y la digestión del plásmido anterior con las enzimas de restricción NheI y KpnI (Promega), por lo que, aunque carece del gen de CXCR4, tiene idénticas características a pLentIII-UbC-CXCR4-Luciferasa.
- **Plásmidos víricos**: bajo el promotor CMV, incluyen resistencia a ampicilina en bacterias a 25 µg/ml. Son plásmidos de bajo número de copias, y fueron cedidos por la doctora Mary Collins (*Medical School, Cleveland College, Ohio*).
 - **pCMV-dR 8.91**: contiene las secuencias codificantes para las proteínas de la cápside, Gag, y los genes reguladores de la replicación y síntesis lentiviral, Pol.
 - **pCMV-VSV-G**: contiene las secuencias codificantes para las proteínas de la envuelta lentiviral, VSV-G.

MATERIAL Y MÉTODOS

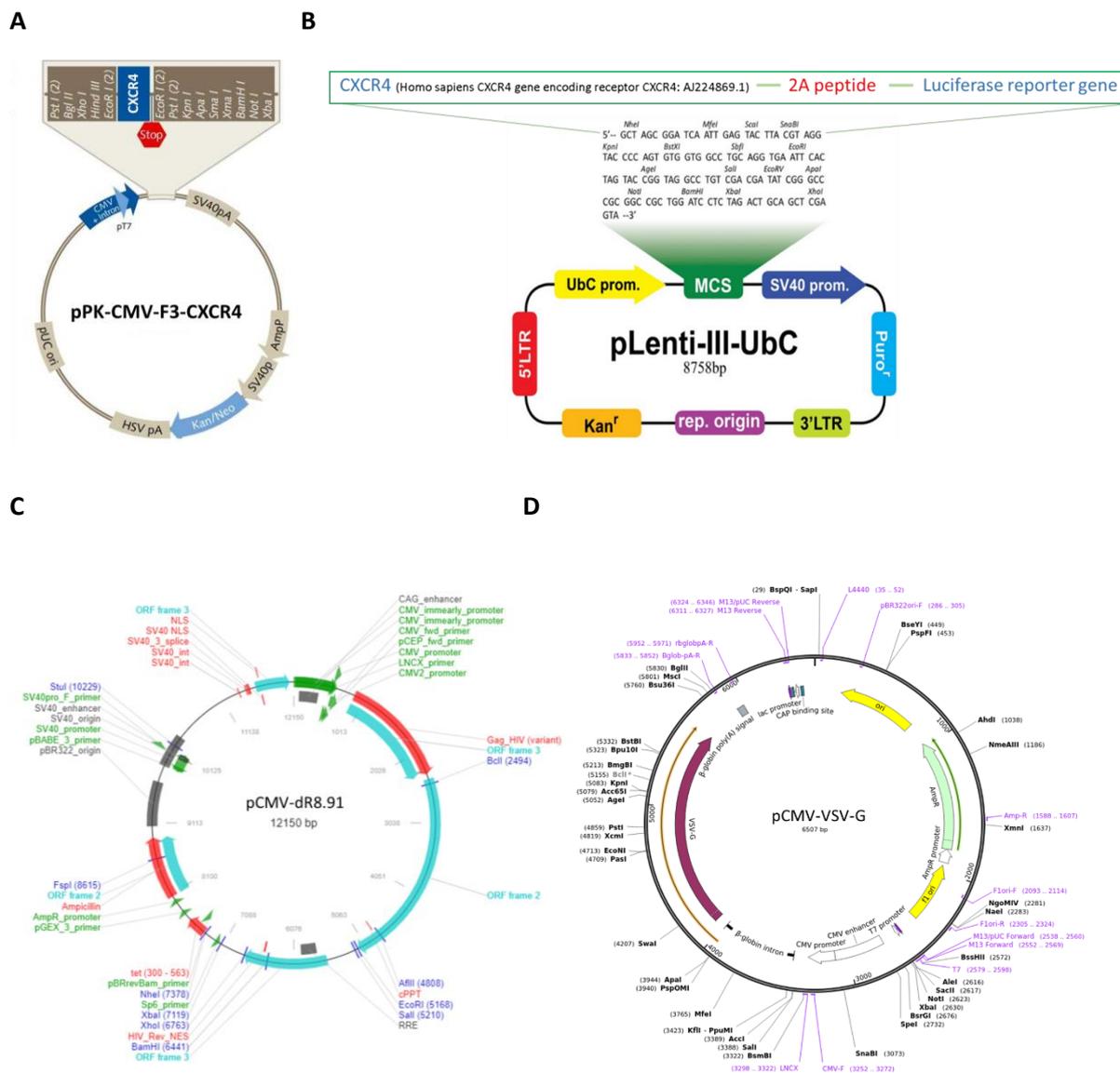


Figura 18. Mapas de los plásmidos diana y víricos empleados para la transfección liposomal y transducción lentiviral, que muestran la secuencia y posición de los elementos funcionales de cada uno: sitios de digestión por enzimas de restricción, promotores y terminadores; genes de resistencia a antibióticos y origen de replicación, además de las secuencias de los genes diana. **A.** Plásmido pPK-CMV-F3-CXCR4 (Promokine), empleado para la expresión de CXCR4 en líneas celulares mediante transfección liposomal. **B.** Plásmido pLentiIII-UbC-CXCR4-Luciferasa (ABM), empleado para la expresión de CXCR4 y Luciferasa en líneas celulares mediante transducción lentiviral. **C.** Plásmido pCMV-dR 8.91, codifican las proteínas de la cápside y los genes reguladores de la replicación y síntesis lentiviral (Addgene). **D.** Plásmido pCMV-VSV-G, contiene las secuencias codificantes para las proteínas de la envuelta lentiviral (Addgene).

b. Crecimiento del cultivo bacteriano transformado, extracción y cuantificación de los plásmidos

A partir de **bacterias** *E. coli* de la cepa Stbl3 transformadas y congeladas en glicerol para que integraran los plásmidos de interés, se preparó un **cultivo starter** de poco volumen a partir del cual obtener el cultivo bacteriano de trabajo, de mayor volumen. Rascando, en condiciones de esterilidad, se extrajeron las bacterias y se añadieron a un matraz *starter* con 5 ml de LB con antibiótico de selección (ampicilina o kanamicina, según la resistencia del plásmido), para incubarlo en agitación a 37°C.

Una vez pasadas 6-8 horas de incubación, se realizó una dilución 1/500 y se dejó incubando durante otras 12-16 horas en idénticas condiciones. Cuando se observó turbidez, indicadora del crecimiento bacteriano, se repartió el volumen en tubos para su centrifugación durante 15 min a 4°C y 6000 g. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y los restos de medio con una pipeta automática. Para la **extracción del plásmido** se realizó una **Maxi/Miniprep** (Qiagen) siguiendo las indicaciones del kit. Finalmente, tras la elución y resuspensión del plásmido, se **cuantificó el ADN** presente en cada muestra. Para ello, se realizó una dilución 1/40 de cada muestra (2 µl de ADN en 78 µl de agua destilada), se programó el **Nanodrop** (Thermo Fisher) en ADNds y se empleó agua destilada como blanco control.

c. Transfección liposomal para la expresión de CXCR4 en líneas celulares de CE

La transfección liposomal, mediada por liposomas catiónicos, se empleó para introducir el **plásmido pPK-CMV-F3-CXCR4** en las diferentes líneas celulares de CE: AN3CA, HEC1A y ARK-2. La lipofectamina (*Lipofectamine 2000 Transfection Reagent*, Thermo Fisher) es una formulación para la transfección de ácidos nucleicos (ADN y ARN) en células eucariotas que generalmente presenta buena eficiencia de transfección y baja toxicidad, de forma que no es necesario retirar los complejos ácido nucleico-lipofectamina.

Para realizar la transfección, se sembraron placas de 6 pocillos a una densidad de siembra de 300.000 células/ml. A las 24 horas se retiró el medio, se lavó con PBS y se añadieron 2 ml de medio de suero reducido **Opti-MEM** (Gibco). Las placas se incubaron 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ mientras se prepararon las siguientes soluciones pipeteando suavemente con la pipeta automática:

- **Solución de ADN:** 4 µg de ADN en 250 µl de Opti-MEM.
- **Solución de lipofectamina:** 8 µl de lipofectamina en 250 µl de Opti-MEM.

MATERIAL Y MÉTODOS

Seguidamente, los dos tubos fueron incubados 5 min a temperatura ambiente y mezclados entre sí una vez transcurrido ese tiempo. Como control se empleó una solución de 500 µl de Opti-MEM con 12 µl de lipofectamina, sin ADN. Las mezclas fueron incubadas durante otros 20 min a temperatura ambiente, momento en el que se retiró el Opti-MEM de los pocillos y se añadió 100 µl de mezcla.

A continuación, las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Tras ese tiempo, se reemplazó la mezcla con los complejos ADN-lipofectamina por el medio de cultivo habitual de cada línea celular con el **antibiótico de selección**: geneticina a una concentración de selección de 8 mg/ml. Cuando se almacenaron un mínimo de 3 viales de cada línea transfectada, se determinó la expresión de CXCR4 según se describe en los subapartados **2.3.a** y **2.3.b**. La concentración de geneticina utilizada para el mantenimiento de las células fue de 4 mg/ml.

d. Transducción lentiviral para la expresión de CXCR4 y Luciferasa en líneas celulares de CE

La transducción mediante un **vector lentiviral** permite la **integración**, de forma aleatoria, del ADN plasmídico en el genoma de la célula, lo que asegura la **expresión estable** de las secuencias de interés sin necesidad de emplear antibióticos de selección. En esta tesis, se empleó esta estrategia para introducir los plásmidos pLentiIII-UbC-CXCR4-Luciferasa y pLentiIII-UbC-Luciferasa en las líneas celulares de CE.

1. Producción de partículas lentivirales por transfección de la línea celular HEK293T

Para generar los lentivirus portadores de los plásmidos diana, se emplearon como células empaquetadoras la línea **HEK293T**. Se trata de células de baja adhesión a las placas de siembra, por lo que requieren el pretratamiento de las placas con una solución al 0,01% de poli-L-lisina y una manipulación especialmente cuidadosa.

Para su transfección liposomal, las células HEK293T fueron sembradas en placas de 60 mm a una densidad de 3×10^6 células/ml de su medio de cultivo completo, y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. A las 16 horas, se prepararon las dos soluciones necesarias para que se formen los complejos de transfección:

- **Solución de ADN (viral y diana)**: añadiendo, por cada placa a transfectar, 500 µl de Opti-MEM con los diferentes plásmidos, pipeteando suavemente:
 - 2,25 µg del plásmido diana (pLentiIII-UbC-CXCR4-Luciferasa o pLentiIII-UbC-Luciferasa)

- 1,5 µg de pCMV-dR8.9
- 0,75 µg de pCMV-VSV-G
- **Solución de lipofectamina:** mezclando, por cada placa, 12 µl de lipofectamina y 500 µl de Opti-MEM.

Después de la **incubación** durante 5 min a temperatura ambiente, se mezclaron las dos soluciones y se dejó reposar la mezcla durante 20 min más, para permitir la formación de los complejos. Tras retirar el medio de las placas, se añadieron en cada una 500 µl de DMEM sin antibióticos ni FBS y 1 ml de la solución de transfección. Después de agitar suavemente la placa, se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas, pasadas las cuales se cambió el medio por 3 ml de Opti-MEM con DMEM en proporción 1:1, con 2% de FBS inactivado por calor.

Después de **48 horas**, en las que las células produjeron y **expulsaron al medio las partículas virales** empaquetadas, en cuyo interior se encontraba el plásmido de interés, se recogió el sobrenadante, que fue centrifugado a 4°C durante 10 min a 2500 rpm, y filtrado con un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro. La **suspensión viral** fue recogida y almacenada en criotubos a -80°C hasta su uso.

2. Transducción lentiviral de las líneas celulares humanas de CE

Para su transducción, cada **línea celular de CE**, AN3CA, HEC1A o ARK-2, fue **sembrada** en placas de 24 pocillos, con 100.000 células, las cuales se incubaron durante 16 horas. Tras retirar el medio, se añadió a cada pocillo 400 µl de **suspensión vírica** a diferentes diluciones (1/2, 1/10, 1/100 y 1/1000), excepto a los dos pocillos de control, a los que se añadieron 400 µl de medio sin virus. El medio de dilución fue el específico de cada línea, suplementado con FBS inactivado por calor. Tras 6 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se añadieron 500 µl más de medio.

3. Selección de las células transducidas con resistencia a antibiótico

A las 48 horas, las células ya **expresan la construcción exógena**, si la transducción se ha producido de forma efectiva. En ese momento, a todos los pocillos (salvo a uno de los controles) se les cambió el medio consumido por 500 µl de su medio de cultivo con antibiótico de selección, puromicina (10 mg/ml, InvivoGen), a 1 µg/ml en el caso de AN3CA, 3 µg/ml para HEC1A y 5 µg/ml para ARK-2, cada 3 días durante un mes.

En cuanto se criopreservaron un mínimo de 3 viales de cada línea transducida, se determinó la expresión de las proteínas deseadas (Luciferasa y CXCR4 de superficie).

MATERIAL Y MÉTODOS

2. 3. Determinación de la expresión de las moléculas diana

a. Detección de CXCR4 de membrana por citometría de flujo

Para evaluar la **expresión de CXCR4 de membrana** en las diferentes líneas celulares, tanto parentales como transfectadas o transducidas, se empleó la **citometría de flujo**, una tecnología que emplea luz láser para el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas y presencia de marcadores, en este caso el receptor de superficie CXCR4.

Tras su conteo, las células fueron divididas en tres tubos con 10^6 células en 100 μ l de PBS 0,5% BSA cada uno, a los cuales se añadieron respectivamente 5 μ l de **anticuerpo** anti-CXCR4 (PE-Cy5 Mouse Anti-Human CD184, BD), 5 μ l de **isotipo** control (*PE-Cy5 Mouse IgG2a, K isotype control*, BD) o 5 μ l de PBS (control negativo). Después de 20 min de incubación a 4°C en oscuridad y agitación suave, se realizaron dos lavados más y, finalmente, fueron resuspendidas en 200 μ l de PBS 0,5% BSA y pasadas a tubos de citometría.

Tanto el porcentaje de células positivas para CXCR4 de superficie como la intensidad de expresión fueron determinados en el citómetro *FACScalibur* (BD Biosciences), utilizando el programa *CellQuest Pro* (BD Biosciences).

Para obtener poblaciones celulares homogéneas, con elevado porcentaje e intensidad de CXCR4 a partir de las líneas transfectadas o transducidas, las células con niveles mayor expresión de este receptor fueron **seleccionadas y aisladas** utilizando el citómetro **FACSAria** (BD Biosciences).

La determinación de los niveles de expresión de CXCR4 por citometría de flujo se realizó **sistemáticamente de manera previa a todos los experimentos**, tanto *in vitro* como *in vivo*.

b. Detección de CXCR4 por tinción inmunocitoquímica

Con objeto de conocer si CXCR4 estaba expresado, además de en la membrana, en otros **compartimentos celulares**, se obtuvieron pellets siguiendo el protocolo de *Obtención de pellets celulares* explicado anteriormente. Tras su fijación en formaldehído al 4%, fueron procesados para realizar sobre ellos una tinción inmunocitoquímica de CXCR4 según se explica en el apartado **3.7.**, para finalmente determinar el patrón de expresión de CXCR4 a nivel celular, así como el porcentaje de células positivas y su intensidad.

c. Detección de Luciferasa por emisión de bioluminiscencia

Para evaluar la expresión de **Luciferasa** en células en cultivo, éstas fueron levantadas con tripsina y contadas para sembrar 1 ml en una placa de 6 pocillos a una densidad de 500.000 células/ml.

El registro de la emisión de bioluminiscencia, en el equipo **IVIS Spectrum 2000**, se realizó retirando el medio de cultivo a las 24 horas, para ser reemplazado por 1 ml de PBS 0,5% BSA. Antes de registrar la emisión de bioluminiscencia por las células, se les añadió 200 µl de una solución de D-luciferina (*D-Luciferin Firefly, potassium salt 1.0 g*, Perkin Elmer) a 15 mg/ml. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software del equipo, *Living Image v.4.7.3*.

2. 4. Ensayos funcionales con nanopartículas en líneas celulares de CE

a. Ensayo de internalización de nanopartículas fluorescentes

La evaluación de la **eficiencia de internalización** de las nanopartículas en las células se realizó mediante citometría de flujo. Este estudio se llevó a cabo únicamente en **nanopartículas** que contenían en su estructura el **dominio GFP**. Para ello, se sembraron placas de 6 pocillos con 1 ml de una dilución de células a una densidad de 500.000 células/ml. A las 24 horas, cada pocillo fue tratado, respectivamente, con:

- **Tampón de dilución:** bicarbonato sódico con sal ($\text{NaCO}_3\text{H} + \text{NaCl}$) a pH 8, para los pocillos de control.
- **Nanopartícula de estudio** a concentraciones en un rango entre 1 nM y 400 nM:
 - T22-GFP-H6
 - T22-GFP-H6·AUR
 - T22-GFP-H6·FdU
- **AMD3100, antagonista de CXCR4**, a una concentración de 1 µM durante 1 hora para el bloqueo total del receptor, previamente a la exposición a las nanopartículas.

Una vez transcurrido el tiempo de estudio (1, 6 o 24 horas), las células fueron levantadas y centrifugadas 5 min a 400 g en tubos de 2 ml y se descartó el sobrenadante. Después de realizar otro lavado con PBS, se añadieron 150 µl de **tripsina EDTA** (1 mg/ml) (Life Technologies) para eliminar nanopartículas unidas a la membrana de forma inespecífica, y se incubaron las células a 37°C y 5% de CO_2 . Cuando pasaron 15 min, se añadieron 350 µl de PBS y se centrifugaron 5 min a 400 g. Tras realizar otro lavado con PBS y descartar el sobrenadante,

MATERIAL Y MÉTODOS

el pellet fue resuspendido en un volumen final de 200 μ l e introducido en tubos de citometría. Cada experimento contó con dos réplicas por condición, y se repitió como mínimo 3 veces.

Finalmente, se utilizó el **citómetro FACSCalibur** (BD Biosciences), para medir la fluorescencia emitida por la proteína GFP, que fue expresada como porcentaje de células fluorescentes y como intensidad media de fluorescencia, utilizando el programa *CellQuest Pro* (BD Biosciences).

b. Ensayo de viabilidad celular

La **viabilidad celular**, tras la exposición a las nanopartículas, se determinó utilizando el kit comercial *Cell Proliferation Kit II (XTT)*, Roche). Se trata de un ensayo colorimétrico, no radiactivo, que cuantifica el metabolismo celular medido en términos de su capacidad de reducir la sal de tetrazolium, XTT [2,3-bis (2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide], de color amarillo, a una sal de formazán de color naranja. La sal de tetrazolium es soluble en solución acuosa y tiene carga neta negativa, por lo que se utiliza en conjunto con intermediarios aceptores de electrones, en este caso el PMS (*N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate*).

Para llevar a cabo el ensayo XTT, se sembraron placas de 96 pocillos con 100 μ l de una suspensión celular a una concentración de 250.000 células/ml. A las 24 horas después de la siembra, fueron tratadas con:

- **Tampón de dilución como control:** bicarbonato sódico con sal para el nanotransportador T22-GFP-H6 y los nanoconjugados; bicarbonato sódico sin sal como control para el resto de nanopartículas.
- **Nanopartícula de estudio** a diferentes concentraciones, en un rango entre 0,5 nM y 1 μ M, especificado en cada estudio:
 - T22-GFP-H6
 - T22-GFP-H6·CLIP71
 - T22-PUMA-GFP-H6
 - T22-GFP-H6·AUR
 - T22-GFP-H6·GOM
 - T22-BAXPORO-GFP-H6
 - T22-GFP-H6·FdU
 - T22-MEL-GFP-H6
 - T22-BAK-GFP-H6
 - T22-DITOX-H6
 - T22-GWH1-GFP-H6
 - T22-PE24-H6
- **AMD3100, antagonista de CXCR4**, a una concentración de 1 μ M durante 1 hora para el bloqueo total del receptor, de manera previa a la exposición a las nanopartículas.

Cada experimento contó con cuatro réplicas por condición, y se repitió como mínimo 3 veces.

A las 48 horas se añadió a cada pocillo 50 μ l de mezcla de XTT y PMS preparada en proporción 50:2. Se incubó durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Tras este tiempo, se midió la absorbancia a 490 nm en el **espectrómetro de placas** FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech), empleando como blanco el medio de cultivo de cada tipo celular. Los resultados se expresaron como **porcentaje de viabilidad** de las células tratadas con respecto a la viabilidad de las células control.

c. Ensayo de apoptosis

El porcentaje de células que entraron en apoptosis temprana o tardía, tras la administración del tratamiento, se cuantificó por citometría de flujo empleando el kit de detección de **Anexina V-FITC** (Sigma-Aldrich). En este kit se detecta el isocianato de fluoresceína (FITC) conjugado a la anexina V, que interactúa con la fosfatidilserina en presencia de calcio. En las células apoptóticas, la **fosfatidilserina** es expuesta en la superficie celular, siendo un marcador de apoptosis temprana.

Para distinguir las **células viables de las apoptóticas tempranas o apoptóticas tardías**, se emplea el **yoduro de propidio**. Las células en apoptosis tardía se unen tanto a la anexina V-FITC como al yoduro de propidio, mientras que en las células viables (sin FITC) y las apoptóticas tempranas (FITC positivas) el yoduro de propidio no entra. Este protocolo no permite distinguir las células necróticas de las que están en las fases finales de la apoptosis ya que, en ausencia de fagocitosis, estas fases implican la desintegración completa de la célula de forma parecida a la necrosis.

En este ensayo, se sembraron placas de 6 pocillos con 1 ml de una suspensión de células a una densidad de 500.000 células/ml. A las 24 horas, fueron tratadas con las nanotoxinas T22-PE24-H6 y T22-DITOX-H6 a una concentración de 4 nM, o bien con tampón bicarbonato sódico. Transcurrido el tiempo de incubación (2, 6, 24 y 48 horas), se recogió el medio en tubos de 2 ml y se levantaron las células aún adheridas con tripsina, que fueron resuspendidas en su medio original y homogeneizadas. La mitad de la solución final fue centrifugada y lavada con PBS. A continuación, las células se resuspendieron en 250 μ l de *binding buffer*, con 2,5 μ l de anexina-FITC y 5 μ l de yoduro de propidio. Después de 10 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, fueron analizadas en el citómetro *MACSQuant* empleando el programa *MACS Quantify* v.2.3 (Miltenyi Biotec).

Cada experimento contó con dos réplicas y se repitió 3 veces. Los resultados se expresaron como **porcentaje de células viables**, en apoptosis temprana o en apoptosis tardía con respecto al total de células detectadas, tomando como control las células tratadas con tampón.

MATERIAL Y MÉTODOS

d. Evaluación del mecanismo de muerte celular

Para estudiar la **activación del mecanismo de muerte mediada por la vía apoptótica**, se obtuvieron pellets celulares, como se describe en el subapartado **2.1.c.**, para ser parafinados y teñidos con DAPI para cuantificar la condensación nuclear, o mediante inmunocitoquímica de los marcadores de **apoptosis caspasa-3 activa** y **PARP proteolizada**, según se describe en el apartado **3.7**.

Para el análisis inmunohistoquímico, se evaluaron 5 campos de gran aumento (400x) para cada uno de los pellets, mediante el programa *QuPath* v.0.2.3., siendo los resultados expresados como **porcentaje de células con expresión** de caspasa-3 activa o PARP proteolizada con respecto al total de células detectadas, tomando como control las células tratadas con tampón.

2. 5. Análisis estadísticos

Con objeto de analizar las posibles diferencias entre los valores medios de dos condiciones o variables comparadas en los ensayos *in vitro*, se utilizó el **test no paramétrico de la U de Mann Whitney**, debido al reducido tamaño muestral. Las diferencias se consideraron significativas para una $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa *IBM SPSS Statistics* v.23.

3. EXPERIMENTOS *IN VIVO* EN MODELOS XENÓGRAFOS DE CÁNCER DE ENDOMETRIO

3. 1. Cepas de ratón

Para la generación de los nuevos modelos animales necesarios para llevar a cabo los distintos estudios, se emplearon **ratones** (*Mus musculus*) **hembras** de **5 semanas** de edad obtenidas de los laboratorios Charles River de Francia. Se emplearon dos cepas diferentes de ratones inmunodeprimidos:

- **Swiss nude**: ratones atómicos, por lo que sus **linfocitos T** no maduran y, por tanto, no son funcionales. Así, carecen de parte de la respuesta adaptativa (la mediada por linfocitos T), pero la innata es completamente funcional, con lo que su inmunodepresión es parcial.
- **NSG** o NOD *scid* gamma (NOD.Cg-Prkd^{scid} Il2rgtm1Wjl/SzJ), desarrollados originalmente por los laboratorios Jackson (JAX Mice Laboratory). Estos ratones carecen de **linfocitos T maduros, linfocitos B y linfocitos NK funcionales**, y presentan **deficiencias en la señalización** mediada por citoquinas. De este modo, sufren un **bloqueo** casi total de la **respuesta adaptativa** (solo actúan las células dendríticas, presentadoras de antígenos) y, a su vez, un bloqueo **bastante elevado en cuanto a la respuesta innata** (carecen de macrófagos, del sistema del complemento y de funcionalidad en los linfocitos NK).

Todos estos animales fueron estabulados en *racks* con ventilación controlada en una zona SPF (*Specific Pathogen Free*), siendo alimentados con comida y agua *ad libitum*, a una temperatura ambiente de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa $45 \pm 15\%$ y ciclo de luz de 12 horas. Los procedimientos a los que fueron sometidos fueron aprobados previamente por el Comité Ético del Instituto de Investigación del *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* y formaban parte de un protocolo de experimentación animal aprobado por la Generalidad de Cataluña (**Anexo 1**).

3. 2. Generación de los modelos xenógrafos de CE

a. Modelo subcutáneo de CE en la cepa *Swiss nude*

Para generar el modelo de CE subcutáneo se utilizaron ratones *Swiss nude*. Inicialmente, los ratones se anestesiaron por vía inhalatoria con **isoflurano** (IsoFlo, Ecuphar) regulando el vaporizador al 3-4% de isoflurano y flujo de oxígeno a 1 l/min. Pasados unos minutos, se evaluó el reflejo plantar y, cuando lo perdieron, los animales fueron colocados sobre una manta

MATERIAL Y MÉTODOS

térmica para evitar la posible hipotermia durante el procedimiento, y se bajó el isoflurano al 2%.

Tras desinfectar la piel con povidona yodada (Meda Pharma), se implantaron los **dos flancos dorsales** con una suspensión celular que contenía **10⁷ células AN3CA CXCR4⁺ Luciferasa⁺** en **250 µl** de medio DMEM:F12 sin suplementar, empleando una jeringa de insulina de 29G (BD).

b. Modelo ortotópico y metastático de CE en la cepa NSG

En la generación del modelo ortotópico de CE se emplearon ratones NSG, que fueron anestesiados por vía **intraperitoneal** con una mezcla de 100 mg/kg de **ketamina** (Ketolar, Pfizer) y 10 mg/kg de **xilacina** (Rompun, Bayer). Tras la pérdida del reflejo plantar, los animales fueron colocados sobre una manta térmica y afeitados en su zona abdominal, que fue desinfectada con povidona yodada.

Se les practicó una **laparotomía** mediante una pequeña incisión en la línea alba y se expuso el **cuerno uterino derecho**, que fue **ligado** con una sutura no absorbible Optilene 7/0 (Braun), impidiendo el escape de las células por vía vaginal. Esta ligadura fue llevada a cabo separando el útero del sistema arterial que lo irriga, con objeto de evitar la oclusión del mismo y la posible isquemia del órgano.

De manera proximal a la ligadura se inocularon, lentamente y en sentido distal, **25 µl** de una suspensión celular conteniendo **10⁶ de células** de la línea AN3CA CXCR4⁺ Luciferasa⁺ o bien AN3CA Luciferasa⁺ (N=4) en el lumen del útero, por vía transmiometrial. La inoculación se llevó a cabo con una jeringa de precisión **Hamilton** de calibre 29G (Microliter Serie 800, Hamilton), y la dilatación de la cavidad endometrial indicó que había sido llevada a cabo de forma correcta. En la **Figura 19** se describe en detalle la técnica empleada.

Pasados unos minutos, para evitar el reflujo hacia el peritoneo, se retiró lentamente la aguja y, finalmente, se aplicaron unas gotas de povidona yodada diluida en suero fisiológico (Braun) con un hisopo en el punto de inyección.

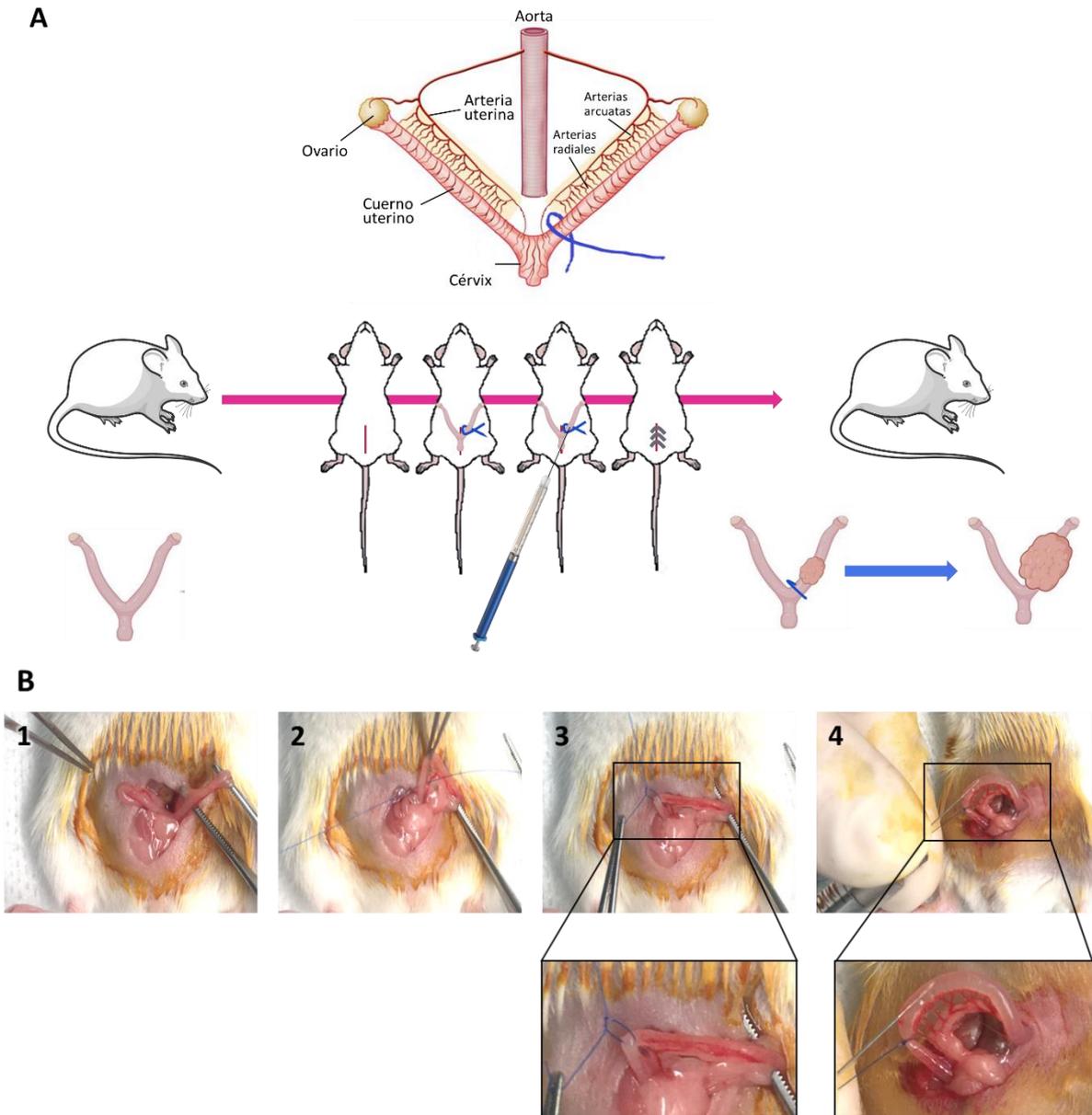


Figura 19. Procedimiento de la inoculación ortotópica de líneas celulares humanas en la cepa de ratones NSG para la obtención de un modelo metastático de cáncer de endometrio. A. Esquema del procedimiento y detalle del sistema de irrigación del útero murino. El trazo azul indica el punto donde se lleva a cabo la ligadura en este modelo. Adaptado de ²⁴⁰. B. Fotografías representativas y detalles de cada fase del procedimiento: exposición del útero (1), ligadura del cuerno derecho sin pinzar la arteria uterina (2 y 3) e inyección intraluminal de un millón de células suspendidas en medio de cultivo con una jeringuilla de precisión Hamilton (4).

Una vez acabada la intervención, se introdujo nuevamente el útero en la cavidad abdominal, se suturó el músculo con **puntos simples discontinuos** empleando el hilo 6/0 Optilene (Braun), y se cerró la piel con **grapas** de 7 mm (Braun). Se volvió a desinfectar la zona operada con povidona yodada y se dejó reposar al animal en la manta térmica sobre una gasa estéril hasta

MATERIAL Y MÉTODOS

que recuperó el reflejo plantar, tras lo cual se devolvió a la jaula. Las grapas fueron extraídas una vez cicatrizada la herida, aproximadamente 15 días después.

3. 3. Seguimiento *in vivo* del crecimiento tumoral

La **expresión de Luciferasa** en las líneas celulares de CE transducidas permitió realizar el seguimiento del crecimiento tumoral *in vivo*, midiendo la emisión de bioluminiscencia por los tumores o focos metastáticos generados. El registro de los animales se hizo mediante el equipo de imagen *IVIS Spectrum 2000* (Perkin Elmer), acoplado al sistema de anestesia por isofluorano XGI-8 (Xenogen).

Para ello se inyectaron a cada animal **150 µl de D-luciferina** a 15 mg/ml, diluida en suero fisiológico estéril, por vía intraperitoneal. Según la zona de implantación, el registro de los ratones se realizó en decúbito prono (para visualizar los tumores subcutáneos) o decúbito supino (para visualizar los tumores ortotópicos). El **tiempo de exposición fue automático**. La frecuencia de registro dependió de cada experimento, por lo general una o dos veces a la semana para minimizar la exposición de los ratones al isofluorano, y también antes del momento del sacrificio. En caso de comparar la emisión de bioluminiscencia de dos grupos de ratones inoculados con líneas con diferente bioluminiscencia basal, los datos de registro fueron normalizados.

En paralelo al registro de la bioluminiscencia, y en el caso de los animales inoculados subcutáneamente, se realizó periódicamente el seguimiento del aumento del **volumen tumoral** a través de la medición del diámetro mayor y menor de cada tumor. Éste fue empleado, a su vez, para calcular de forma simplificada su crecimiento semanal, así como el diario a tiempo final, aplicando las siguientes fórmulas:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{\text{Diámetro mayor} \times \text{Diámetro menor}^2}{2}$$

$$\text{Tasa de crecimiento tumoral (mm}^3\text{/unidad de tiempo)} = \frac{\Delta \text{Volumen}}{\Delta \text{tiempo}}$$

3. 4. Necropsia y registro *ex vivo* de bioluminiscencia y fluorescencia

Una vez llegado al tiempo programado o el punto final, según el diseño del experimento, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.

En el caso de **experimentos de supervivencia**, en los que se quiso analizar el tiempo de vida del ratón tras la implantación, los ratones fueron sacrificados siguiendo el protocolo de supervisión, que tenía en cuenta, entre otros parámetros, cambios a nivel de aspecto general (visibilidad y palpación del tumor, distensión abdominal, ascitis), en el comportamiento (automutilaciones, dificultad en el movimiento) y pérdida de peso (superior al 20% del peso inicial) (**Anexo 2**).

En el caso de los ratones implantados subcutáneamente sometidos a un experimento de biodistribución del nanotransportador T22-GFP-H6, se realizó un registro ***ex vivo* de la fluorescencia de la nanopartícula**, en tumor, hígado, riñón, pulmón y bazo, también empleando el equipo *IVIS Spectrum 2000*.

En el caso de los ratones implantados **ortotópicamente**, se realizó un **registro *ex vivo* de la bioluminiscencia** de los órganos de interés, colonizados por las células inoculadas o con posible desarrollo de focos metastáticos: tumor primario (útero), carcinomatosis peritoneal, hígado, riñones, pulmones y ganglios linfáticos abdominales, cubriéndolos con una solución de 0,75 mg/ml de luciferina en suero fisiológico.

En todos los casos, tras finalizar el registro de fluorescencia o bioluminiscencia, los órganos, tumorales y no tumorales (hígado, riñón, pulmón y bazo), fueron recogidos en cassettes y sumergidos en formaldehído al 4% en PBS para su fijación y procesamiento como se describe en el apartado **3.7**.

3. 5. Determinación de metástasis a distancia

En los experimentos de implantación ortotópica se analizó la diseminación celular y formación de focos metastáticos en pulmón e hígado, mediante tinciones inmunohistoquímicas de **vimentina** de las células tumorales, como se detalla en el subapartado **3.7.c**. En cada sección tisular, se analizaron 10 campos de medio aumento (200x) y se determinó la presencia o ausencia de células tumorales. A **nivel hepático**, se evaluó el número y el área de focos de metástasis mediante el programa *CellSens* v.3.3. A **nivel pulmonar**, se cuantificó el número de células tumorales y totales en el pulmón, y se calculó el área de tejido invadido, empleando el programa *QuPath* v.0.2.3.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. 6. Ensayos con nanopartículas en modelos animales de CE

a. Biodistribución del nanotransportador T22-GFP-H6 en el modelo subcutáneo de CE

La biodistribución de la nanopartícula T22-GFP-H6 fue evaluada en el modelo subcutáneo obtenido a partir de la línea transducida AN3CA CXCR4⁺ Luciferasa⁺, tal y como se ha descrito en el subapartado 3.2.a.

Como se describe en el esquema de la **Figura 20**, cuando los tumores alcanzaron un **volumen aproximado de 200 mm³**, se les administró por vía intravenosa caudal **200 µg de T22-GFP-H6** diluida en tampón de bicarbonato sódico con sal a pH 8, en un volumen de 200 µl. A los ratones control se les administró 200 µl de tampón bicarbonato sódico con sal a pH 8. Ambos grupos (N=3-4) fueron sacrificados a las **2, 5 y 24 horas** después de la administración, obteniendo un registro de la fluorescencia *ex vivo* como se ha explicado previamente en el apartado 3.4. A los mismos tiempos, y a las **48 horas**, se extrajeron y fijaron los órganos como se describe en el apartado 3.7.

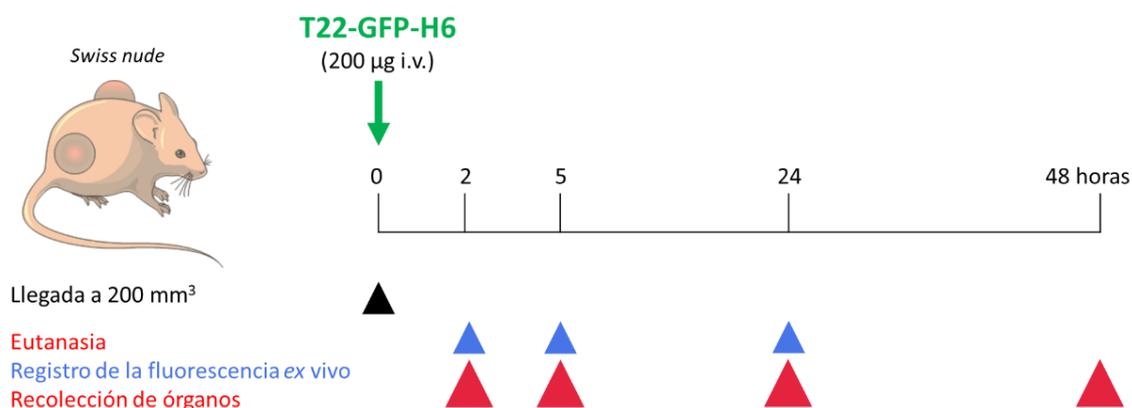


Figura 20. Diseño del experimento de biodistribución de la nanopartícula T22-GFP-H6 llevado a cabo en el modelo subcutáneo derivado de la línea celular AN3CA CXCR4⁺ en la cepa *Swiss nude*. Una vez el tumor alcanzó 200 mm³, los ratones recibieron una inyección intravenosa (i.v.) de tampón bicarbonato sódico con sal a pH 8 o de 200 µg de T22-GFP-H6 (N=3-4), y se sacrificaron a las 2, 5, 24 o 48 horas tras la administración.

b. Efecto antitumoral de T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6, a dosis repetidas, en el modelo subcutáneo de CE

Para evaluar el **efecto antitumoral y la posible toxicidad *in vivo*** de las **nanotoxinas**, T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6, se utilizó el modelo subcutáneo derivado de la línea transducida AN3CA CXCR4⁺ Luciferasa⁺, descrito en el subapartado 3.2.a.

Los ratones cuyos tumores alcanzaron un volumen de entre 30 y 70 mm³ fueron aleatorizados en tres grupos (N=10) y se les administró por vía intravenosa 200 µl de una dilución de tampón

bicarbonato sódico con 10 µg de **T22-DITOX-H6** o **T22-PE24-H6**, según el grupo, tres veces a la semana. Los animales del grupo control recibieron 200 µl de tampón bicarbonato sódico.

Desde el inicio del tratamiento, se realizó un seguimiento del **volumen tumoral** y de la emisión de **bioluminiscencia** cada dos o tres días; los ratones fueron **sacrificados a tiempo final**, definido por la llegada a un volumen tumoral de 900 mm³. En la necropsia se extrajo el tumor y órganos de interés para ser registrada su emisión de bioluminiscencia como se ha explicado previamente en el apartado **3.4.** y su fijación según el apartado **3.7.**

Los ratones cuyos tumores no habían alcanzado este volumen tras **15 dosis**, dejaron de recibir tratamiento y fueron sacrificados al llegar al punto final. Dos de los ratones del grupo control, que no desarrollaron tumor (77 días después de la inoculación), se consideraron *outliers* aplicando el test de Grubbs y fueron descartados del experimento. El esquema del procedimiento aparece representado en la **Figura 21.**

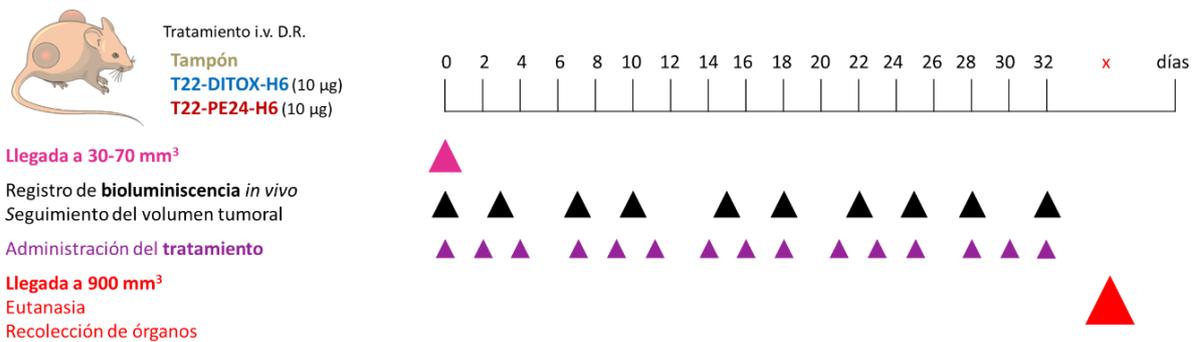


Figura 21. Diseño experimental del estudio *in vivo* empleado para evaluar el efecto antitumoral de las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6, administradas a dosis repetidas en el modelo subcutáneo derivado de la línea celular AN3CA CXCR4⁺ en la cepa *Swiss nude*. Una vez los tumores alcanzaron 30-70 mm³, los ratones fueron aleatorizados en tres grupos (N=10), para recibir 10 µg de una u otra nanotoxina, o tampón, por vía intravenosa (i.v.), tres días a la semana. Periódicamente se realizó el seguimiento del crecimiento tumoral, medido por emisión de bioluminiscencia o mediante la determinación del volumen del tumor. D.R.: dosis repetidas

c. Determinación de la inducción de muerte celular por T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 en el modelo subcutáneo de CE

Para determinar si las nanotoxinas inducían la muerte de las células tumorales por la vía apoptótica *in vivo*, se empleó el modelo subcutáneo de CE obtenido a partir de la línea transducida AN3CA CXCR4⁺ Luciferasa⁺, tal y como se ha descrito en el subapartado **3.2.a.**

Cuando los tumores alcanzaron un **volumen aproximado de 200 mm³**, los animales recibieron, por vía intravenosa caudal, **30 µg de T22-DITOX-H6**, o bien **100 µg de T22-PE24-H6**, diluidas en 200 µl de tampón bicarbonato sódico (N=2-3). A los animales control se les administró 200 µl

MATERIAL Y MÉTODOS

de tampón bicarbonato sódico. Los animales fueron sacrificados a las 24 y 48 horas después de la administración, y los tumores subcutáneos fueron extraídos como se describe en el apartado 3.4. Finalmente, los tumores se procesaron y tiñeron con **DAPI** para determinar la posible condensación nuclear, o la expresión, mediante **inmunohistoquímica**, de los marcadores de apoptosis **caspasa-3 activa** y **PARP proteolizada**, según se desarrolla en el apartado 3.7.

d. Efecto antimetastático de T22-DITOX-H6, a dosis repetidas, en el modelo ortotópico de CE

En este experimento, se evaluó el **efecto antimetastático** y la **toxicidad** asociada a la administración de la nanotoxina T22-DITOX-H6 midiendo la posible inhibición del desarrollo de focos metastáticos, utilizando el modelo ortotópico descrito en el subapartado 3.2.b., derivado de la línea de CE transducida AN3CA CXCR4⁺ Luciferasa⁺, tal como se describe en la **Figura 22**.

Tres días después de la inoculación intrauterina de la suspensión de las células de CE, se registró la bioluminiscencia de los animales para ser distribuidos aleatoriamente en dos grupos (N=10). A los ratones control se les administró por vía intravenosa 200 µl de tampón bicarbonato sódico, mientras que los animales del grupo experimental recibieron 200 µl de una dilución de tampón bicarbonato sódico con **5 µg de T22-DITOX-H6**, tres veces a la semana llegando a un total de **14 dosis**.

Cuando uno o más ratones llegaron a punto final, todos fueron sacrificados. En la necropsia, se extrajeron y procesaron los órganos de interés como se describe en el apartado 3.4. También se llevó a cabo un análisis de las metástasis a distancia generadas en los distintos órganos, como se explica en el apartado 3.5.

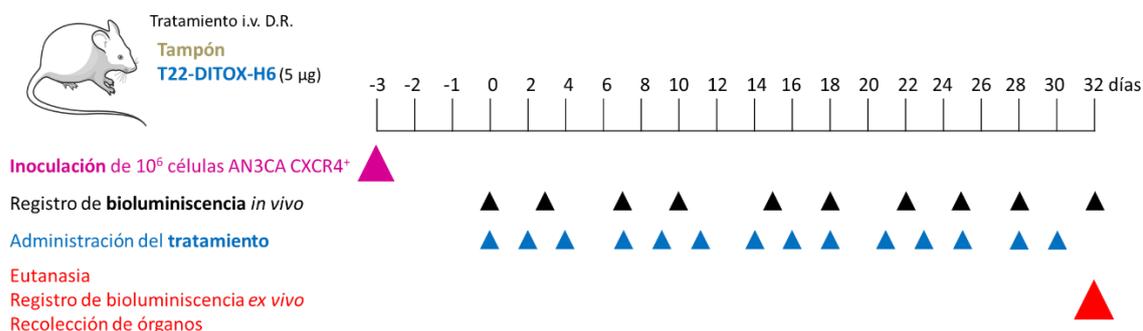


Figura 22. Diseño del experimento empleado para evaluar el efecto antimetastático de la nanotoxina T22-DITOX-H6 en un modelo ortotópico derivado de la línea celular AN3CA CXCR4⁺ en la cepa de ratones NSG. Tres días después de la inoculación transmiometrial de un millón de células en el lumen uterino, los animales fueron aleatorizados en dos grupos (N=10), recibiendo por vía intravenosa (i.v.) 14 dosis de 5 µg de T22-DITOX-H6 o bien tampón bicarbonato sódico como control. Periódicamente se realizó el seguimiento del crecimiento tumoral por bioluminiscencia. D.R.: dosis repetidas.

3. 7. Procesamiento de muestras parafinadas

Las **muestras de pacientes**, los **pellets celulares** (obtenidos de las células en cultivo), y los **órganos murinos** recogidos en la **necropsia**, fueron procesados, parafinados y cortados en secciones en las que se llevaron a cabo tinciones que permitieran detectar características histológicas relacionadas con la progresión de la enfermedad, o la expresión de proteínas tumorales o marcadores de apoptosis. El esquema general del análisis y procesamiento de las muestras murinas se describe en la **Figura 23**.

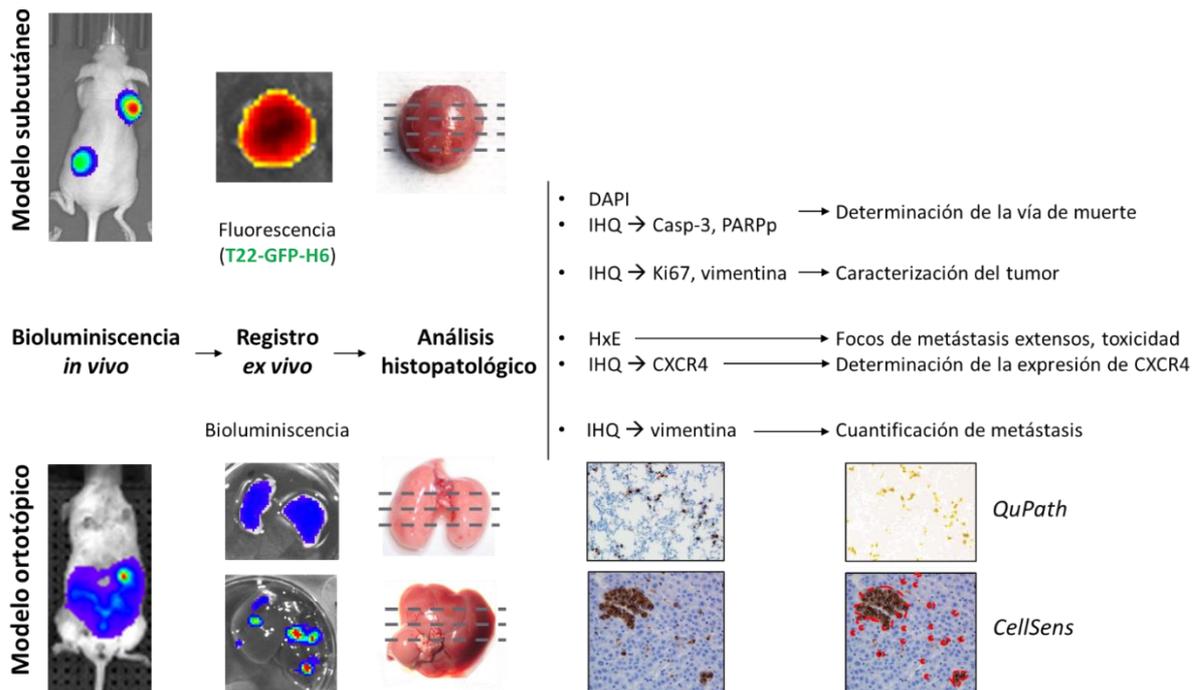


Figura 23. Representación esquemática del análisis y procesamiento de muestras para la evaluación de parámetros relacionados con actividad antitumoral o antimetastática en los distintos modelos animales tras el sacrificio. Se registró la **bioluminiscencia** del animal completo *in vivo* y, tras la necropsia, se midió la bioluminiscencia *ex vivo* de los órganos con probable colonización metastática, así como la emisión de **fluorescencia ex vivo** en hígado, riñón, pulmón y bazo, en el caso del estudio de la biodistribución de la nanopartícula T22-GFP-H6. Los órganos, tumorales y no tumorales (no representados), fueron fijados, procesados y teñidos por **hematoxilina-eosina** (H&E, para determinar la posible toxicidad sobre tejidos sanos de las diversas nanopartículas terapéuticas); tinción con **DAPI** (para determinar la condensación nuclear) o tinciones **inmunohistoquímicas** (IHQ) de marcadores celulares de activación de apoptosis (caspasa-3 activa, “casp-3”; PARP proteolizada, “PARPp”), del marcador de proliferación Ki67 o de vimentina, para caracterizar el tumor y detectar la presencia de células metastáticas en hígado y pulmón. Dichas metástasis fueron cuantificadas mediante los programas informáticos *QuPath* v.0.2.3 y *CellSens* v3.3.

MATERIAL Y MÉTODOS

Después de la fijación durante 24 horas en formaldehído al 4% de cada órgano o pellet celular fue procesado siguiendo el siguiente esquema:

1. **Deshidratación de la muestra:** las muestras ya fijadas fueron deshidratadas con tres lavados de 10 min en agua destilada para eliminar el formaldehído y 3 incubaciones de 5 min en disoluciones de etanol a concentraciones crecientes (70, 80, 96, 100%). Finalmente, se incubaron 10 min en xileno al 100%, tres veces seguidas.
2. **Inclusión en parafina:** se realizaron 3 incubaciones de cada muestra en 3 soluciones de parafina durante 1 hora cada una en una estufa a 60°C. Posteriormente, la muestra se colocó en un molde metálico, se cubrió con parafina líquida y se incluyó en un casete rotulado, y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
3. **Corte:** una vez solidificada la parafina, se empleó un microtomo para realizar cortes de 4 µm, que se adhirieron a portaobjetos.

a. Tinción de hematoxilina-eosina

Para ello, las muestras en los portaobjetos fueron incubadas en una estufa durante 1 hora a 60°C y rehidratadas mediante incubaciones de 10 min: dos en xileno al 100%, dos incubaciones en etanol 100% y una incubación en etanol 96%, 80% y 50%. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron durante 5 min en agua destilada, para ser teñidos con tres pases de **hematoxilina de Mayer** de 3 min cada uno. A continuación, fueron lavados durante 10 min con agua destilada y posteriormente introducidos en **eosina** al 2%, aislada de la luz durante 3 min. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas con soluciones de alcohol crecientes. Su montaje se llevó a cabo con medio de montaje DPX (Merck).

b. Tinción de fluorescencia con DAPI

Para identificar la posible inducción de **apoptosis como mecanismo de muerte celular** se determinó si existía condensación nuclear tras el tratamiento con nanopartículas. Este procedimiento se llevó a cabo mediante una tinción con DAPI, un **agente fluorescente** que se intercala en el ADN permitiendo valorar la formación de cuerpos apoptóticos, en las muestras parafinadas de pellets celulares o de tumores subcutáneos.

Para ello, los cortes fueron incubados en una estufa a 60°C durante 1 hora y rehidratados con tres incubaciones de 5 min en xileno e incubaciones de 3 min en concentraciones decrecientes de etanol hasta el 76%. Tras dos lavados de 5 min en PBS y su permeabilización durante 10 min en Tritón al 10% en PBS, las muestras fueron lavadas en PBS de nuevo para ser montadas

utilizando medio de montaje con DAPI, *ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI* (Invitrogen). Seguidamente, fueron almacenadas a 4°C en oscuridad hasta que pudieran ser evaluadas en el microscopio de fluorescencia Olympus BX53 (Olympus).

La cuantificación de las células apoptóticas en los pellets se llevó a cabo observando 5 campos aleatorios de gran aumento (400x). Los resultados se expresaron como **porcentaje de células** con presencia de cuerpos apoptóticos, con respecto al total de células detectadas, tomando como control las células tratadas con tampón.

c. Tinciones inmunohistoquímicas o inmunocitoquímicas

Para caracterizar la expresión de proteínas en diferentes muestras parafinadas se emplearon tinciones **inmunohistoquímicas** en el caso de tejidos animales, tanto tumores subcutáneos como tumores primarios y órganos posiblemente afectados por metástasis en el modelo ortotópico, y tinciones **inmunocitoquímicas** en el caso de los pellets celulares.

Para ambas técnicas, las secciones se colocaron sobre portas cargados positivamente para evitar la pérdida de la muestra en el proceso de inmunohistoquímica (*FLEX IHC Microscope Slides*, Dako). Como en el apartado anterior, las muestras fueron incubadas en estufa durante 1 hora a 60°C y se realizó la recuperación antigénica utilizando el sistema *PT Link* (Dako), programando una incubación a 95°C durante 10 min y posteriormente 45 min a 65°C en tampón citrato de pH 6 (pH bajo, Dako) o bien tampón TRIS/EDTA pH 9 (pH alto, Dako). La inmunotinción se realizó mediante el sistema automatizado *Autostainer Link 48* (Dako), empleando los reactivos del kit *EnVision Flex, High pH* (Dako) y programando las siguientes incubaciones: 1 min de lavado con tampón, 5 min de bloqueo de la peroxidasa endógena, 1 min de lavado en tampón, incubación con el anticuerpo primario correspondiente diluido en *rinse buffer* (Dako) (**Tabla 6**), lavado con tampón durante 1 min, incubación durante 20 min con peroxidasa de rábano *EnVision/HRP*, lavado con tampón durante 1 min, incubación con la solución cromogénica para el revelado (*DAB+ Chromogen y Substrate Buffer*), lavado con tampón 1 min, contratinción con hematoxilina durante 5 min y lavado final con tampón durante 1 min.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 6. Condiciones aplicadas a los anticuerpos primarios utilizados para las tinciones por inmunohistoquímica e inmunocitoquímica.

Anticuerpo primario	Recuperación antigénica	Dilución	Anticuerpo secundario	Casa comercial y referencia
CXCR4	pH alto	1/200	Rabbit	Abcam (ab124824)
Vimentina	pH bajo	-	Mouse	Dako (IGA63061-2)
Ki67	pH bajo	-	Mouse	Dako (GA62661-2)
Caspasa-3 activa	pH bajo	1/300	Rabbit	BD Pharmingen (559565)
PARP proteolizada (p85)	pH alto	1/300	Rabbit	Promega (G7341)

En el caso de las inmunocitoquímicas de los pellets celulares, la cuantificación de las células apoptóticas tras el tratamiento con nanopartículas se llevó a cabo observando 5 campos aleatorios de gran aumento (400x) en cada sección. Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas para cada marcador con respecto al total de células detectadas, tomando como control las células tratadas con tampón.

3. 8. Análisis estadísticos

Las curvas de **Kaplan Meier** y el **test Log-Rank** se utilizaron para representar y comparar, respectivamente, la supervivencia entre grupos de animales.

Para analizar la probabilidad de la existencia de diferencias entre dos grupos en relación a una variable categórica (por ejemplo, número de ratones con presencia o ausencia de metástasis pulmonares en dos grupos), se realizaron tablas de contingencia y se aplicó el **test de Fisher** o el test Chi-cuadrado.

Para conocer la magnitud de las diferencias entre grupos de ratones, se empleó la **delta de Cohen (d)**, considerándose un efecto de gran tamaño cuando $d \geq 0,8$.

El análisis de las diferencias en el valor de una variable entre grupos, se realizó conociendo, en primer lugar, la normalidad de la muestra mediante el **test de Shapiro-Wilk**. En el caso de que la distribución fuera normal, los datos se analizaron mediante el test paramétrico de la **t de Student** (para dos grupos) o **ANOVA** (más de dos grupos). Cuando la distribución no era normal, se emplearon tests no paramétricos: la **U de Mann-Whitney** o el **test de Kruskal-Wallis** para comparar las medias de los valores de dos o de más de dos grupos, respectivamente. Las diferencias se consideraron significativas para una $p < 0,05$. En caso de que hubiera valores anómalos, se evaluó si podían ser considerados *outliers* mediante el **test de Grubbs**.

Las **IC₅₀** y el **área bajo la curva** se calcularon utilizando el programa *GraphPad Prism* v.8. La delta de Cohen se calculó con el paquete *effectsize* del programa estadístico R v.3.4.4. Todos los demás análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa *IBM SPSS Statistics* v.23.

IV. RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR CXCR4 EN PACIENTES CON CE

1. 1. Expresión en membrana de CXCR4 en muestras de pacientes con CE

Con el objetivo de conocer el nivel de la expresión de **CXCR4** en **pacientes de CE**, se trabajó con dos conjuntos de muestras independientes: una cohorte procedente del **Hospital de la Santa Creu i Sant Pau**, y una cohorte obtenida del proyecto TCGA-UCEC, procedente de la base de datos pública de **TCGA**. En la primera cohorte, se valoró por inmunohistoquímica la expresión de CXCR4 a nivel de **proteína**, y en la segunda se extrajeron los valores de expresión a nivel de **ARNm**.

En primer lugar, se realizó la **evaluación histológica** de la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 en las muestras recogidas en el *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*. Contando con el asesoramiento y la validación de un patólogo, se analizaron un total de 106 muestras, 27 de ellas de tejido endometrial sano, procedentes de 79 pacientes. En ellas se evaluó la presencia o ausencia de expresión de CXCR4, su patrón de expresión a nivel celular, para obtener el H-score a partir de su intensidad y porcentaje de expresión (**Figura 24**).

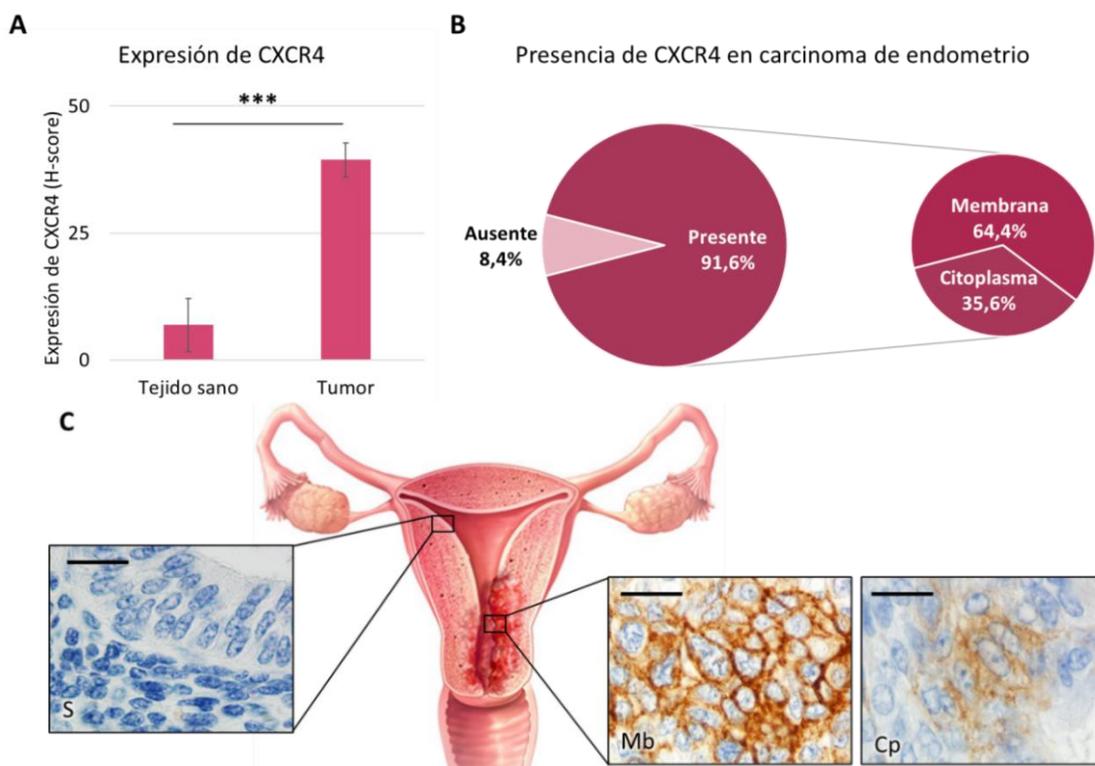


Figura 24. Expresión de **CXCR4** en *tissue microarrays* obtenidos a partir de muestras de pacientes con cáncer de endometrio. **A.** **CXCR4** está **sobreexpresado** en tejido tumoral con respecto al endometrio sano (media \pm SEM). Para el análisis estadístico se empleó el test de la U de Mann-Whitney (***) $p=0,000$. **B.** **Porcentaje de tumores con o sin expresión de CXCR4** y su patrón de expresión a nivel celular. **C.** **Tinciones inmunohistoquímicas de CXCR4** en tejido endometrial sano (S) y tumoral con distinto patrón de expresión de CXCR4: de membrana (Mb) y citoplasmático (Cp). Barra: 20 μ m.

RESULTADOS

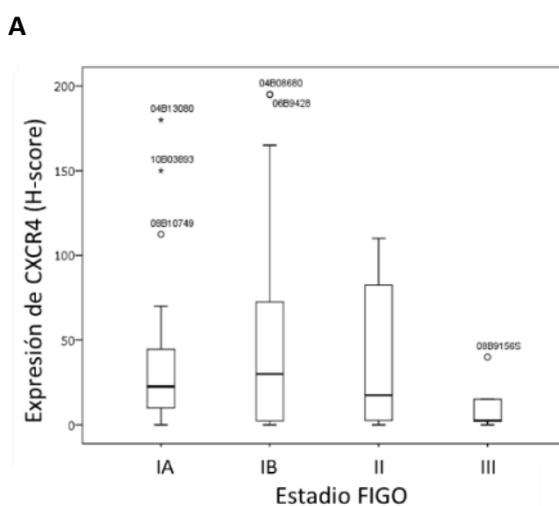
El **91,6%** de las muestras de tumor mostraron **sobreexpresión de CXCR4** comparadas con las de endometrio normal ($X^2=58,986$; $p=0,000$), que, en caso de ser positivas, lo eran con menor intensidad y porcentaje ($p=0,000$). En el tejido tumoral, el patrón de expresión celular de CXCR4 fue predominantemente de membrana en el 64,4% de los casos.

La sobreexpresión de **CXCR4 en tejido tumoral** en comparación al tejido sano, y su localización predominantemente **membranal**, sugirió que este receptor podía ser una **buena diana terapéutica** para el tratamiento del CE.

1. 2. Estudio de correlación entre la expresión de CXCR4 en tumores de CE y parámetros clinicopatológicos

Con el objetivo de correlacionar la presencia o ausencia de CXCR4 y su H-score con parámetros clínicos de mal pronóstico, se realizaron distintos análisis estadísticos utilizando las muestras tumorales de la misma cohorte de pacientes.

Para analizar la presencia o ausencia de CXCR4, se utilizó el test de Fisher cuando las variables tenían dos categorías cada una (invasión linfovascular, infiltración miometrial, afectación del cuello del útero), y el test de Chi-cuadrado cuando las variables tenían más de dos categorías (estadio). En ningún caso se halló correlación entre expresión de CXCR4 y las categorías de mal pronóstico ($X^2 < 2,165$; $p > 0,365$). Para conocer las posibles diferencias en el valor de H-Score se emplearon los test paramétricos de la t de Student para analizar las variables de dos categorías y tablas ANOVA para más categorías, aunque tampoco se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,222$) (**Figura 25**).



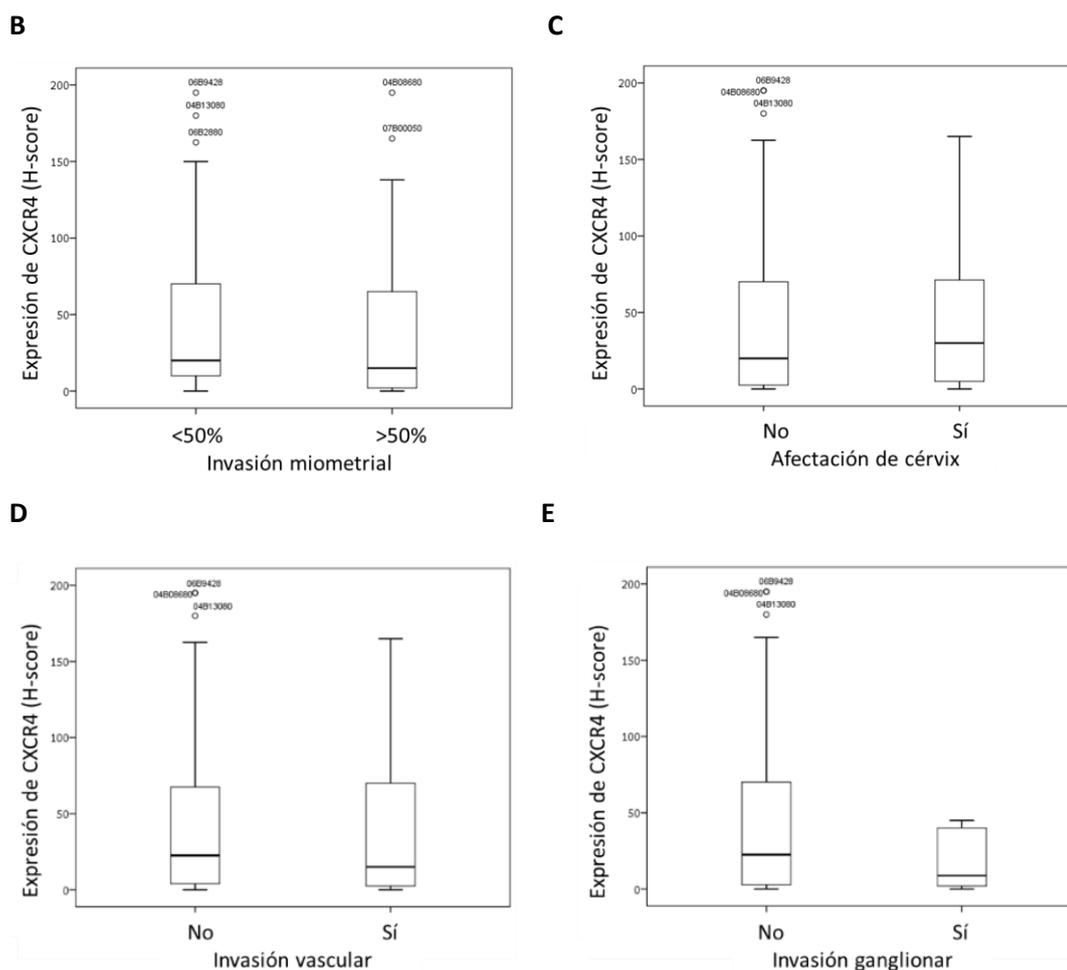


Figura 25. Análisis de los niveles de expresión de CXCR4, mediante el parámetro H-score, obtenidos en inmunohistoquímicas de *tissue microarrays* de tumores de pacientes con cáncer de endometrio, en relación a variables clínicas. Los gráficos muestran los distintos valores de la expresión de CXCR4 en tumores de CE en una serie de 79 pacientes, para las variables clínicas analizadas, seguida de la probabilidad para la existencia de diferencias entre los grupos comparados: **A. Estadio FIGO** ($p=0,883$); **B. Invasión del miometrio** ($p=0,791$). **C. Afectación del cérvix uterino** ($p=0,798$). **D. Invasión vascular** ($p=0,921$). **E. Invasión linfática** ($p=0,222$). Análisis estadísticos: ANOVA y t de Student. Todas las variables se expresan como media \pm SEM.

Por otro lado, se evaluó la cohorte de 529 pacientes con CE, obtenida de la base de datos de TCGA para conocer si existe alguna relación entre la expresión a nivel de ARNm del receptor CXCR4 y la evolución clínica de las pacientes. En esta base de datos se incluía información sobre el tipo histológico, subtipo molecular, y variables clínicas como el grado histológico, el estadio FIGO, la supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia global y la probabilidad de progresión de la enfermedad (**Figuras 26 y 27**).

RESULTADOS

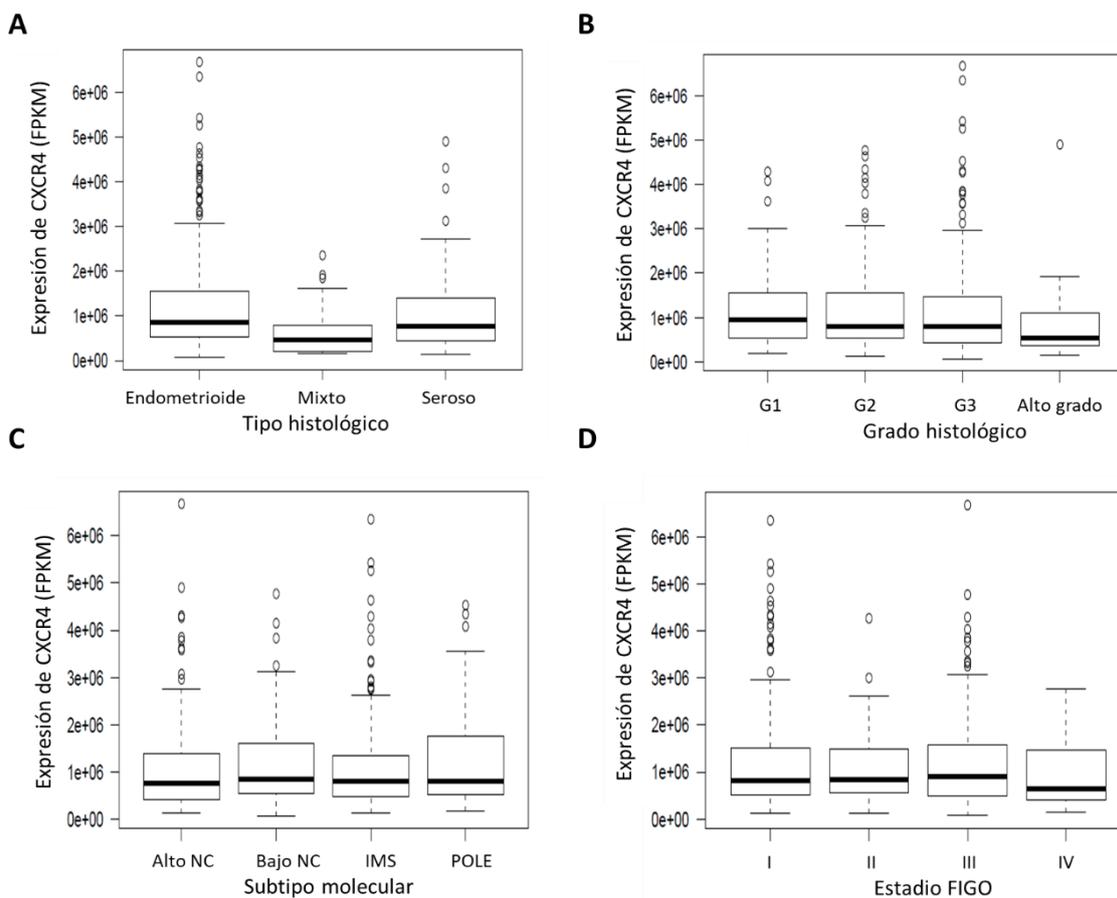


Figura 26. Estudio de asociación entre la expresión de CXCR4 y tipo histológico, grado histológico, subtipo molecular o estadio en una cohorte de 529 pacientes con cáncer de endometrio. Los gráficos describen la diferencia en el nivel de expresión de ARNm de CXCR4, medido por PCR cuantitativa en las 529 muestras de pacientes de CE obtenidas de la base de datos de TCGA, seguida de la probabilidad para la posible existencia de diferencias entre los siguientes parámetros diagnósticos: **A. Tipo histológico** ($p=0,067$). **B. Grado histológico** ($p=0,911$). **C. Subtipo molecular** ($p=0,630$). **D. Estadio FIGO** ($p=0,457$). Análisis estadísticos: ANOVA+TukeyHSD. Todos los parámetros están expresados como media \pm SEM.

Para analizar todas estas variables se utilizaron tablas ANOVA, salvo para las supervivencias. En este caso, las muestras se separaron en cuartiles según su expresión de CXCR4, y fueron comparadas mediante Kaplan-Meier. Ninguna de las categorías en ningún parámetro de evolución clínica mostró relación con la expresión de CXCR4 a nivel de ARNm ($p>0,067$).

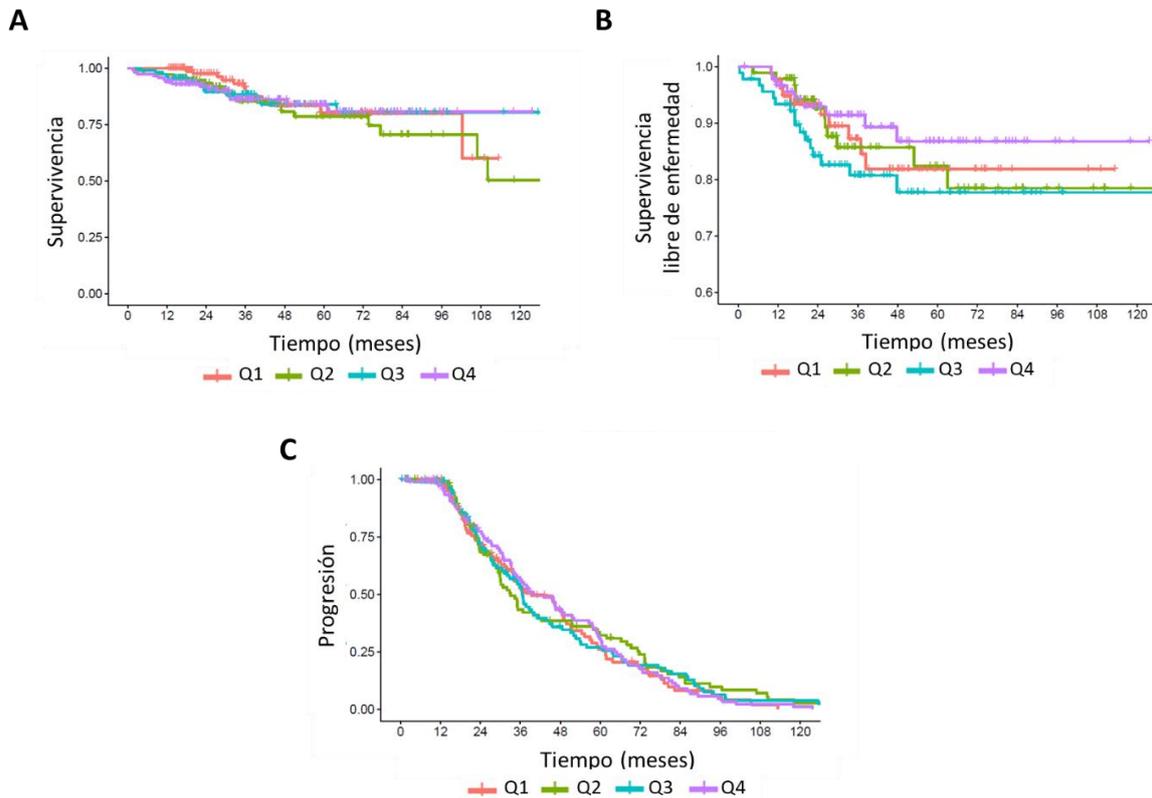


Figura 27. Estudio de asociación entre la expresión de CXCR4 y la supervivencia total, la supervivencia libre de enfermedad o la progresión de la enfermedad en una cohorte de 529 pacientes con cáncer de endometrio. Expresión de CXCR4 estructurada en cuartiles de mayor a menor nivel de expresión (Q1, Q2, Q3, Q4) y su asociación con los siguientes parámetros de evolución clínica: **A. supervivencia total** ($p=0,42$). **B. supervivencia libre de enfermedad** ($p=0,42$) y **C. progresión de la enfermedad** ($p=0,89$). Análisis estadístico: test log-Rank.

Después de analizar los resultados obtenidos **no hemos hallado correlación** entre el nivel de expresión de CXCR4 en tejido tumoral, evaluado a nivel de proteína o de ARNm y los parámetros de mal pronóstico (invasión linfovascular, del miometrio o del cérvix), clasificación (tipo histológico, grado, subtipo molecular), estadiaje FIGO o evolución clínica de la enfermedad (supervivencia, progresión). No obstante, la observación de que este receptor está **sobreexpresado** en la mayoría de las muestras estudiadas de tumores de pacientes con CE, presentando un patrón de localización predominantemente **membranal**, y la referencia previa, descrita por otros autores, de que la ruta CXCL12/CXCR4 promueve la progresión del CE endometrial¹⁵⁴, identifica a **CXCR4** como una **diana terapéutica**, de forma similar a lo que se ha descrito en otros tipos tumorales²⁴¹, apoyando y justificando, por tanto, el **desarrollo** de una **terapia dirigida** a este receptor para el tratamiento del CE.

RESULTADOS

2. DESARROLLO DE MODELOS ANIMALES DE CE CON SOBREENPRESIÓN DE CXCR4

Una vez constatada la expresión de membrana de CXCR4 en tejido tumoral de CE, fue necesario desarrollar **modelos xenógrafos en ratón con sobreexpresión de CXCR4 membranal**, tanto subcutáneos como ortotópicos, que permitieran evaluar *in vivo* agentes terapéuticos dirigidos a este receptor.

Con este objetivo, se generaron clones a partir de **líneas celulares de CE con alta expresión de CXCR4 en membrana**, y de la enzima **Luciferasa**, que produce bioluminiscencia en presencia de su sustrato (luciferina). Estas células fueron **implantadas** en el subcutis o en el lumen uterino de **ratones**, lo que permitió realizar un seguimiento de las células *in vivo*, y el estudio de la progresión tumoral y su patrón de diseminación.

2. 1. Generación de líneas celulares de CE con expresión constitutiva de CXCR4 en membrana y actividad Luciferasa

El análisis de la expresión de CXCR4 en la membrana de las líneas celulares de CE AN3CA, HEC1A y ARK-2, se realizó por citometría de flujo e inmunohistoquímica (**Figura 28.A.**).

Dado que su expresión basal fue despreciable, las tres líneas fueron transfectadas por **lipofección** con el plásmido de CXCR4, bajo los promotores del citomegalovirus (CMV) y SV40p. Mediante este procedimiento, se obtuvieron líneas celulares CXCR4⁺ con una expresión de CXCR4 débil e inestable, a pesar de llevar a cabo múltiples selecciones (*sortings*) mediante citometría de flujo para aislar aquellas poblaciones con mayor intensidad de expresión del receptor. Por este motivo, se decidió, posteriormente, **transducir** las líneas parentales con lentivirus portadores del plásmido CXCR4-Luciferasa con expresión constitutiva, regulada por el promotor de la Ubiquitina.

En las dos líneas de CE endometriode, AN3CA y HEC1A, se obtuvo una expresión **estable** de CXCR4 de **alta intensidad**, medida por citometría de flujo, en **más del 97%** de las células. Este resultado se corroboró mediante tinción inmunocitoquímica en pellets celulares. Se observó que, mientras que en la línea HEC1A el receptor CXCR4 se encontraba expresado con la misma intensidad en el citosol y en la membrana celular, en el caso de AN3CA la expresión era predominantemente de membrana (**Figura 28.B.**).

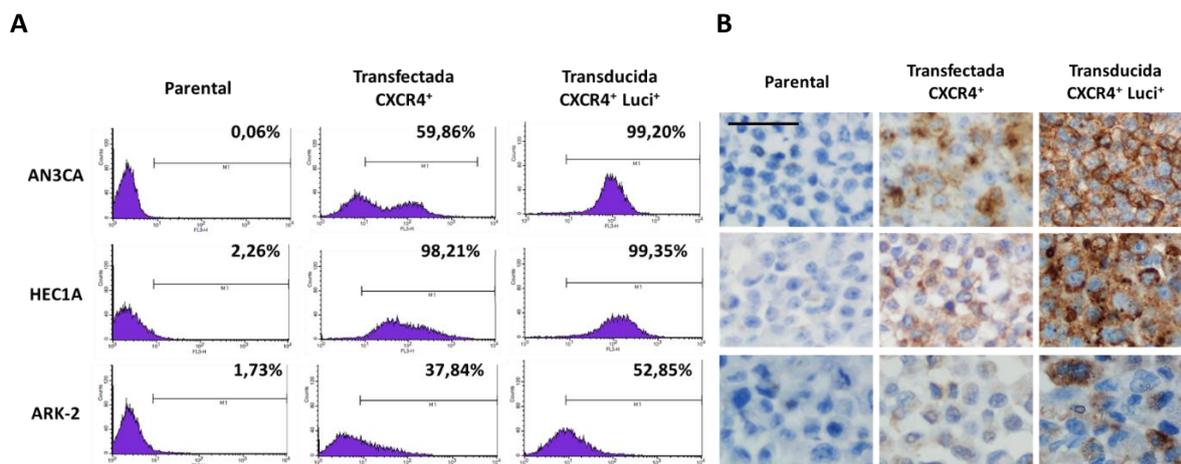


Figura 28. Análisis de la expresión de CXCR4 en líneas celulares de cáncer de endometrio AN3CA, HEC1A y ARK-2 parentales, transfectadas y transducidas, evaluada por: A. Citometría de flujo. B. Inmunocitoquímica en pellets celulares. Barra 50 μ m.

Paralelamente, las mismas líneas parentales AN3CA, HEC1A y ARK-2 fueron **transducidas** con lentivirus portadores de un plásmido que contenía el gen de la **Luciferasa**. La actividad luciferasa fue confirmada tanto en las líneas Luciferasa⁺ como en las líneas CXCR4⁺ Luciferasa⁺ mediante el equipo de imagen *IVIS Spectrum 2000* (Figura 29).

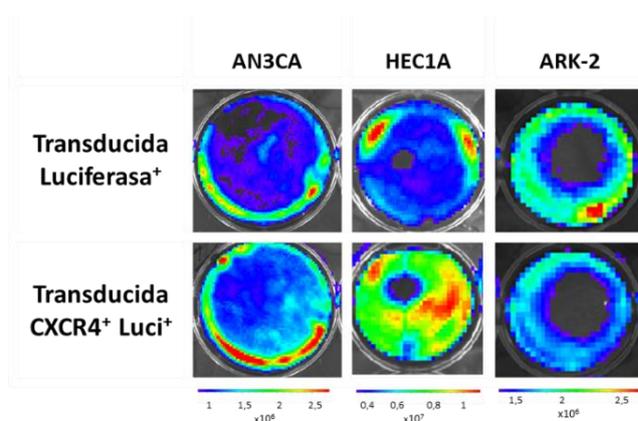


Figura 29. Análisis de la expresión de luciferasa en las líneas celulares de cáncer de endometrio AN3CA, HEC1A y ARK-2 transducidas con el vector codificante para la Luciferasa (“Transducida Luciferasa⁺”) o bien CXCR4-Luciferasa (“Transducida CXCR4⁺ Luciferasa⁺”), medidas en el equipo *IVIS Spectrum 2000*.

De forma **sistemática**, y previamente a todos los experimentos *in vitro* e *in vivo*, se analizó la expresión de **CXCR4** por citometría de flujo, comprobando que ésta se mantenía a lo largo de los pases y congelaciones de las líneas. La **actividad luciferasa** en las células también era determinada previamente a su inoculación en animales para generar los modelos *in vivo*.

RESULTADOS

2. 2. Desarrollo de un modelo murino subcutáneo con sobreexpresión de CXCR4

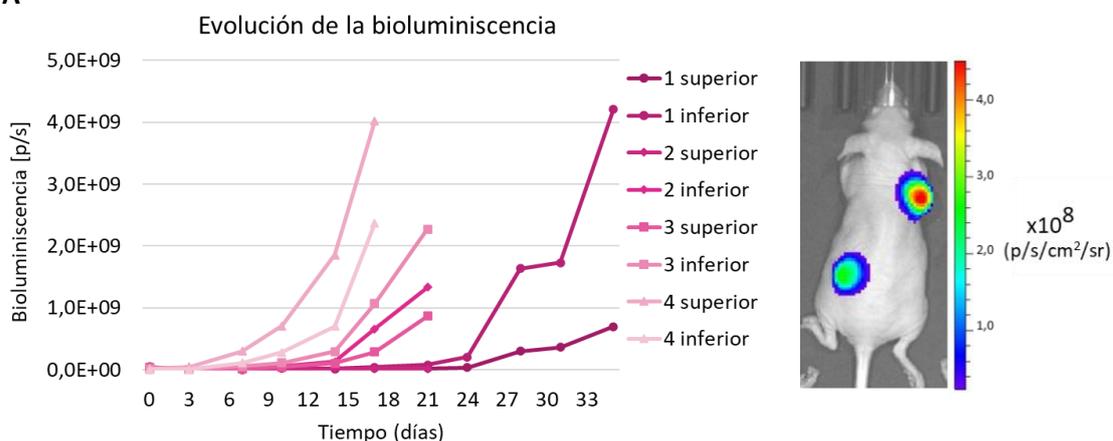
Debido a la **intensidad, estabilidad y localización** predominantemente membranal del receptor **CXCR4**, la línea **AN3CA transducida** (AN3CA CXCR4⁺ Luciferasa⁺) fue seleccionada para generar los **modelos xenógrafos** que posteriormente se emplearon para estudiar el efecto *in vivo* de las nanopartículas terapéuticas.

Para generar el **modelo ectópico subcutáneo**, se inocularon **10 millones de células** en el subcutis de dos flancos en 4 ratones de la cepa inmunodeprimida *Swiss nude*. Desde el momento de su implantación, se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral, midiendo el volumen de cada tumor, así como su emisión de bioluminiscencia (**Figura 30. A. y 30.B.**).

Para evitar el desarrollo de necrosis en los tumores, el punto final fue definido en un volumen de 400-500 mm³, manteniéndose como tejido viable y sin signos de necrosis macroscópica. Los animales vivieron una media de 23,5 ± 3,94 días, y se obtuvo una **tasa de implantación y desarrollo tumoral del 100%**. Tras el sacrificio, los tumores fueron recogidos y procesados para estudiar su histología mediante la tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de las proteínas CXCR4, Ki67 y vimentina.

Mediante el análisis histológico se comprobó que los tumores tenían buena **vascularización** y soporte **estromal**, sin signos de necrosis. Los niveles de expresión de **CXCR4** se mantuvieron expresados al igual que sucedía en cultivo, presentando una alta intensidad de tinción y una localización de membrana. La inmunohistoquímica de **Ki67** indicó una alta tasa de proliferación y la **vimentina**, que es un marcador mesenquimal característico del mesodermo, del que derivan las células epiteliales del endometrio, se expresó en todas las células mientras que el estroma tumoral, murino, fue negativo en los dos casos (**Figura 30.C.**).

A



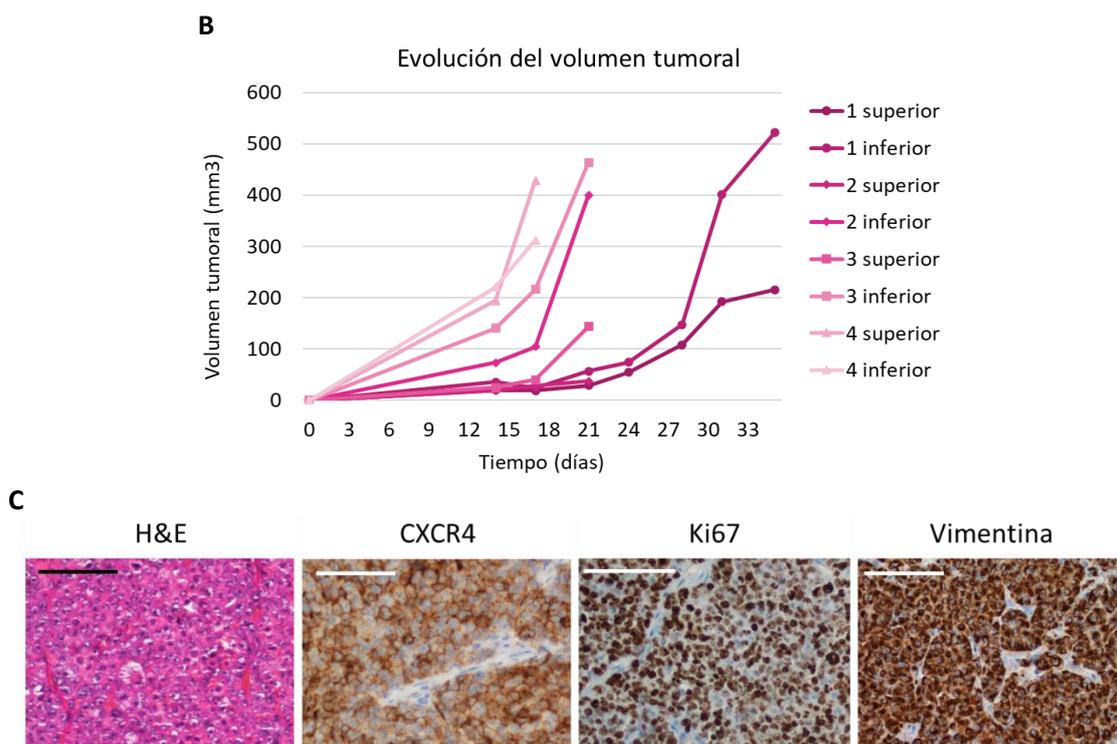


Figura 30. Evolución del crecimiento tumoral y caracterización histopatológica del modelo de cáncer de endometrio subcutáneo generado. Se utilizó la cepa *Swiss nude* para implantar la línea celular AN3CA CXCR4⁺ Luciferasa⁺, evaluándose: **A. La intensidad de la bioluminiscencia** de cada uno de los tumores inoculados, registrada con el equipo *IVIS Spectrum 2000*. A la derecha, una imagen representativa de la bioluminiscencia en un ratón. **B. El volumen tumoral** en los animales implantados. **C. La histología de los tumores**, teñidos con hematoxilina-eosina (H&E) e inmunohistoquímica de CXCR4, Ki67 y vimentina humana (barra: 100 μm).

El modelo subcutáneo obtenido fue de **desarrollo rápido**, con expresión de **Luciferasa**, que permitía el seguimiento del crecimiento tumoral por bioluminiscencia. Los tumores fueron **altamente proliferativos** y con expresión de **vimentina**, marcador **mesenquimal**. El receptor **CXCR4** se mantuvo con una **elevada expresión en la membrana**, lo que permitía la evaluación de la biodistribución y el efecto antitumoral de agentes terapéuticos dirigidos a este receptor.

2. 3. Desarrollo de un modelo murino ortotópico con elevada capacidad tumorigénica y metastática a partir de las líneas celulares derivadas de AN3CA

Para estudiar, además, la posible actividad antimetastática de las nanopartículas direccionadas a células tumorales CXCR4⁺, fue necesario desarrollar un **modelo ortotópico de CE avanzado** con alta capacidad **metastática** que mantuviera la expresión de membrana de **CXCR4**.

Para abordar este objetivo, se inyectaron un millón de células de las líneas **AN3CA CXCR4⁺ Luciferasa⁺** o **AN3CA Luciferasa⁺** (a las que nos referiremos a partir de ahora como AN3CA

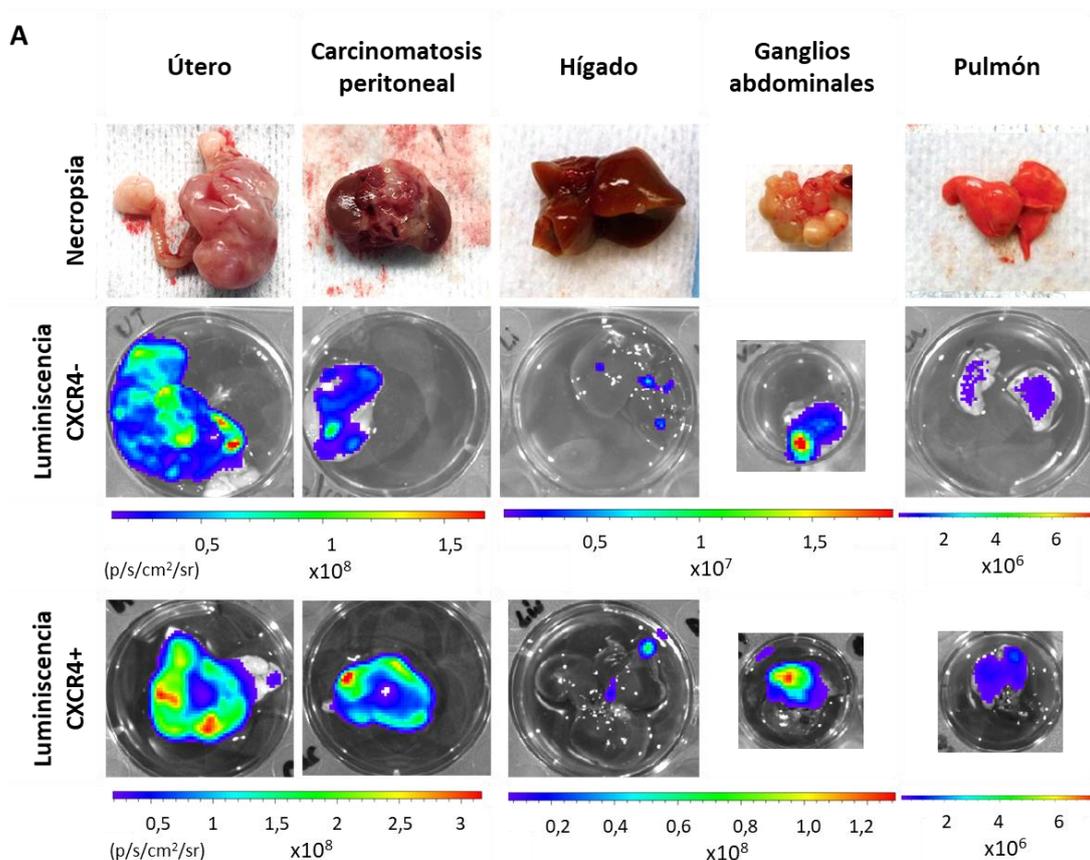
RESULTADOS

CXCR4⁺ y AN3CA CXCR4⁻, respectivamente), en el lumen uterino de ratones hembra de la cepa inmunodeprimida NSG (N=4), según el protocolo descrito en el subapartado **3.2.b.** de *Material y métodos*. Para **conocer el patrón de diseminación** de las células inyectadas, los animales eran sacrificados al tiempo determinado, entre otros parámetros, por el crecimiento del tumor primario y la carcinomatosis peritoneal, que daban lugar a signos de distensión abdominal y ascitis.

a. Estudio de la capacidad tumorigénica de los modelos ortotópicos

El día de la eutanasia se realizó el registro *ex vivo* de la **bioluminiscencia** emitida por el tumor primario en el **útero** y los **órganos relevantes** a nivel clínico, con posible localización metastática, como los focos tumorales en el **peritoneo** (carcinomatosis), y el **hígado, pulmón** y **ganglios linfáticos abdominales**. No se observaron diferencias significativas entre la bioluminiscencia medida en los animales inoculados con una u otra línea celular.

Durante la necropsia se observó macroscópicamente que **todos los ratones** habían desarrollado **tumor primario** y **carcinomatosis peritoneal**, y la emisión de bioluminiscencia indicó que las células inoculadas habían crecido en el útero, formando el tumor primario, y **colonizado órganos** diferentes, y **distales**, al punto de inoculación (**Figura 31**).



B

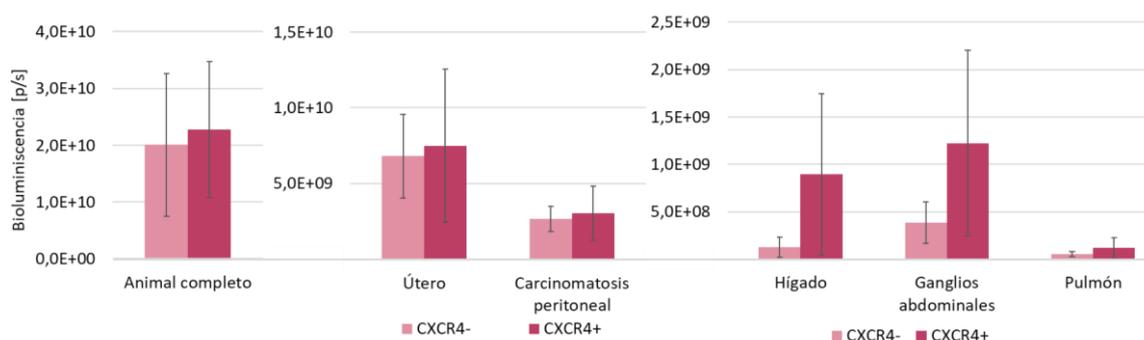


Figura 31. Emisión de bioluminiscencia en el modelo xenógrafo ortotópico de cáncer de endometrio generado. Las líneas celulares AN3CA Luciferasa⁺ (CXCR4⁻) o AN3CA CXCR4⁺ Luciferasa⁺ (CXCR4⁺) se implantaron en el endometrio de ratones de la cepa NSG. **A. Imágenes macroscópicas representativas de los órganos clínicamente relevantes** en el modelo ortotópico de cáncer de endometrio, y de la bioluminiscencia emitida tras la necropsia. **B. Cuantificación de la emisión de bioluminiscencia** a tiempo final en el animal completo, y análisis *ex vivo* en diferentes órganos con afectación metastática (expresada como media ± SEM; N=3).

Una vez determinado que todos los animales habían desarrollado tumor primario y carcinomatosis peritoneal, se llevó a cabo la **evaluación histológica**, por microscopía óptica de útero y ovarios, y de la carcinomatosis peritoneal, hígado, pulmón y ganglios abdominales.

b. Descripción de las características histopatológicas de los modelos ortotópicos

Después de registrar la bioluminiscencia *ex vivo* emitida por los órganos diana de metástasis y relevantes en la clínica, fueron procesados e incluidos en parafina para su análisis microscópico, con objeto de poder describir histopatológicamente el modelo desarrollado y determinar la presencia de focos metastáticos, su número y tamaño. En todos ellos se realizó una tinción con hematoxilina-eosina, la cual permitía determinar los posibles focos metastáticos de áreas extensas por microscopía óptica. Además, se determinó la expresión de CXCR4 por inmunohistoquímica.

En el **100%** de los ratones se generó **tumor primario** en el útero y **carcinomatosis peritoneal**, así como metástasis en **ovario** y **ganglios linfáticos** de la zona abdominal. En el útero, las células tumorales invadían el endometrio, llegando hasta la capa serosa, formando una masa grande de tumor primario y perdiéndose la arquitectura tisular.

RESULTADOS

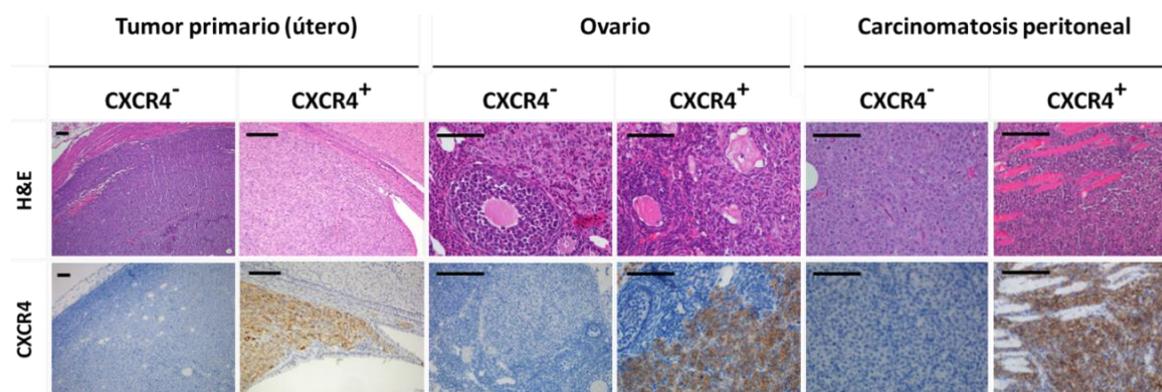


Figura 32. Histología y nivel de expresión de CXCR4 en tumor primario, ovario y carcinomatosis peritoneales en el modelo ortotópico de cáncer de endometrio avanzado. El modelo se obtuvo a partir de la inoculación de la línea celular AN3CA Luciferasa⁺ (CXCR4⁻) y AN3CA CXCR4⁺ Luciferasa⁺ (CXCR4⁺) en ratones de la cepa NSG. Muestras teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) o por inmunohistoquímica de CXCR4 (barra: 100 μ m).

Por otra parte, la inoculación *in vivo* de la línea AN3CA CXCR4⁻ no indujo la expresión de CXCR4. En el caso de AN3CA CXCR4⁺, la **expresión de CXCR4 en membrana** se mantenía *in vivo* presentando **alta intensidad**, tanto en el **tumor primario** como en los **focos metastáticos** del ovario y la carcinomatosis peritoneal (**Figura 32**).

La sobreexpresión de CXCR4 aumenta la capacidad de diseminación de la línea celular AN3CA

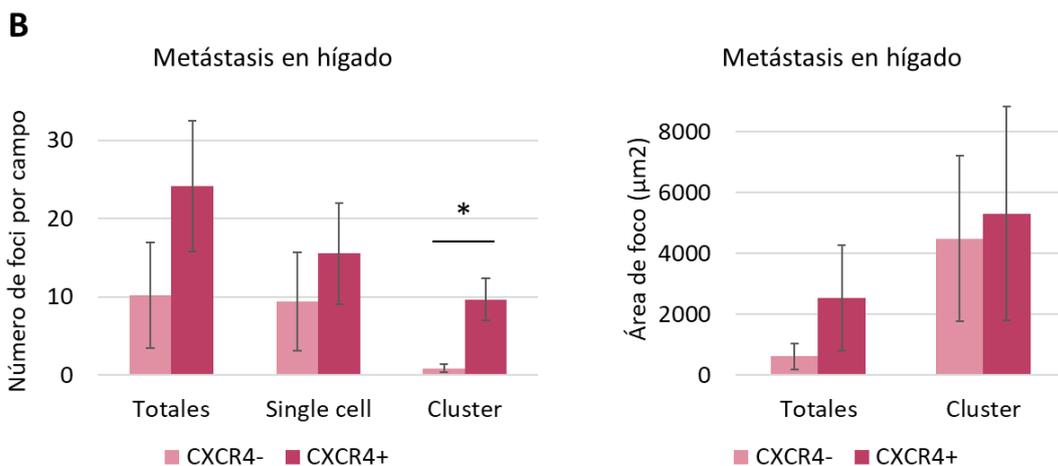
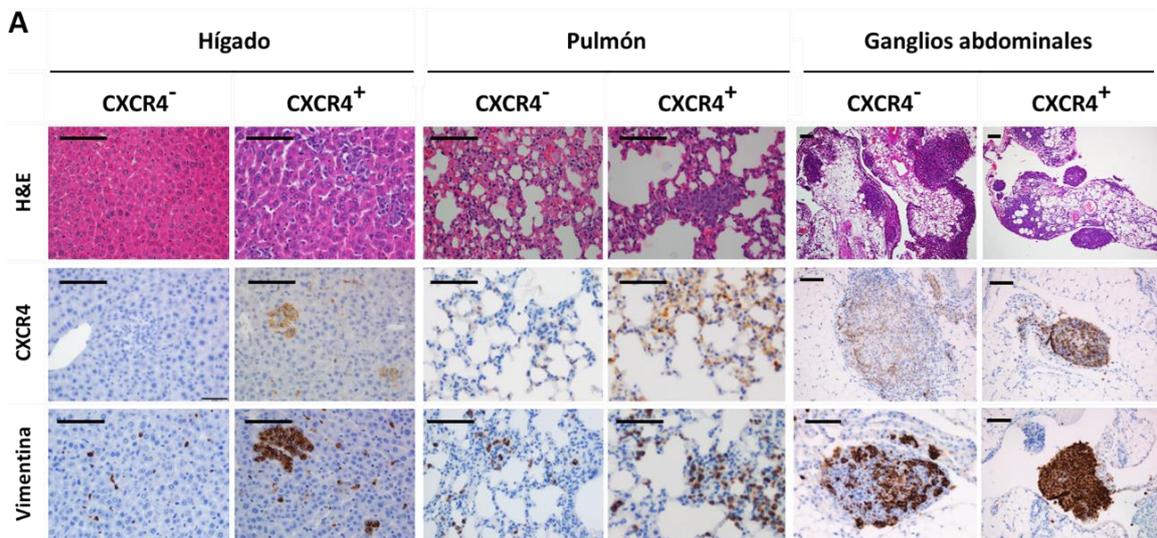
Para evidenciar la presencia de células tumorales en hígado y pulmón, se decidió realizar tinciones inmunohistoquímicas de **vimentina humana** en estos órganos, ya que las células tumorales expresaban altos niveles de esta proteína, al contrario que las células murinas. Esta metodología permitió distinguir rápida y fácilmente las células metastáticas en hígado y pulmón, incluso cuando se presentaban como células únicas (*single cells*). Su cuantificación fue posible gracias al uso de los programas informáticos *CellSens* y *QuPath*, estandarizando así el conteo y cálculo de porcentajes y áreas ocupadas por células tumorales únicas o en grupos, sin perder información sobre su diseminación. Gracias a esta estrategia, se observó que el **100% de los animales** habían desarrollado focos de **metástasis en hígado y pulmón**. En estos focos, positivos para vimentina, la **expresión de CXCR4** se mantenía con **alta intensidad** y patrón de **membrana**, en los animales inoculados con la línea AN3CA CXCR4⁺ (**Figura 33.A.**). La diseminación hepática se analizó teniendo en cuenta el número de focos y su área, mientras que la diseminación pulmonar se expresó como área de tejido invadido.

A pesar del pequeño tamaño muestral (N=4), se obtuvo una clara tendencia en el sentido de que los animales del grupo inoculado con la línea **AN3CA CXCR4⁺** desarrollaban **más metástasis distales** que los del grupo inoculado con la línea AN3CA CXCR4⁻ (**Figura 33.B.** y

33.C.) Para conocer la magnitud de esta tendencia se recurrió al cálculo de la delta de Cohen (*d*), una medida del tamaño del efecto, que se considera elevado cuando *d* adquiere valores superiores a 0,8.

El **número de metástasis pluricelulares** o clústeres en el **hígado** de animales inoculados con la línea AN3CA CXCR4⁺ era significativamente mayor que en los animales inoculados con la línea negativa (*d*=2,3; *p*=0,021). También se observó un **gran efecto de CXCR4** en cuanto al **área** en general de las metástasis (*d*=0,75) y al **número de foci totales** (*d*=0,92) en este órgano.

Por último, los animales inoculados con AN3CA CXCR4⁺ también mostraron el **doble de células tumorales diseminadas a pulmón** (*p*=0,083), demostrando un efecto de gran magnitud de CXCR4 (*d* =1,26) sobre el aumento de la diseminación pulmonar.



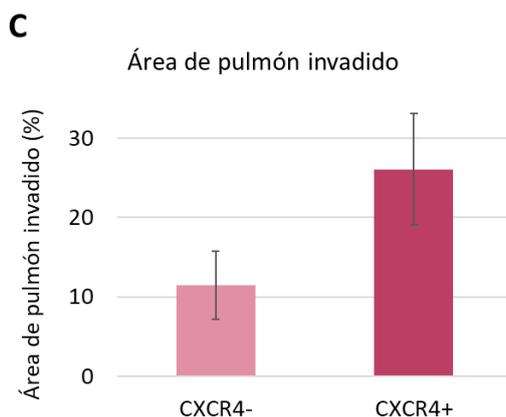


Figura 33. Patrón de diseminación del modelo xenógrafo ortotópico de cáncer de endometrio avanzado generado en la cepa NSG y comparativa entre los modelos derivados de las líneas celulares AN3CA CXCR4⁻ y CXCR4⁺. A. Histología de los órganos principales de metástasis (hígado, pulmón y ganglios linfáticos) teñidos por hematoxilina-eosina (H&E) e inmunohistoquímica de CXCR4 y vimentina humana. B. Cuantificación de número de metástasis y área de los focos en hígado, catalogadas según su tamaño (*single cells*: células únicas; *cluster*: en grupo) y su comparativa entre las dos líneas celulares. El análisis estadístico empleado fue el test de la U de Mann-Whitney (* p=0,021). C. Cuantificación del área de tejido pulmonar ocupado por células tumorales y su comparativa entre las dos líneas celulares. Todos los parámetros se expresaron como media ± SEM; N=4.

La comparación de la diseminación metastásica en **hígado** y en **pulmón** del modelo ortotópico derivado de la línea celular de CE AN3CA CXCR4⁻ con el derivado de las células de CE AN3CA CXCR4⁺, mostró que la **expresión de CXCR4** generó **mayor diseminación metastásica** en ambos órganos, confirmando el papel del receptor CXCR4 en la inducción de metástasis hematógenas en CE (**Tabla 7**).

Tabla 7. Patrón de diseminación a hígado y pulmón del modelo xenógrafo ortotópico de cáncer de endometrio generado en la cepa NSG a partir de la línea celular AN3CA con y sin sobreexpresión de CXCR4.

	Hígado					Pulmón
	Foci totales		Foci de célula única	Foci de células en clústers		Porcentaje de tejido invadido
	Número	Área (µm ²)	Número	Número	Área (µm ²)	
AN3CA CXCR4⁻	10,2 ± 6,73 ^a	615,45 ± 429,46 ^b	9,37 ± 6,30	0,85 ± 0,49 ^c	4486,34 ± 2727,98	11,47 ± 4,2 ^d
AN3CA CXCR4⁺	24,15 ± 8,34 ^a	2536,76 ± 1746,84 ^b	15,55 ± 6,47	9,68 ± 2,65 ^c	5304,98 ± 3517,93	26,06 ± 7,04 ^d

Los resultados se reportan como media ± SEM por ratón y campo microscópico de medio aumento (200x, 10 campos) en secciones de hígado o pulmón, tras su tinción inmunohistoquímica con vimentina; N=4. La comparación de cada parámetro entre los dos modelos se realizó aplicando el test estadístico de la U de Mann-Whitney (p) y la delta de Cohen (d). ^a d=0,92; ^b d=0,75; ^c p=0,021 y d=2,3; ^d p=0,083 y d=1,26.

Por lo tanto, a través del **modelo ortotópico de CE CXCR4⁺** generado por inoculación transmiometrial con ligadura del cuerno uterino, se logró el objetivo de desarrollar una **tasa elevada de diseminación (100%)** en todos los **órganos de metástasis habituales** en CE avanzado en la clínica, lo que **permitió** su uso para abordar el siguiente objetivo planteado en esta tesis: **evaluar el efecto** antitumoral y antimetastático de **nanopartículas dirigidas a células CXCR4⁺** en un modelo murino de CE altamente metastático.

RESULTADOS

3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL NANOTRANSPORTADOR T22-GFP-H6 EN MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE CE CXCR4⁺

Como se ha explicado en el apartado **6.2.** de la Introducción, en colaboración con el grupo de **Nanobiotecnología** de la Universidad Autónoma de Barcelona, liderado por el Dr. Villaverde, se diseñaron y produjeron **nanopartículas proteicas** que portan un ligando (T22) de unión al receptor CXCR4, basadas en el **nanotransportador T22-GFP-H6**, el cual ha demostrado una elevada capacidad de internalización en modelos *in vitro* e *in vivo* de varios tipos tumorales CXCR4⁺. Por este motivo, y una vez determinada la sobreexpresión de CXCR4 en la membrana de las células tumorales de pacientes con **CE**, se decidió **evaluar** su capacidad de internalización y selectividad en **líneas celulares humanas**, para conocer así su potencial terapéutico en este cáncer ginecológico.

3. 1. Internalización dependiente de CXCR4 del nanotransportador T22-GFP-H6 en las líneas celulares AN3CA CXCR4⁺ y HEC1A CXCR4⁺

La cinética de **internalización** del nanotransportador T22-GFP-H6 en líneas de CE se estudió mediante **citometría de flujo** aprovechando la fluorescencia que le confería el dominio GFP. Para ello, las dos líneas celulares con la expresión más alta y estable de CXCR4, AN3CA y HEC1A fueron expuestas a diferentes concentraciones (1, 10, 50, 100 o 400 nM) de la nanopartícula, en un rango de tiempo (1, 6 o 24 horas). En su análisis se tuvieron en cuenta dos parámetros: el **porcentaje de células** que habían adquirido fluorescencia por la internalización del nanotransportador, y la **intensidad** de dicha fluorescencia, cuyo valor reflejaría la cantidad de GFP en el interior de cada célula (**Figura 34**).

A 1 nM, la internalización de la nanopartícula fue despreciable a todos los tiempos, mientras que **a partir de 10 nM** se observó entrada en las células **tras 1 hora** de exposición, en las dos líneas celulares. Todas las concentraciones mostraron **un pico de internalización a las 6 horas**, tanto en el porcentaje de células fluorescentes como en la intensidad de dicha fluorescencia.

En el caso de la línea **HEC1A** se observó que la internalización máxima de T22-GFP-H6, que ocurrió en aproximadamente un 60% de las células, se obtuvo a las 6 horas de exposición a 400 nM, con una intensidad de fluorescencia 4 veces mayor que la autofluorescencia celular basal. Tanto el porcentaje de células fluorescentes como la intensidad de su fluorescencia disminuyeron tras 24 horas de exposición.

T22-GFP-H6 mostró **mayor facilidad** de internalización en la línea **AN3CA**. A las 6 horas de exposición a 10 nM de nanopartícula, el 80% de las células mostraron fluorescencia, con una intensidad 3 veces mayor que la fluorescencia basal, de las células control. Su intensidad fue **dosis dependiente**, aumentando con la concentración, de modo que a 400 nM se multiplicaba por 7, y el porcentaje de células positivas fue de cerca del 100%. Tanto los porcentajes como la intensidad de fluorescencia fueron similares a las 24 horas de exposición, en todos los casos.

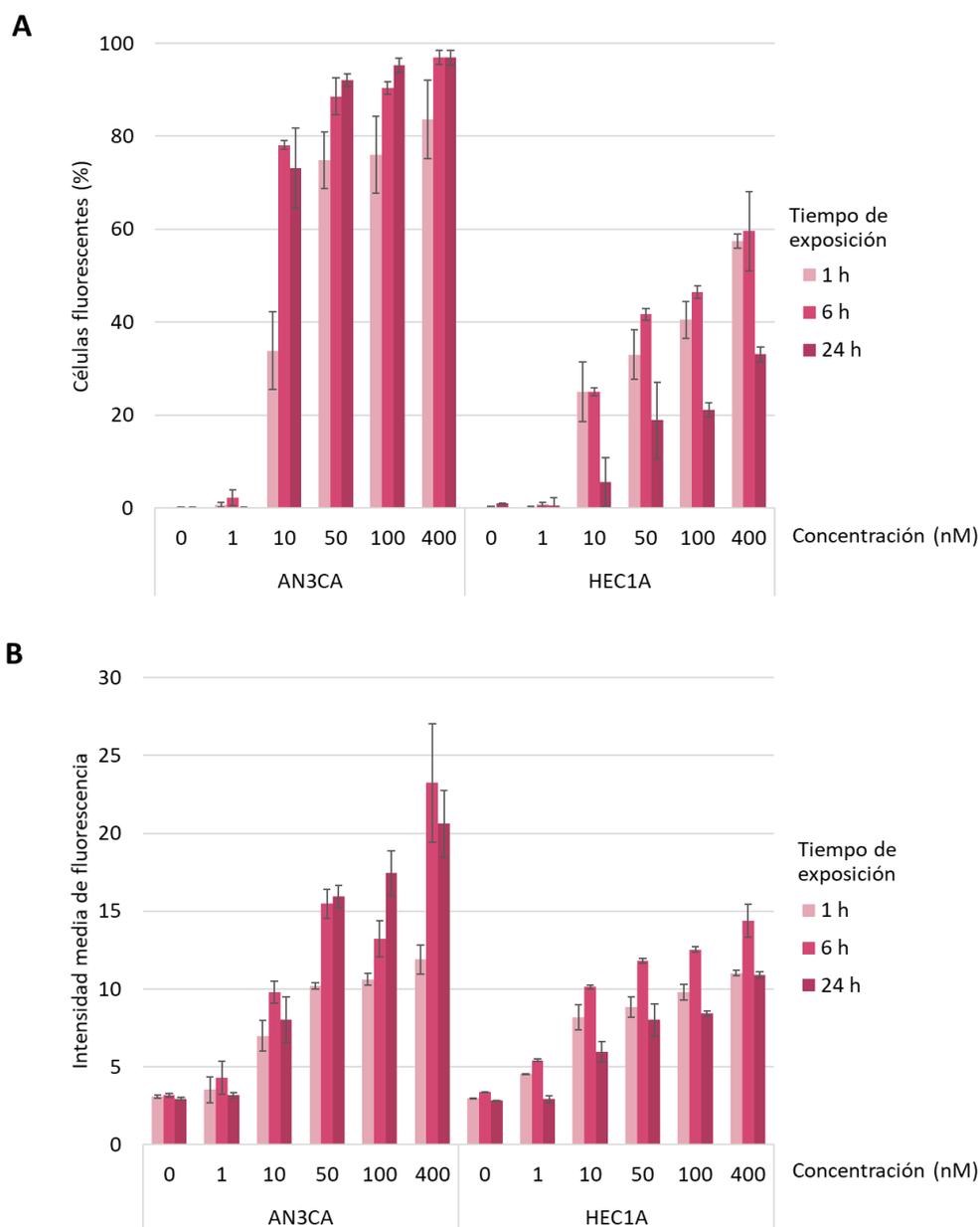


Figura 34. Evaluación de la internalización de la nanopartícula T22-GFP-H6 en las líneas celulares AN3CA y HEC1A, de cáncer de endometrio. El estudio de la internalización se realizó mediante citometría de flujo. **A. Porcentaje de células fluorescentes** tras la exposición a la nanopartícula. **B. Intensidad de fluorescencia** de las células expuestas. Todos los parámetros están expresados como media \pm SEM.

RESULTADOS

Por otro lado, para evaluar la dependencia de CXCR4 en la entrada del nanotransportador en la línea AN3CA se estudió su capacidad de internalización a las 6 horas, a varias concentraciones de T22-GFP-H6, y utilizando la línea celular CXCR4⁻ (**Figura 35**). Además, se realizaron estudios de competición con el antagonista de CXCR4 AMD3100 [1 μ M], con el que se trataron las células CXCR4⁺ durante la hora previa a la exposición a la nanopartícula. La línea AN3CA sin expresión de CXCR4 no mostró internalización de la nanopartícula a concentraciones de 10 nM o 100 nM. Con respecto al tratamiento con el antagonista, no se detectó fluorescencia en la línea expuesta a 10 nM, y al exponerse a 100 nM, la internalización disminuyó en un 60%.

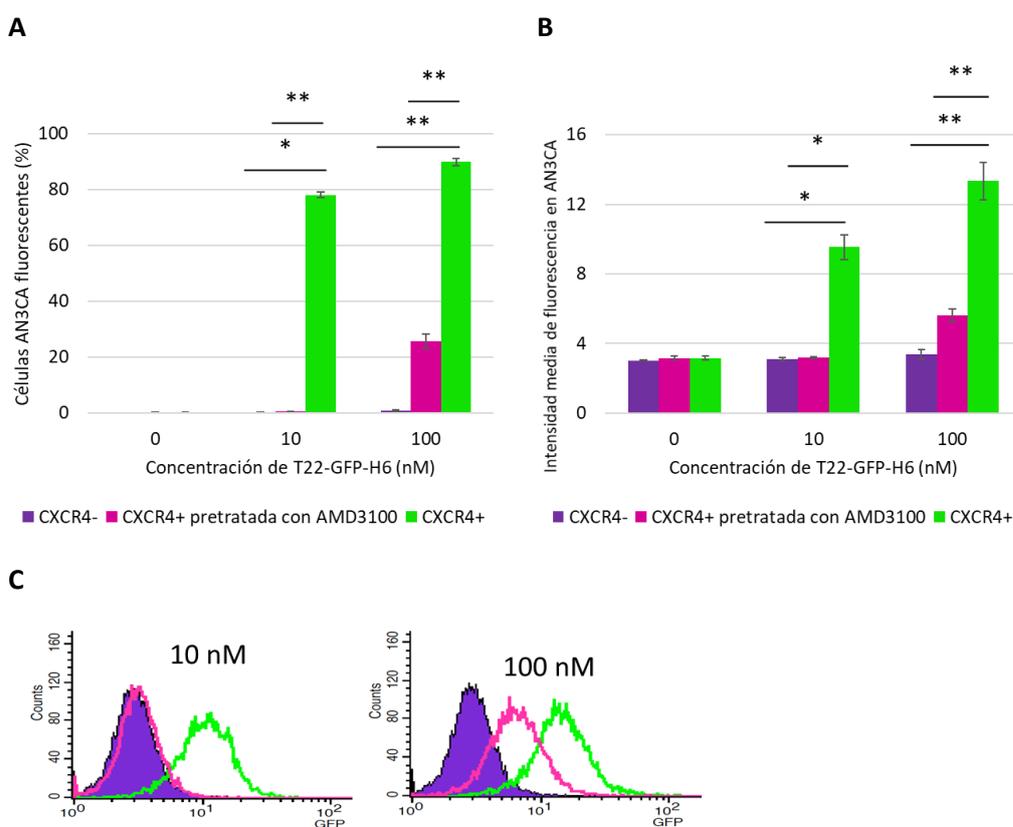


Figura 35. Evaluación de la internalización de la nanopartícula T22-GFP-H6 dependiente de CXCR4 en las líneas AN3CA CXCR4⁻ y AN3CA CXCR4⁺, con y sin pretratamiento con el antagonista de CXCR4 AMD3100, analizado mediante citometría de flujo. A. Porcentaje de células fluorescentes tras la exposición a la nanopartícula. B. Intensidad de la fluorescencia en el ensayo de dependencia de CXCR4. C. Gráficas representativas de la intensidad media de fluorescencia en las tres condiciones, con la misma leyenda que los gráficos de barras. Todos los parámetros están expresados como media \pm SEM. Análisis estadístico: test de la U de Mann-Whitney (* $p < 0,005$; ** $p < 0,001$).

De este modo, se demostró que la **internalización** de **T22-GFP-H6** fue selectiva y **dependiente de CXCR4**, validándose así la especificidad del direccionamiento del nanotransportador en líneas celulares de CE CXCR4⁺.

3. 2. Ausencia de citotoxicidad *in vitro* del nanotransportador T22-GFP-H6 en las células AN3CA CXCR4⁺ y HEC1A CXCR4⁺

La citotoxicidad del nanotransportador se evaluó mediante ensayos de viabilidad XTT a 48 horas, dentro el rango de concentraciones empleado en el estudio de la internalización (0-400 nM). En ninguna de las concentraciones evaluadas se observó una disminución significativa del porcentaje de viabilidad en ninguna de las líneas, AN3CA CXCR4⁺ o HEC1A CXCR4⁺ (**Figura 36**).

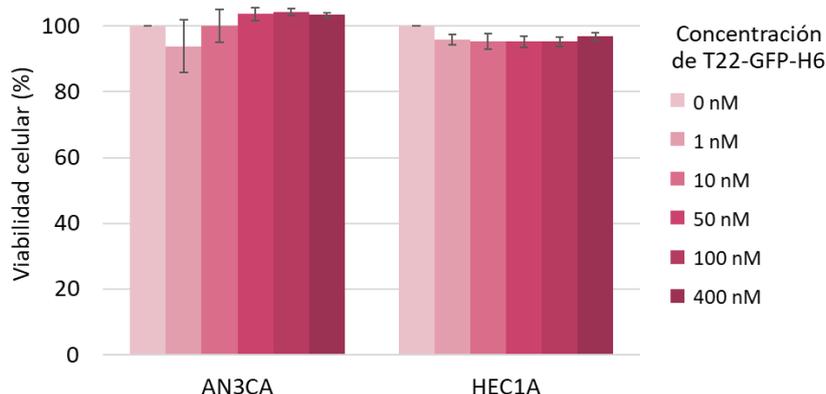


Figura 36. Evaluación del efecto citotóxico del nanotransportador T22-GFP-H6 en las líneas celulares de cáncer de endometrio AN3CA CXCR4⁺ y HEC1A CXCR4⁺. La cuantificación de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante el ensayo XTT y fue expresada como media ± SEM.

Estos resultados demuestran la **ausencia de capacidad citotóxica de T22-GFP-H6 *in vitro***, la cual, junto con su **elevada internalización celular dependiente de CXCR4**, demuestra el potencial de esta nanopartícula para cargar y transportar fármacos o dominios polipeptídicos con actividad terapéutica e introducirlos en las células diana, de manera selectiva. Por este motivo, continuamos la evaluación de este nanotransportador estudiando *in vivo* su **biodistribución** en el tejido tumoral y su posible toxicidad, o ausencia de ella, en tejidos no tumorales. Para llevar a cabo este objetivo utilizamos el modelo xenógrafo subcutáneo en la cepa *Swiss nude* derivado de la línea celular de CE AN3CA CXCR4⁺.

3. 3. Estudio *in vivo* de la biodistribución y toxicidad del nanotransportador T22-GFP-H6 en el modelo subcutáneo de CE CXCR4⁺

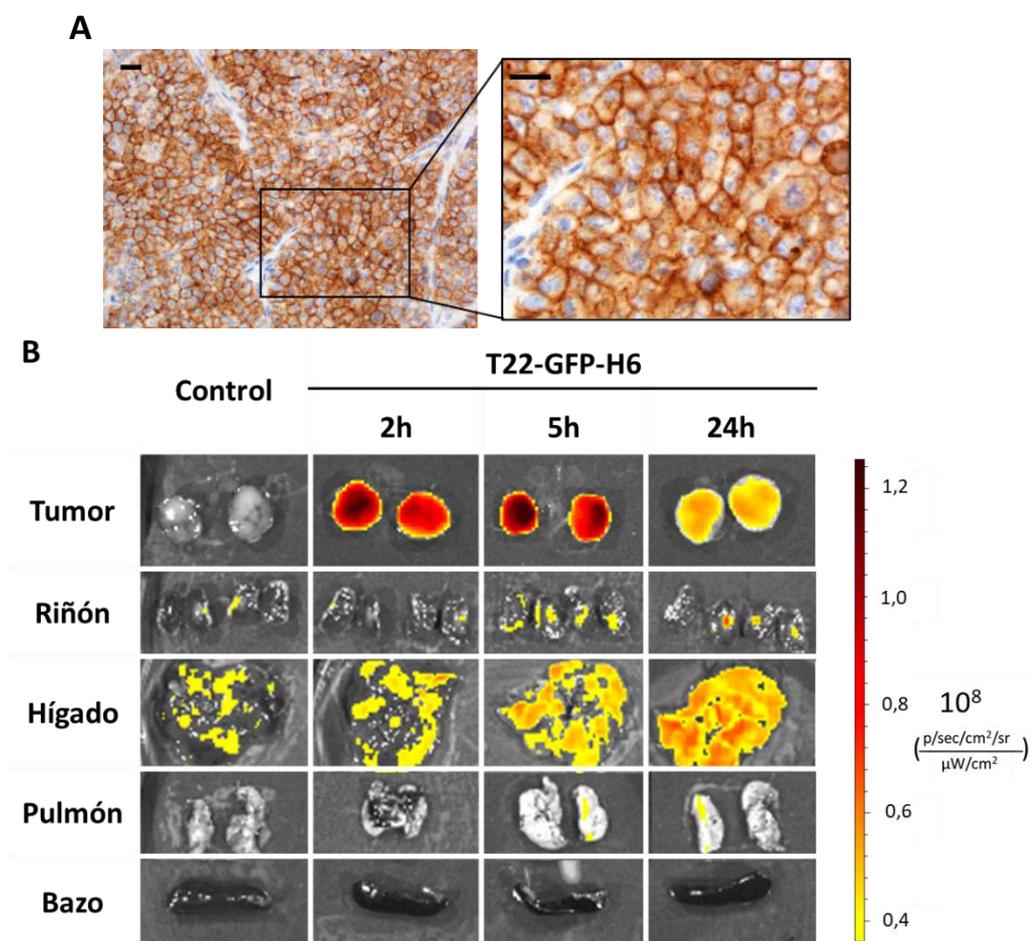
Una vez demostrada la capacidad de internalización, dependiente de CXCR4, de la nanopartícula **T22-GFP-H6**, y su despreciable toxicidad *in vitro* en líneas CXCR4⁺, se evaluó su **biodistribución *in vivo*** en tejidos tumorales y no tumorales en el modelo xenógrafo subcutáneo derivado de la línea celular AN3CA CXCR4⁺ en la cepa *Swiss nude*. De este modo se podría determinar la capacidad de este nanotransportador de acumularse de forma selectiva en los modelos de CE y su toxicidad sobre células sanas, en ambiente fisiológico *in vivo*.

RESULTADOS

Debido a la variabilidad en el crecimiento de los tumores subcutáneos derivados de la línea AN3CA CXCR4⁺, descrita en el apartado 2.2. de *Resultados*, fue necesario reclutar los distintos animales en diferentes momentos. Es decir, cuando los tumores alcanzaban un **volumen aproximado de 200 mm³**, los **ratones** eran **aleatorizados** en tres grupos en los que se estudiaba la biodistribución de T22-GFP-H6 en tumor y tejidos no tumorales a las **2, 5 o 24 horas** después de la administración de una dosis única intravenosa de **200 µg**.

a. Biodistribución selectiva del nanotransportador T22-GFP-H6 a tumor

Se determinó la **expresión de CXCR4** en secciones de **tumores subcutáneos** por tinción inmunohistoquímica previamente a la inyección del nanotransportador, mostrando una expresión **intensa** y una localización **de membrana** (**Figura 37.A.**). Por otra parte, la inyección de la nanopartícula **T22-GFP-H6** en este modelo permitió evaluar su **biodistribución** a 2, 5 o 24 horas después de su administración a través su emisión de fluorescencia, observándose su acumulación en tumor a las 2 horas, y llegando a su **pico de acumulación a las 5 horas** antes de disminuir la señal fluorescente a las 24 horas (**Figura 37.B.**).



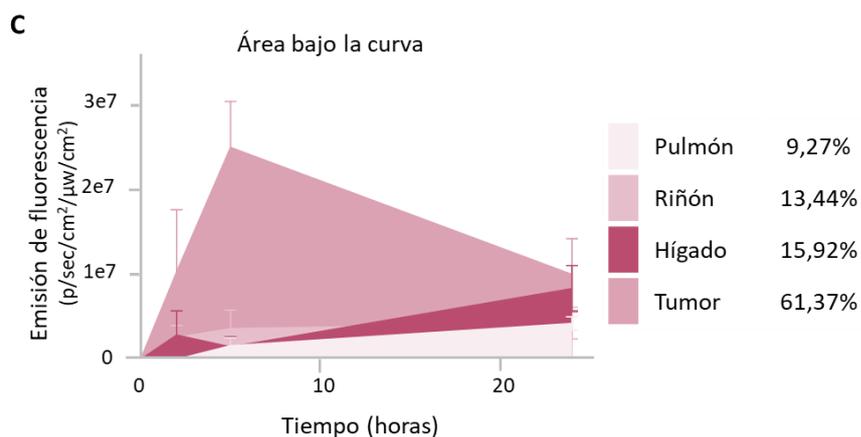


Figura 37. Biodistribución del nanotransportador T22-GFP-H6 en el modelo xenógrafo subcutáneo AN3CA CXCR4⁺ generado en la cepa *Swiss nude*. A. Tinción por inmunohistoquímica de CXCR4 de un tumor subcutáneo (barra: 20 μm). B. Imágenes representativas de la fluorescencia emitida por T22-GFP-H6 en tumor y en diferentes órganos no tumorales a las 2, 5 y 24 horas. C. Área bajo la curva de emisión de fluorescencia por el tumor a lo largo del tiempo. Se representa la acumulación de la nanopartícula en tumor en comparación con la de los órganos normales a lo largo del tiempo, expresada como media ± SEM. Número de animales analizados: N=4.

También se estudió la emisión de fluorescencia emitida por los órganos vitales más relevantes: riñón, hígado, pulmón y bazo. Los niveles de fluorescencia en riñón se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo, mientras que en hígado mostraron un ligero aumento a las 24 horas, siendo ambos mucho menores que los detectados en tumor. Los niveles en bazo fueron indetectables. En consecuencia, cuando se analizó el área bajo la curva de la acumulación de T22-GFP-H6 en los distintos órganos, se observó que **más del 60% del total de la nanopartícula había sido captada por el tumor (Figura 37.C.)**, situándose para el resto de los tejidos normales en el rango de 9-16% dependiendo del órgano.

b. Ausencia de toxicidad del nanotransportador T22-GFP-H6 in vivo

A nivel macroscópico no se observó **ninguna diferencia** visual en los órganos no tumorales, incluyendo el hígado, riñón o pulmón de los animales tratados con respecto a los del grupo control. Sin embargo, dado que sí se detectó emisión de fluorescencia en estos órganos, se decidió estudiar la histología de todos ellos, y del bazo, mediante tinción con hematoxilina-eosina. Tras 48 horas de la administración de T22-GFP-H6, no se observaron alteraciones de la arquitectura tisular, y no hubo evidencias de muerte celular en ninguno de los órganos analizados (Figura 38).

RESULTADOS

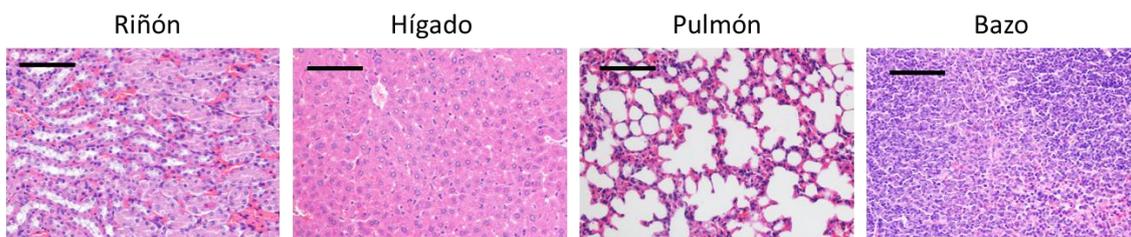


Figura 38. Evaluación de la toxicidad tras la administración de T22-GFP-H6 en el modelo xenógrafo subcutáneo AN3CA CXCR4⁺ generado en la cepa *Swiss nude*. No se observaron alteraciones histológicas ni acumulaciones proteicas en los órganos no tumorales (riñón, hígado, pulmón y bazo), analizados 48 horas después de la administración del nanotransportador (tinción de hematoxilina-eosina; barra: 100 μm).

La observación de que la mayor parte de la dosis administrada de **T22-GFP-H6 se acumula en el tejido tumoral, sin toxicidad sistémica asociada**, valida nuestro nanotransportador como una buena estrategia para la entrega selectiva de agentes terapéuticos en células de CE CXCR4⁺ *in vivo*.

4. ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS TERAPÉUTICAS DERIVADAS DE T22-GFP-H6 EN LÍNEAS CELULARES DE CE CXCR4⁺

Una vez determinado que la internalización del nanotransportador T22-GFP-H6 era dependiente del receptor CXCR4, y se acumulaba preferentemente en el tejido tumoral *in vivo*, se evaluó una gran **batería de nanopartículas terapéuticas** que mantenía la **misma estructura** que T22-GFP-H6. Estas nanopartículas fueron obtenidas mediante diferentes estrategias, como la conjugación química del nanotransportador a fármacos o la incorporación a la estructura de T22-GFP-H6 de dominios polipeptídicos citotóxicos. De esta manera, se desarrollaron los **nanoconjugados** T22-GFP-H6-FdU (obtenido por conjugación al genotóxico floxuridina), T22-GFP-H6-AUR (que porta monometil auristatina E, una toxina inhibidora de los microtúbulos) y las **nanotoxinas** T22 DITOX-H6 y T22-PE24-H6 (que incorporan dominios polipeptídicos de toxinas bacterianas), así como otras **nanopartículas** basadas en **venenos animales** o en dominios funcionales derivados de **proteínas proapoptóticas** humanas.

Con el objetivo de identificar las **nanopartículas** con más posibilidades de **traslación** a fases preclínicas, era necesario que demostraran **una elevada selectividad y dependencia de CXCR4**, tanto en su **internalización** como en su **citotoxicidad *in vitro***.

4. 1. Internalización dependiente de CXCR4 de los nanoconjugados terapéuticos T22-GFP-H6-FdU y T22-GFP-H6-AUR

De entre las nanopartículas terapéuticas desarrolladas, los nanoconjugados **T22-GFP-H6-FdU y T22-GFP-H6-AUR**, obtenidos por la conjugación del nanotransportador con floxuridina y auristatina respectivamente, incluían en su estructura el dominio GFP, lo que, al igual que en el caso del nanotransportador, permitía la evaluación de su capacidad de internalización *in vitro* y, en caso de ser seleccionadas, su acumulación por el tejido tumoral *in vivo*.

Para determinar si el proceso de conjugación tenía algún impacto sobre la internalización selectiva de los nanoconjugados en células AN3CA CXCR4⁺, la fluorescencia celular fue analizada en el pico de internalización del nanotransportador y en un rango de concentraciones entre 10 y 400 nM (**Figura 39**).

La internalización a las 6 horas de **T22-GFP-H6-FdU** resultó ser muy **similar a la del nanotransportador** T22-GFP-H6, alcanzando el 70,6% de las células a una concentración de 10 nM y el 92,1% a 400 nM. La internalización se revertió con el tratamiento previo con AMD3100, demostrando su selectividad y dependencia de la expresión de CXCR4, aunque a

RESULTADOS

400 nM la capacidad de internalización del nanoconjugado se saturó, observándose internalización en el 67,7% de las células.

En el caso de **T22-GFP-H6-AUR** la internalización fue **menor**, de modo que la exposición de las células a una concentración de 100 nM solo consiguió alcanzar un 45,2% de las células, y el 74,4% a 400 nM, y en ambos casos se consiguió un bloqueo casi total al pretratar con AMD3100.

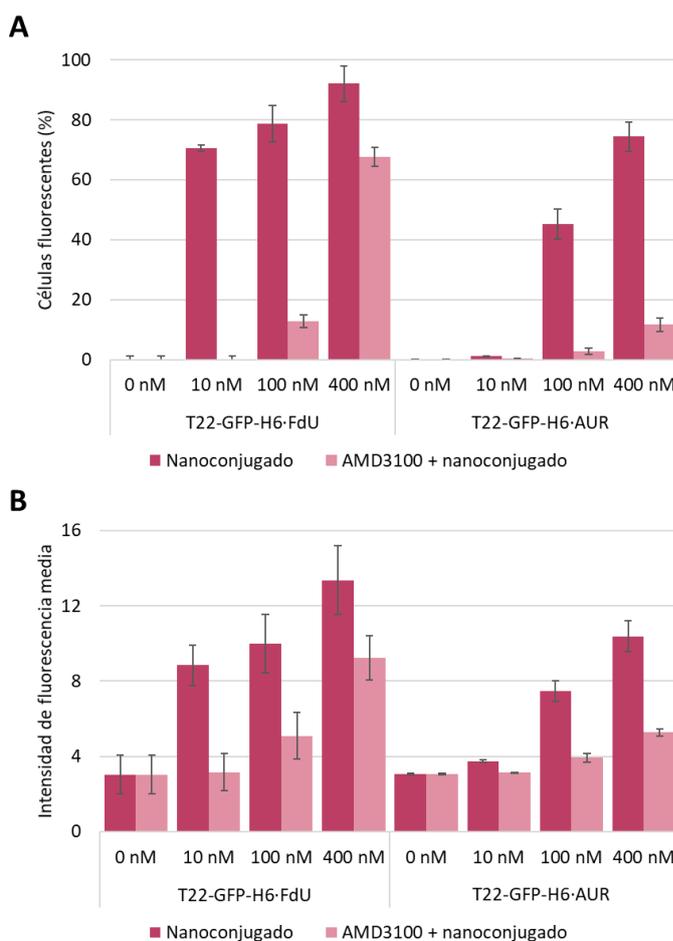


Figura 39. Internalización de los nanoconjugados T22-GFP-H6-FdU y T22-GFP-H6-AUR en la línea AN3CA CXCR4⁺ y su dependencia de CXCR4. La internalización de los nanoconjugados portadores de la proteína fluorescente GFP se evaluó tras 6 h de exposición, mediante citometría de flujo, con y sin pretratamiento con el antagonista de CXCR4, AMD3100. **A. Porcentaje** de células fluorescentes. **B. Intensidad** de fluorescencia. Todos los valores fueron expresados como media \pm SEM.

De esta manera, los nanoconjugados T22-GFP-H6-FdU y T22-GFP-H6-AUR mantuvieron la capacidad de **internalización dependiente de CXCR4** observada para el nanotransportador a concentraciones menores de 100 nM, validándose así la especificidad del direccionamiento de estas nanopartículas terapéuticas en la línea de CE AN3CA CXCR4⁺.

4. 2. Efecto citotóxico dependiente de CXCR4 de las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 en la línea celular AN3CA CXCR4⁺

Una vez demostrado que la internalización del nanotransportador y de los nanoconjugados al interior celular se llevaba a cabo de manera dependiente del receptor CXCR4, y en paralelo al desarrollo de los modelos animales, se llevó a cabo un **cribaje** de las diversas **nanopartículas** derivadas de T22-GFP-H6 descritas previamente. Para ello, se evaluó su efecto antitumoral *in vitro* mediante ensayos de viabilidad XTT, tanto en la línea celular de CE AN3CA como en HEC1A con sobreexpresión de CXCR4. De esta manera se conocería cuál o cuáles de ellas eran las **candidatas idóneas** para probar su efecto antineoplásico *in vivo* utilizando los modelos animales de CE CXCR4⁺ desarrollados.

Tras 48 horas de incubación, ninguna de las dos líneas evaluadas fue sensible a ninguna de las nanopartículas terapéuticas basadas en proteínas **proapoptóticas** (T22-PUMA-GFP-H6, T22-BAXPORO-GFP-H6 y T22-BAK-GFP-H6) o en el **péptido antimicrobiano** GWH1 (T22-GWH1-GFP-H6), a pesar de la elevada concentración a la que fueron expuestas (1 μ M). La línea AN3CA también fue expuesta a nanopartículas basadas en **venenos animales** (T22-MEL-GFP-H6, T22-GFP-H6-GOM y T22-GFP-H6-CLIP71), que tampoco mostraron efecto sobre la viabilidad celular (**Figura 40.A.** y **40.B.**). Para estudiar más exhaustivamente el rango de sensibilidad de las líneas celulares, se aumentó el rango de concentraciones en aquellas nanopartículas que a 1 μ M habían conseguido disminuir la viabilidad celular al 40% o menos en alguna de las líneas.

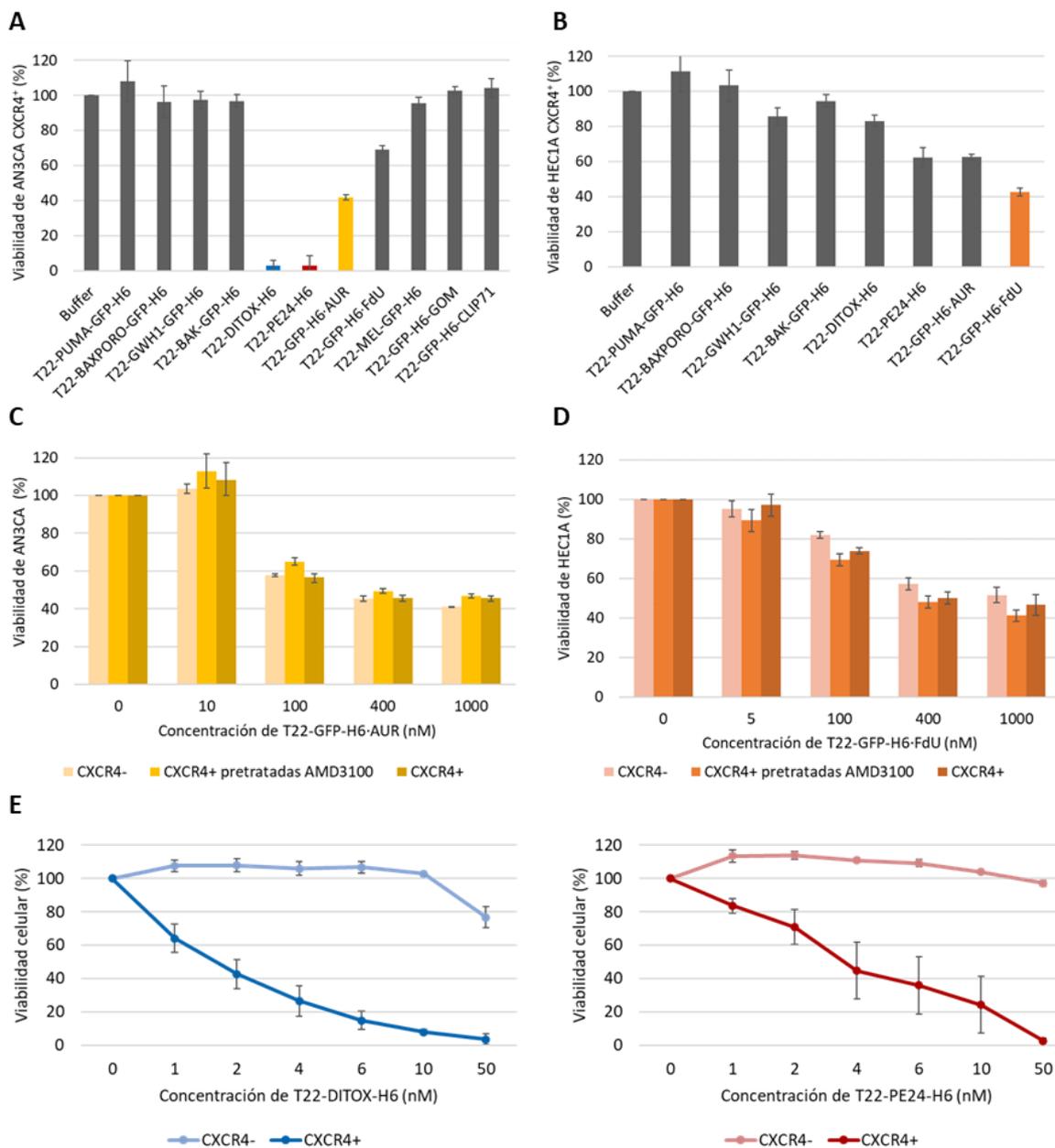
El nanoconjugado **T22-GFP-H6-AUR** disminuyó al 40% la viabilidad de las células AN3CA CXCR4⁺ (**Figura 40.A.**), mientras que la línea HEC1A CXCR4⁺ fue más sensible a **T22-GFP-H6-FdU**, disminuyendo su viabilidad también al 40% (**Figura 40.B.**). Para determinar si el efecto era dependiente de CXCR4, se evaluó la sensibilidad de las líneas sin expresión del receptor, y de las líneas positivas expuestas al antagonista AMD3100 de manera previa a su tratamiento con los nanoconjugados. En todos los casos la **viabilidad se mantuvo estable**, siendo del 40% a partir de la exposición a 400 nM, independientemente de la expresión o bloqueo de CXCR4 (**Figura 40.C.** y **40.D.**).

En contraposición con la falta de sensibilidad al tratamiento con los nanoconjugados, la viabilidad de la línea AN3CA CXCR4⁺ mostró una drástica caída tras su exposición a las nanopartículas derivadas de toxinas bacterianas, **T22-DITOX-H6** y **T22-PE24-H6**. Por este motivo, la citotoxicidad de estas dos nanotoxinas fue evaluada en un rango de concentraciones de 0 a 100 nM, en células de esta línea con y sin expresión de CXCR4. Las dos nanotoxinas

RESULTADOS

mostraron un **potente efecto dosis-dependiente** en la línea CXCR4⁺ a muy bajas concentraciones, siendo la IC₅₀ a 48 horas de 1,60 nM para T22-DITOX-H6 y de 2,25 nM para T22-PE24-H6 (**Figura 40.E.**), siendo inocuas para la línea sin expresión de CXCR4.

Por último, el ensayo de competición demostró que el **bloqueo de CXCR4** por su antagonista AMD3100 inhibía la actividad antitumoral de las dos nanotoxinas, previniendo la muerte celular y manteniendo la viabilidad de la línea celular cercana al 100%. (**Figura 40.F.**)



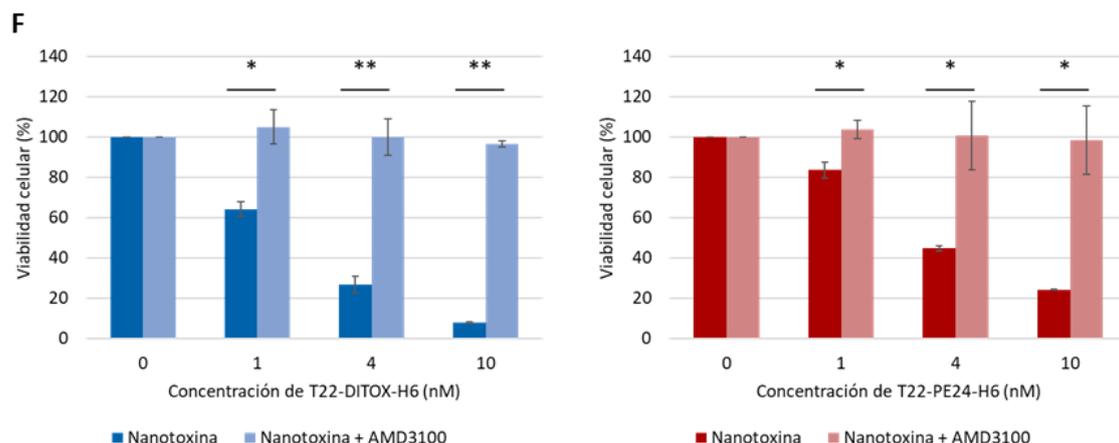


Figura 40. Evaluación del efecto citotóxico de distintas nanopartículas en líneas celulares de cáncer de endometrio, mediante ensayo XTT a las 48 horas. Cribaje de las nanopartículas descritas en el pie de cada panel a 1 μM en las líneas A. AN3CA CXCR4⁺ y B. HEC1A CXCR4⁺. C. Dependencia de CXCR4 en el efecto citotóxico de T22-GFP-H6·AUR por exposición de la línea AN3CA sin expresión de CXCR4, y con expresión de CXCR4 pretratada y sin pretratar con el antagonista AMD3100. D. Dependencia de CXCR4 del efecto citotóxico de T22-GFP-H6·FdU por exposición de la línea HEC1A sin expresión de CXCR4, y con expresión de CXCR4 pretratada y sin pretratar con el antagonista AMD3100. E. Efecto de las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 sobre la línea AN3CA con y sin expresión de CXCR4 expuesta a un rango de diferentes concentraciones. F. Bloqueo de la muerte celular inducida por T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 con y sin pretratamiento con el antagonista AMD3100 en la línea AN3CA CXCR4⁺. Todos los valores están expresados como media ± SEM; * p < 0,005; ** p = 0,001. Análisis estadístico: test de la U de Mann-Whitney.

En base a todos estos resultados, y por haber demostrado un **efecto citotóxico más potente** y estrictamente **dependiente** del receptor CXCR4 en la línea celular de CE AN3CA, en comparación con el resto de las nanopartículas proteicas y de los nanoconjugados evaluados *in vitro*, se seleccionaron las **nanotoxinas**, T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6, como las candidatas para su posterior **desarrollo preclínico**. La evaluación de su actividad antineoplásica se llevó a cabo en los modelos animales de CE CXCR4⁺ desarrollados previamente.

4. 3. Estudio del mecanismo de muerte celular inducida por las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6

Con el objetivo de estudiar el **mecanismo de inducción de muerte** T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6, se realizaron ensayos de **anexina V** mediante citometría de flujo, y tinción de pellets celulares con **DAPI** e **inmunocitoquímica**, empleando la línea AN3CA CXCR4⁺. En todos los casos, las células fueron expuestas a una concentración de **4 nM** de T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 durante diferentes tiempos (entre 2 y 48 horas), siendo comparadas con la exposición al mismo volumen de tampón control.

RESULTADOS

El **ensayo de anexina V** permite identificar las alteraciones de la membrana celular que tienen lugar durante el proceso de apoptosis, concretamente la traslocación de fosfatidilserina a la superficie celular, como se ha explicado en el apartado **2.4.c.** de *Material y métodos*. La viabilidad a 24 horas fue similar tras la exposición a ambas nanotoxinas, siendo de alrededor del 20% y manteniéndose a las 48 horas. Sin embargo, mientras que en las células expuestas a **T22-DITOX-H6** se observó un 34,2% de células en **apoptosis temprana** a las 6 horas, las que fueron expuestas a T22-PE24-H6 no mostraron marcaje temprano a ninguno de los tiempos estudiados (**Figura 41**).

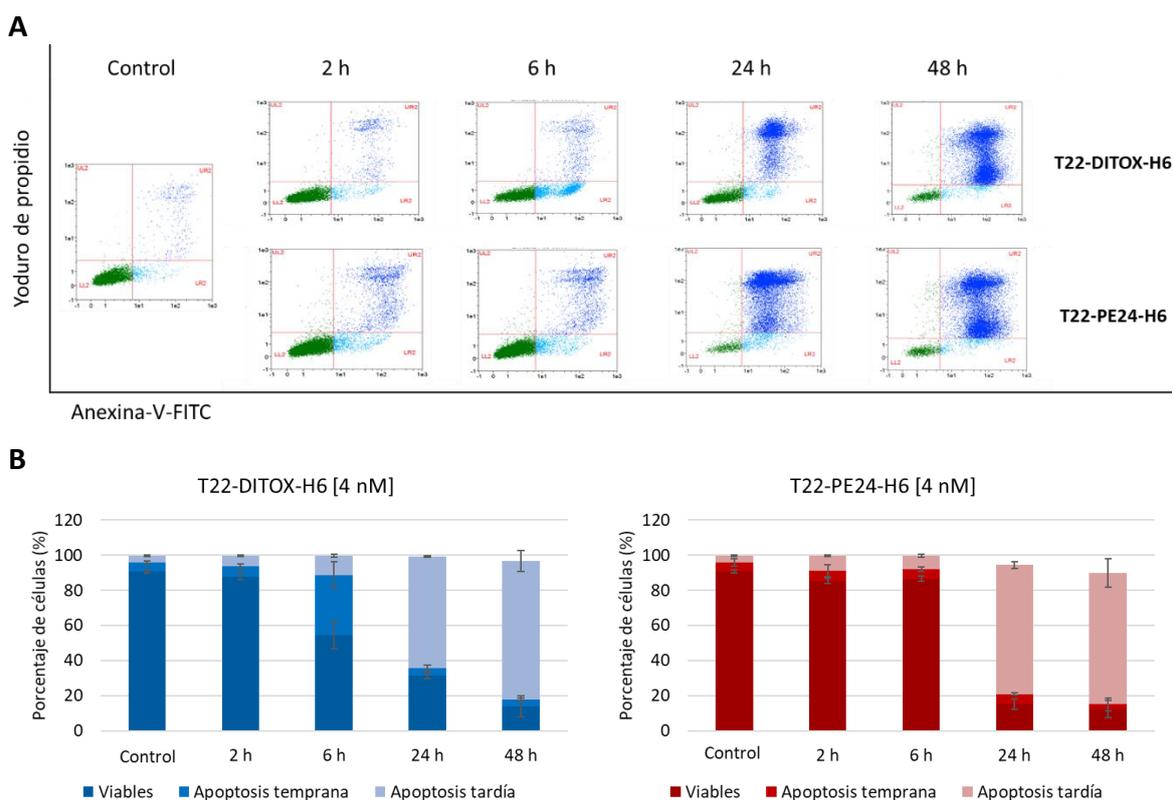


Figura 41. Estudio de la muerte celular inducida por las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 a 4 nM en células AN3CA CXCR4⁺. Evaluación por citometría de flujo del ensayo de Anexina-V, tras la exposición a 4 nM de cada nanotoxina, durante un rango de 2-48 horas. A. Gráficos de puntos representativos. B. Cuantificación de células viables, en apoptosis temprana o en apoptosis tardía; expresada como media \pm SEM.

Además de la exposición de la fosfatidilserina, otra de las características más importantes de la apoptosis es la **condensación del núcleo y la fragmentación del ADN**, dando lugar a la formación de cuerpos apoptóticos. Para detectar si se producía dicha condensación y fragmentación, se llevó a cabo una tinción fluorescente del núcleo con **DAPI** en pellets celulares, contabilizando el número de células apoptóticas con respecto al total de células presentes. Se observó que a las 12 horas de exposición a una u otra nanotoxina, más del 80% de las células mostraban condensación nuclear. A partir de las 24 horas y a las 48 horas,

prácticamente el 100% de las células se habían fragmentado para formar cuerpos apoptóticos (Figura 42).

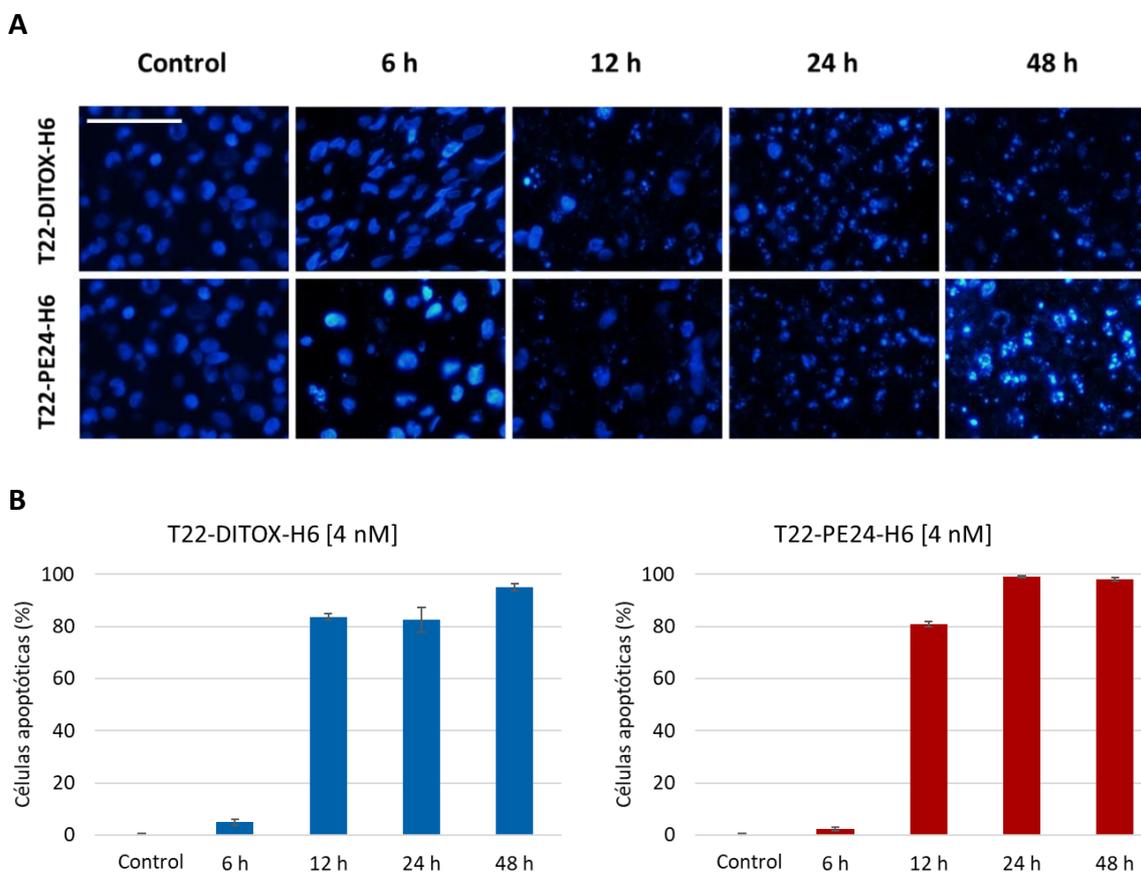
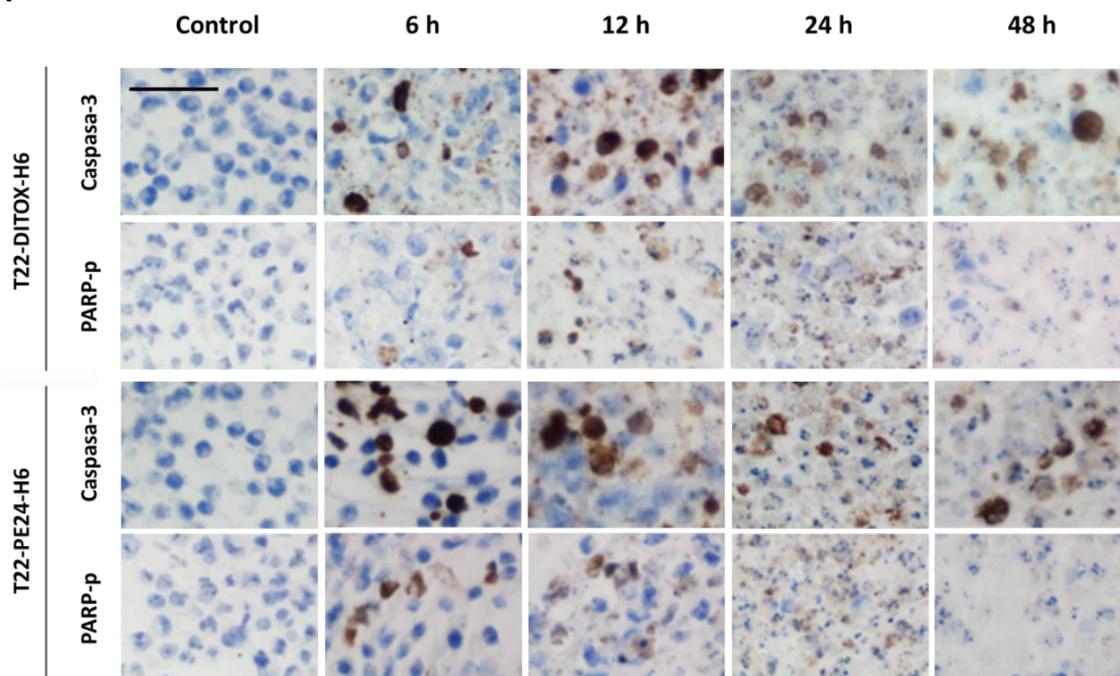


Figura 42. Evaluación de la inducción de la condensación de núcleos y cuerpos apoptóticos por las nanotoxinas en células AN3CA CXCR4⁺. Tras la exposición a 4 nM de T22-DITOX-H6 o T22-PE24-H6 en un rango de tiempo de 6-48 horas, se realizó una tinción de DAPI de los pellets celulares generados para determinar el porcentaje de células apoptóticas por campo microscópico. **A. Campos representativos** a los diferentes tiempos de exposición (barra: 50 μ m). **B. Cuantificación en porcentaje de células apoptóticas** con respecto a células totales por campo. Análisis de 5 campos de gran aumento (400x) por pellet; expresado en media \pm SEM

Por último, para estudiar a nivel molecular la vía de inducción de apoptosis, se evaluó, mediante **inmunocitoquímica**, la activación de **caspasa-3**, (una proteína efectora de apoptosis), y la proteólisis (e inactivación) de **PARP**, enzima de reparación del ADN, ambas proteínas asociadas con la ruta de señalización de este tipo de muerte celular en sus fases tempranas y tardías, respectivamente (Figura 43).

RESULTADOS

A



B

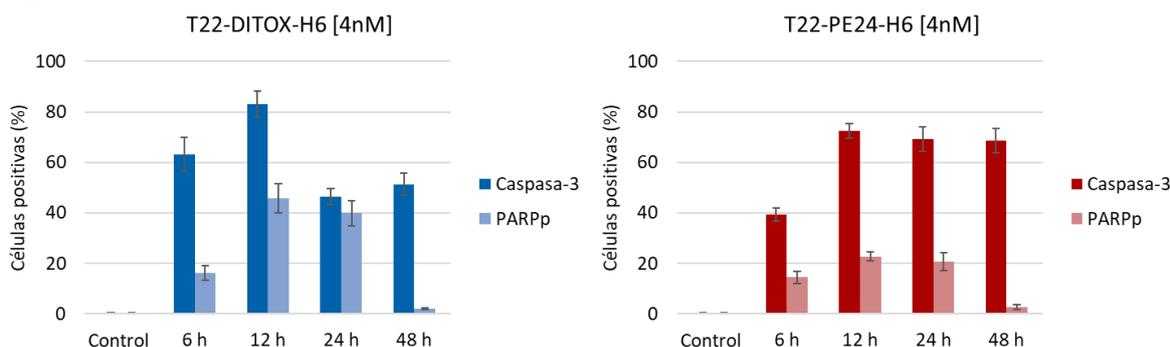


Figura 43. Estudio de la expresión de los marcadores de apoptosis caspasa-3 activada y PARP proteolizada. La evaluación se realizó mediante inmunohistoquímicas de pellets celulares de la línea AN3CA CXCR4⁺ tras su exposición a 4 nM de T22-DITOX-H6 o T22-PE24-H6 a un rango de tiempo de 6-48 h. **A. Campos representativos de caspasa -3 activada o de PARP proteolizada** para las distintas nanotoxinas a los diferentes tiempos de exposición (barra: 50 μ m). **B. Cuantificación del porcentaje de células positivas** para los marcadores estudiados en relación a las células totales identificadas por campo. Análisis de 5 campos de gran aumento (400x) por pellet, mediante el programa *QuPath*; expresado en media \pm SEM.

A las 6 horas de exposición a las nanotoxinas se observó un incremento en la expresión de **caspasa-3** activada de más del 60% en el caso de las células tratadas con T22-DITOX-H6, y del 40% en el caso de las expuestas a T22-PE24-H6. A las 12 horas, caspasa-3 activa marcaba alrededor del 80% de las células expuestas a cada una de las dos nanotoxinas. Por otra parte, el marcaje de **PARP proteolizada** en la línea AN3CA CXCR4⁺ se detectó a las 6 horas tras la exposición a las nanotoxinas, mostrando un pico en el porcentaje de células positivas a las 12

horas después de la exposición, especialmente prominente en la línea tratada con T22-DITOX-H6.

En su conjunto, los resultados obtenidos demuestran el potente efecto citotóxico *in vitro* de las nanopartículas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6, a través de la activación de la **vía apoptótica**, utilizando diferentes marcadores de este mecanismo de muerte y técnicas independientes.

RESULTADOS

5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y ANTIMETASTÁTICA DE LAS NANOTOXINAS BACTERIANAS DIRIGIDAS A CXCR4 EN MODELOS ANIMALES DE CE CXCR4⁺

Tras haber concluido que las nanotoxinas, T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6, eran las candidatas óptimas para su desarrollo preclínico, se procedió a evaluar su **actividad antineoplásica** en los **modelos animales** de CE CXCR4⁺ desarrollados previamente.

5. 1. Efecto antitumoral de las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 en el modelo xenógrafo de implantación subcutánea en la cepa *Swiss nude*

Dada la elevada citotoxicidad dependiente de CXCR4 que ejercen las nanopartículas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6, y una vez demostrada la captación selectiva por el tumor del nanotransportador T22-GFP-H6 en el modelo subcutáneo derivado de la línea AN3CA CXCR4⁺, se procedió a evaluar el posible **efecto antitumoral de las nanotoxinas** en el mismo modelo.

Cuando los tumores alcanzaban un volumen entre 30 y 70 mm³, los ratones eran aleatorizados en **tres grupos** y comenzaban a recibir 200 µl de tampón, solo (como **control**) o con **10 µg de T22-DITOX-H6 o T22-PE24-H6**, en un régimen de **dosificación repetida** administrado por inyección intravenosa, tres veces a la semana, hasta un máximo de **15 dosis**. En el momento en que los **tumores** alcanzaban un volumen de **900 mm³**, los ratones eran sacrificados. Aquellos animales cuyos tumores no habían llegado este volumen tras la administración intravenosa de las 15 dosis pautadas dejaron de recibir tratamiento y fueron sacrificados al llegar al punto final.

a. T22-DITOX-H6 disminuye la tasa de crecimiento tumoral en animales con tumores subcutáneos

Para evaluar la actividad antitumoral de las nanotoxinas en el modelo subcutáneo de CE, se calculó semanalmente la tasa de crecimiento del volumen tumoral. En la **semana 2** después del inicio del tratamiento se observó una **disminución de la tasa de crecimiento** del grupo tratado con T22-PE24-H6 con respecto al grupo control, con una tendencia muy próxima a la significación estadística ($p=0,055$). En el caso del grupo tratado con T22-DITOX-H6, la diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,005$), y para esta toxina también se mantuvo próxima a la significación ($p=0,051$) en la semana 3 (**Figura 44.A.**).

La tasa media de **crecimiento** de los tumores en animales tratados con una u otra nanotoxina se **estabilizó** a partir de la semana 3, y, en concreto, los animales tratados con T22-DITOX-H6

mantuvieron una tasa de crecimiento similar durante la semana posterior a la última dosis de tratamiento (semana 6).

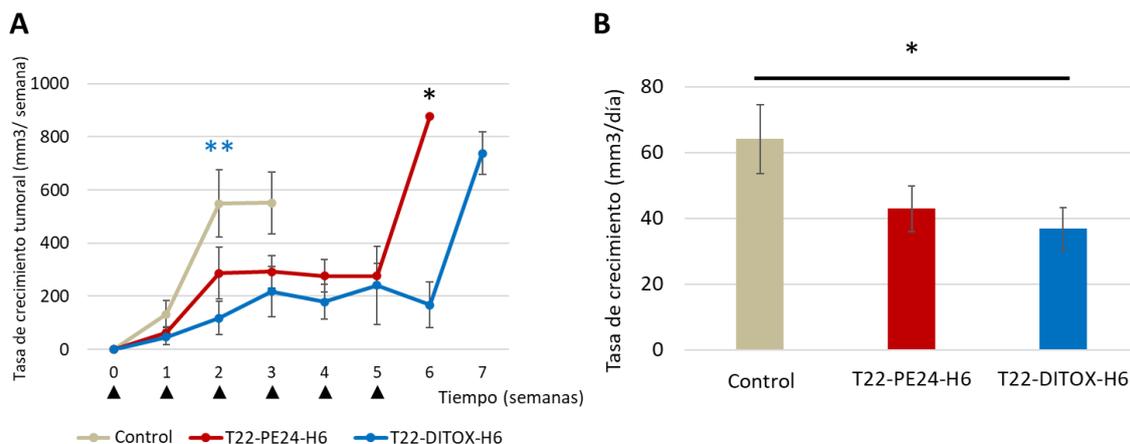


Figura 44. Análisis del crecimiento tumoral tras la administración de T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 en el modelo subcutáneo de CE derivado de AN3CA CXCR4⁺ en la cepa *Swiss nude*. La administración de dosis repetidas de cada nanotoxina a 10 µg por dosis, por un total de 15 dosis (6 semanas), redujo las tasas de crecimiento tumoral en los dos grupos. **A. Tasa de crecimiento tumoral semanal.** ** p=0,005; * p=0,034. **B. Tasa de crecimiento tumoral diaria total.** *p=0,038. Las flechas indican la administración del tratamiento. Número de animales por grupo comparado: N=8 para el grupo control, N=10 para cada grupo tratado con nanotoxina. Análisis estadístico: test t de Student. Los valores se expresan como media ± SEM.

Una vez sacrificados los animales, se calculó la **tasa de crecimiento tumoral diaria** a partir del tiempo de supervivencia. El grupo de animales tratados con **T22-DITOX-H6** mostró una **reducción** estadísticamente significativa (p=0,038) de la tasa de crecimiento tumoral diaria, mientras que en el caso del grupo tratado con **T22-PE24-H6** no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (**Figura 44.B.**).

b. T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 aumentan la supervivencia de los animales con tumores subcutáneos

La disminución de la tasa de crecimiento tumoral tuvo una repercusión sobre la **supervivencia** de los grupos tratados con las nanotoxinas.

En el análisis de la **supervivencia**, aplicando el test de Kaplan-Meier, se observó que los animales del grupo control vivieron una media de $17,5 \pm 1,44$ días tras el inicio del tratamiento. En cambio, los animales de los grupos tratados con las nanotoxinas tuvieron una supervivencia mayor. En concreto, los administrados con dosis repetidas de T22-PE24-H6 vivieron $25,7 \pm 2,94$ días y los del grupo tratado con T22-DITOX-H6 alcanzaron los $32,8 \pm 3,89$ días, contados desde el inicio del tratamiento (**Figura 45**). Al compararse con el grupo control

RESULTADOS

tratado con tampón, las diferencias estadísticas fueron **significativas** tanto para T22-PE24-H6 como para T22-DITOX-H6 ($p=0,017$ y $p=0,002$ respectivamente; test Log-Rank).

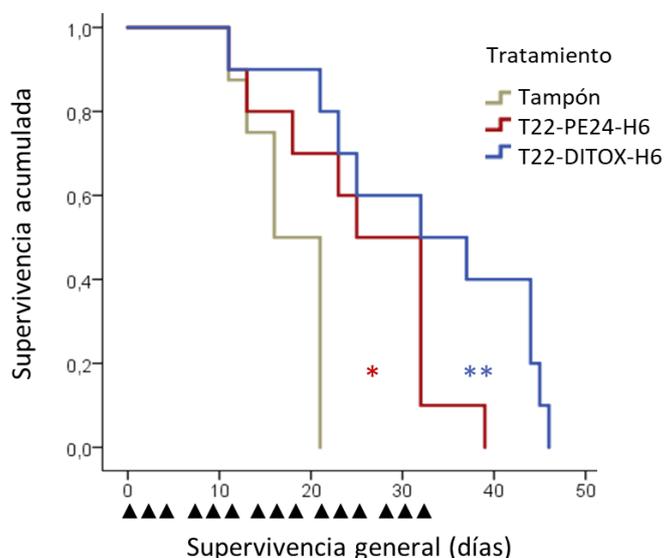


Figura 45. Efecto del tratamiento con T22-DITOX-H6 o T22-PE24-H6 sobre la supervivencia de los ratones portadores de tumores subcutáneos derivados de la línea AN3CA CXCR4⁺. Para este análisis, se administró un máximo de 15 dosis de 10 μ g de cada nanotoxina o tampón. Las flechas indican los días de administración de las nanopartículas. El análisis estadístico aplicado fue el test Log-rank. * $p=0,017$, ** $p=0,002$.

El tratamiento a dosis repetidas con las dos nanotoxinas, T22-DITOX-H6 o T22-PE24-H6, **redujo la tasa de crecimiento tumoral y aumentó la supervivencia** de los animales. Esta actividad antitumoral fue especialmente relevante tras la administración de T22-DITOX-H6, al alcanzar significación estadística tanto en la reducción de la tasa de crecimiento tumoral como en la prolongación del tiempo de supervivencia, que llegó a duplicar la supervivencia de los animales tratados con tampón.

c. Ausencia de toxicidad de las nanopartículas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 en órganos no tumorales

A las 48 horas después de la última administración del tratamiento con cada nanotoxina, los animales se sacrificaron. Los órganos principales de eliminación de toxinas y acumulación de fármacos, y las localizaciones en las que se había registrado previamente emisión de fluorescencia del nanotransportador (hígado, riñón, pulmón y bazo) fueron teñidos con hematoxilina-eosina para su análisis histológico. **Ninguna de las nanotoxinas alteró la histología** de ninguno de estos órganos al compararlos con el tejido de ratones control, ni se veían acumulaciones proteicas en ellos (**Figura 46**).

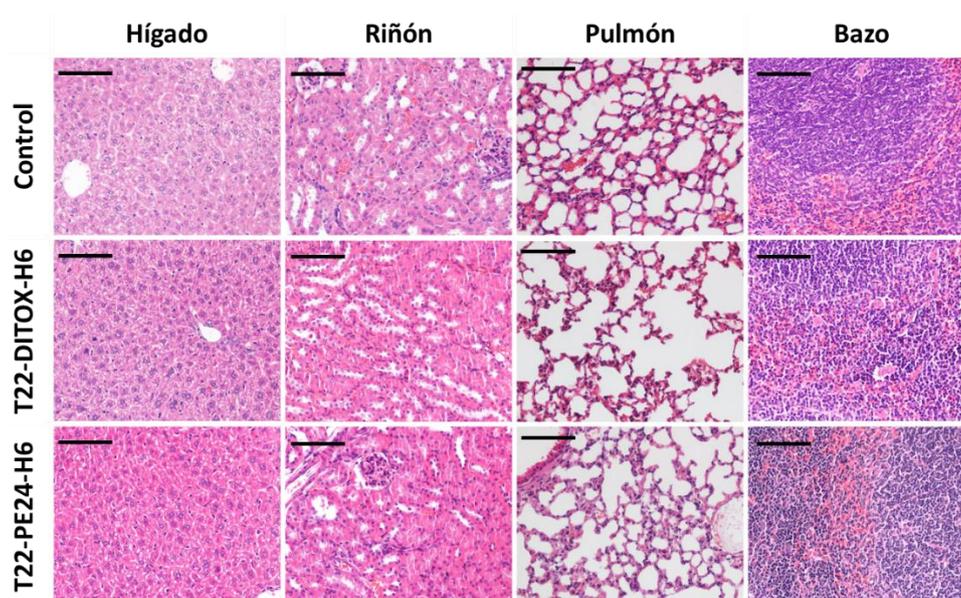


Figura 46. Evaluación de la toxicidad tras la administración de T22-DITOX-H6 o T22-PE24-H6 en el modelo xenógrafo subcutáneo AN3CA CXCR4⁺ generado en la cepa *Swiss nude*. Tras la administración de un máximo de 15 dosis de cada nanotoxina a 10 µg/dosis, no se observaron alteraciones histológicas ni acumulación de nanopartículas en los órganos no tumorales (riñón, hígado, pulmón y bazo), analizados 48 horas después de la última administración (tinción de hematoxilina-eosina; barra: 100 µm).

La **ausencia de toxicidad sistémica**, así como el **gran efecto de las nanotoxinas** sobre la reducción del crecimiento tumoral y la prolongación de la supervivencia de los ratones en el modelo xenógrafo subcutáneo confirma el elevado potencial terapéutico en CE CXCR4⁺ de ambas. Sin embargo, con la pauta de administración utilizada, el efecto de **T22-DITOX-H6** se **sostuvo durante más tiempo** una vez acabado el tratamiento. Debido a que llegó a doblar el tiempo de supervivencia de los animales control, esta fue la nanotoxina seleccionada para determinar su efecto **antimetastático** en el modelo de CE ortotópico previamente desarrollado.

5. 2. Estudio del mecanismo de muerte celular inducida por T22-DITOX-H6 o T22-PE24-H6 en el modelo xenógrafo subcutáneo

Con el objetivo de conocer si la inhibición del crecimiento tumoral tenía lugar, como se observó *in vitro*, por inducción de **apoptosis**, se estudió este mecanismo de muerte en el modelo subcutáneo CXCR4⁺ desarrollado. Para ello, cuando el volumen tumoral alcanzó 120-150 mm³, los ratones recibieron por vía intravenosa una dosis única dosis de 30 µg de T22-DITOX-H6 o 100 µg de T22-PE24-H6.

En resultados previos con otros tipos tumorales se describió la ausencia de toxicidad, que fue confirmada en este experimento al no observar alteraciones histológicas en los animales

RESULTADOS

tratados. A las 24 y 48 horas después de la administración, los tumores fueron extraídos, fijados y procesados. En cortes de 4 μm , se llevaron a cabo inmunohistoquímicas de caspasa-3 activa y PARP proteolizada, así como tinciones con DAPI. Este estudio determinó un **aumento del número de cuerpos apoptóticos por DAPI** y de la **expresión** de los marcadores **caspasa-3 activa** y **PARP proteolizada** por inmunohistoquímica (Figura 47).

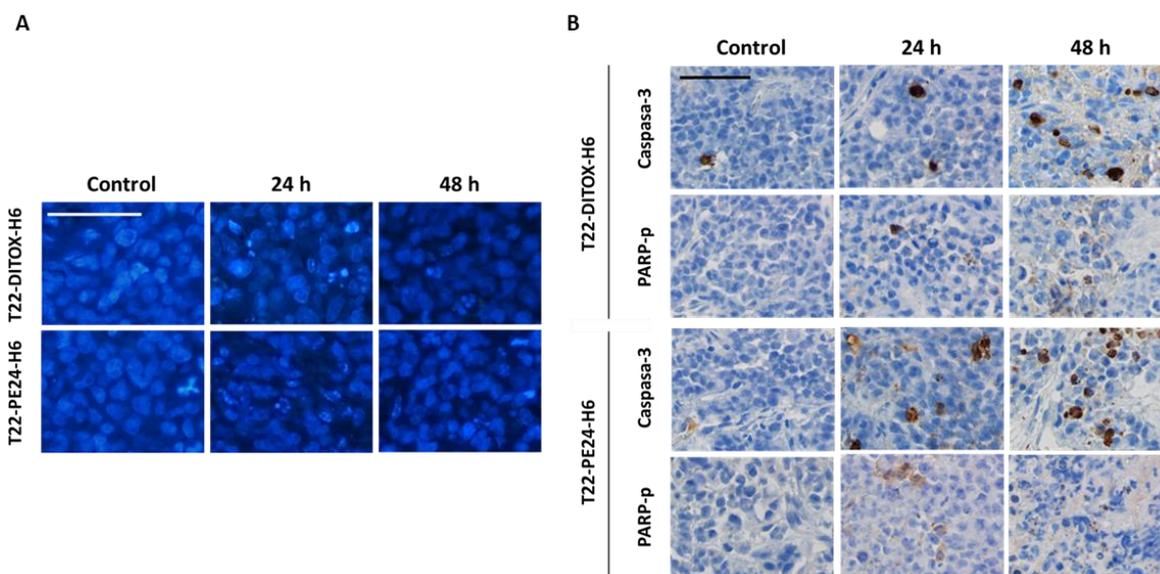


Figura 47. Apoptosis inducida por las nanotoxinas a dosis altas en tumores subcutáneos derivados de la línea de CE AN3CA CXCR4⁺. Para determinar el mecanismo de muerte celular inducido por las nanotoxinas se administró por vía intravenosa una única dosis (30 μg para T22-DITOX-H6 y 100 μg para T22-PE24-H6), sacrificando a los animales 24 o 48 horas después de la administración. En secciones de tumor, se observaron: **A. Formación de cuerpos apoptóticos** mediante tinción con DAPI. **B. Expresión de los marcadores de apoptosis caspasa-3 activada y PARP proteolizada** por inmunohistoquímica. Barra: 50 μm .

A través de este experimento se confirmó que el **mecanismo de muerte apoptótica** que se había observado *in vitro* tras la administración de las nanotoxinas también tenía lugar en el modelo *in vivo* subcutáneo derivado de la línea de CE AN3CA CXCR4⁺.

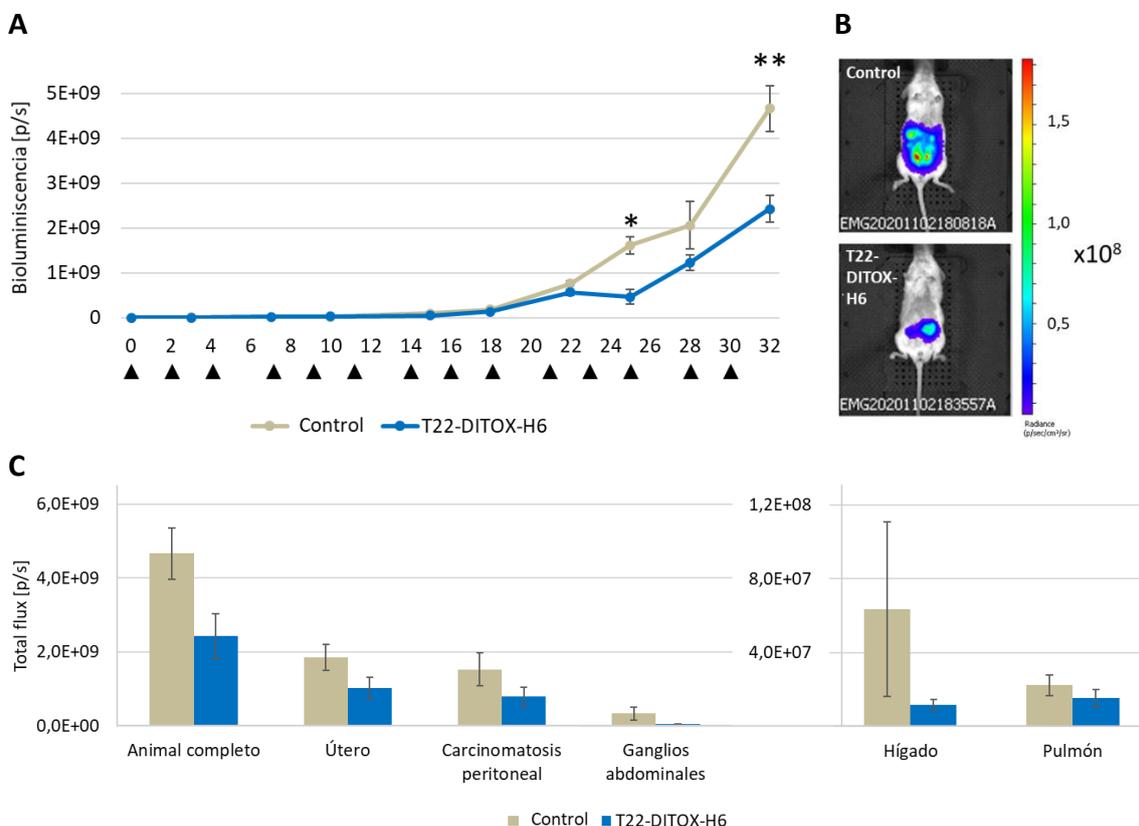
5. 3. Efecto antimetastático de T22-DITOX-H6 en el modelo murino de implantación ortotópica en la cepa NSG

Después de determinar que la nanotoxina **T22-DITOX-H6**, a dosis repetidas, inhibía con **mayor efectividad** y de manera significativa el crecimiento tumoral, prolongando al doble el tiempo de supervivencia de los ratones con respecto al grupo control, se decidió determinar su efecto antimetastático. Para ello, se analizó su capacidad de inhibir la diseminación celular y el desarrollo de focos metastáticos en los órganos diana del modelo ortotópico de CE avanzado previamente desarrollado y descrito en el subapartado **3.2.b**.

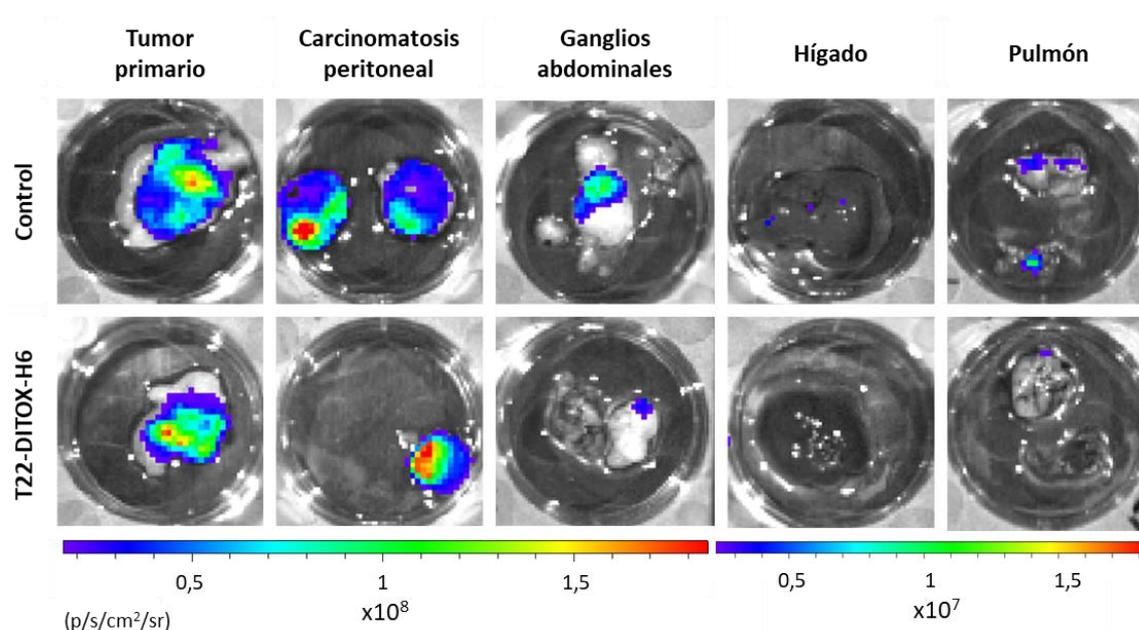
Para generar el modelo, se inyectaron un millón de células de la línea de CE AN3CA CXCR4⁺ en el útero de ratones de la cepa NSG. El **día 3 después de la implantación**, los animales fueron aleatorizados y comenzaron a recibir dosis de **5 µg** de la nanotoxina **T22-DITOX-H6**, o de su tampón (N=10), tres días a la semana. El tratamiento se mantuvo hasta que el primer animal cumplió los criterios de punto final, lo cual permitió la administración de **14 dosis**. Dos ratones, uno de cada grupo, que no desarrollaron tumor primario, fueron descartados del experimento.

A las 48 horas de la última dosis, un total de **10 ratones** mostraron **distensión abdominal** y prominente **carcinomatosis peritoneal**, de modo que todos los animales, tanto del grupo experimental como del grupo control, fueron sacrificados. De aquellos animales que cumplían los criterios de punto final, el **70%** pertenecían al grupo **control**, mientras que el 30% eran del grupo tratado con T22-DITOX-H6.

A lo largo de todo el experimento se llevó a cabo un registro de la bioluminiscencia total emitida en el animal completo. Se observaron diferencias significativas entre el grupo tratado y el control en los días 25 y 32 después del inicio de la administración del tratamiento (p=0,031 y p=0,007, respectivamente). La **disminución** observada en la intensidad de emisión de bioluminiscencia, de aproximadamente a la mitad, fue reflejo de la disminución de **la carga tumoral** en los animales tratados con T22-DITOX-H6 (Figura 48.A. y 48.B.).



RESULTADOS



Una vez sacrificados los ratones, se evaluó la señal de **bioluminiscencia** *ex vivo* en diferentes órganos afectados por el crecimiento tumoral, incluyendo el útero (tumor primario), la carcinomatosis peritoneal, los ganglios linfáticos abdominales, el hígado y el pulmón. Las diferencias entre el grupo tratado con T22-DITOX-H6 y el control no fueron significativas estadísticamente, a pesar de observarse una **tendencia** hacia una **menor emisión de bioluminiscencia** en el grupo tratado con T22-DITOX-H6, tanto en el tumor primario como en los órganos afectados por metástasis (Figura 48.C.).

Para determinar las posibles **diferencias** en la **diseminación** metastática entre ambos grupos, se utilizó el **marcaje con vimentina** humana de las células tumorales. Se empleó como método independiente, de mayor **fiabilidad** que la emisión de bioluminiscencia, tras el procesamiento histopatológico de los tejidos afectados, y permitió la cuantificación del **número** y del **área** de los **focos** de metástasis, tanto como células únicas como agrupadas en clústeres.

a. T22-DITOX-H6 disminuye el desarrollo de las carcinomatosis peritoneales.

Todos los animales, ya fueran los tratados con la nanotoxina o con tampón, desarrollaron **tumor primario e implantes peritoneales**, macroscópicos. Para evaluar si la nanotoxina T22-DITOX-H6 era capaz de inhibir el desarrollo de la carcinomatosis peritoneal, se registró el **número y peso** de cada foco tras la necropsia.

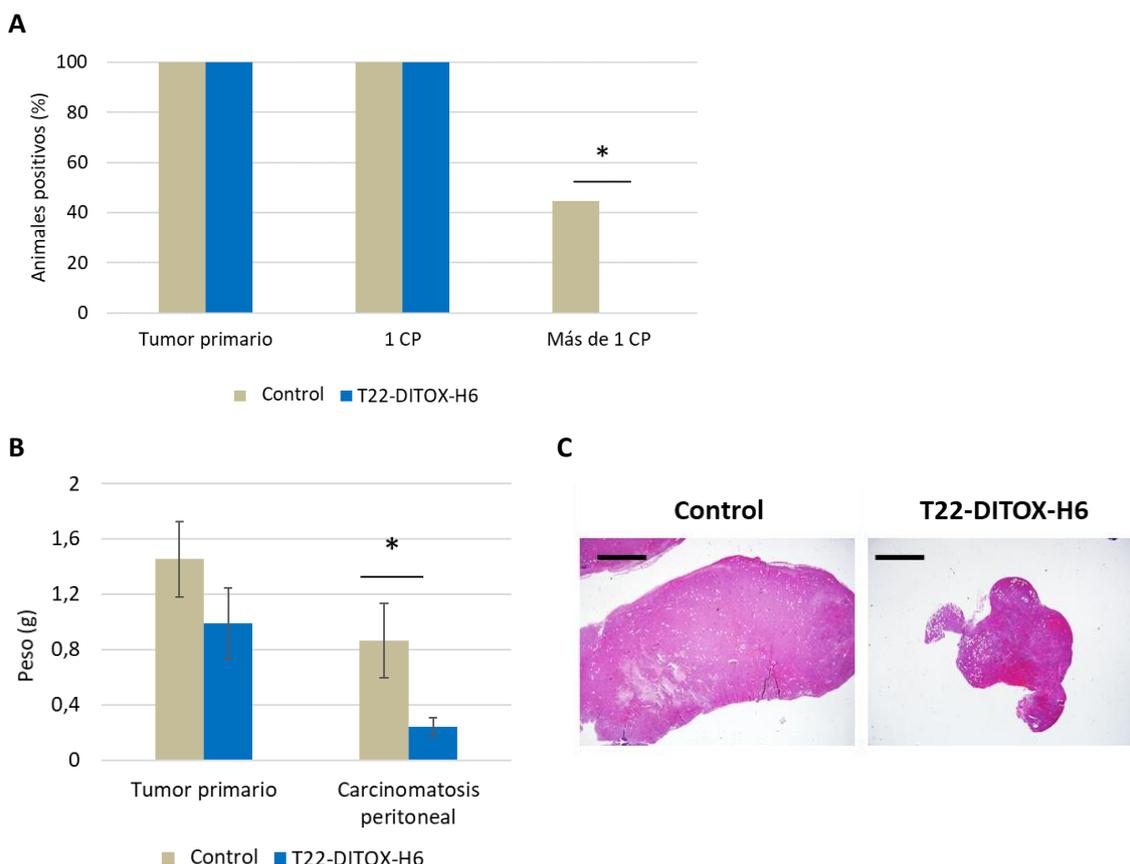


Figura 49. Inhibición de la carcinomatosis peritoneal tras la administración de T22-DITOX-H6 en el modelo xenógrafo de CE avanzado derivado de la línea AN3CA CXCR4⁺ en la cepa de ratón NSG. Tras la administración intravenosa de 14 dosis repetidas de la nanotoxina (5 µg), o de tampón (control), se determinaron los siguientes parámetros: **A. Porcentajes de animales con desarrollo de tumor primario y carcinomatosis peritoneales (CP)** por grupo. El análisis estadístico empleado fue el test de Fisher (*p=0,041). **B. Peso de tumor primario y carcinomatosis peritoneales.** Análisis estadístico mediante el test de la U de Mann-Whitney (*p=0,036). **C. Imágenes representativas del tamaño de las carcinomatosis peritoneales** en cada grupo, por tinción de hematoxilina-eosina (barra: 2 mm).

El grupo tratado con la nanotoxina T22-DITOX-H6 mostró una **reducción significativa del peso** de las **carcinomatosis peritoneales** (p=0,036), así como del **número** de implantes macroscópicos, ya que ninguno de los animales tratados mostró más de uno, a diferencia del 44% de los animales control (p=0,041) (**Figura 49**).

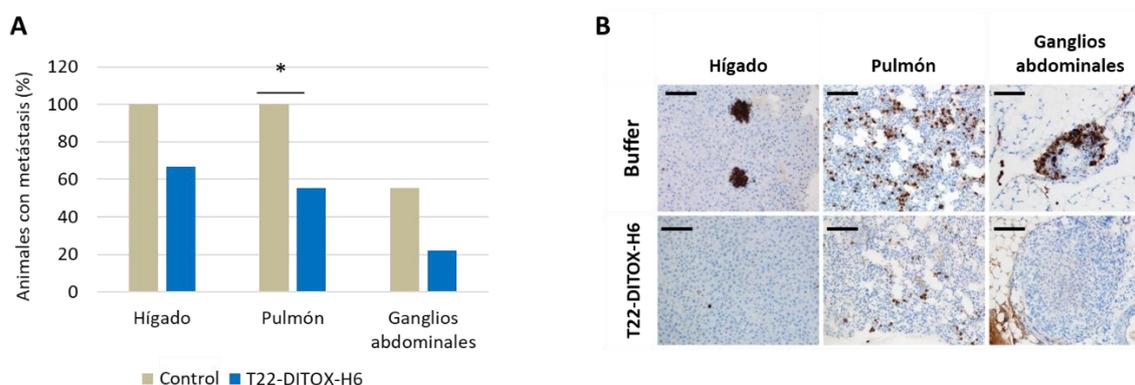
RESULTADOS

b. T22-DITOX-H6 previene el desarrollo de metástasis pulmonares y hepáticas

A continuación, se llevó a cabo la evaluación de la presencia de focos metastáticos, identificados por tinción inmunohistoquímica de vimentina, en **hígado, pulmón y ganglios linfáticos abdominales**. En este análisis se observó que el 100% de los animales del grupo control mostraron focos de metástasis en hígado y pulmón, mientras que el 33,3% de los animales tratados con T22-DITOX-H6 estaban libres de diseminación en estos órganos. La inhibición del desarrollo de metástasis llegó a tener significación estadística en su localización en pulmón ($p=0,041$) (**Figura 50.A.**).

En cuanto a las **metástasis linfáticas**, la afectación fue del 66,7% en los ratones control, mientras que en los ratones tratados con T22-DITOX-H6 este porcentaje se redujo hasta el 22,2%, si bien esta diferencia no alcanzó significación estadística. Por otra parte, el recuento del número de focos metastáticos en ganglios linfáticos no se pudo realizar debido a su presentación concurrente en contacto físico directo con los implantes peritoneales, mucho mayores en tamaño. Este hecho no permitió la evaluación suficientemente fiable de la afectación linfática.

Tras analizar el número y el área de los focos de metástasis observados en el **hígado**, que fueron identificados por su tinción de vimentina, en ambos parámetros se observaron diferencias significativas entre grupos, de modo que T22-DITOX-H6 indujo una **potente inhibición del desarrollo de metástasis hepáticas** en este modelo (**Figura 50.C.**). De modo similar, la nanotoxina también indujo un **potente bloqueo del desarrollo de metástasis pulmonares**, reduciéndose significativamente el **área del pulmón ocupada** por células metastáticas, positivas para vimentina (**Figura 50.D.**)



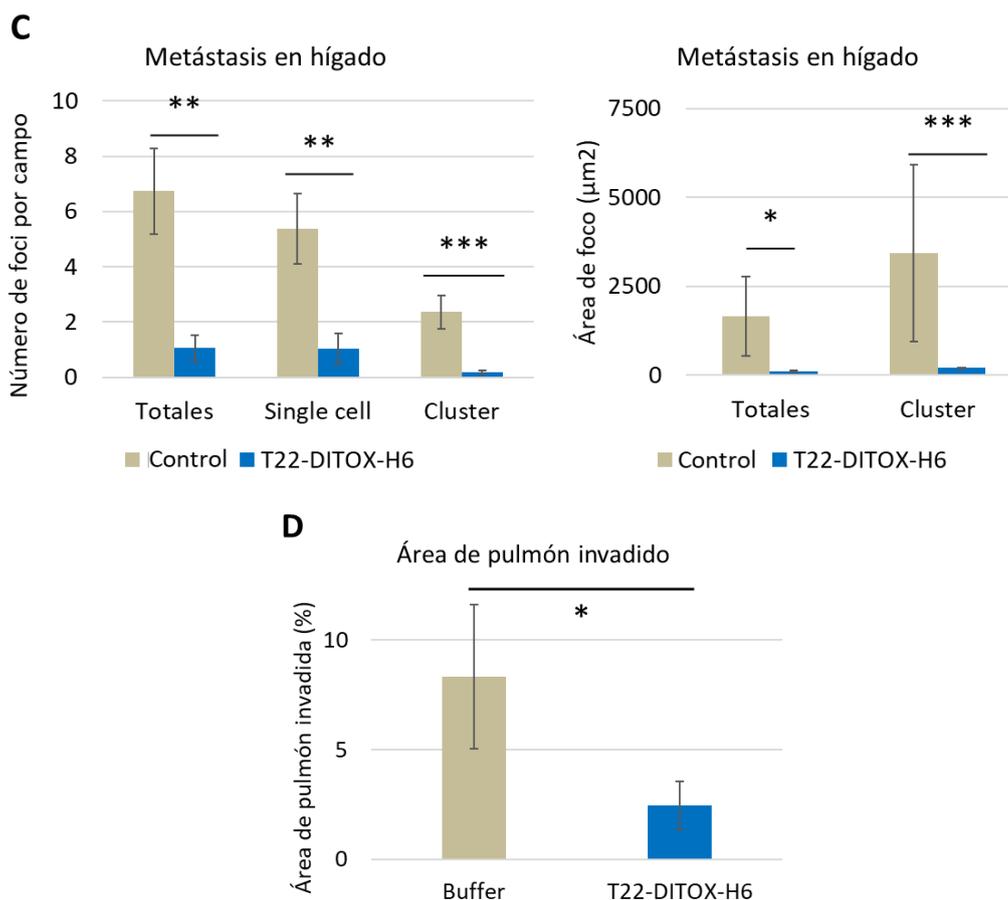


Figura 50. Evaluación del efecto antimetastático de la administración de T22-DITOX-H6 en el modelo xenógrafo de CE avanzado derivado de la línea AN3CA CXCR4⁺ en la cepa de ratón NSG. Tras la administración intravenosa de 14 dosis repetidas de la nanotoxina (5 µg), o de tampón (control), se evaluó la presencia de metástasis en hígado, pulmón y ganglios linfáticos abdominales. **A. Porcentajes de animales con metástasis en hígado, pulmón y ganglios abdominales.** El análisis estadístico aplicado fue el test de Fisher (* p=0,041). **B. Imágenes representativas de la presencia de células tumorales** en hígado, pulmón y ganglios abdominales por tinción inmunohistoquímica de vimentina humana (barra: 100 µm). **C. Número de metástasis** (U de Mann-Whitney; ** p≤0,005; *** p=0,000) **y área de foco en hígado** (*p=0,023; *** p=0,001). **D. Área de tejido pulmonar ocupado** por células tumorales metastáticas (U de Mann-Whitney; * p=0,038).

Con respecto a las **metástasis hepáticas**, observamos una reducción del porcentaje de animales positivos desde el 100% en el grupo control, hasta el 66,7% de los ratones tratados con T22-DITOX-H6, y una reducción significativa de 5 veces en número y de 10 veces en el tamaño de los focos metastáticos en el hígado. Por otra parte, se **redujo** significativamente el **número** de metástasis hepáticas desarrolladas en el grupo tratado con la nanotoxina, en comparación con el grupo control, tanto de aquellas identificadas como células únicas, como de aquellas agregadas en clústeres (p=0,000). Además, el **tamaño** de las metástasis hepáticas en clústeres, era significativamente menor en el grupo T22-DITOX-H6 respecto al grupo control.

RESULTADOS

Tabla 8. Evaluación del efecto antimetastático de T22-DITOX-H6 en el modelo ortotópico derivado de la línea AN3CA CXCR4⁺ en la cepa NSG. A. Efecto sobre el desarrollo de tumor, carcinomatosis peritoneales y metástasis (número de ratones y porcentaje). B. Efecto sobre el número y área de metástasis hepáticas y pulmonares.

A

	Tumor primario	Carcinomatosis peritoneal		Ganglios abdominales	Hígado	Pulmón
		Al menos una	Más de una			
Control	9/9 (100%)	9/9 (100%)	4/9 (44%)*	6/9 (66,7%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)*
T22-DITOX-H6	9/9 (100%)	9/9 (100%)	0*	2/9 (22,2%)	6/9 (66,7%)	5/9 (55,5%)*

B

	Hígado					Pulmón
	Foci totales		Foci de célula única	Foci de células en clústers		Porcentaje de tejido invadido
	Número	Área	Número	Número	Área	
Control	6,73 ± 1,54 ^a	1665,75 ± 1117,36 ^b	5,38 ± 1,27 ^c	2,36 ± 0,61 ^d	3424,54 ± 2487,89 ^e	8,34 ± 3,28 ^f
T22-DITOX-H6	1,05 ± 0,48 ^a	114,89 ± 21,50 ^b	1,03 ± 0,55 ^c	0,19 ± 0,07 ^d	199,56 ± 11,78 ^e	1,06 ± 1,09 ^f

Los resultados se reportan como media ± SEM por ratón y campo microscópico de medio aumento (200x, 10 campos) en secciones de hígado o pulmón, tras su tinción inmunohistoquímica con vimentina; N=9. * p=0,041; análisis estadístico: test de Fisher. ^a p=0,002; ^b p= 0,023; ^c p= 0,005; ^d p= 0,000; ^e p= 0,001; ^f p= 0,038; análisis estadístico: test de la U de Mann-Whitney.

También observamos que el porcentaje de ratones afectados por **metástasis pulmonares** se redujo del 100% al 55,5% tras el tratamiento con T22-DITOX-H6, **disminuyendo** de forma significativa el **área** del pulmón **ocupada** por las células diseminadas, del 8,3% en ratones tratados con tampón hasta el 1,1% en los tratados con la nanotoxina T22-DITOX-H6 (p=0,038).

En base a estos resultados se demostró que la administración repetida de 5 µg de T22-DITOX-H6 ejerce un **potente y significativo efecto antimetastático**, inhibiendo el desarrollo de las **metástasis hepáticas y pulmonares (Tabla 8)**, y reduciendo el desarrollo de metástasis **ganglionares**, a pesar de no alcanzarse diferencias significativas en esta localización.

c. Ausencia de toxicidad de T22-DITOX-H6 en órganos no tumorales

Por último, se evaluó si las dosis repetidas de T22-DITOX-H6 administradas para evaluar su actividad antimetastática en el modelo de CE ortotópico producía toxicidad sobre el tejido sano. Para ello, se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina sobre secciones de los órganos habituales de eliminación y acumulación de fármacos (hígado, riñón, pulmón y bazo). Tras su análisis histológico, **no se observó ninguna alteración histopatológica** en los animales tratados (**Figura 51**), que habían recibido un total de 14 dosis de 5 µg de esta nanotoxina, esto es, una dosis total acumulada de 70 µg.

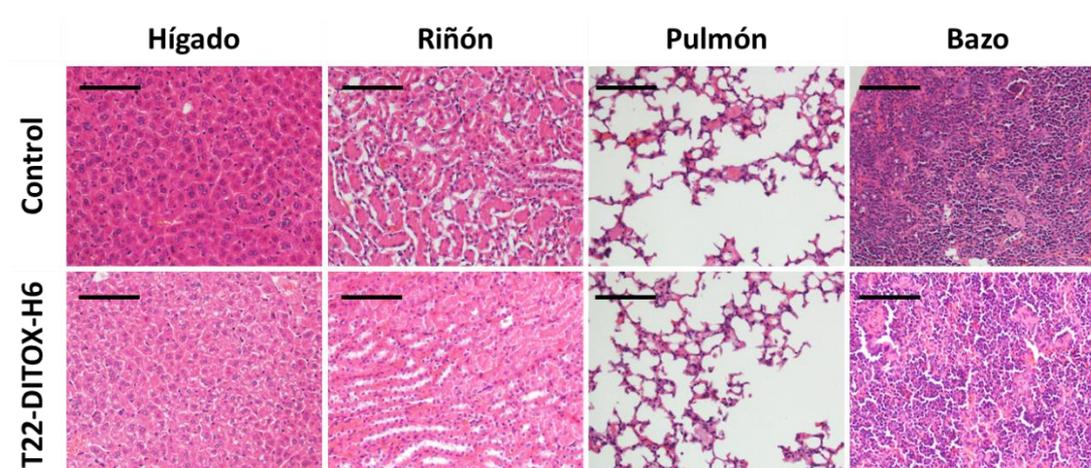


Figura 51. Evaluación de la toxicidad tras la administración de T22-DITOX-H6 en el modelo xenógrafo de CE avanzado derivado de la línea AN3CA CXCR4⁺ en la cepa de ratón NSG. Tras la administración intravenosa de 14 dosis repetidas de la nanotoxina (5 µg), o de tampón (control), no se observaron alteraciones histológicas ni acumulación de nanopartículas en los órganos no tumorales (riñón, hígado, pulmón y bazo) (tinción de hematoxilina-eosina; barra: 100 µm).

En conjunto, los resultados obtenidos en el modelo ortotópico de CE CXCR4⁺ indican que el tratamiento con dosis repetidas de la nanotoxina **T22-DITOX-H6** induce un **potente efecto antimetastático, sin toxicidad** sobre tejidos no tumorales. Este tratamiento reduce significativamente el tamaño de las **metástasis peritoneales**, a la vez que disminuye de manera significativa el número y tamaño de los focos **metastáticos hepáticos**. Además, en los ratones tratados con esta nanotoxina observamos una reducción significativa en el porcentaje de ratones afectados por **metástasis pulmonares**, a la par que una reducción del área del pulmón ocupada por las metástasis. En definitiva, **T22-DITOX-H6** inhibió potentemente el desarrollo de metástasis peritoneales, hepáticas y pulmonares, en ausencia de toxicidad sistémica en tejidos sanos, lo que se traduce en un **alto índice terapéutico** para esta nanotoxina.

V. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Las pacientes con **CE en estadios avanzados** carecen, a día de hoy, de una terapia adecuada, lo que redundaría en una **corta supervivencia**. En esta tesis abordamos esta **urgente necesidad clínica** mediante el desarrollo de una **nueva estrategia terapéutica** basada en la nanomedicina para el tratamiento del CE metastático con sobreexpresión del receptor de membrana **CXCR4**.

Primeramente, hemos estudiado el porcentaje de **pacientes** afectadas con CE que sobreexpresan **CXCR4** con patrón de **membrana**, para conocer el posible impacto de la traslación clínica de esta nueva aproximación terapéutica. Seguidamente, hemos generado un **nuevo modelo murino de CE avanzado** que sobreexpresa este receptor en la membrana de las células tumorales, y que presenta una elevada diseminación metastática. Este modelo *in vivo* se ha utilizado para la evaluación del efecto antimetastático de la nueva terapia que proponemos.

A continuación, evaluamos la citotoxicidad de diferentes **nanopartículas proteicas** unidas a diferentes agentes terapéuticos (fármacos de síntesis química o polipéptidos citotóxicos). Estas nanopartículas están **dirigidas** a células tumorales que sobreexpresan **CXCR4**, para inducir su **internalización** dependiente del receptor, liberando en el interior celular el agente terapéutico y consiguiendo la **eliminación selectiva** de las células diana. En modelos animales, las nanopartículas **biodistribuyen** al tejido tumoral y consiguen una **actividad antineoplásica sin toxicidad sistémica** asociada, lo que favorece en gran medida la posible **traslación clínica** de este nuevo tratamiento para el CE avanzado.

En este apartado, exponemos la base racional que sustenta las **mejoras introducidas** para la terapia que proponemos con nanopartículas dirigidas a CXCR4, a través de la elección del receptor diana, del uso de nanotecnología para aumentar la selectividad en la entrega del agente antitumoral que transporta, y de su singular mecanismo de acción antineoplásica, en comparación con las terapias actuales. Esperamos que este nuevo abordaje terapéutico mejore la baja tasa de respuesta observada con el tratamiento convencional en pacientes con CE, así como los escasos avances alcanzados por otros fármacos en desarrollo preclínico o clínico.

1. PREVALENCIA DE LA EXPRESIÓN DE CXCR4 EN CÁNCER DE ENDOMETRIO

Para conocer el posible impacto de la traslación clínica de esta nueva aproximación terapéutica a pacientes afectadas con CE, hemos trabajado con una serie de 106 biopsias pertenecientes a 79 pacientes con CE, en *tissue microarrays*, evaluando la **expresión proteica** del receptor **CXCR4** por inmunohistoquímica. Más del **90% de las muestras** de tumores fueron positivas para este receptor y, en su mayoría, presentaban un patrón de expresión **membranal**, mientras que el tejido endometrial sano fue negativo. No obstante, **no encontramos una correlación**, en esta cohorte, entre el nivel de expresión de CXCR4 y los parámetros de evolución clínica. Por otro lado, analizamos la posible correlación entre la expresión de CXCR4, a nivel de **ARNm**, en una cohorte de 529 pacientes de CE, obtenidas de la base de datos de TCGA, con parámetros de clasificación y estadiaje, y la evolución clínica de las pacientes, y tampoco encontramos asociación estadística entre niveles de ARNm de CXCR4 y parámetros clinicopatológicos. En base a la determinación previa de la capacidad pronóstica de CXCR4 en otros tipos tumorales^{148,242-244}, esperábamos que su expresión correlacionara con la evolución clínica de los pacientes.

El receptor de quimiocinas **CXCR4** está implicado en procesos de **proliferación y migración celular**, y **sobreexpresado** en muchos tipos tumorales, por lo que anticipábamos que CXCR4 podía representar una diana terapéutica en CE, como ya ha sido establecido en múltiples neoplasias sólidas y hematológicas^{245,246}. En varias de ellas, CXCR4 es un marcador de CSCs por su papel crucial en el mantenimiento de esta población celular, encargada de la renovación tumoral y de la diseminación metastática^{151,152}. En tumores de **endometrio**, la sobreexpresión de CXCR4 tanto a nivel de ARN como de proteína²⁴⁷ sugiere su implicación en la **carcinogénesis** y la **invasión** tumoral¹⁵⁷, demostrada *in vitro*¹⁵³ e *in vivo* en modelos subcutáneos¹⁵⁸. Además, en CE se ha identificado la coexpresión de CXCR4 junto con CD133 en células *stem-like*, con capacidad de generar tumores subcutáneos, siendo identificado de esta manera como **marcador de probables CSCs** en este tipo tumoral¹³⁶. En este sentido, la **ruta de señalización** en la que participa, juntamente con su ligando, CXCL12, ha sido definida como **crucial en la progresión** del CE¹⁵⁴, y a su vez se ha asociado con resistencia a quimio e inmunoterapia²⁴⁸ y una mayor agresividad en carcinomas endometrioides¹⁵⁵. Sin embargo, a pesar de que la bibliografía apoya la implicación de CXCR4 en estos procesos de tumorigénesis y progresión tumoral en CE, en ninguna de nuestras dos cohortes de pacientes observamos **correlación** entre la expresión de este receptor y las **variables de mal pronóstico y evolución clínica**.

El CE es una enfermedad clínicamente muy **heterogénea**, y los diferentes comportamientos clínicos están determinados, en parte, por la **expresión hormonal**. En concreto, los estrógenos participan en la regulación de CXCR4, al inducir la expresión de CXCL12. Creemos que tanto la heterogeneidad clínica del CE como la carga hormonal del útero añaden dificultad al estudio del **papel pronóstico de CXCR4** en esta neoplasia, evidenciando que su papel en ella sigue siendo controvertido a día de hoy. Con respecto al número de pacientes de nuestras cohortes, consideramos que podrían ser insuficientes. En el caso de las muestras de *tissue microarrays*, también existe una limitación en cuanto a la caracterización de los subtipos moleculares a los que pertenecen las muestras. Estas biopsias fueron recogidas entre 2004 y 2010, y en la mayoría de ellas no se realizaron análisis exhaustivos de los marcadores inmunohistoquímicos p53, MSH-6 y PMS-2, ni de las mutaciones somáticas de POLE, ya que las aproximaciones para la clasificación molecular de CE son posteriores^{60,249,250}.

Con respecto a la falta de asociación obtenida entre los cuatro subtipos moleculares clásicos y la expresión de CXCR4 en la cohorte obtenida de TCGA, nuestras observaciones redundan en la **actual falta de consenso** en cuanto al papel de CXCR4 como posible marcador de agresividad en CE humano. Los estudios previos en los que se discute este papel contaban a su vez con un número de muestras limitado (rango entre 41 y 166) y una caracterización molecular insuficiente¹⁶⁰. Cabe destacar que el **tipo de muestra** de la cohorte de TCGA estudiada, con ARNm extraído del tejido, puede incluir **infiltrado inmune**, que podría sesgar los niveles registrados de CXCR4, el cual también se expresa, aunque con menor intensidad, en células del sistema inmune. En este sentido, en una reciente publicación se han identificado **cuatro subtipos inmunes de CE** con valor pronóstico, a través de la determinación del fenotipo del infiltrado inmune en el tumor. Estos subtipos inmunes son independientes de los cuatro subtipos moleculares clásicos²⁵¹, motivo por el cual consideramos necesario estudiar la relación de CXCR4 con cada uno de ellos. Creemos que es posible que **CXCR4 ejerza distintas funciones** en CE, según su subtipo inmune y/o al subtipo molecular, considerando ambas clasificaciones. En cualquier caso, creemos que la clasificación inmune del CE podría complementar su caracterización molecular, añadiendo aún más valor pronóstico a la misma.

En este sentido, recientemente se ha propuesto añadir un **quinto subtipo** a la clasificación **molecular**, fruto de la falta de caracterización molecular lo suficientemente exhaustiva, ya que incluye cualquier combinación de los marcadores propios de los otros cuatro subtipos²⁵². De esta manera, la **caracterización molecular** está adquiriendo cada vez mayor peso en la **elección del tratamiento** que reciben las pacientes^{252,253}, así como en el desarrollo de nuevos agentes

DISCUSIÓN

terapéuticos basados en características histológicas y **biomarcadores** tumorales. Estos marcadores pueden ser criterios para la elección de la terapia personalizada a aplicar y para ser usados como **predictores de la respuesta** al tratamiento^{254,255}.

En resumen, consideramos que la demostración de la capacidad pronóstica del ligando del receptor CXCR4, CXCL12, en CE¹⁵⁴ sugiere la necesidad de ampliar el estudio de la **posible relación** entre la expresión de **CXCR4** y la **progresión** de la enfermedad en series más extensas de CE. Creemos que es posible que el eslabón necesario para establecer esta relación se encuentre en la **nueva clasificación inmune** del CE, la cual tiene en cuenta el infiltrado inmune y, por tanto, el **microambiente tumoral**. La caracterización de este microambiente en los distintos tumores, incluido el de endometrio²⁵⁶, está cobrando cada vez mayor importancia, ya que **interactúa** con las células cancerosas, mediante hormonas, citoquinas y quimiocinas que se unen a los receptores localizados en las membranas celulares (como es el caso de CXCL12 a través de CXCR4) y en el citosol (en el caso de los receptores hormonales), siendo fundamental en los procesos de supervivencia y progresión tumoral²⁵⁷.

Por último, la **sobreexpresión** con un patrón predominantemente **membranal** de **CXCR4** en CE valida este receptor como **diana** para el tratamiento de esta neoplasia, y para la **entrega selectiva de fármacos**. Las **nanopartículas dirigidas** a CXCR4 que proponemos en esta tesis son multivalentes en cuanto a los ligandos T22 que exponen en la superficie de las nanopartículas, y por ello interactúan con múltiples receptores, a través de los cuales internalizan. De esta manera, la sobreexpresión de CXCR4 en el tejido tumoral con respecto al tejido endometrial normal permite la **captación selectiva** de nuestras nanopartículas por las **células tumorales diana**, sin inferir daño a órganos sanos, consiguiendo la liberación del agente terapéutico en el citosol e induciendo un efecto antineoplásico en CE.

2. DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO DE CE AVANZADO CXCR4⁺ CON ELEVADA DISEMINACIÓN METASTÁTICA

Para evaluar el potencial antitumoral y antimetastático de las nuevas nanopartículas terapéuticas dirigidas a células tumorales CXCR4⁺ desarrolladas por nuestro grupo ha sido **necesario generar modelos** con sobreexpresión de CXCR4 que imitaran las características del CE en estadios avanzados.

Con este propósito, elegimos la **línea celular de CE AN3CA** para la generación de los modelos de CE en ratón. Se trata de una línea derivada de una metástasis linfática de una paciente con CE endometriode avanzado, para la que se han reportado alteraciones de la vía de PI3K/AKT, elevada **inestabilidad de microsatélites, mutaciones** en p53 y deleciones en PTEN. También se ha descrito su **resistencia a cisplatino y paclitaxel**^{136,258}, replicando una característica altamente relevante de los tumores avanzados y recurrentes, observada en clínica²¹⁵. Sin embargo, al contrario de lo observado en una amplia mayoría de tumores procedentes de pacientes de CE, AN3CA no sobreexpresaba *in vitro* el receptor CXCR4. Es conocido que este receptor tiende a internalizar cuando se establece como línea celular, al ser cultivado ***in vitro***, de manera que el porcentaje de células que expresan **CXCR4 decrece** con pases sucesivos^{259,260}. Esta observación puede estar relacionada con los altos niveles de oxígeno presentes en el ambiente en el que se cultivan, y con la diferencia en disponibilidad de nutrientes del medio de cultivo, así como los estímulos químicos a los que están expuestas, o su ausencia, en comparación con el microambiente tumoral *in vivo*^{215,261}. La transducción lentiviral que realizamos indujo la **sobreexpresión de CXCR4** de manera constitutiva en las células, presentando niveles similares a lo que observamos en las inmunohistoquímicas de las biopsias de pacientes. Por otra parte, el plásmido introducido contenía **luciferasa**, lo que ha permitido el **seguimiento** del crecimiento tumoral y de la diseminación metastática *in vivo*.

Una vez generado el clon AN3CA CXCR4⁺, fue utilizado para desarrollar, en primer lugar, un **modelo subcutáneo** estable para la expresión de CXCR4, consiguiendo una alta tasa de injerto tumoral y un perfil altamente proliferativo y mesenquimal. Este modelo permitió evaluar la **biodistribución** del nanotransportador T22-GFP-H6 y determinar el posible **efecto antitumoral** de las nanopartículas terapéuticas derivadas, así como la **toxicidad asociada** a la administración de ambos. En la actualidad, a pesar de ser escasamente predictores de eficacia clínica, los modelos subcutáneos son los más empleados para el desarrollo regulatorio de fármacos. Sin embargo, en estos modelos no es posible evaluar el efecto de los fármacos sobre la

DISCUSIÓN

diseminación metastática, un elemento esencial para el desarrollo riguroso de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas al tratamiento de neoplasias en estadios avanzados ²¹⁵.

En base a esta limitación, generamos también un **modelo ortotópico** de CE que obtuvo una **diseminación metastática en el 100%** de los animales implantados, afectando los órganos habituales de metástasis observados en pacientes con CE en estadios avanzados. Para su desarrollo, empleamos ratones de la **cepa inmunodeprimida NSG** y una nueva estrategia para la implantación celular, que consistió en la **ligadura** de la base del cuerno uterino, y la posterior **inoculación transmiometrial** de las células de CE. Una vez inyectadas, y confinadas en el lumen, las células tumorales adquieren **capacidad de invasión** del endometrio y miometrio, llegando hasta la capa serosa del útero, mostrando una histología de **tumor sólido indiferenciado de alto grado y elevada agresividad**, con pérdida de la arquitectura tisular del útero, replicando así la progresión de la enfermedad en las pacientes.

A tiempo final, el 100% de los animales habían desarrollado focos metastáticos en todas las localizaciones habituales de CE avanzado o recurrente, incluyendo ovarios, ganglios linfáticos, peritoneo, hígado y pulmón, siendo un modelo representativo del CE en su estadio más avanzado. La expresión en **membrana de CXCR4**, de alta intensidad, se mantuvo *in vivo* en las células tumorales, con un patrón muy similar al identificado en las muestras de pacientes, y se asoció con un **aumento** del número y área de los foci en las **metástasis de hígado y pulmón**.

Los **modelos xenógrafos en ratón descritos** hasta ahora presentan **limitaciones** importantes que implican la necesidad de desarrollar modelos más representativos de la progresión de los tumores humanos a **estadios avanzados** ²¹⁵. En este sentido, la mayoría de los **modelos** descritos como **metastáticos** no remedan lo suficiente las características clinicopatológicas de los tumores más agresivos debido a **baja tasa de diseminación** o incluso **carencia de desarrollo de metástasis** distales (menor al 50% de los animales inoculados) ²⁶²⁻²⁶⁹, o a la presencia de una **alta variabilidad** interindividual. Estas observaciones limitan su uso en la evaluación de la actividad antimetastática de nuevas terapias, que se ve dificultado por la **elevada dispersión** en los parámetros analizados (como el número o tamaño de metástasis), que **reduce su poder estadístico**, una característica necesaria para poder determinar si existen o no diferencias entre los grupos experimentales tratados y los controles. En algunos casos, a pesar de llegar a desarrollar metástasis, solo se consigue la implantación del tumor primario en un porcentaje reducido de los ratones ²⁷⁰, o bien son **modelos heterotópicos**, donde el **punto de implantación** de las células tumorales **no es el interior del útero**, sino su exterior ^{263,271}, el peritoneo ^{265,272}, bajo la cápsula renal ²⁶⁴ o, incluso, directamente los órganos de metástasis distales ²⁷³. Estos

últimos modelos pierden valor al **no imitar el microambiente** tumoral original ni mimetizar las vías moleculares o celulares de diseminación metastática.

Por último, si bien es cierto que para poder estudiar la posible inmunogenicidad de las aproximaciones terapéuticas basadas en proteínas se requiere su evaluación en animales **inmunocompetentes** (ya sean **modelos transgénicos**, los obtenidos por **inducción química** o los **humanizados**)²¹⁵, estos modelos están **limitados** en cuanto al desarrollo de metástasis distales, ya que la activación de las células del sistema inmune previene su desarrollo. Por tanto, es necesario, a día de hoy, elegir un modelo apropiado para cada tipo de estudio. Para el conocer la actividad antimetastática de nuevas terapias es necesario utilizar cepas de animales inmunodeprimidos, mientras que para el estudio de su efecto antitumoral y la inmunogenicidad de los fármacos sería apropiado utilizar modelos inmunocompetentes.

En base a lo descrito, el **modelo desarrollado** en esta tesis mejora todos los disponibles actualmente en cuanto a su tasa de implantación y metástasis y su homogeneidad y reproducibilidad. Es un modelo **fácil de generar** y monitorizable mediante **bioluminiscencia**; siendo **representativo** del CE avanzado y capaz de replicar las distintas fases de desarrollo de la enfermedad que conducen al establecimiento de metástasis. Por otro lado, este modelo imita con mayor exactitud las características clinicopatológicas de la enfermedad, como son la **sobreexpresión del receptor CXCR4**, presente en la mayoría de las pacientes, y su elevada tasa de implantación y **diseminación metastática** a tiempo final, siendo del 100% en todas las localizaciones habituales de metástasis. Su uso asegura, por tanto, tener **gran poder estadístico** en relación al estudio de la actividad antimetastática de nuevos tratamientos, que constituye el principal objetivo de este trabajo.

Este nuevo modelo puede ser utilizado también para el **estudio** de los **factores** implicados en la **invasión** miometrial o linfovascular, o la eficacia de **otros nuevos tratamientos** antineoplásicos. En el caso de terapias dirigidas a CXCR4, como la de esta tesis, la expresión de este receptor en los modelos *in vivo* puede otorgar capacidad predictiva de respuesta a fármacos, si se determina que únicamente responden aquellos tumores que sobreexpresan este receptor.

DISCUSIÓN

3. DEMOSTRACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DEL NANOTRANSPORTADOR PROTEICO DIRIGIDO A CÉLULAS DE CE CXCR4⁺ *IN VITRO* E *IN VIVO*

Para obtener un agente terapéutico capaz de competir con los fármacos actualmente en desarrollo clínico, optamos por **desarrollar nanopartículas proteicas terapéuticas**, derivadas del nanotransportador T22-GFP-H6. Al igual que demostramos anteriormente en líneas celulares y en modelos animales de cáncer colorrectal y de neoplasias hematológicas (leucemia mieloide aguda o linfoma difuso de células grande) ^{196,197,206}, en CE observamos que T22-GFP-H6 tiene la capacidad de **internalizar** de manera **dependiente de CXCR4** y no presenta **citotoxicidad *in vitro*** en las líneas celulares AN3CA CXCR4⁺ y HEC1A CXCR4⁺. La internalización más efectiva se observó en la línea AN3CA, probablemente debido a su expresión en membrana más intensa de CXCR4, que explica el menor efecto citotóxico de las nanopartículas terapéuticas sobre la línea HEC1A.

Por otra parte, el desarrollo de un **modelo subcutáneo** de CE, derivado de la línea celular AN3CA, con elevada sobreexpresión del receptor CXCR4 en la membrana de las células tumorales, permitió el estudio de la **biodistribución** de este nanotransportador en tejido tumoral, demostrando una acumulación en tumor de **más del 60%** de la dosis de nanopartícula administrada por vía intravenosa, y en **ausencia de acumulación** en tejidos no tumorales y **de toxicidad** asociada. Estos resultados indicaron que los fármacos o dominios terapéuticos incorporados a este nanotransportador serían captados de igual manera por el tejido tumoral, cumpliéndose el requisito esencial de la entrega selectiva de fármacos en el tumor, que se persigue en este trabajo.

4. ELECCIÓN DE LAS NANOTOXINAS BACTERIANAS DIRIGIDAS A CÉLULAS TUMORALES CXCR4⁺ COMO TRATAMIENTO PARA CE AVANZADO

Una vez validada la selectividad de la internalización de T22-GFP-H6 en células de CE CXCR4⁺ en cultivo y en un modelo tumoral de CE, fue necesario identificar, de entre las **nanopartículas terapéuticas** disponibles, aquellas que mostraran **mayor potencia antitumoral** a menores concentraciones, mediante un cribaje de todas ellas. En este sentido, se establecieron como requisitos esenciales para su selección que tanto su internalización como la inducción de muerte celular fueran **estrictamente dependientes** del receptor **CXCR4**, ya que solo así nuestra nueva aproximación terapéutica podría mejorar de manera significativa el tratamiento actual del CE.

Las mejor posicionadas según estos criterios serían las candidatas seleccionadas para evaluar su efecto antitumoral en el modelo subcutáneo CE CXCR4⁺, y su efecto antimetastático en el modelo ortotópico de CE avanzado, ambos generados en este trabajo a partir de la línea AN3CA transducida para la sobreexpresión de CXCR4.

Cribado de nanoconjugados y nanopartículas polipeptídicas *in vitro* y selección de las candidatas a evaluar *in vivo*

Las **nuevas nanomedicinas** evaluadas incluían los nanoconjugados T22-GFP-H6-AUR y T22-GFP-H6-FdU, las nanopartículas polipeptídicas proapoptóticas, antimicrobianas, derivadas de venenos animales y aquellas que incorporan toxinas bacterianas como T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6, descritas en el apartado **6.3.** de la Introducción.

La **idoneidad** para su elección incluía la necesidad de alcanzar un efecto antitumoral **potente *in vitro***, en el rango nanomolar bajo, y su estricta **dependencia** del receptor **CXCR4** para su actividad antitumoral. De este modo, después de ser evaluadas, las nanopartículas polipeptídicas **proapoptóticas, antimicrobianas** y las derivadas de **venenos** animales fueron **descartadas**, ya que ninguna de ellas logró disminuir la viabilidad de las células CXCR4⁺, incluso a altas concentraciones.

Por su parte, **los nanoconjugados** T22-GFP-H6-AUR y T22-GFP-H6-FdU, **internalizaban** de manera **dependiente** de CXCR4 en las líneas celulares de CE, AN3CA y HEC1A, pero no mantuvieron la dependencia del receptor en cuanto a su capacidad **citotóxica**; es decir, la exposición previa de las células al antagonista de CXCR4 **AMD3100** **no revertía** su efecto. Esta observación las descartó como candidatas idóneas para pasar a fases de experimentación animal.

DISCUSIÓN

Además, **ninguna de las líneas** evaluadas fue lo suficientemente **sensible** a ninguno de estos dos nanoconjugados, ya que mantenían la **viabilidad** en alrededor del **40%** a partir de su exposición a altas concentraciones, coincidiendo con resultados previamente publicados por otros grupos.

Otros autores han reportado resultados similares tras la evaluación *in vitro* del potencial terapéutico en CE de **ADC** conjugados con **auristatina** y dirigidos al receptor RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End products*). Aunque demostraron efecto citotóxico en la línea HEC1A, éstos no fueron completos en cuanto a reducción de viabilidad celular, de modo que a las 96 horas de la exposición se mantuvo viable una población de aproximadamente el 30%, incluso a concentraciones de 100 μM , 50 veces superiores a las empleadas en esta tesis²⁷⁴. Por otro lado, otro grupo ha descrito que el 40% de la población de la línea AN3CA mantiene su viabilidad tras su exposición a paclitaxel, que, de forma similar a la auristatina, actúa inhibiendo la polimerización de los microtúbulos²⁷⁵. En cuanto a la **floxuridina**, si bien es cierto que el 5-fluorouracilo, emparentado químicamente con la floxuridina, se ha empleado como terapia de tercera línea en CE, en monoterapia o en combinación con otros agentes, apenas se utiliza en la actualidad²⁷⁶, por lo que se podría inferir que el CE es menos sensible a 5-fluorouracilo que a la combinación habitual carboplatino/paclitaxel.

Por último, en contraposición a la falta de sensibilidad de las líneas de CE a los nanoconjugados y a las demás nanopartículas polipeptídicas terapéuticas evaluadas, las nanopartículas derivadas de toxinas bacterianas, **las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6**, sí que indujeron un **potente efecto** (en el rango nanomolar bajo, IC_{50} de 1,6 y 2,5 nM, respectivamente) sobre la viabilidad de las células CXCR4^+ derivadas de la línea AN3CA. Además, este efecto fue **revertido** hasta alcanzar el 100% de viabilidad celular, cuando se realizó una incubación previa a la exposición a las nanotoxina con el antagonista AMD3100. Por todos estos motivos, se eligieron las nanotoxinas, de entre todas las candidatas evaluadas, para su posterior **estudio de actividad antineoplásica** en modelos animales de CE derivados de la línea AN3CA CXCR4^+ .

Demostración del efecto antitumoral e identificación del mecanismo de acción citotóxica de las nanotoxinas seleccionadas, T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6

La caracterización funcional de las dos nanotoxinas seleccionadas incluyó la determinación de su potencia antitumoral, su dependencia de CXCR4 , y la identificación del tipo de muerte celular inducida *in vitro* en la línea celular AN3CA CXCR4^+ . La posible capacidad de ambas nanotoxinas para inducir **apoptosis** se evaluó mediante ensayos de anexina V para conocer la pérdida de **simetría de la membrana** celular, por tinción de pellets celulares con DAPI para evaluar la

condensación de núcleos, fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos, y por la determinación de la expresión de los **marcadores de apoptosis** caspasa-3 activada y de PARP proteolizada por tinción inmunocitoquímica en pellets celulares.

Por otra parte, se caracterizó su actividad antitumoral y mecanismo de acción *in vivo*. De este modo, la administración intravenosa de dosis repetidas para cada una de la nanotoxinas demostró un **gran efecto antineoplásico** a través de la disminución de la tasa de crecimiento tumoral en el modelo de ratón subcutáneo derivado de la línea AN3CA CXCR4⁺. Posteriormente, en este modelo, se confirmó la activación de la **apoptosis** en el tejido tumoral, mediante la determinación de la expresión de los marcadores caspasa-3 activa y PARP proteolizada. Como consecuencia de su actividad antitumoral a dosis repetidas, tanto T22-DITOX-H6 como T22-PE24-H6 **augmentaron** de forma significativa la **supervivencia** de los ratones, respecto a los animales tratados con tampón, y en **ausencia de acumulación** en tejidos normales y **toxicidad** asociada en ratones, lo que estableció un gran margen terapéutico para ambas nanotoxinas.

Para el estudio de actividad **antimetastática**, se eligió el tratamiento con **T22-DITOX-H6**, ya que demostró alcanzar una mayor **reducción en la tasa de crecimiento tumoral** y mayor prolongación del tiempo de supervivencia de los ratones, en comparación con T22-PE24-H6, que también mostró un potente efecto antitumoral pero ligeramente menor.

Efecto antimetastático de la nanotoxina T22-DITOX-H6 en un modelo ortotópico de CE avanzado CXCR4⁺

Con objeto de desarrollar una opción terapéutica capaz de competir con los tratamientos actuales o de aquellos que se encuentran en desarrollo clínico para el CE en estadio avanzado, era necesario que la nanotoxina T22-DITOX-H6, seleccionada por su mayor actividad antitumoral, demostrara una elevada potencia también en cuanto a su capacidad de inhibición de la diseminación metastática en un **modelo ortotópico de CE avanzado**. Para ello, se evaluó la actividad antimetastática de esta nanotoxina administrada a dosis repetidas en el modelo de CE avanzado AN3CA CXCR4⁺ generado en la cepa inmunodeprimida NSG.

La nanotoxina demostró, en este modelo, un **potente efecto** sobre el crecimiento del **tumor primario** y una **reducción** significativa del 50% en el tamaño de las **metástasis peritoneales**. Por otra parte, el porcentaje de ratones afectados por **metástasis en ganglios linfáticos** se redujo del 66,7% al 22,2% tras el tratamiento, a pesar de no llegar a ser significativo. No obstante, no fue posible determinar su efecto sobre el tamaño de las metástasis linfáticas, ya que coexistían en contacto físico directo con las metástasis peritoneales, de mucho mayor tamaño. Además,

DISCUSIÓN

observamos una reducción del porcentaje de los animales con presencia de **metástasis en hígado**, desde el 100% al 66,7% de los ratones tratados con T22-DITOX-H6, y una reducción significativa de 5 veces en número y de 10 veces en el tamaño de los focos metastáticos hepáticos. También el porcentaje de ratones afectados por **metástasis en pulmón** se redujo del 100% al 55,5% tras tratamiento con T22-DITOX-H6, reduciendo a su vez significativamente el área del pulmón ocupada por las metástasis, que bajó desde el 8,3% en ratones tratados con tampón hasta el 1,1% en los tratados con la nanotoxina.

En definitiva, T22-DITOX-H6 **inhibió potentemente el desarrollo** de implantes peritoneales, reduciendo su número y tamaño. A su vez, la nanotoxina disminuyó significativamente el número y el tamaño de los focos metastáticos hepáticos. Por otra parte, redujo también, y de modo significativo, el porcentaje de ratones afectados por metástasis pulmonares y el área de tejido ocupado por ellas. Esta considerable actividad antineoplásica sobre diferentes localizaciones con relevancia clínica se consiguió en **ausencia de toxicidad sistémica**, lo que confiere a esta nanotoxina un **elevado índice terapéutico** en el tratamiento de CE avanzado. En consonancia con los resultados de actividad citotóxica selectiva sobre células de CE CXCR4⁺ obtenidos *in vitro* y con la actividad antitumoral demostrada en el modelo subcutáneo, determinando un aumento de la supervivencia de los ratones, es altamente probable que la inhibición del desarrollo de metástasis ocurra a través de la eliminación de células CXCR4⁺, con capacidad migratoria o proliferativa en los órganos colonizados, posiblemente CSCs, como se ha demostrado para las células tumorales CXCR4⁺ en otros tipos tumorales²⁷⁷.

Para concluir, este nuevo abordaje terapéutico para el CE avanzado, basado en una **nanopartícula proteica** que incorpora la exotoxina de *C. diphtheriae*, consigue una **actividad antineoplásica** de gran potencia, tanto a nivel del tumor primario (actividad antitumoral) como de las metástasis (actividad antimetastática) en todas las localizaciones estudiadas. Además, la **ausencia de toxicidad** sistémica asociada en los distintos modelos xenógrafos utilizados puede facilitar, en gran medida, su posible traslación clínica.

Esperamos que este **nuevo abordaje terapéutico** mejore la baja tasa de respuesta del CE avanzado obtenida tanto por el tratamiento convencional como por los nuevos fármacos en desarrollo preclínico y clínico, a la par que disminuya los efectos secundarios asociados a estas terapias.

5. COMPARACIÓN DE LA TERAPIA DIRIGIDA A CÉLULAS TUMORALES CXCR4⁺ MEDIANTE LA NANOTOXINA T22-DITOX-H6, CON LOS FÁRMACOS EN DESARROLLO CLÍNICO PARA EL TRATAMIENTO DE CE AVANZADO

A continuación, desglosamos las razones por las que consideramos que nuestro abordaje terapéutico, concretado en este trabajo en la nanotoxina T22-DITOX-H6, supone una alternativa relevante respecto a las terapias utilizadas en clínica, o aquellas en desarrollo en ensayos clínicos. Nuestra aproximación no solo **mejora la entrega del fármaco** mediante un direccionamiento activo a las células neoplásicas CXCR4⁺, que la hace altamente selectiva, sino que también es **novedosa** en cuanto a su naturaleza **proteica**, su **biocompatibilidad**, su elevada **recirculación** en el torrente sanguíneo y su singular **mecanismo** de inducción de muerte en las células diana.

T22-DITOX-H6 incrementa el margen terapéutico respecto a la terapia clásica o en desarrollo

La nanopartícula T22-DITOX-H6, cuya actividad antitumoral y antimetastática ha sido evaluada durante el desarrollo de esta tesis, puede suponer un salto cualitativo importante en la mejora de la supervivencia y la calidad de vida de las pacientes con CE en estadios avanzados. Dado su mal pronóstico, el enfoque del **tratamiento** de las pacientes con CE que presentan diseminación distal (ya sea en el momento del diagnóstico, tras la progresión o en la recurrencia) es, **a día de hoy**, más **paliativo** que curativo. Como se ha descrito con mayor detalle en el apartado **4.2.** de la Introducción, el régimen de **quimioterapia** habitual, que combina carboplatino y paclitaxel, conlleva una **elevada toxicidad asociada** ²⁷⁸. En el caso de la **terapia hormonal**, a la que solo son candidatas las pacientes positivas en receptores de estrógenos, tiene una toxicidad menor, aunque el porcentaje de mujeres que responden es muy bajo, lo que indica que la expresión de receptores hormonales no es un marcador predictivo del efecto del tratamiento ^{107,112}. Cuando las pacientes son positivas para **HER2**, se recomienda el tratamiento con **trastuzumab**, aunque este receptor se encuentra presente en **menos del 6%** de las pacientes con CE de alto riesgo ²⁷⁹. Con respecto a los tratamientos de segunda y tercera línea, y los que están siendo evaluados en ensayos clínicos, como son los inhibidores del *checkpoint* inmunológico, inhibidores de angiogénesis e inhibidores de mTOR, tienen una **tasa de respuesta baja**, de entre el 30-50%, y hasta el 70% de las pacientes sufren efectos adversos severos o letales ^{100,116,117,119,280}. Por estas observaciones previas y en base a los resultados obtenidos *in vivo* en este trabajo, creemos que T22-DITOX-H6 podría por un lado aumentar la tasa de respuesta en pacientes con tumor CXCR4⁺ (que en CE son la mayoría), así como reducir la toxicidad severa asociada a la terapia actual.

DISCUSIÓN

Ventajas de la nanotoxina T22-DITOX-H6 en relación a otros abordajes basados en nanopartículas

Tan solo existen aproximadamente una veintena de **nanopartículas** que han sido evaluadas como tratamiento del CE en la última década. No obstante, son pocas las que han pasado a ensayos clínicos y ninguna ha superado la fase II. Por otro lado, hasta donde sabemos, todas ellas son de naturaleza **lipídica** (doxorubicina liposomal pegilada)¹¹⁸ o **polimérica** (BIND-014, CALAA-01)^{281,282}, e incorporan y entregan fármacos convencionales, aunque carecen de un direccionamiento activo. Al igual que éstas, las nanotoxinas que hemos diseñado también se benefician de las ventajas farmacocinéticas que implica el **tamaño nanométrico** que presentan gracias a su estructura autoensamblable, incluida T22-DITOX-H6. Pero, además, a diferencia de las lipídicas o poliméricas y debido a su **naturaleza proteica**, nuestras nanotoxinas evitan la formación de la corona proteica que se genera en torno a las nanopartículas una vez administradas en sangre. Esto permite el mantenimiento de su **direccionamiento activo *in vivo*** a las células tumorales que sobreexpresan CXCR4, con lo cual se consigue que un elevado porcentaje de la dosis administrada (alrededor del 60%) se acumule en el tumor, como hemos demostrado con el nanotransportador T22-GFP-H6 en el modelo subcutáneo de CE.

Ventajas derivadas de la naturaleza proteica de la nanopartícula T22-DITOX-H6 y de su diseño molecular

El **tamaño** de las nanopartículas, así como su naturaleza (inorgánica, polimérica, lipídica, proteica...) y su diseño por ingeniería genética, determinan su farmacocinética, biodistribución y captación por el tumor. Aquellas que tienen un tamaño menor de 6-8 nm, son excretadas por riñón, mientras que si son mayores de 150-200 nm son susceptibles de ser eliminadas por los macrófagos del sistema retículo-endotelial, especialmente en el hígado. En nuestro caso, la nanopartícula T22-DITOX-H6 tiene un tamaño de 38-90 nm²¹⁰, lo cual impide tanto su entrada en el parénquima hepático, evitando su metabolismo y eliminación por macrófagos, como su filtración en los glomérulos renales, lo que les permite **recircular** en el torrente sanguíneo durante más tiempo que aquellas de menor tamaño o que los fármacos clásicos²⁸³. Al contrario que los agentes terapéuticos de bajo peso molecular, que generan toxicidad en tejidos no tumorales, nuestras nanopartículas no se distribuyen en el organismo por difusión pasiva^{284,194}.

La nanotoxina T22-DITOX-H6, como el resto de nanopartículas derivadas del nanotransportador T22-GFP-H6, está formada exclusivamente por **monómeros** proteicos **autoensamblables** que forman nanopartículas oligoméricas **altamente estables** gracias a los

dominios catiónicos T22 y H6. Esta estabilidad estructural se mantiene en suero humano, que no degrada la nanopartícula y evita su agregación. Además, el hecho de que sean de **naturaleza proteica** evita la formación de la **corona proteica** que se genera en la sangre en torno a las nanopartículas inorgánicas o compuestas por lípidos o polímeros, reconocidos como materiales exógenos^{194,197}. La corona proteica cambia la conformación de la superficie de las nanopartículas, alterando su tamaño, morfología y su capacidad de direccionamiento a células diana y con ello el comportamiento en medio fisiológico. Esta característica facilita su reconocimiento por macrófagos en los órganos de eliminación y se reduce su captación por el tejido tumoral²⁸⁵.

Por otro lado, las nanopartículas proteicas son **biocompatibles**, y **económicas** por la facilidad de su producción y escalado. Actualmente, el Abraxane, una nanopartícula que consiste en la unión de paclitaxel a albúmina por co-acervación, es la única nanomedicina proteica aprobada por la FDA únicamente para su uso en cáncer de páncreas²⁸⁶, no habiéndose evaluado en CE. No obstante, se trata de una nanopartícula no direccionada a células tumorales diana, que libera el paclitaxel en el espacio extracelular del tumor, aumentando su concentración a nivel local. En cambio, nuestras nanopartículas son capaces de internalizar selectivamente en las células tumorales diana, imitando las estructuras víricas, en cuanto a su capacidad de autoensamblaje y de penetración en el interior celular mediante las interacciones entre los motivos peptídicos de sus cápsidas y los receptores diana de la superficie de las células que infectan.

En este sentido, el **diseño** de nuestras nanopartículas proteicas, basado en ingeniería genética, es **muy versátil**, posibilitando la adición a su estructura de dominios con diferentes funciones, que pueden jugar un papel también en su autoensamblaje a partir de los monómeros proteicos expresados en bacterias, como es el caso del dominio **T22**, un péptido catiónico, y la cola de polihistidinas, mediante su coordinación con cationes divalentes. Además, la **cola de histidinas** tiene también un papel fundamental en el escape endosomal gracias al efecto “esponja de protones” que ejerce. En conjunto, la carga positiva de la nanopartícula permite que también escape con mayor facilidad de la degradación lisosomal que las nanopartículas aniónicas o neutras, permitiendo que el cargo terapéutico ejerza su acción citotóxica en el citoplasma celular¹⁹⁴. Por último, la posibilidad de **incluir dominios citotóxicos** a la estructura de las nanopartículas, así como su **conjugación** a agentes químicos, supone un elemento altamente innovador y de **gran impacto** en terapia antineoplásica¹⁸¹.

DISCUSIÓN

Ventajas derivadas del direccionamiento activo de T22-DITOX-H6

Como se ha comentado, otra de las propiedades clave de nuestras nanopartículas es su **direccionamiento activo a las células tumorales CXCR4⁺** gracias a los múltiples ligandos T22 expuestos en su superficie. La unión de CXCR4 y T22 induce la endocitosis del complejo receptor-nanopartícula. CXCR4 sería reciclado a la membrana celular o degradado en el lisosoma²⁸⁷, mientras que la nanopartícula escapa de la degradación endo y lisosomal, gracias a la cola de polihistidinas (H6)¹⁹⁴ y al dominio de escape endosomal específico de la exotoxina de la difteria^{208,210}, permitiendo que ejerza su acción citotóxica en el citoplasma¹⁹⁴.

Se ha descrito extensamente que la mayoría de las nanopartículas aprobadas o en ensayos clínicos funcionan mediante **direccionamiento pasivo**²⁸⁸⁻²⁹¹, que consiste en el aprovechamiento de las diferencias anatómicas y las anomalías fisiopatológicas que existen en la vascularización tumoral en comparación con el tejido normal, lo que se conoce como efecto de aumento de permeabilidad y retención (*enhanced permeability and retention*, **EPR**) en el tejido tumoral. La mayor permeabilidad se debe a una separación intercelular endotelial mayor que en los capilares del tejido normal, y la mayor retención del agente terapéutico en el tumor, a la presión generada por la falta de drenaje linfático¹⁷⁹. Sin embargo, se ha demostrado que la mayor parte de las nanopartículas administradas se acumulan en el bazo y el hígado, donde son eliminadas por los macrófagos, por lo que el efecto EPR no es suficiente para aumentar su captación en tumor²⁹². Es posible que este sea el caso de la **doxorubicina liposomal pegilada**, la única nanopartícula considerada para el tratamiento del CE en estadios avanzados que ha llegado a ensayos clínicos de fase II; no obstante, tiene una baja tasa de respuesta (9,5%) y una tasa de efectos adversos graves del 22%¹¹⁸.

Recientemente, se ha estudiado el efecto EPR en tumores en humanos, observando con cierta sorpresa que este efecto puede ser mucho menor que el que ocurre en modelos murinos, lo que ha llevado a cuestionarse si este es el mecanismo principal de extravasación de las nanopartículas en tumores sólidos humanos²⁹³. Otra publicación reciente ha demostrado la existencia de la **transcitosis endotelial** de las nanopartículas, ya sean direccionadas o no, las cuales utilizan un transporte activo a través de las células endoteliales que componen los vasos sanguíneos hasta el espacio intersticial tumoral, utilizando un receptor específico de dichas células, o mediante su absorción en el caso de nanopartículas catiónicas^{294,295}, aunque todavía se desconocen los mecanismos moleculares subyacentes a este tipo de transporte activo.

En el caso de nuestras nanopartículas, sus propiedades físicas y moleculares en su conjunto, y especialmente su direccionamiento activo gracias al ligando T22, mejoran su farmacocinética, manteniéndose en circulación durante más tiempo sin degradarse y eliminarse, y aumentando su captación por el tejido diana ^{196,197}. De acuerdo con la gran eficiencia de internalización observada *in vitro*, el porcentaje de acumulación de **T22-GFP-H6 en el tejido tumoral** del modelo subcutáneo de CE CXCR4⁺ fue de **más del 60%** de la dosis administrada, mientras que el porcentaje que se acumula en tumor de las nanopartículas sin direccionamiento activo es del 1-5% ²⁹⁶. Gracias a esta estrategia, mejoramos la biodistribución de los agentes terapéuticos, aumentando su eficiencia de acumulación en células tumorales diana, reduciendo así la toxicidad inespecífica, independientemente del proceso de extravasación empleado por las nanopartículas.

Además, T22-DITOX-H6, del mismo modo que el nanotransportador T22-GFP-H6, penetra en el interior de la célula tumoral mediante **transporte activo exclusivamente** a través de su receptor diana, CXCR4, como hemos demostrado *in vitro* comparando su citotoxicidad en células de CE CXCR4⁺ con la de células CXCR4⁻, y mediante el bloqueo del receptor con su antagonista AMD3100 en células CXCR4⁺. La elevada selectividad del nanotransportador se confirmó *in vivo* estudiando la histología de los **órganos no tumorales**, en el modelo de CE subcutáneo CXCR4⁺, a las 48 horas de la administración, especialmente en los que se había registrado mayor emisión de fluorescencia (hígado y riñón). En ellos, **no se observó toxicidad ni acumulación de la nanopartícula**, al igual que cuando se utilizó la nanotoxina T22-DITOX-H6. Esto sugiere que la fluorescencia detectada en esos órganos, en el caso de T22-GFP-H6, se deba al **tránsito** de la nanopartícula por los **sinusoides** fenestrados hepáticos y los capilares de los **glomérulos** renales, durante un breve periodo de tiempo, antes de volver a la circulación sistémica **sin** haber llegado a **alcanzar el parénquima** tisular. Estos resultados estarían de acuerdo con lo descrito por nuestro grupo en un modelo animal de linfoma, en el que se demostró que la nanopartícula se metaboliza principalmente en el tejido tumoral, proteolizándose allí y generando pequeños fragmentos peptídicos, que no se observaron en tejidos no tumorales ¹⁹⁷.

A pesar de que actualmente existen múltiples ensayos clínicos con nanopartículas que tienen un direccionamiento activo, para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, ninguna ha llegado al mercado. Para **CE avanzado**, la única nanopartícula con direccionamiento activo que se evaluó en **ensayos clínicos** fue **BIND-014**, una nanopartícula polimérica, dirigida al antígeno prostático específico de membrana que encapsula docetaxel, que no llegó a fase II ²⁸¹. También

DISCUSIÓN

se propuso el tratamiento de CE metastático con **CALAA-01**, una nanopartícula polimérica cargada con ARNi dirigida al receptor de transferrina, aunque, hasta donde sabemos, no se reclutaron pacientes de este tipo tumoral y, en cualquier caso, tampoco superó la fase I en ensayos clínicos ²⁸². Ambas son nanopartículas poliméricas, por lo que creemos que es posible que la falta de traslación clínica, en el caso de BIND-014, se deba en parte a la **pérdida de direccionamiento** por su recubrimiento en sangre por la corona proteica que se ha descrito previamente.

Otros grupos han desarrollado distintas estrategias de direccionamiento de fármacos, siendo los ADC los que están teniendo mayor impacto clínico, aunque su porcentaje de captación por el tejido tumoral es del 0,01% de la dosis total administrada ¹⁷⁶. Mientras que los ADC presentan solo dos ligandos de unión al receptor diana, nuestras **nanopartículas** se autoensamblan a partir de múltiples monómeros, por lo que son **multivalentes**: en el caso de T22-GFP-H6 el autoensamblaje es de once monómeros, mostrando, por tanto, once ligandos por cada nanopartícula. Esta capacidad de unión a múltiples dianas les confiere **superselectividad** y, en consecuencia, un aumento exponencial de su internalización en las células diana ²⁰⁶. Esta es probablemente la razón para la mayor eficiencia de acumulación en tumor de nuestras nanopartículas, en comparación con los ADCs, logrando una captación de más del 60% de la dosis administrada en tumor. A día de hoy, solo existen tres ADCs que han sido evaluados en ensayos clínicos como tratamiento del CE metastático. En primer lugar, **tisotumab vedotin**, conjugado con auristatina y dirigido al factor tisular (TF), sobreexpresado en células tumorales, que se evaluó en 33 pacientes con diferentes tipos de cáncer en estadios avanzado, aunque solo dos de ellos eran mujeres con CE ²⁹⁷. Por otro lado, existen dos ADCs dirigidos a HER2, **SYD985** y trastuzumab deruxtecan, para los que actualmente se están reclutando pacientes para ensayos clínicos de fase II. Inesperadamente, en estudios publicados recientemente con **trastuzumab deruxtecan**, se obtuvo actividad antitumoral en tumores negativos para HER2, por liberación del fármaco al medio debido al efecto *bystander*, lo que disminuye su selectividad y aumenta la toxicidad en tejido sano ^{298,299}.

En nuestro abordaje terapéutico, el porcentaje de T22-GFP-H6 que se acumula en tumor, o de las nanopartículas derivadas de este nanotransportador ^{194,196–198,206}, incluyendo la nanotoxina T22-DITOX-H6, es notoriamente más elevado que el que se obtiene empleando nanopartículas de direccionamiento pasivo o los ADCs, lo que supone una **gran mejora en la entrega** del agente terapéutico a las células tumorales. Sin embargo, creemos que es posible conseguir un mayor porcentaje de captación por el tumor ajustando la dosis de administración de la

nanopartícula a la intensidad de expresión de CXCR4. De esta manera, podríamos obtener una acumulación de entre el 72% y el 86%, como se ha obtenido para el nanotransportador en modelos animales de cáncer colorrectal y linfoma difuso de células B grandes, respectivamente. En el modelo colorrectal se administró una dosis de T22-GFP-H6 mayor (326 µg)¹⁹⁶ que la administrada en este trabajo, mientras que en la línea celular empleada para el modelo de linfoma la intensidad de expresión de CXCR4 en la membrana era mucho mayor¹⁹⁷ que la de la línea de CE empleada en este trabajo. Estos datos indican que la expresión de **CXCR4** es, además, un **factor predictivo** de la eficiencia de acumulación de las nanopartículas en el tumor y, probablemente, de la respuesta al tratamiento, en aquellos casos en los que el tumor tratado sea sensible al fármaco que transporta.

Ventaja derivada del singular mecanismo de acción de T22-DITOX-H6

T22-DITOX-H6, de modo similar a **T22-PE24-H6**, incorporan dominios de toxinas bacterianas que actúan **inhibiendo la síntesis proteica** a través de la ADP-ribosilación de eEF2^{211,212}, por lo que comparten tanto el receptor CXCR4, en la superficie de la célula, que les permite internalizar de forma selectiva, como su diana terapéutica, eEF2, que se encuentra en el citosol. **eEF2** es una proteína encargada de la elongación de las cadenas polipeptídicas en la traducción, que ha sido descrita, a partir de un estudio proteómico, como un potencial biomarcador de CE³⁰⁰. El hecho de que la diana intracelular de nuestra nanotoxina esté **upregulada en CE** es una ventaja más añadida a las características moleculares de nuestras nanopartículas y a su direccionamiento activo gracias al ligando T22.

La inhibición de eEF2 da lugar a la muerte celular por vía apoptótica. *In vitro*, la **inducción de la apoptosis** se evaluó a través de la traslocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la bicapa lipídica, la formación de cuerpos apoptóticos y la expresión de **caspasa-3 activa** y de la **proteólisis de PARP**. En los dos casos la formación de **cuerpos apoptóticos** en más del 80% de las células se observa a las 12 horas, aunque la activación de la vía de apoptosis por la nanotoxina T22-DITOX-H6 se lleva a cabo de forma más rápida que a través de T22-PE24-H6. Esta observación puede deberse a **diferencias** en el **procesamiento intracelular** de las dos nanopartículas, ya que en el caso de DITOX, la acidez del pH en el endosoma temprano provoca cambios conformacionales que llevan a la formación de un poro en la membrana endosomal, que conduce a la liberación del dominio catalítico al citosol. Por su parte, PE24 pasa del endosoma temprano al aparato de Golgi, en el que su secuencia KDEL es reconocida, y la toxina es llevada al lumen del retículo endoplasmático por transporte retrógrado, donde finalmente es translocada y liberada al citoplasma²¹³.

DISCUSIÓN

Por otro lado, en los estudios de actividad antitumoral y antimetastática desarrollados en este trabajo, no se detectaron cambios de peso o comportamiento de los animales, ni alteraciones histopatológicas en hígado, bazo, riñones o pulmones a las 48 horas de la administración de las nanopartículas. *In vitro* demostramos que la muerte celular era inducida **únicamente a través del receptor de membrana CXCR4**, ya que cuando las nanotoxinas eran administradas en células sin expresión de CXCR4, o pretratadas con el antagonista AMD3100, no afectaban a la viabilidad. Así confirmamos que la incorporación del dominio catalítico de la toxina diftérica, sustituyendo al dominio GFP del nanotransportador (no citotóxico) mantenía el direccionamiento activo a células de CE CXCR4⁺.

La **potente actividad** antineoplásica demostrada por T22-DITOX-H6 en CE avanzado, su **direccionamiento activo** a células CXCR4⁺ y el hecho de que induzca **apoptosis** a través de la inhibición de la elongación proteica, mediante la inhibición de eEF2, apoya su posterior desarrollo preclínico y clínico, al incorporar un **mecanismo singular** de muerte celular, no explorada en este tipo tumoral, diferente al de cualquiera de los fármacos actuales o en desarrollo para el tratamiento del CE.

6. CONTRIBUCIÓN DE LA NANOTOXINA T22-DITOX-H6, DIRIGIDA A CÉLULAS TUMORALES CXCR4⁺, AL TRATAMIENTO DE CE AVANZADO

La nanotoxina **T22-DITOX-H6**, supone un abordaje terapéutico altamente novedoso y con potencial impacto clínico. Probablemente, también T22-PE24-H6 podría tener impacto en el tratamiento del CE, al haber demostrado potente actividad antitumoral, aunque habría que determinar su efecto antimetastático, que a día de hoy no hemos evaluado.

En cualquier caso, la importancia de la posible transferencia industrial de T22-DITOX-H6 se debe a su potente efecto antineoplásico, demostrado en el modelo ortotópico de CE avanzado, a la ausencia de toxicidad asociada, y al hecho de que actualmente no existe **ningún ensayo clínico que emplee toxinas** para el tratamiento del CE. De hecho, hasta donde sabemos, los pocos tratamientos para CE basados en toxinas vegetales^{301,302} o animales³⁰³ no llegaron a evaluarse más que en modelos preclínicos. Con respecto a toxinas de origen bacteriano, en 2004 se diseñó una terapia dirigida a HER2, que incorporaba dominios activos de caspasas y, de modo similar a T22-PE24-H6, el dominio citotóxico de *Pseudomonas aeruginosa* que se evaluó en preclínica³⁰⁴⁻³⁰⁶, pero no tenemos conocimiento de que llegara a fases clínicas. Por otro lado, recientemente se ha evaluado el efecto antitumoral de angubindina-1, derivada de la toxina iota de la bacteria *Clostridium perfringens*, aunque solo se han publicado resultados de citotoxicidad *in vitro*³⁰⁷.

En concreto, las inmunotoxinas consisten en una sustancia inmune (un anticuerpo monoclonal, citoquina o inmunoglobulina) unida químicamente a toxinas bacterianas, vegetales o animales, por lo que, de forma similar a los ADC, funcionan por direccionamiento activo. El empleo terapéutico de algunas **inmunotoxinas está aprobado** para leucemia y linfoma (denileukin diftotox, tagraxofusp, moxetumomab pasudotox), y algunas de ellas han sido también evaluadas en otros tipos de cáncer (que no incluían el CE), aunque **no han sido efectivas en tumores sólidos**. Al contrario que las neoplasias hematológicas, los tumores sólidos presentan limitaciones para su uso como son la escasa accesibilidad a células tumorales, y su toxicidad e inmunogenicidad³⁰⁸. En este sentido, los dos problemas principales de la administración de inmunotoxinas a nivel sistémico son la **falta de especificidad** (derivada de la presencia de la molécula tumoral diana en el tejido sano), y la **toxicidad en el tejido sano** (por la unión inespecífica de las inmunotoxinas a otros componentes de la superficie celular con más afinidad que a su diana). El primero de los problemas está relacionado con la expresión y distribución del receptor diana, que nuestra aproximación terapéutica soluciona explotando la importante diferencia entre la expresión de CXCR4 en tumor en comparación con tejidos no tumorales. Sin

DISCUSIÓN

embargo, la segunda limitación tiene que ver con el agente terapéutico en sí mismo ²¹³, y se ha abordado mediante la deimmunización de las toxinas recombinantes, a través de la identificación y eliminación de los epítomos reconocidos por células B y T, para disminuir la respuesta inmune ^{209,210}. Por este motivo, también en nuestro grupo hemos desarrollado las nanotoxinas, incluyendo T22-DITOX-H6, empleando los dominios catalíticos deimmunizados.

Otra de las ventajas de nuestro abordaje terapéutico es que, mientras que los agentes antineoplásicos genotóxicos y antimitóticos son dependientes de la fase del ciclo celular en la que se encuentren las células, actuando fundamentalmente sobre células en división, **T22-DITOX-H6** es capaz de ejercer su efecto citotóxico, además, sobre las células en **fase G0**. Esto permite la eliminación de **mayor número de células tumorales diana**, estén o no en mitosis, **sin causar toxicidad** severa, y ampliar de este modo la ventana terapéutica, por lo que también el mecanismo de inducción de muerte celular utilizado por esta nanotoxina es novedoso y ventajoso para el tratamiento del CE.

Por otra parte, creemos que la **combinación de T22-DITOX-H6 con otros fármacos** ya explorados en CE podría aumentar el espectro de pacientes candidatas a tratamiento. Consideramos que nuestra nanotoxina se podría combinar especialmente con **inhibidores de las vías PI3K/AKT** (perifosina, BKM120, temsirolimus, everolimus, entre otros) o **inhibidores del checkpoint** inmunológicos (pembrolizumab, dostarlimab), estos últimos aprobados por la FDA para el tratamiento del CE avanzado en pacientes con alta inestabilidad de microsatélites y deficiencias en genes de *mismatch repair*. La combinación podría incrementar la tasa de respuesta actual, alrededor del 50% ^{114,115} empleando dosis menores, lo que reduciría los efectos adversos asociados ¹¹⁶. En este sentido, creemos que los **modelos animales** que hemos desarrollado serían útiles para evaluar estas hipótesis de terapia combinada, al derivar de la línea celular humana **AN3CA**, en la que se han descrito alteraciones de la vía de **PI3K/AKT** y elevada **inestabilidad de microsatélites**.

Por último, hasta ahora, ninguna de las aproximaciones terapéuticas evaluadas en pacientes con CE avanzado se había estudiado previamente en modelos murinos con diseminación metastática como el que hemos generado en esta tesis. La **evaluación preclínica** de los tratamientos en un modelo ortotópico, y no solo subcutáneos o *in vitro*, podrá **predecir** en mayor medida su nivel de efectividad antineoplásica o su toxicidad en pacientes de CE avanzado y, así, hacer una estimación de cómo podría comportarse en clínica. Junto a los prometedores resultados que hemos obtenido en este trabajo, tanto en modelos subcutáneos como ortotópicos de CE, será necesario conocer el efecto del sistema inmune sobre las nanopartículas y viceversa. Para ello,

en el futuro próximo se deberán realizar ensayos en modelos tumorales utilizando cepas de ratones inmunocompetentes o humanizados. En nuestro laboratorio actualmente se están llevando a cabo, con resultados satisfactorios, ensayos de toxicidad a distintas dosis de los nanoconjugados y de las nanopartículas proteicas, incluyendo las nanotoxinas, en ratones inmunocompetentes. La evaluación de su biodistribución, efectividad antitumoral e inmunogenicidad permitirá estimar aún mejor su posible comportamiento en pacientes de CE y su posible paso a fases clínicas.

A modo de resumen, a lo largo de esta tesis se ha validado el **gran potencial** de nuestra novedosa aproximación terapéutica para el **CE avanzado CXCR4⁺**, basada en **nanopartículas proteicas direccionadas** al receptor CXCR4. De manera previa, hemos generado un **modelo de CE CXCR4⁺ altamente metastático** específicamente desarrollado para la evaluación de nuestras nanopartículas dirigidas. En primer lugar, hemos demostrado que el nanotransportador T22-GFP-H6 alcanza una **elevada especificidad de internalización** dependiente de CXCR4 en este tipo tumoral, tanto *in vitro* como *in vivo*. En segundo lugar, hemos seleccionado la nanotoxina **T22-DITOX-H6**, de entre las múltiples nanopartículas terapéuticas dirigidas a CXCR4 disponibles en el laboratorio, por su mayor potencia citotóxica y mayor dependencia de CXCR4 en líneas de CE *in vitro*. T22-DITOX-H6 mantiene la misma estructura que el nanotransportador, siendo una nanopartícula autoensamblada y multivalente, que incorpora múltiples péptidos T22 de unión a CXCR4 y dominios catalíticos de la toxina diftérica. En tercer lugar, hemos demostrado que T22-DITOX-H6 ejerce un **potente efecto antitumoral y antimetastático**, mediado por la activación de **apoptosis, sin toxicidad** sistémica asociada, en el modelo de CE CXCR4⁺ altamente metastático.

En base a estos resultados, la nanotoxina T22-DITOX-H6 se considera una candidata para su desarrollo preclínico regulatorio y posterior desarrollo clínico, que promete contribuir a solucionar la falta de tratamiento efectivo para las pacientes de CE CXCR4⁺ avanzado, con alto riesgo de recaída o recurrente.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- I. En nuestra serie, el receptor de quimiocinas CXCR4 está expresado en el 91,6% de pacientes de cáncer de endometrio, de las cuales un 64,4% muestra un patrón predominantemente membranal.
- II. El modelo de tumor subcutáneo generado en ratones *Swiss nude* a partir de la línea celular de cáncer de endometrio AN3CA CXCR4⁺ Luciferasa⁺ mantiene una elevada expresión de CXCR4 en la membrana de las células tumorales.
- III. El modelo ortotópico con sobreexpresión de CXCR4 generado en la cepa de ratones NSG a partir de la línea celular de cáncer de endometrio AN3CA aumenta la diseminación metastática y replica el patrón de diseminación del cáncer de endometrio avanzado observado en pacientes, obteniendo una tasa de desarrollo de metástasis locales y distales del 100%.
- IV. El nanotransportador T22-GFP-H6 internaliza en las células de cáncer de endometrio CXCR4⁺ de forma dependiente de CXCR4, *in vitro* e *in vivo*, alcanzando una captación en tumor del 61,4% de la dosis administrada, sin inducir toxicidad en órganos no tumorales.
- V. De entre las nanopartículas terapéuticas evaluadas, las nanotoxinas T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6, que incorporan dominios polipeptídicos de toxinas bacterianas, inducen un mayor efecto citotóxico, dependiente de CXCR4, que los nanoconjugados o las nanopartículas polipeptídicas que contienen dominios antimicrobianos, proapoptóticos o venenos animales en la línea celular de cáncer de endometrio AN3CA CXCR4⁺.
- VI. El potente efecto citotóxico que ejercen T22-DITOX-H6 y T22-PE24-H6 en la línea celular de cáncer de endometrio AN3CA CXCR4⁺ Luciferasa⁺ *in vitro* es dependiente de CXCR4 y está mediado por la inducción de apoptosis, con activación de caspasa-3, proteólisis de PARP, condensación nuclear y generación de cuerpos apoptóticos.
- VII. La administración a dosis repetidas, tanto de T22-DITOX-H6 como de T22-PE24-H6, induce un potente efecto antitumoral *in vivo* mediado por apoptosis, que reduce la tasa de crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia en el modelo subcutáneo de cáncer de endometrio CXCR4⁺, sin toxicidad sistémica asociada, mostrando T22-DITOX-H6 un mayor efecto.

CONCLUSIONES

- VIII. La administración de la nanotoxina T22-DITOX-H6, a dosis repetidas, genera un potente efecto antimetastático, disminuyendo el número y el tamaño de las metástasis peritoneales, hepáticas y pulmonares, sin toxicidad sistémica asociada, en el modelo ortotópico de cáncer de endometrio CXCR4⁺.

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Saladin, K. S.; Gan, C. A. *Human Anatomy*, Sixth edition.; McGraw-Hill Education: New York, NY, 2020.
- (2) Agostinis, C.; Mangogna, A.; Bossi, F.; Ricci, G.; Kishore, U.; Bulla, R. Uterine Immunity and Microbiota: A Shifting Paradigm. *Front Immunol* **2019**, *10*, 2387. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02387>.
- (3) Deligdisch-Schor, L.; Mareş Miceli, A. Hormonal Biophysiology of the Uterus. In *Hormonal Pathology of the Uterus*; Deligdisch-Schor, L., Mareş Miceli, A., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2020; Vol. 1242, pp 1–12. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38474-6_1.
- (4) Messinis, I. E.; Messini, C. I.; Dafopoulos, K. Novel Aspects of the Endocrinology of the Menstrual Cycle. *Reproductive BioMedicine Online* **2014**, *28* (6), 714–722. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.02.003>.
- (5) Takizawa, P. Uterus http://medcell.med.yale.edu/histology/female_reproductive_system_lab/uterus.php (accessed 2021 -07 -12).
- (6) Parkes, C.; Kamal, A.; Valentijn, A. J.; Alnafakh, R.; Gross, S. R.; Barraclough, R.; Moss, D.; Kirwan, J.; Hapangama, D. K. Assessing Estrogen-Induced Proliferative Response in an Endometrial Cancer Cell Line Using a Universally Applicable Methodological Guide. *Int J Gynecol Cancer* **2018**, *28* (1), 122–133. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000001121>.
- (7) Goad, J.; Ko, Y.-A.; Kumar, M.; Jamaluddin, M. F. B.; Tanwar, P. S. Oestrogen Fuels the Growth of Endometrial Hyperplastic Lesions Initiated by Overactive Wnt/ β -Catenin Signalling. *Carcinogenesis* **2018**, *39* (9), 1105–1116. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy079>.
- (8) Endometrial cancer statistics | World Cancer Research Fund <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/endometrial-cancer-statistics> (accessed 2020 -04 -04).
- (9) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2018**, *68* (6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- (10) Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2011**, *61* (2), 69–90. <https://doi.org/10.3322/caac.20107>.
- (11) Braun, M. M. Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *Endometrial Cancer* **2016**, *93* (6), 7.
- (12) Cáncer de endometrio-útero - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019 <https://seom.org/171-Infomaci%C3%B3n%20al%20P%C3%ABlico%20-%20Patolog%C3%ADas/cancer-de-endometrio-utero> (accessed 2020 -04 -04).

- (13) Jemal, A.; Siegel, R.; Xu, J.; Ward, E. Cancer Statistics, 2010. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2010**, *60* (5), 277–300. <https://doi.org/10.3322/caac.20073>.
- (14) Creasman, W.; Odicino, F.; Maisonneuve, P.; Quinn, M.; Beller, U.; Benedet, J.; Heintz, A.; Ngan, H.; Pecorelli, S. Carcinoma of the Corpus Uteri. 39.
- (15) McAlpine, J. N.; Temkin, S. M.; Mackay, H. J. Endometrial Cancer: Not Your Grandmother's Cancer: Progress and Challenges Moving Forward. *Cancer* **2016**, *122* (18), 2787–2798. <https://doi.org/10.1002/cncr.30094>.
- (16) Lee, N. K.; Cheung, M. K.; Shin, J. Y.; Husain, A.; Teng, N. N.; Berek, J. S.; Kapp, D. S.; Osann, K.; Chan, J. K. Prognostic Factors for Uterine Cancer in Reproductive-Aged Women. **2007**, *109* (3), 8.
- (17) Andrews, J.; Guyatt, G.; Oxman, A. D.; Alderson, P.; Dahm, P.; Falck-Ytter, Y.; Nasser, M.; Meerpohl, J.; Post, P. N.; Kunz, R.; Brozek, J.; Vist, G.; Rind, D.; Akl, E. A.; Schünemann, H. J. GRADE guidelines: 14. Going from evidence to recommendations: the significance and presentation of recommendations. *Journal of Clinical Epidemiology* **2013**, *66* (7), 719–725. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2012.03.013>.
- (18) Moore, K.; Brewer, M. A. Endometrial Cancer: Is This a New Disease? *Am Soc Clin Oncol Educ Book* **2017**, *37*, 435–442. https://doi.org/10.1200/EDBK_175666.
- (19) *Hormonal Pathology of the Uterus*; Deligdisch-Schor, L., Mareş Miceli, A., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2020; Vol. 1242. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-38474-6>.
- (20) Gavriilyuk, O.; Braaten, T.; Weiderpass, E.; Licaj, I.; Lund, E. Lifetime Number of Years of Menstruation as a Risk Index for Postmenopausal Endometrial Cancer in the Norwegian Women and Cancer Study. *Acta Obstet Gynecol Scand* **2018**, *97* (10), 1168–1177. <https://doi.org/10.1111/aogs.13381>.
- (21) Gong, T.-T.; Wang, Y.-L.; Ma, X.-X. Age at Menarche and Endometrial Cancer Risk: A Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies. *Sci Rep* **2015**, *5* (1), 14051. <https://doi.org/10.1038/srep14051>.
- (22) Sjögren, L. L.; Mørch, L. S.; Løkkegaard, E. Hormone Replacement Therapy and the Risk of Endometrial Cancer: A Systematic Review. *Maturitas* **2016**, *91*, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.05.013>.
- (23) Barry, J. A.; Azizia, M. M.; Hardiman, P. J. Risk of Endometrial, Ovarian and Breast Cancer in Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Human Reproduction Update* **2014**, *20* (5), 748–758. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu012>.
- (24) Tokmak, A.; Kokanali, M. K.; Guzel, A. I.; Kara, A.; Topcu, H. O.; Cavkaytar, S. Polycystic Ovary Syndrome and Risk of Endometrial Cancer: A Mini-Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **2014**, *15* (17), 7011–7014. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.17.7011>.
- (25) Mueck, A. O.; Seeger, H.; Rabe, T. Hormonal Contraception and Risk of Endometrial Cancer: A Systematic Review. *Endocrine-Related Cancer* **2010**, *17* (4), R263–R271. <https://doi.org/10.1677/ERC-10-0076>.

BIBLIOGRAFÍA

- (26) Deligdisch-Schor, L. Hormone Therapy Effects on the Uterus. In *Hormonal Pathology of the Uterus*; Deligdisch-Schor, L., Mareş Miceli, A., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2020; Vol. 1242, pp 145–177. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38474-6_8.
- (27) Emons, G.; Mustea, A.; Tempfer, C. Tamoxifen and Endometrial Cancer: A Janus-Headed Drug. *Cancers (Basel)* **2020**, *12* (9). <https://doi.org/10.3390/cancers12092535>.
- (28) Nelson, L. R.; Bulun, S. E. Estrogen Production and Action. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2001**, *45* (3), S116–S124. <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.117432>.
- (29) Onstad, M. A.; Schmandt, R. E.; Lu, K. H. Addressing the Role of Obesity in Endometrial Cancer Risk, Prevention, and Treatment. *J Clin Oncol* **2016**, *34* (35), 4225–4230. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.69.4638>.
- (30) Aune, D.; Sen, A.; Vatten, L. J. Hypertension and the Risk of Endometrial Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control and Cohort Studies. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 44808. <https://doi.org/10.1038/srep44808>.
- (31) Haggerty, A. F.; Sarwer, D. B.; Schmitz, K. H.; Ko, E. M.; Allison, K. C.; Chu, C. S. Obesity and Endometrial Cancer: A Lack of Knowledge but Opportunity for Intervention. *Nutrition and Cancer* **2017**, *69* (7), 990–995. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1359313>.
- (32) Parslov, M.; Lidegaard, Ø.; Klintorp, S.; Pedersen, B.; Jønsson, L.; Eriksen, P. S.; Ottesen, B. Risk Factors among Young Women with Endometrial Cancer: A Danish Case-Control Study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **2000**, *182* (1), 23–29. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(00\)70486-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(00)70486-8).
- (33) Møller, P. The Prospective Lynch Syndrome Database Reports Enable Evidence-Based Personal Precision Health Care. *Hered Cancer Clin Pract* **2020**, *18* (1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13053-020-0138-0>.
- (34) Pilarski, R.; Burt, R.; Kohlman, W.; Pho, L.; Shannon, K. M.; Swisher, E. Cowden Syndrome and the PTEN Hamartoma Tumor Syndrome: Systematic Review and Revised Diagnostic Criteria. *J Natl Cancer Inst* **2013**, *105* (21), 1607–1616. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt277>.
- (35) Cerretelli, G.; Ager, A.; Arends, M.; Frayling, I. Molecular Pathology of Lynch Syndrome. *J. Pathol.* **2020**, path.5422. <https://doi.org/10.1002/path.5422>.
- (36) Singh, S.; Resnick, K. E. Lynch Syndrome and Endometrial Cancer. *South Med J* **2017**, *110* (4), 265–269. <https://doi.org/10.14423/SMJ.0000000000000633>.
- (37) Hojman, P.; Gehl, J.; Christensen, J. F.; Pedersen, B. K. Molecular Mechanisms Linking Exercise to Cancer Prevention and Treatment. *Cell Metabolism* **2018**, *27* (1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.015>.
- (38) Raglan, O.; Kalliala, I.; Markozannes, G.; Cividini, S.; Gunter, M. J.; Nautiyal, J.; Gabra, H.; Paraskeva, E.; Martin-Hirsch, P.; Tsilidis, K. K.; Kyrgiou, M. Risk Factors for Endometrial Cancer: An Umbrella Review of the Literature: Risk Factors for Endometrial Cancer. *Int. J. Cancer* **2019**, *145* (7), 1719–1730. <https://doi.org/10.1002/ijc.31961>.

- (39) Lu, K. H.; Daniels, M. Endometrial and Ovarian Cancer in Women with Lynch Syndrome: Update in Screening and Prevention. *Familial Cancer* **2013**, *12* (2), 273–277. <https://doi.org/10.1007/s10689-013-9664-5>.
- (40) Staff, S.; Aaltonen, M.; Huhtala, H.; Pylvänäinen, K.; Mecklin, J.-P.; Mäenpää, J. Endometrial Cancer Risk Factors among Lynch Syndrome Women: A Retrospective Cohort Study. *Br J Cancer* **2016**, *115* (3), 375–381. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.193>.
- (41) Santaballa, A.; Matías-Guiu, X.; Redondo, A.; Carballo, N.; Gil, M.; Gómez, C.; Gorostidi, M.; Gutierrez, M.; González-Martín, A. SEOM Clinical Guidelines for Endometrial Cancer (2017). *Clin Transl Oncol* **2018**, *20* (1), 29–37. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1809-9>.
- (42) *Principles and Practice of Gynecologic Oncology*, Seventh edition.; Chi, D. S., Berchuck, A., Dizon, D. S., Yashar, C., Eds.; Wolters Kluwer: Philadelphia Baltimore New York, 2017.
- (43) Opolskiene, G.; Sladkevicius, P.; Valentin, L. Ultrasound Assessment of Endometrial Morphology and Vascularity to Predict Endometrial Malignancy in Women with Postmenopausal Bleeding and Sonographic Endometrial Thickness ≥ 4.5 Mm. *Ultrasound Obstet Gynecol* **2007**, *30* (3), 332–340. <https://doi.org/10.1002/uog.4104>.
- (44) Torres, M. L.; Weaver, A. L.; Kumar, S.; Uccella, S.; Famuyide, A. O.; Cliby, W. A.; Dowdy, S. C.; Mariani, A. Risk Factors for Developing Endometrial Cancer After Benign Endometrial Sampling. **2013**, 13.
- (45) Baro, R. S. Resultados del test molecular GynEC®-DX en aspirados endometriales con dictamen histológico no concluyente. 12.
- (46) Fernández-González, S.; Amorós, M.; Arroyuelo, S. M.; Barazi, D.; Cararach, M.; Fernández, J.; de Castillo, L. F.; Jofre, L.; Pallares, L.; Palau, M.; Rodríguez-Domingo, M. J.; Santos, L.; Fernández-Montoli, M. E.; Sanz, X.; Tena, G.; Ponce, J. Mejora coste efectiva en diagnóstico de cáncer endometrial con la incorporación del análisis molecular GynEC®-DX. 12.
- (47) de Boer, S. M.; Nout, R. A.; Jürgenliemk-Schulz, I. M.; Jobsen, J. J.; Lutgens, L. C. H. W.; van der Steen-Banasik, E. M.; Mens, J. W. M.; Slot, A.; Stenfert Kroese, M. C.; Oerlemans, S.; Putter, H.; Verhoeven-Adema, K. W.; Nijman, H. W.; Creutzberg, C. L. Long-Term Impact of Endometrial Cancer Diagnosis and Treatment on Health-Related Quality of Life and Cancer Survivorship: Results From the Randomized PORTEC-2 Trial. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **2015**, *93* (4), 797–809. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.08.023>.
- (48) Tran, A.-Q.; Gehrig, P. Recent Advances in Endometrial Cancer. *F1000Res* **2017**, *6*, 81. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10020.1>.
- (49) Colombo, N.; Creutzberg, C.; Amant, F.; Bosse, T.; González-Martín, A.; Ledermann, J.; Marth, C.; Nout, R.; Querleu, D.; Mirza, M. R.; Sessa, C.; Abal, M.; Altundag, O.; Amant, F.; van Leeuwenhoek, A.; Banerjee, S.; Bosse, T.; Casado, A.; de Agustín, L. C.; Cibula, D.; Colombo, N.; Creutzberg, C.; del Campo, J.-M.; Emons, G.; Goffin, F.; González-Martín, A.; Greggi, S.; Haie-Meder, C.; Katsaros, D.; Kesic, V.; Kurzeder, C.; Lax, S.; Lécuru, F.; Ledermann, J.; Levy, T.; Lorusso, D.; Mäenpää, J.; Marth, C.; Matias-Guiu, X.; Morice, P.; Nijman, H. W.; Nout, R.; Powell, M.; Querleu, D.; Mirza, M. R.; Reed, N.; Rodolakis, A.; Salvesen, H.; Sehouli, J.; Sessa, C.; Taylor, A.; Westermann, A.; Zeimet, A. G. ESMO-ESGO-

BIBLIOGRAFÍA

- ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Annals of Oncology* **2016**, 27 (1), 16–41. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv484>.
- (50) Amant, F.; Mirza, M. R.; Koskas, M.; Creutzberg, C. L. Cancer of the Corpus Uteri. *Int J Gynecol Obstet* **2018**, 143, 37–50. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12612>.
- (51) World Health Organization. *Female Genital Tumours*; 2020.
- (52) Goebel, E. A.; Vidal, A.; Matias-Guiu, X.; Blake Gilks, C. The Evolution of Endometrial Carcinoma Classification through Application of Immunohistochemistry and Molecular Diagnostics: Past, Present and Future. *Virchows Arch* **2018**, 472 (6), 885–896. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2279-8>.
- (53) Bansal, N.; Yendluri, V.; Wenham, R. M. The Molecular Biology of Endometrial Cancers and the Implications for Pathogenesis, Classification, and Targeted Therapies. *Cancer Control* **2009**, 16 (1), 8–13. <https://doi.org/10.1177/107327480901600102>.
- (54) Murali, R.; Soslow, R. A.; Weigelt, B. Classification of Endometrial Carcinoma: More than Two Types. *The Lancet Oncology* **2014**, 15 (7), e268–e278. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70591-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70591-6).
- (55) Ambros, R. A.; Sherman, M. E.; Zahn, C. M.; Bitterman, P.; Kurman, R. J. Endometrial Intraepithelial Carcinoma: A Distinctive Lesion Specifically Associated with Tumors Displaying Serous Differentiation. *Human Pathology* **1995**, 26 (11), 1260–1267. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90203-1](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90203-1).
- (56) Gehrig, P. A.; Groben, P. A.; Fowler, W. C.; Walton, L. A. Noninvasive Papillary Serous Carcinoma of the Endometrium. **2001**, 97 (1), 5.
- (57) Soslow, R. A.; Tornos, C.; Park, K. J.; Malpica, A.; Matias-Guiu, X.; Oliva, E.; Parkash, V.; Carlson, J.; McCluggage, W. G.; Gilks, C. B. Endometrial Carcinoma Diagnosis: Use of FIGO Grading and Genomic Subcategories in Clinical Practice. *International Journal of Gynecological Pathology* **2019**, 38, S64–S74. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000518>.
- (58) *Robbins Basic Pathology*, Tenth edition.; Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C., Perkins, J. A., Eds.; Elsevier: Philadelphia, Pennsylvania, 2018.
- (59) The Cancer Genome Atlas Research Network; Levine, D. A. Integrated Genomic Characterization of Endometrial Carcinoma. *Nature* **2013**, 497 (7447), 67–73. <https://doi.org/10.1038/nature12113>.
- (60) Piulats, J. M.; Guerra, E.; Gil-Martín, M.; Roman-Canal, B.; Gatus, S.; Sanz-Pamplona, R.; Velasco, A.; Vidal, A.; Matias-Guiu, X. Molecular Approaches for Classifying Endometrial Carcinoma. *Gynecologic Oncology* **2017**, 145 (1), 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.12.015>.
- (61) Kossai, M.; Penault-Llorca, F. Role of Hormones in Common Benign Uterine Lesions: Endometrial Polyps, Leiomyomas, and Adenomyosis. In *Hormonal Pathology of the Uterus*; Deligdisch-Schor, L., Mareş Miceli, A., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2020; Vol. 1242, pp 37–58. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38474-6_3.

- (62) Singh, G.; Puckett, Y. Endometrial Hyperplasia. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2021.
- (63) Sanderson, P. A.; Critchley, H. O. D.; Williams, A. R. W.; Arends, M. J.; Saunders, P. T. K. New Concepts for an Old Problem: The Diagnosis of Endometrial Hyperplasia. *Hum. Reprod. Update* **2016**, humupd;dmw042v1. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw042>.
- (64) Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; Li, P. W.; Mural, R. J.; Sutton, G. G.; Smith, H. O.; Yandell, M.; Evans, C. A.; Holt, R. A.; Gocayne, J. D.; Amanatides, P.; Ballew, R. M.; Huson, D. H.; Wortman, J. R.; Zhang, Q.; Kodira, C. D.; Zheng, X. H.; Chen, L.; Skupski, M.; Subramanian, G.; Thomas, P. D.; Zhang, J.; Miklos, G. L. G.; Nelson, C.; Broder, S.; Clark, A. G.; Nadeau, J.; McKusick, V. A.; Zinder, N.; Levine, A. J.; Roberts, R. J.; Simon, M.; Slayman, C.; Hunkapiller, M.; Bolanos, R.; Delcher, A.; Dew, I.; Fasulo, D.; Flanigan, M.; Florea, L.; Halpern, A.; Hannenhalli, S.; Kravitz, S.; Levy, S.; Mobarry, C.; Reinert, K.; Remington, K.; Abu-Threideh, J.; Beasley, E.; Biddick, K.; Bonazzi, V.; Brandon, R.; Cargill, M.; Chandramouliswaran, I.; Charlab, R.; Chaturvedi, K.; Deng, Z.; Francesco, V. D.; Dunn, P.; Eilbeck, K.; Evangelista, C.; Gabrielian, A. E.; Gan, W.; Ge, W.; Gong, F.; Gu, Z.; Guan, P.; Heiman, T. J.; Higgins, M. E.; Ji, R.-R.; Ke, Z.; Ketchum, K. A.; Lai, Z.; Lei, Y.; Li, Z.; Li, J.; Liang, Y.; Lin, X.; Lu, F.; Merkulov, G. V.; Milshina, N.; Moore, H. M.; Naik, A. K.; Narayan, V. A.; Neelam, B.; Nuskern, D.; Rusch, D. B.; Salzberg, S.; Shao, W.; Shue, B.; Sun, J.; Wang, Z. Y.; Wang, A.; Wang, X.; Wang, J.; Wei, M.-H.; Wides, R.; Xiao, C.; Yan, C.; Yao, A.; Ye, J.; Zhan, M.; Zhang, W.; Zhang, H.; Zhao, Q.; Zheng, L.; Zhong, F.; Zhong, W.; Zhu, S. C.; Zhao, S.; Gilbert, D.; Baumhueter, S.; Spier, G.; Carter, C.; Cravchik, A.; Woodage, T.; Ali, F.; An, H.; Awe, A.; Baldwin, D.; Baden, H.; Barnstead, M.; Barrow, I.; Beeson, K.; Busam, D.; Carver, A.; Center, A.; Cheng, M. L.; Curry, L.; Danaher, S.; Davenport, L.; Desilets, R.; Dietz, S.; Dodson, K.; Doup, L.; Ferreira, S.; Garg, N.; Gluecksmann, A.; Hart, B.; Haynes, J.; Haynes, C.; Heiner, C.; Hladun, S.; Hostin, D.; Houck, J.; Howland, T.; Ibegwam, C.; Johnson, J.; Kalush, F.; Kline, L.; Koduru, S.; Love, A.; Mann, F.; May, D.; McCawley, S.; McIntosh, T.; McMullen, I.; Moy, M.; Moy, L.; Murphy, B.; Nelson, K.; Pfannkoch, C.; Pratts, E.; Puri, V.; Qureshi, H.; Reardon, M.; Rodriguez, R.; Rogers, Y.-H.; Romblad, D.; Ruhfel, B.; Scott, R.; Sitter, C.; Smallwood, M.; Stewart, E.; Strong, R.; Suh, E.; Thomas, R.; Tse, S.; Vech, C.; Wang, G.; Wetter, J.; Williams, S.; Williams, M.; Windsor, S.; Winn-Deen, E.; Wolfe, K.; Zaveri, J.; Zaveri, K.; Abril, J. F.; Guigo, R.; Campbell, M. J.; Sjolander, K. V.; Karlak, B.; Kejariwal, A.; Mi, H.; Lazareva, B.; Hatton, T.; Narechania, A.; Diemer, K.; Muruganujan, A.; Guo, N.; Sato, S.; Bafna, V.; Istrail, S.; Lippert, R.; Schwartz, R.; Walenz, B.; Yooseph, S.; Allen, D.; Basu, A.; Baxendale, J.; Blick, L.; Caminha, M.; Carnes-Stine, J.; Caulk, P.; Chiang, Y.-H.; Coyne, M.; Dahlke, C.; Mays, A. D.; Dombroski, M.; Donnelly, M.; Ely, D.; Esparham, S.; Fosler, C.; Gire, H.; Glanowski, S.; Glasser, K.; Glodek, A.; Gorokhov, M.; Graham, K.; Gropman, B.; Harris, M.; Heil, J.; Henderson, S.; Hoover, J.; Jennings, D.; Jordan, C.; Jordan, J.; Kasha, J.; Kagan, L.; Kraft, C.; Levitsky, A.; Lewis, M.; Liu, X.; Lopez, J.; Ma, D.; Majoros, W.; McDaniel, J.; Murphy, S.; Newman, M.; Nguyen, T.; Nguyen, N.; Nodell, M.; Pan, S.; Peck, J.; Peterson, M.; Rowe, W.; Sanders, R.; Scott, J.; Simpson, M.; Smith, T.; Sprague, A.; Stockwell, T.; Turner, R.; Venter, E.; Wang, M.; Wen, M.; Wu, D.; Wu, M.; Xia, A.; Zandieh, A.; Zhu, X. The Sequence of the Human Genome. *THE HUMAN GENOME* **2001**, 291, 51.
- (65) Engelsens, I. B.; Akslen, L. A.; Salvesen, H. B. Biologic Markers in Endometrial Cancer Treatment. *APMIS* **2009**, 117 (10), 693–707. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02467.x>.
- (66) Basil, J. B.; Goodfellow, P. J.; Rader, J. S.; Mutch, D. G.; Herzog, T. J. Clinical Significance of Microsatellite Instability in Endometrial Carcinoma. 7.

BIBLIOGRAFÍA

- (67) Mutter, G. L.; Baak, J. P. A.; Crum, C. P.; Richart, R. M.; Ferenczy, A.; Faquin, W. C. Endometrial Precancer Diagnosis by Histopathology, Clonal Analysis, and Computerized Morphometry. *J Pathol* **2000**, *8*.
- (68) Kim, T. H.; Yoo, J.-Y.; Kim, H. I.; Gilbert, J.; Ku, B. J.; Li, J.; Mills, G. B.; Broaddus, R. R.; Lydon, J. P.; Lim, J. M.; Yoon, H.-G.; Jeong, J.-W. Mig-6 Suppresses Endometrial Cancer Associated with Pten Deficiency and ERK Activation. *Cancer Res* **2014**, *74* (24), 7371–7382. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0794>.
- (69) Yoo, J.-Y.; Kang, H.-B.; Broaddus, R. R.; Risinger, J. I.; Choi, K.-C.; Kim, T. H. MIG-6 Suppresses Endometrial Epithelial Cell Proliferation by Inhibiting Phospho-AKT. *BMC Cancer* **2018**, *18* (1), 605. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4502-7>.
- (70) Doll, A.; Abal, M.; Rigau, M.; Monge, M.; Gonzalez, M.; Demajo, S.; Colás, E.; Llauradó, M.; Alazzouzi, H.; Planagumá, J.; Lohmann, M. A.; Garcia, J.; Castellvi, S.; Cajal, J. R. y; Gil-Moreno, A.; Xercavins, J.; Alameda, F.; Reventós, J. Novel Molecular Profiles of Endometrial Cancer—New Light through Old Windows. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2008**, *108* (3–5), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.09.020>.
- (71) Bosse, T.; ter Haar, N. T.; Seeber, L. M.; Diest, P. J. v; Hes, F. J.; Vasen, H. F.; Nout, R. A.; Creutzberg, C. L.; Morreau, H.; Smit, V. T. Loss of ARID1A Expression and Its Relationship with PI3K-Akt Pathway Alterations, TP53 and Microsatellite Instability in Endometrial Cancer. *Mod Pathol* **2013**, *26* (11), 1525–1535. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.96>.
- (72) Takeda, T.; Banno, K.; Okawa, R.; Yanokura, M.; Iijima, M.; Irie-Kunitomi, H.; Nakamura, K.; Iida, M.; Adachi, M.; Umene, K.; Nogami, Y.; Masuda, K.; Kobayashi, Y.; Tominaga, E.; Aoki, D. ARID1A Gene Mutation in Ovarian and Endometrial Cancers (Review). *Oncology Reports* **2016**, *35* (2), 607–613. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4421>.
- (73) Markova, I.; Prochazk, M. Molecular Biology of Endometrial Carcinoma. In *Cancer of the Uterine Endometrium - Advances and Controversies*; Saldivar, J. S., Ed.; InTech, 2012. <https://doi.org/10.5772/26614>.
- (74) Enomoto, T.; Inone, M.; Perantoni, A. O.; Terakawa, N.; Tanizawa, O.; Rice, J. M. K-Ras Activation in Neoplasms of the Human Female Reproductive Tract. *8*.
- (75) Caduff, R. F.; Johnston, C. M.; Frank, T. S. Mutations of the Ki-Ras Oncogene in Carcinoma of the Endometrium. **1995**, *146* (1), 7.
- (76) Di Cristofano, A.; Ellenson, L. H. Endometrial Carcinoma. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2007**, *2* (1), 57–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.2.010506.091905>.
- (77) Molecular Pathology of Endometrial Carcinoma: Transcriptional Signature in Endometrioid Tumors. *Histology and Histopathology* **2005**, No. 21, 197–204. <https://doi.org/10.14670/HH-21.197>.
- (78) Moreno-Bueno, G.; Hardisson, D. Abnormalities of the APC/b-Catenin Pathway in Endometrial Cancer. *10*.

- (79) Holcomb, K.; Delatorre, R.; Pedemonte, B.; McLeod, C.; Anderson, L.; Chambers, J. E. Cadherin Expression in Endometrioid, Papillary Serous, and Clear Cell Carcinoma of the Endometrium. **2002**, *100* (6), 6.
- (80) Banno, K.; Yanokura, M.; Iida, M.; Masuda, K.; Aoki, D. Carcinogenic Mechanisms of Endometrial Cancer: Involvement of Genetics and Epigenetics: Carcinogenesis of Endometrial Cancer. *J Obstet Gynaecol Res* **2014**, *40* (8), 1957–1967. <https://doi.org/10.1111/jog.12442>.
- (81) Arnett-Mansfield, R. L.; Clarke, C. L. Relative Expression of Progesterone Receptors A and B in Endometrioid Cancers of the Endometrium 1. 8.
- (82) Ferrandina, G.; Ranelletti, F. O.; Gallotta, V.; Martinelli, E.; Zannoni, G. F.; Gessi, M.; Scambia, G. Expression of Cyclooxygenase-2 (COX-2), Receptors for Estrogen (ER), and Progesterone (PR), P53, Ki67, and Neu Protein in Endometrial Cancer. *Gynecologic Oncology* **2005**, *98* (3), 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.04.024>.
- (83) Liu, F.-S. Molecular Carcinogenesis of Endometrial Cancer. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* **2007**, *46* (1), 26–32. [https://doi.org/10.1016/S1028-4559\(08\)60102-3](https://doi.org/10.1016/S1028-4559(08)60102-3).
- (84) Hubbard, S. A.; Friel, A. M.; Kumar, B.; Zhang, L.; Rueda, B. R.; Gargett, C. E. Evidence for Cancer Stem Cells in Human Endometrial Carcinoma. *Cancer Res* **2009**, *69* (21), 8241–8248. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4808>.
- (85) Keys, H. M.; Roberts, J. A.; Brunetto, V. L.; Zaino, R. J.; Spirtos, N. M.; Bloss, J. D.; Pearlman, A.; Maiman, M. A.; Bell, J. G. A Phase III Trial of Surgery with or without Adjunctive External Pelvic Radiation Therapy in Intermediate Risk Endometrial Adenocarcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecologic Oncology* **2004**, *92* (3), 744–751. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2003.11.048>.
- (86) Kong, A.; Johnson, N.; Kitchener, H. C.; Lawrie, T. A. Adjuvant Radiotherapy for Stage I Endometrial Cancer. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*; The Cochrane Collaboration, Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2012; p CD003916.pub3. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003916.pub3>.
- (87) Liang, L. W.; Perez, A. R.; Cangemi, N. A.; Zhou, Q.; Iasonos, A.; Abu-Rustum, N.; Alektiar, K. M.; Makker, V. An Assessment of Prognostic Factors, Adjuvant Treatment, and Outcomes of Stage IA Polyp-Limited Versus Endometrium-Limited Type II Endometrial Carcinoma: *International Journal of Gynecological Cancer* **2016**, *26* (3), 497–504. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000635>.
- (88) Gupta, S.; Provenzale, D.; Regenbogen, S. E.; Hampel, H.; Slavin, T. P.; Hall, M. J.; Llor, X.; Chung, D. C.; Ahnen, D. J.; Bray, T.; Cooper, G.; Early, D. S.; Ford, J. M.; Giardiello, F. M.; Grady, W.; Halverson, A. L.; Hamilton, S. R.; Klapman, J. B.; Larson, D. W.; Lazenby, A. J.; Lynch, P. M.; Markowitz, A. J.; Mayer, R. J.; Ness, R. M.; Samadder, N. J.; Shike, M.; Sugandha, S.; Weiss, J. M.; Dwyer, M. A.; Ogba, N. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal, Version 3.2017. *J Natl Compr Canc Netw* **2017**, *15* (12), 1465–1475. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.0176>.
- (89) Morice, P.; Leary, A.; Creutzberg, C.; Abu-Rustum, N.; Darai, E. Endometrial Cancer. *The Lancet* **2016**, *387* (10023), 1094–1108. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00130-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00130-0).

BIBLIOGRAFÍA

- (90) Nout, R.; Smit, V.; Putter, H.; Jürgenliemk-Schulz, I.; Jobsen, J.; Lutgens, L.; van der Steen-Banasik, E.; Mens, J.; Slot, A.; Kroese, M. S.; van Bunningen, B.; Ansink, A.; van Putten, W.; Creutzberg, C. 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. *The Lancet* **2010**, 375 (9717), 816–823. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)62163-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)62163-2).
- (91) Mendivil, A.; Schuler, K. M.; Gehrig, P. A. Non-Endometrioid Adenocarcinoma of the Uterine Corpus: A Review of Selected Histological Subtypes. *Cancer Control* **2009**, 16 (1), 46–52. <https://doi.org/10.1177/107327480901600107>.
- (92) Fader, A. N.; Drake, R. D.; O'Malley, D. M.; Gibbons, H. E.; Huh, W. K.; Havrilesky, L. J.; Gehrig, P. A.; Tuller, E.; Axtell, A. E.; Zanotti, K. M.; for the Uterine Papillary Serous Carcinoma (UPSC) Consortium. Platinum/Taxane-Based Chemotherapy with or without Radiation Therapy Favorably Impacts Survival Outcomes in Stage I Uterine Papillary Serous Carcinoma: Chemotherapy and Survival in UPSC. *Cancer* **2009**, 115 (10), 2119–2127. <https://doi.org/10.1002/cncr.24247>.
- (93) Gupta, D. Clinical Behavior and Treatment of Endometrial Cancer. In *Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma*; Hedrick Ellenson, L., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2017; Vol. 943, pp 47–74. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43139-0_2.
- (94) Burke, W. M.; Orr, J.; Leitao, M.; Salom, E.; Gehrig, P.; Olawaiye, A. B.; Brewer, M.; Boruta, D.; Vilella, J.; Herzog, T.; Abu Shahin, F. Endometrial Cancer: A Review and Current Management Strategies: Part I. *Gynecologic Oncology* **2014**, 134 (2), 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.05.018>.
- (95) Hubbs, J. L.; Saig, R. M.; Abaid, L. N.; Bae-Jump, V. L.; Gehrig, P. A. Systemic and Local Hormone Therapy for Endometrial Hyperplasia and Early Adenocarcinoma: *Obstetrics & Gynecology* **2013**, 121 (6), 1172–1180. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31828d6186>.
- (96) Decruze, S. B.; Green, J. A. Hormone Therapy in Advanced and Recurrent Endometrial Cancer: A Systematic Review. *Int J Gynecol Cancer* **2007**, 17 (5), 964–978. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2007.00897.x>.
- (97) Bradford, L. S.; Rauh-Hain, J. A.; Schorge, J.; Birrer, M. J.; Dizon, D. S. Advances in the Management of Recurrent Endometrial Cancer: *American Journal of Clinical Oncology* **2015**, 38 (2), 206–212. <https://doi.org/10.1097/COC.0b013e31829a2974>.
- (98) Passarello, K.; Kurian, S.; Villanueva, V. Endometrial Cancer: An Overview of Pathophysiology, Management, and Care. *Seminars in Oncology Nursing* **2019**, 35 (2), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.002>.
- (99) Calabrese, C. R.; Almassy, R.; Barton, S.; Batey, M. A.; Calvert, A. H.; Canan-Koch, S.; Durkacz, B. W.; Hostomsky, Z.; Kumpf, R. A.; Kyle, S.; Li, J.; Maegley, K.; Newell, D. R.; Notarianni, E.; Stratford, I. J.; Skalitzky, D.; Thomas, H. D.; Wang, L.-Z.; Webber, S. E.; Williams, K. J.; Curtin, N. J. Anticancer Chemosensitization and Radiosensitization by the Novel Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibitor AG14361. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **2004**, 96 (1), 56–67. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh005>.
- (100) Oza, A. M.; Elit, L.; Tsao, M.-S.; Kamel-Reid, S.; Biagi, J.; Provencher, D. M.; Gotlieb, W. H.; Hoskins, P. J.; Ghatage, P.; Tonkin, K. S.; Mackay, H. J.; Mazurka, J.; Sederias, J.; Ivy, P.;

- Dancey, J. E.; Eisenhauer, E. A. Phase II Study of Temsirolimus in Women With Recurrent or Metastatic Endometrial Cancer: A Trial of the NCIC Clinical Trials Group. *JCO* **2011**, *29* (24), 3278–3285. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.1578>.
- (101) Slomovitz, B. M.; Lu, K. H.; Johnston, T.; Coleman, R. L.; Munsell, M.; Broaddus, R. R.; Walker, C.; Ramondetta, L. M.; Burke, T. W.; Gershenson, D. M.; Wolf, J. A Phase 2 Study of the Oral Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor, Everolimus, in Patients with Recurrent Endometrial Carcinoma. *Cancer* **2010**, *116* (23), 5415–5419. <https://doi.org/10.1002/cncr.25515>.
- (102) Zeng, H.; Dvorak, H. F.; Mukhopadhyay, D. Vascular Permeability Factor (VPF)/Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor-1 Down-Modulates VPF/VEGF Receptor-2-Mediated Endothelial Cell Proliferation, but Not Migration, through Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Pathways. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (29), 26969–26979. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103213200>.
- (103) Leslie, K. K.; Sill, M. W.; Fischer, E.; Darcy, K. M.; Mannel, R. S.; Tewari, K. S.; Hanjani, P.; Wilken, J. A.; Baron, A. T.; Godwin, A. K.; Schilder, R. J.; Singh, M.; Maihle, N. J. A Phase II Evaluation of Gefitinib in the Treatment of Persistent or Recurrent Endometrial Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecologic Oncology* **2013**, *129* (3), 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.02.019>.
- (104) Aghajanian, C.; Sill, M. W.; Darcy, K. M.; Greer, B.; McMeekin, D. S.; Rose, P. G.; Rotmensch, J.; Barnes, M. N.; Hanjani, P.; Leslie, K. K. Phase II Trial of Bevacizumab in Recurrent or Persistent Endometrial Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *JCO* **2011**, *29* (16), 2259–2265. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.6397>.
- (105) Simpkins, F.; Drake, R.; Escobar, P. F.; Nutter, B.; Rasool, N.; Rose, P. G. A Phase II Trial of Paclitaxel, Carboplatin, and Bevacizumab in Advanced and Recurrent Endometrial Carcinoma (EMCA). *Gynecologic Oncology* **2015**, *136* (2), 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.12.004>.
- (106) Alvarez, E. A.; Brady, W. E.; Walker, J. L.; Rotmensch, J.; Zhou, X. C.; Kendrick, J. E.; Yamada, S. D.; Schilder, J. M.; Cohn, D. E.; Harrison, C. R.; Moore, K. N.; Aghajanian, C. Phase II Trial of Combination Bevacizumab and Temsirolimus in the Treatment of Recurrent or Persistent Endometrial Carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecologic Oncology* **2013**, *129* (1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.12.022>.
- (107) Campos, S. M.; Cohn, D. E. Treatment of Metastatic Endometrial Cancer - UpToDate. **2021**, 26.
- (108) Barlin, J. N.; Puri, I.; Bristow, R. E. Cytoreductive Surgery for Advanced or Recurrent Endometrial Cancer: A Meta-Analysis. *Gynecologic Oncology* **2010**, *118* (1), 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.04.005>.
- (109) Kasherman, L.; Ahrari, S.; Lheureux, S. Dostarlimab in the Treatment of Recurrent or Primary Advanced Endometrial Cancer. *Future Oncology* **2021**, *17* (8), 877–892. <https://doi.org/10.2217/fon-2020-0655>.
- (110) Miller, D.; Filiaci, V.; Fleming, G.; Mannel, R.; Cohn, D.; Matsumoto, T.; Tewari, K.; DiSilvestro, P.; Pearl, M.; Zaino, R. Late-Breaking Abstract 1: Randomized Phase III Noninferiority Trial of First Line Chemotherapy for Metastatic or Recurrent Endometrial

BIBLIOGRAFÍA

- Carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecologic Oncology* **2012**, 125 (3), 771. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.03.034>.
- (111) Rose, P. G.; Brunetto, V. L.; VanLe, L.; Bell, J.; Walker, J. L.; Lee, R. B. A Phase II Trial of Anastrozole in Advanced Recurrent or Persistent Endometrial Carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* **2000**, 78 (2), 212–216. <https://doi.org/10.1006/gyno.2000.5865>.
- (112) Ma, B. B. Y.; Oza, A.; Eisenhauer, E.; Stanimir, G.; Carey, M.; Chapman, W.; Latta, E.; Sidhu, K.; Powers, J.; Walsh, W.; Fyles, A. The Activity of Letrozole in Patients with Advanced or Recurrent Endometrial Cancer and Correlation with Biological Markers--a Study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Int J Gynecol Cancer* **2004**, 14 (4), 650–658. <https://doi.org/10.1111/j.1048-891X.2004.14419.x>.
- (113) Piulats, J. M.; Matias-Guiu, X. Immunotherapy in Endometrial Cancer: In the Nick of Time. *Clin Cancer Res* **2016**, 22 (23), 5623–5625. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1820>.
- (114) Chung, H. C.; Ros, W.; Delord, J.-P.; Perets, R.; Italiano, A.; Shapira-Frommer, R.; Manzuk, L.; Piha-Paul, S. A.; Xu, L.; Zeigenfuss, S.; Pruitt, S. K.; Leary, A. Efficacy and Safety of Pembrolizumab in Previously Treated Advanced Cervical Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *JCO* **2019**, 37 (17), 1470–1478. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01265>.
- (115) Oaknin, A.; Tinker, A. V.; Gilbert, L.; Samouëlian, V.; Mathews, C.; Brown, J.; Barretina-Ginesta, M.-P.; Moreno, V.; Gravina, A.; Abdeddaim, C.; Banerjee, S.; Guo, W.; Danaee, H.; Im, E.; Sabatier, R. Clinical Activity and Safety of the Anti-Programmed Death 1 Monoclonal Antibody Dostarlimab for Patients With Recurrent or Advanced Mismatch Repair-Deficient Endometrial Cancer: A Nonrandomized Phase 1 Clinical Trial. *JAMA Oncol* **2020**, 6 (11), 1766–1772. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.4515>.
- (116) Postow, M. Toxicities Associated with Checkpoint Inhibitor Immunotherapy. **2021**, 38.
- (117) Makker, V.; Taylor, M. H.; Aghajanian, C.; Oaknin, A.; Mier, J.; Cohn, A. L.; Romeo, M.; Bratos, R.; Brose, M. S.; DiSimone, C.; Messing, M.; Stepan, D. E.; Dutcus, C. E.; Wu, J.; Schmidt, E. V.; Orłowski, R.; Sachdev, P.; Shumaker, R.; Casado Herraiez, A. Lenvatinib Plus Pembrolizumab in Patients With Advanced Endometrial Cancer. *J Clin Oncol* **2020**, 38 (26), 2981–2992. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02627>.
- (118) Muggia, F. M.; Blessing, J. A.; Sorosky, J.; Reid, G. C. Phase II Trial of the Pegylated Liposomal Doxorubicin in Previously Treated Metastatic Endometrial Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* **2002**, 20 (9), 2360–2364. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.08.171>.
- (119) Aghajanian, C.; Filiaci, V.; Dizon, D. S.; Carlson, J. W.; Powell, M. A.; Secord, A. A.; Tewari, K. S.; Bender, D. P.; O'Malley, D. M.; Stuckey, A.; Gao, J.; Dao, F.; Soslow, R. A.; Lankes, H. A.; Moore, K.; Levine, D. A. A Phase II Study of Frontline Paclitaxel/Carboplatin/Bevacizumab, Paclitaxel/Carboplatin/Temsirolimus, or Ixabepilone/Carboplatin/Bevacizumab in Advanced/Recurrent Endometrial Cancer. *Gynecol Oncol* **2018**, 150 (2), 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.05.018>.
- (120) Slomovitz, B. M.; Jiang, Y.; Yates, M. S.; Soliman, P. T.; Johnston, T.; Nowakowski, M.; Levenback, C.; Zhang, Q.; Ring, K.; Munsell, M. F.; Gershenson, D. M.; Lu, K. H.; Coleman,

- R. L. Phase II Study of Everolimus and Letrozole in Patients With Recurrent Endometrial Carcinoma. *JCO* **2015**, *33* (8), 930–936. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3401>.
- (121) Planesas, J. M.; Pérez-Nueno, V. I.; Borrell, J. I.; Teixidó, J. Impact of the CXCR4 Structure on Docking-Based Virtual Screening of HIV Entry Inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2012**, *38*, 123–136. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2012.06.010>.
- (122) Murakami, T.; Yamamoto, N. Role of CXCR4 in HIV Infection and Its Potential as a Therapeutic Target. *Future Microbiology* **2010**, *5* (7), 1025–1039. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.67>.
- (123) Gibson, M. S.; Bradshaw, R. W. The Gabriel Synthesis of Primary Amines. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1968**, *7* (12), 919–930. <https://doi.org/10.1002/anie.196809191>.
- (124) Bianchi, M. E.; Mezzapelle, R. The Chemokine Receptor CXCR4 in Cell Proliferation and Tissue Regeneration. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 2109. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02109>.
- (125) Teicher, B. A.; Fricker, S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research* **2010**, *16* (11), 2927–2931. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2329>.
- (126) Hodge, P. Synthesis of Organic Compounds Using Polymer-Supported Reagents, Catalysts, and/or Scavengers in Benchtop Flow Systems[†]. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, *44* (23), 8542–8553. <https://doi.org/10.1021/ie040285e>.
- (127) Cheng, Z.-J.; Zhao, J.; Sun, Y.; Hu, W.; Wu, Y.-L.; Cen, B.; Wu, G.-X.; Pei, G. β -Arrestin Differentially Regulates the Chemokine Receptor CXCR4-Mediated Signaling and Receptor Internalization, and This Implicates Multiple Interaction Sites between β -Arrestin and CXCR4. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (4), 2479–2485. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2479>.
- (128) Wong, D.; Korz, W. Translating an Antagonist of Chemokine Receptor CXCR4: From Bench to Bedside. *Clinical Cancer Research* **2008**, *14* (24), 7975–7980. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4846>.
- (129) Würth, R.; Bajetto, A.; Harrison, J. K.; Barbieri, F.; Florio, T. CXCL12 Modulation of CXCR4 and CXCR7 Activity in Human Glioblastoma Stem-like Cells and Regulation of the Tumor Microenvironment. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00144>.
- (130) Boudot, A.; Kerdivel, G.; Habauzit, D.; Eeckhoute, J.; Le Dily, F.; Flouriot, G.; Samson, M.; Pakdel, F. Differential Estrogen-Regulation of CXCL12 Chemokine Receptors, CXCR4 and CXCR7, Contributes to the Growth Effect of Estrogens in Breast Cancer Cells. *PLoS One* **2011**, *6* (6), e20898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020898>.
- (131) Rodríguez-Lara, V.; Ignacio, G.-S.; Cerbón Cervantes, M. A. Estrogen Induces CXCR4 Overexpression and CXCR4/CXCL12 Pathway Activation in Lung Adenocarcinoma Cells *in Vitro*. *Endocrine Research* **2017**, 1–13. <https://doi.org/10.1080/07435800.2017.1292526>.
- (132) He, M.; Yu, W.; Chang, C.; Miyamoto, H.; Liu, X.; Jiang, K.; Yeh, S. Estrogen Receptor α Promotes Lung Cancer Cell Invasion via Increase of and Cross-talk with Infiltrated Macrophages through the CCL2/CCR2/MMP9 and CXCL12/CXCR4 Signaling Pathways. *Mol Oncol* **2020**, *14* (8), 1779–1799. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12701>.

BIBLIOGRAFÍA

- (133) Sauv , K.; Lepage, J.; Sanchez, M.; Heveker, N.; Tremblay, A. Positive Feedback Activation of Estrogen Receptors by the CXCL12-CXCR4 Pathway. *Cancer Res* **2009**, *69* (14), 5793–5800. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4924>.
- (134) Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F.; Weissman, I. L. Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature* **2001**, *414* (6859), 105–111. <https://doi.org/10.1038/35102167>.
- (135) Nagarsheth, N.; Wicha, M. S.; Zou, W. Chemokines in the Cancer Microenvironment and Their Relevance in Cancer Immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **2017**, *17* (9), 559–572. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.49>.
- (136) Sun, Y.; Yoshida, T.; Okabe, M.; Zhou, K.; Wang, F.; Soko, C.; Saito, S.; Nikaido, T. Isolation of Stem-Like Cancer Cells in Primary Endometrial Cancer Using Cell Surface Markers CD133 and CXCR4. *Translational Oncology* **2017**, *10* (6), 976–987. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2017.07.007>.
- (137) Giannone; Attademo; Scotto; Genta; Ghisoni; Tuninetti; Aglietta; Pignata; Valabrega. Endometrial Cancer Stem Cells: Role, Characterization and Therapeutic Implications. *Cancers* **2019**, *11* (11), 1820. <https://doi.org/10.3390/cancers11111820>.
- (138) Walcher, L.; Kistenmacher, A.-K.; Suo, H.; Kitte, R.; Dluczek, S.; Strau , A.; Blaudszun, A.-R.; Yevesa, T.; Fricke, S.; Kossatz-Boehlert, U. Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1280. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01280>.
- (139) Xu, Y.; Zhu, H.; Zhao, D.; Tan, J. Endometrial Stem Cells: Clinical Application and Pathological Roles. *6*.
- (140) Pello, O. M.; Rodríguez-Frade, J. M.; Martínez-Muñoz, L.; Mellado, M. Modulaci n del tráfico leucocitario: Papel de las quimiocinas y de los opioides. **2006**, *25* (1), 11.
- (141) Orimo, A.; Gupta, P. B.; Sgroi, D. C.; Arenzana-Seisdedos, F.; Delaunay, T.; Naeem, R.; Carey, V. J.; Richardson, A. L.; Weinberg, R. A. Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell* **2005**, *121* (3), 335–348. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.034>.
- (142) Burger, J. A.; Kipps, T. J. CXCR4: A Key Receptor in the Crosstalk between Tumor Cells and Their Microenvironment. *Blood* **2006**, *107* (5), 1761–1767. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3182>.
- (143) Fischer, T.; Nagel, F.; Jacobs, S.; Stumm, R.; Schulz, S. Reassessment of CXCR4 Chemokine Receptor Expression in Human Normal and Neoplastic Tissues Using the Novel Rabbit Monoclonal Antibody UMB-2. *PLoS ONE* **2008**, *3* (12), e4069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004069>.
- (144) Nimmagadda, S.; Pullambhatla, M.; Pomper, M. G. Immunoimaging of CXCR4 Expression in Brain Tumor Xenografts Using SPECT/CT. *Journal of Nuclear Medicine* **2009**, *50* (7), 1124–1130. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.061325>.
- (145) Felix, A. S.; Stone, R. A.; Chivukula, M.; Bowser, R.; Parwani, A. V.; Linkov, F.; Edwards, R. P.; Weissfeld, J. L. Survival Outcomes in Endometrial Cancer Patients Are Associated with

- CXCL12 and Estrogen Receptor Expression. *Int. J. Cancer* **2012**, *131* (2), E114–E121. <https://doi.org/10.1002/ijc.27317>.
- (146) Dubrovskaja, A.; Cojoc, M.; Peitzsch, F.; Trautmann, F.; Polishchuk, I.; Telegeev, E. Emerging Targets in Cancer Management: Role of the CXCL12/CXCR4 Axis. *OTT* **2013**, *1347*. <https://doi.org/10.2147/OTT.S36109>.
- (147) The Axis of CXCR4/SDF-1 Plays a Role in Colon Cancer Cell Adhesion Through Regulation of the AKT and IGF1R Signalling Pathways. *AR* **2017**, *37* (8). <https://doi.org/10.21873/anticancerres.11830>.
- (148) Stanisavljević, L.; Aβmus, J.; Storli, K. E.; Leh, S. M.; Dahl, O.; Myklebust, M. P. CXCR4, CXCL12 and the Relative CXCL12-CXCR4 Expression as Prognostic Factors in Colon Cancer. *Tumor Biol.* **2016**, *37* (6), 7441–7452. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4591-8>.
- (149) Dubrovskaja, A.; Hartung, A.; Bouchez, L. C.; Walker, J. R.; Reddy, V. A.; Cho, C. Y.; Schultz, P. G. CXCR4 Activation Maintains a Stem Cell Population in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Cells through AhR Signalling. *Br J Cancer* **2012**, *107* (1), 43–52. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.105>.
- (150) Trautmann, F.; Cojoc, M.; Kurth, I.; Melin, N.; Bouchez, L. C.; Dubrovskaja, A.; Peitzsch, C. CXCR4 as Biomarker for Radioresistant Cancer Stem Cells. *International Journal of Radiation Biology* **2014**, *90* (8), 687–699. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.906766>.
- (151) Wang, T.; Shigdar, S.; Gantier, M. P.; Hou, Y.; Wang, L.; Li, Y.; Shamaileh, H. A.; Yin, W.; Zhou, S.-F.; Zhao, X.; Duan, W. Cancer Stem Cell Targeted Therapy: Progress amid Controversies. *Oncotarget* **2015**, *6* (42), 44191–44206. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6176>.
- (152) Li, X.; Bu, W.; Meng, L.; Liu, X.; Wang, S.; Jiang, L.; Ren, M.; Fan, Y.; Sun, H. CXCL12/CXCR4 Pathway Orchestrates CSC-like Properties by CAF Recruited Tumor Associated Macrophage in OSCC. *Exp Cell Res* **2019**, *378* (2), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.03.013>.
- (153) Liu, P.; Long, P.; Huang, Y.; Sun, F.; Wang, Z. CXCL12/CXCR4 Axis Induces Proliferation and Invasion in Human Endometrial Cancer. **2016**, *11*.
- (154) Teng, F.; Tian, W.-Y.; Wang, Y.-M.; Zhang, Y.-F.; Guo, F.; Zhao, J.; Gao, C.; Xue, F.-X. Cancer-Associated Fibroblasts Promote the Progression of Endometrial Cancer via the SDF-1/CXCR4 Axis. *J Hematol Oncol* **2016**, *9* (1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0231-4>.
- (155) Buchynska, L. G.; Movchan, O. M.; Iurchenko, N. P. Expression of Chemokine Receptor CXCR4 in Tumor Cells and Content of CXCL12+ Fibroblasts in Endometrioid Carcinoma of Endometrium. *Exp Oncol* **2021**, *43* (2), 135–141.
- (156) Long, P.; Sun, F.; Ma, Y.; Huang, Y. Inhibition of CXCR4 and CXCR7 for Reduction of Cell Proliferation and Invasion in Human Endometrial Cancer. *Tumor Biol.* **2016**, *37* (6), 7473–7480. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4580-y>.
- (157) Kojiro-Sanada, S.; Yasuda, K.; Nishio, S.; Ogasawara, S.; Akiba, J.; Ushijima, K.; Yano, H. CXCL14-CXCR4 and CXCL12-CXCR4 Axes May Play Important Roles in the Unique Invasion Process of Endometrioid Carcinoma With MELF-Pattern Myoinvasion: *International*

BIBLIOGRAFÍA

- Journal of Gynecological Pathology* **2017**, 36 (6), 530–539.
<https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000362>.
- (158) Sirohi, V. K.; Popli, P.; Sankhwar, P.; Kaushal, J. B.; Gupta, K.; Manohar, M.; Dwivedi, A. Curcumin Exhibits Anti-Tumor Effect and Attenuates Cellular Migration via Slit-2 Mediated down-Regulation of SDF-1 and CXCR4 in Endometrial Adenocarcinoma Cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2017**, 44, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.12.021>.
- (159) Huang, Y.; Ye, Y.; Long, P.; Zhao, S.; Zhang, L. Silencing of CXCR4 and CXCR7 Expression by RNA Interference Suppresses Human Endometrial Carcinoma Growth in Vivo. 9.
- (160) Felix, A. S.; Edwards, R.; Bowser, R.; Linkov, F. Chemokines and Cancer Progression: A Qualitative Review on the Role of Stromal Cell-Derived Factor 1-Alpha and CXCR4 in Endometrial Cancer. *Cancer Microenvironment* **2010**, 3 (1), 49–56. <https://doi.org/10.1007/s12307-010-0042-7>.
- (161) Zhou, W.-H.; Wu, X.; Hu, W.-D.; Du, M.-R. Co-Expression of CXCR4 and CXCR7 in Human Endometrial Stromal Cells Is Modulated by Steroid Hormones. *Int J Clin Exp Pathol* **2015**, 8 (3), 2449–2460.
- (162) Kodama, J.; Hasengaowa, null; Seki, N.; Kusumoto, T.; Hiramatsu, Y. Expression of the CXCR4 and CCR7 Chemokine Receptors in Human Endometrial Cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **2007**, 28 (5), 370–375.
- (163) Tsukamoto, H.; Shibata, K.; Kajiyama, H.; Terauchi, M.; Nawa, A.; Kikkawa, F. Uterine Smooth Muscle Cells Increase Invasive Ability of Endometrial Carcinoma Cells through Tumor–Stromal Interaction. *Clin Exp Metastasis* **2007**, 24 (6), 423–429. <https://doi.org/10.1007/s10585-007-9079-5>.
- (164) Walentowicz-Sadlecka, M.; Sadlecki, P.; Bodnar, M.; Marszalek, A.; Walentowicz, P.; Sokup, A.; Wilińska-Jankowska, A.; Grabiec, M. Stromal Derived Factor-1 (SDF-1) and Its Receptors CXCR4 and CXCR7 in Endometrial Cancer Patients. *PLoS ONE* **2014**, 9 (1), e84629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084629>.
- (165) Mizokami, Y.; Kajiyama, H.; Shibata, K.; Ino, K.; Kikkawa, F.; Mizutani, S. Stromal Cell-Derived Factor-1-Induced Cell Proliferation and Its Possible Regulation by CD26/Dipeptidyl Peptidase IV in Endometrial Adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* **2004**, 110 (5), 652–659. <https://doi.org/10.1002/ijc.20183>.
- (166) Gelmini, S.; Mangoni, M.; Castiglione, F.; Beltrami, C.; Pieralli, A.; Andersson, K. L.; Fambrini, M.; Taddei, G. L.; Serio, M.; Orlando, C. The CXCR4/CXCL12 Axis in Endometrial Cancer. *Clin Exp Metastasis* **2009**, 26 (3), 261–268. <https://doi.org/10.1007/s10585-009-9240-4>.
- (167) Cacina, C.; Bulgurcuoglu-Kuran, S.; Iyibozkurt, A. C.; Yaylim-Eraltan, I.; Cakmakoglu, B. Genetic Variants of SDF-1 and CXCR4 Genes in Endometrial Carcinoma. *Mol Biol Rep* **2012**, 39 (2), 1225–1229. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0852-9>.
- (168) McCabe, A.; Dolled-Filhart, M.; Camp, R. L.; Rimm, D. L. Automated Quantitative Analysis (AQUA) of In Situ Protein Expression, Antibody Concentration, and Prognosis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2005**, 97 (24), 1808–1815. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji427>.

- (169) Walenkamp, A. M. E.; Lapa, C.; Herrmann, K.; Wester, H.-J. CXCR4 Ligands: The Next Big Hit? *J Nucl Med* **2017**, *58* (Supplement 2), 77S-82S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.186874>.
- (170) Stephenson, J. Researchers Buoyed by Novel HIV Drugs. *JAMA* **2007**, *297* (14), 1535. <https://doi.org/10.1001/jama.297.14.1535>.
- (171) Burger, J. A.; Peled, A. CXCR4 Antagonists: Targeting the Microenvironment in Leukemia and Other Cancers. *Leukemia* **2009**, *23* (1), 43–52. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.299>.
- (172) Endres, M. J.; Clapham, P. R.; Marsh, M.; Ahuja, M.; Turner, J. D.; McKnight, A.; Thomas, J. F.; Stoebenau-Haggarty, B.; Choe, S.; Vance, P. J.; Wells, T. N. C.; Power, C. A.; Sutterwala, S. S.; Doms, R. W.; Landau, N. R.; Hoxie, J. A. CD4-Independent Infection by HIV-2 Is Mediated by Fusin/CXCR4. *Cell* **1996**, *87* (4), 745–756. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81393-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81393-8).
- (173) Burger, J. A.; Stewart, D. J.; Wald, O.; Peled, A. Potential of CXCR4 Antagonists for the Treatment of Metastatic Lung Cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy* **2011**, *11* (4), 621–630. <https://doi.org/10.1586/era.11.11>.
- (174) Dong, P.; Kaneuchi, M.; Konno, Y.; Watari, H.; Sudo, S.; Sakuragi, N. Emerging Therapeutic Biomarkers in Endometrial Cancer. *BioMed Research International* **2013**, *2013*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/130362>.
- (175) Brasseur, K.; Gévry, N.; Asselin, E. Chemoresistance and Targeted Therapies in Ovarian and Endometrial Cancers. *Oncotarget* **2017**, *8* (3). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14021>.
- (176) Donaghy, H. Effects of Antibody, Drug and Linker on the Preclinical and Clinical Toxicities of Antibody-Drug Conjugates. *MAbs* **2016**, *8* (4), 659–671. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1156829>.
- (177) Joubert, N.; Beck, A.; Dumontet, C.; Denevault-Sabourin, C. Antibody–Drug Conjugates: The Last Decade. *Pharmaceuticals* **2020**, *13* (9), 245. <https://doi.org/10.3390/ph13090245>.
- (178) Wirthl, B.; Kremheller, J.; Schrefler, B. A.; Wall, W. A. Extension of a Multiphase Tumour Growth Model to Study Nanoparticle Delivery to Solid Tumours. *PLoS ONE* **2020**, *15* (2), e0228443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228443>.
- (179) Pawar, P. V.; Domb, A. J.; Kumar, N. Systemic Targeting Systems-EPR Effect, Ligand Targeting Systems. In *Focal Controlled Drug Delivery*; Domb, A. J., Khan, W., Eds.; Advances in Delivery Science and Technology; Springer US: Boston, MA, 2014; pp 61–91. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9434-8_3.
- (180) Bamrungsap, S.; Zhao, Z.; Chen, T.; Wang, L.; Li, C.; Fu, T.; Tan, W. Nanotechnology in Therapeutics: A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System. *Nanomedicine* **2012**, *7* (8), 1253–1271. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.87>.
- (181) Unzueta, U.; Céspedes, M. V.; Vázquez, E.; Ferrer-Miralles, N.; Mangués, R.; Villaverde, A. Towards Protein-Based Viral Mimetics for Cancer Therapies. *Trends in Biotechnology* **2015**, *33* (5), 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.02.007>.

BIBLIOGRAFÍA

- (182) Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery. *Nat Biotechnol* **2015**, *33* (9), 941–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>.
- (183) Villanueva-Flores, F.; Castro-Lugo, A.; Ramírez, O. T.; Palomares, L. A. Understanding Cellular Interactions with Nanomaterials: Towards a Rational Design of Medical Nanodevices. *Nanotechnology* **2020**, *31* (13), 132002. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab5bc8>.
- (184) Jiang, W.; Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W. Nanoparticle-Mediated Cellular Response Is Size-Dependent. *Nature Nanotech* **2008**, *3* (3), 145–150. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.30>.
- (185) Petros, R. A.; DeSimone, J. M. Strategies in the Design of Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9* (8), 615–627. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>.
- (186) Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano–Bio Interface. *Nature Mater* **2009**, *8* (7), 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>.
- (187) Heinz, H.; Pramanik, C.; Heinz, O.; Ding, Y.; Mishra, R. K.; Marchon, D.; Flatt, R. J.; Estrela-Lopis, I.; Llop, J.; Moya, S.; Ziolo, R. F. Nanoparticle Decoration with Surfactants: Molecular Interactions, Assembly, and Applications. *Surface Science Reports* **2017**, *72* (1), 1–58. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2017.02.001>.
- (188) Rodríguez-Carmona, E.; Villaverde, A. Nanostructured Bacterial Materials for Innovative Medicines. *Trends in Microbiology* **2010**, *18* (9), 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.06.007>.
- (189) Hassan, S.; Prakash, G.; Bal Ozturk, A.; Saghadzadeh, S.; Farhan Sohail, M.; Seo, J.; Remzi Dokmeci, M.; Zhang, Y. S.; Khademhosseini, A. Evolution and Clinical Translation of Drug Delivery Nanomaterials. *Nano Today* **2017**, *15*, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2017.06.008>.
- (190) Serna, N.; Sánchez-García, L.; Unzueta, U.; Díaz, R.; Vázquez, E.; Mangués, R.; Villaverde, A. Protein-Based Therapeutic Killing for Cancer Therapies. *Trends in Biotechnology* **2018**, *36* (3), 318–335. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.11.007>.
- (191) Ferrer-Miralles, N.; Rodríguez-Carmona, E.; Corchero, J. L.; García-Fruitós, E.; Vázquez, E.; Villaverde, A. Engineering Protein Self-Assembling in Protein-Based Nanomedicines for Drug Delivery and Gene Therapy. *Critical Reviews in Biotechnology* **2015**, *35* (2), 209–221. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.833163>.
- (192) Sánchez-García, L.; Serna, N.; Álamo, P.; Sala, R.; Céspedes, M. V.; Roldan, M.; Sánchez-Chardi, A.; Unzueta, U.; Casanova, I.; Mangués, R.; Vázquez, E.; Villaverde, A. Self-Assembling Toxin-Based Nanoparticles as Self-Delivered Antitumoral Drugs. *Journal of Controlled Release* **2018**, *274*, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.031>.
- (193) Villaverde, A.; Unzueta, U.; Céspedes, E.; Ferrer-Miralles, N.; Casanova, I.; Cedano, J.; Corchero, J. L.; Domingo-Espín, J.; Mangués, R.; Vázquez, E. Intracellular CXCR4+ Cell Targeting with T22-Empowered Protein-Only Nanoparticles. *IJN* **2012**, 4533. <https://doi.org/10.2147/IJN.S34450>.

- (194) Unzueta; Céspedes; Ferrer-Miralles; Casanova; Cedano; Corchero, J. L.; Domingo-Espín, J.; Mangues; Vázquez, E.; Villaverde, A. Intracellular CXCR4+ Cell Targeting with T22-Empowered Protein-Only Nanoparticles. *IJN* **2012**, 4533. <https://doi.org/10.2147/IJN.S34450>.
- (195) Céspedes, M. V.; Unzueta, U.; Tatkiwicz, W.; Sánchez-Chardi, A.; Conchillo-Solé, O.; Álamo, P.; Xu, Z.; Casanova, I.; Corchero, J. L.; Pesarrodona, M.; Cedano, J.; Daura, X.; Ratera, I.; Veciana, J.; Ferrer-Miralles, N.; Vazquez, E.; Villaverde, A.; Mangues, R. *In Vivo* Architectonic Stability of Fully *de Novo* Designed Protein-Only Nanoparticles. *ACS Nano* **2014**, 8 (5), 4166–4176. <https://doi.org/10.1021/nn4055732>.
- (196) Céspedes, M. V.; Unzueta, U.; Álamo, P.; Gallardo, A.; Sala, R.; Casanova, I.; Pavón, M. A.; Mangues, M. A.; Trías, M.; López-Pousa, A.; Villaverde, A.; Vázquez, E.; Mangues, R. Cancer-Specific Uptake of a Liganded Protein Nanocarrier Targeting Aggressive CXCR4 + Colorectal Cancer Models. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2016**, 12 (7), 1987–1996. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.04.003>.
- (197) Falgàs, A.; Pallarès, V.; Unzueta, U.; Céspedes, M. V.; Arroyo-Solera, I.; Moreno, M. J.; Sierra, J.; Gallardo, A.; Mangues, M. A.; Vázquez, E.; Villaverde, A.; Mangues, R.; Casanova, I. A CXCR4-Targeted Nanocarrier Achieves Highly Selective Tumor Uptake in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Mouse Models. *Haematologica* **2020**, 105 (3), 741–753. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.211490>.
- (198) Falgàs, A.; Pallarès, V.; Unzueta, U.; Núñez, Y.; Sierra, J.; Gallardo, A.; Alba-Castellón, L.; Mangues, M. A.; Álamo, P.; Villaverde, A.; Vázquez, E.; Mangues, R.; Casanova, I. Specific Cytotoxic Effect of an Auristatin Nanoconjugate Towards CXCR4+ Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cells. *Int J Nanomedicine* **2021**, 16, 1869–1888. <https://doi.org/10.2147/IJN.S289733>.
- (199) Sánchez-García, L.; Sala, R.; Serna, N.; Álamo, P.; Parladé, E.; Alba-Castellón, L.; Voltà-Durán, E.; Sánchez-Chardi, A.; Unzueta, U.; Vázquez, E.; Mangues, R.; Villaverde, A. A Refined Cocktailing of Pro-Apoptotic Nanoparticles Boosts Anti-Tumor Activity. *Acta Biomaterialia* **2020**, 113, 584–596. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.033>.
- (200) Díaz, R.; Sánchez-García, L.; Serna, N.; Sánchez-Chardi, A.; Cano-Garrido, O.; Sánchez, J. M.; Unzueta, U.; Vazquez, E.; Villaverde, A. Engineering a Recombinant Chlorotoxin as Cell-Targeted Cytotoxic Nanoparticles. *Sci. China Mater.* **2019**, 62 (6), 892–898. <https://doi.org/10.1007/s40843-018-9391-y>.
- (201) Díaz, R.; Pallarès, V.; Cano-Garrido, O.; Serna, N.; Sánchez-García, L.; Falgàs, A.; Pesarrodona, M.; Unzueta, U.; Sánchez-Chardi, A.; Sánchez, J. M.; Casanova, I.; Vázquez, E.; Mangues, R.; Villaverde, A. Selective CXCR4+ Cancer Cell Targeting and Potent Antineoplastic Effect by a Nanostructured Version of Recombinant Ricin. *Small* **2018**, 14 (26), e1800665. <https://doi.org/10.1002/smll.201800665>.
- (202) Deppe, G.; Jacobs, A. J.; Bruckner, H.; Cohen, C. J. Chemotherapy of Advanced and Recurrent Endometrial Carcinoma with Cyclophosphamide, Doxorubicin, 5-Fluorouracil, and Megestrol Acetate. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **1981**, 140 (3), 313–316. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(81\)90280-5](https://doi.org/10.1016/0002-9378(81)90280-5).
- (203) Pierga, J.-Y.; Dieras, V.; Paraiso, D.; Dorval, T.; Palangie, T.; Beuzeboc, P.; Jouve, M.; Scholl, S. M.; Garcia-Giralt, E.; Pouillart, P. Treatment of Advanced or Recurrent Endometrial

BIBLIOGRAFÍA

- Carcinoma with Combination of Etoposide, Cisplatin, and 5-Fluorouracil: A Phase II Study. *Gynecologic Oncology* **1996**, *60* (1), 59–63. <https://doi.org/10.1006/gyno.1996.0012>.
- (204) Céspedes, M. V.; Unzueta, U.; Aviñó, A.; Gallardo, A.; Álamo, P.; Sala, R.; Sánchez-Chardi, A.; Casanova, I.; Mangués, M. A.; Lopez-Pousa, A.; Eritja, R.; Villaverde, A.; Vázquez, E.; Mangués, R. Selective Depletion of Metastatic Stem Cells as Therapy for Human Colorectal Cancer. *EMBO Mol Med* **2018**, *10* (10). <https://doi.org/10.15252/emmm.201708772>.
- (205) Aviñó, A.; Unzueta, U.; Céspedes, M. V.; Casanova, I.; Vázquez, E.; Villaverde, A.; Mangués, R.; Eritja, R. Efficient Bioactive Oligonucleotide-protein Conjugation for Cell-targeted Cancer Therapy. **2019**, *6*. <https://doi.org/DOI:10.1002/open.201900038>.
- (206) Pallarès, V.; Unzueta, U.; Falgàs, A.; Sánchez-García, L.; Serna, N.; Gallardo, A.; Morris, G. A.; Alba-Castellón, L.; Álamo, P.; Sierra, J.; Villaverde, A.; Vázquez, E.; Casanova, I.; Mangués, R. An Auristatin Nanoconjugate Targeting CXCR4+ Leukemic Cells Blocks Acute Myeloid Leukemia Dissemination. *J Hematol Oncol* **2020**, *13* (1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00863-9>.
- (207) Fong, A.; Durkin, A.; Lee, H. The Potential of Combining Tubulin-Targeting Anticancer Therapeutics and Immune Therapy. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030586>.
- (208) Shafiee, F.; Aucoin, M. G.; Jahanian-Najafabadi, A. Targeted Diphtheria Toxin-Based Therapy: A Review Article. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2340. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02340>.
- (209) Mazor, R.; Pastan, I. Immunogenicity of Immunotoxins Containing Pseudomonas Exotoxin A: Causes, Consequences, and Mitigation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1261. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01261>.
- (210) Sánchez-García, L. Self-Assembling Toxin-Based Nanoparticles as Self-Delivered Antitumoral Drugs. *Journal of Controlled Release* **2018**, *12*.
- (211) Chang, M. P. Internucleosomal DNA Cleavage Precedes Diphtheria Toxin-Induced Cytolysis. **2000**, *7*.
- (212) Keppler-Hafkemeyer, A.; Kreitman, R. J.; Pastan, I. Apoptosis Induced by Immunotoxins Used in the Treatment of Hematologic Malignancies. **1989**, *9*.
- (213) Shapira, A.; Benhar, I. Toxin-Based Therapeutic Approaches. **2010**, *65*.
- (214) Céspedes, M. V.; Casanova, I.; Parreño, M.; Mangués, R. Mouse Models in Oncogenesis and Cancer Therapy. *Clin Transl Oncol* **2006**, *8* (5), 318–329. <https://doi.org/10.1007/s12094-006-0177-7>.
- (215) Van Nyen, T.; Moiola, C. P.; Colas, E.; Annibaldi, D.; Amant, F. Modeling Endometrial Cancer: Past, Present, and Future. *IJMS* **2018**, *19* (8), 2348. <https://doi.org/10.3390/ijms19082348>.
- (216) de Jong, M.; Maina, T. Of Mice and Humans: Are They the Same?—Implications in Cancer Translational Research: TABLE 1. *J Nucl Med* **2010**, *51* (4), 501–504. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.065706>.

- (217) Rangarajan, A.; Weinberg, R. A. Comparative Biology of Mouse versus Human Cells: Modelling Human Cancer in Mice. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3* (12), 952–959. <https://doi.org/10.1038/nrc1235>.
- (218) Anisimov, V. N.; Ukraintseva, S. V.; Yashin, A. I. Cancer in Rodents: Does It Tell Us about Cancer in Humans? *Nat Rev Cancer* **2005**, *5* (10), 807–819. <https://doi.org/10.1038/nrc1715>.
- (219) Ma, Y.; Jia, Y.; Chen, L.; Ezeogu, L.; Yu, B.; Xu, N.; Liao, D. J. Weaknesses and Pitfalls of Using Mice and Rats in Cancer Chemoprevention Studies. *J. Cancer* **2015**, *6* (10), 1058–1065. <https://doi.org/10.7150/jca.12519>.
- (220) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100* (1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- (221) Talmadge, J. E.; Singh, R. K.; Fidler, I. J.; Raz, A. Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. *The American Journal of Pathology* **2007**, *170* (3), 793–804. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060929>.
- (222) Khanna, C. Modeling Metastasis in Vivo. *Carcinogenesis* **2004**, *26* (3), 513–523. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh261>.
- (223) Mirantes, C.; Eritja, N.; Dosil, M. A.; Santacana, M.; Pallares, J.; Gatus, S.; Bergada, L.; Maiques, O.; Matias-Guiu, X.; Dolcet, X. 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), 710–720. <https://doi.org/10.1242/dmm.011445>.
- (224) Daikoku, T.; Hirota, Y.; Tranguch, S.; Joshi, A. R.; DeMayo, F. J.; Lydon, J. P.; Ellenson, L. H.; Dey, S. K. Conditional Loss of Uterine Pten Unfailingly and Rapidly Induces Endometrial Cancer in Mice. *Cancer Research* **2008**, *68* (14), 5619–5627. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1274>.
- (225) Akbay, E. A.; Peña, C. G.; Ruder, D.; Michel, J. A.; Nakada, Y.; Pathak, S.; Multani, A. S.; Chang, S.; Castrillon, D. H. Cooperation between P53 and the Telomere-Protecting Shelterin Component Pot1a in Endometrial Carcinogenesis. *Oncogene* **2013**, *32* (17), 2211–2219. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.232>.
- (226) Kim, T. H.; Yoo, J.-Y.; Jeong, J.-W. Mig-6 Mouse Model of Endometrial Cancer. In *Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma*; Hedrick Ellenson, L., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2017; Vol. 943, pp 243–259. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43139-0_8.
- (227) Pan, J.; Cheng, L.; Bi, X.; Zhang, X.; Liu, S.; Bai, X.; Li, F.; Zhao, A. Z. Elevation of ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids Attenuates PTEN-Deficiency Induced Endometrial Cancer Development through Regulation of COX-2 and PGE2 Production. *Sci Rep* **2015**, *5* (1), 14958. <https://doi.org/10.1038/srep14958>.
- (228) Janzen, D. M.; Paik, D. Y.; Rosales, M. A.; Yep, B.; Cheng, D.; Witte, O. N.; Kayadibi, H.; Ryan, C. M.; Jung, M. E.; Faull, K.; Memarzadeh, S. Low Levels of Circulating Estrogen Sensitize PTEN-Null Endometrial Tumors to PARP Inhibition In Vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* **2013**, *12* (12), 2917–2928. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0572>.

BIBLIOGRAFÍA

- (229) Saito, F.; Tashiro, H.; Yamaguchi, M.; Honda, R.; Ohba, T.; Suzuki, A.; Katabuchi, H. Development of a Mouse Model for Testing Therapeutic Agents: The Anticancer Effect of Dienogest on Endometrial Neoplasms. *Gynecological Endocrinology* **2016**, *32* (5), 403–407. <https://doi.org/10.3109/09513590.2015.1124411>.
- (230) Dosil, M. A.; Mirantes, C.; Eritja, N.; Felip, I.; Navaridas, R.; Gatus, S.; Santacana, M.; Colàs, E.; Moiola, C.; Schoenenberger, J. A.; Encinas, M.; Garí, E.; Matias-Guiu, X.; Dolcet, X. Palbociclib Has Antitumour Effects on *Pten*-Deficient Endometrial Neoplasias: Inhibition of Cyclin D-CDK4/6 Axis in *Pten*-Deficient Neoplasias. *J. Pathol* **2017**, *242* (2), 152–164. <https://doi.org/10.1002/path.4896>.
- (231) Kim, M. P.; Evans, D. B.; Wang, H.; Abbruzzese, J. L.; Fleming, J. B.; Gallick, G. E. Generation of Orthotopic and Heterotopic Human Pancreatic Cancer Xenografts in Immunodeficient Mice. *Nat Protoc* **2009**, *4* (11), 1670–1680. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.171>.
- (232) Hidalgo, M.; Amant, F.; Biankin, A. V.; Budinská, E.; Byrne, A. T.; Caldas, C.; Clarke, R. B.; de Jong, S.; Jonkers, J.; Mælandsmo, G. M.; Roman-Roman, S.; Seoane, J.; Trusolino, L.; Villanueva, A. Patient-Derived Xenograft Models: An Emerging Platform for Translational Cancer Research. *Cancer Discovery* **2014**, *4* (9), 998–1013. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0001>.
- (233) Bruna, A.; Rueda, O. M.; Greenwood, W.; Batra, A. S.; Callari, M.; Batra, R. N.; Pogrebniak, K.; Sandoval, J.; Cassidy, J. W.; Tufegdzcic-Vidakovic, A.; Sammut, S.-J.; Jones, L.; Provenzano, E.; Baird, R.; Eirew, P.; Hadfield, J.; Eldridge, M.; McLaren-Douglas, A.; Barthorpe, A.; Lightfoot, H.; O'Connor, M. J.; Gray, J.; Cortes, J.; Baselga, J.; Marangoni, E.; Welm, A. L.; Aparicio, S.; Serra, V.; Garnett, M. J.; Caldas, C. A Biobank of Breast Cancer Explants with Preserved Intra-Tumor Heterogeneity to Screen Anticancer Compounds. *Cell* **2016**, *167* (1), 260–274.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.041>.
- (234) Gao, H.; Korn, J. M.; Ferretti, S.; Monahan, J. E.; Wang, Y.; Singh, M.; Zhang, C.; Schnell, C.; Yang, G.; Zhang, Y.; Balbin, O. A.; Barbe, S.; Cai, H.; Casey, F.; Chatterjee, S.; Chiang, D. Y.; Chuai, S.; Cogan, S. M.; Collins, S. D.; Dammassa, E.; Ebel, N.; Embry, M.; Green, J.; Kauffmann, A.; Kowal, C.; Leary, R. J.; Lehar, J.; Liang, Y.; Loo, A.; Lorenzana, E.; Robert McDonald, E.; McLaughlin, M. E.; Merkin, J.; Meyer, R.; Naylor, T. L.; Patawaran, M.; Reddy, A.; Röelli, C.; Ruddy, D. A.; Salangsang, F.; Santacrose, F.; Singh, A. P.; Tang, Y.; Tinetto, W.; Tobler, S.; Velazquez, R.; Venkatesan, K.; Von Arx, F.; Wang, H. Q.; Wang, Z.; Wiesmann, M.; Wyss, D.; Xu, F.; Bitter, H.; Atadja, P.; Lees, E.; Hofmann, F.; Li, E.; Keen, N.; Cozens, R.; Jensen, M. R.; Pryer, N. K.; Williams, J. A.; Sellers, W. R. High-Throughput Screening Using Patient-Derived Tumor Xenografts to Predict Clinical Trial Drug Response. *Nat Med* **2015**, *21* (11), 1318–1325. <https://doi.org/10.1038/nm.3954>.
- (235) Moiola, C.; Lopez-Gil, C.; Cabrera, S.; Garcia, A.; Van Nyen, T.; Annibali, D.; Fonnes, T.; Vidal, A.; Villanueva, A.; Matias-Guiu, X.; Krakstad, C.; Amant, F.; Gil-Moreno, A.; Colas, E. Patient-Derived Xenograft Models for Endometrial Cancer Research. *IJMS* **2018**, *19* (8), 2431. <https://doi.org/10.3390/ijms19082431>.
- (236) Sharma, S. V.; Haber, D. A.; Settleman, J. Cell Line-Based Platforms to Evaluate the Therapeutic Efficacy of Candidate Anticancer Agents. *Nat Rev Cancer* **2010**, *10* (4), 241–253. <https://doi.org/10.1038/nrc2820>.

- (237) Mezzanotte, L.; van 't Root, M.; Karatas, H.; Goun, E. A.; Löwik, C. W. G. M. In Vivo Molecular Bioluminescence Imaging: New Tools and Applications. *Trends in Biotechnology* **2017**, *35* (7), 640–652. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.03.012>.
- (238) Dawe, C. J.; Banfield, W. G.; Morgan, W. D.; Slatick, M. S.; Curth, H. O. GROWTH IN CONTINUOUS CULTURE, AND IN HAMSTERS, OF CELLS FROM A NEOPLASM ASSOCIATED WITH ACANTHOSIS NIGRICANS. *J Natl Cancer Inst* **1964**, *33*, 441–456.
- (239) Kuramoto, H. Studies of the Growth and Cytogenetic Properties of Human Endometrial Adenocarcinoma in Culture and Its Development into an Established Line. *Acta Obstet Gynaecol Jpn* **1972**, *19* (1), 47–58.
- (240) Osol, G.; Mandala, M. Maternal Uterine Vascular Remodeling During Pregnancy. *Physiology* **2009**, *24* (1), 58–71. <https://doi.org/10.1152/physiol.00033.2008>.
- (241) Domanska, U. M.; Kruizinga, R. C.; Nagengast, W. B.; Timmer-Bosscha, H.; Huls, G.; de Vries, E. G. E.; Walenkamp, A. M. E. A Review on CXCR4/CXCL12 Axis in Oncology: No Place to Hide. *European Journal of Cancer* **2013**, *49* (1), 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.05.005>.
- (242) Zhang, Z.; Ni, C.; Chen, W.; Wu, P.; Wang, Z.; Yin, J.; Huang, J.; Qiu, F. Expression of CXCR4 and Breast Cancer Prognosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 49. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-49>.
- (243) Akashi, T.; Koizumi, K.; Tsuneyama, K.; Saiki, I.; Takano, Y.; Fuse, H. Chemokine Receptor CXCR4 Expression and Prognosis in Patients with Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Sci* **2008**, *99* (3), 539–542. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00712.x>.
- (244) Klein Nulent, T. J. W.; van Es, R. J. J.; Valstar, M. H.; Smeele, L. E.; Smit, L. A.; Klein Gunnewiek, R.; Zuithoff, N. P. A.; de Keizer, B.; de Bree, R.; Willems, S. M. High CXCR4 Expression in Adenoid Cystic Carcinoma of the Head and Neck Is Associated with Increased Risk of Locoregional Recurrence. *J Clin Pathol* **2020**, *73* (8), 476–482. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-206273>.
- (245) Furusato, B.; Mohamed, A.; Uhlén, M.; Rhim, J. S. CXCR4 and Cancer. *Pathol Int* **2010**, *60* (7), 497–505. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2010.02548.x>.
- (246) Zielińska, K. A.; Katanaev, V. L. The Signaling Duo CXCL12 and CXCR4: Chemokine Fuel for Breast Cancer Tumorigenesis. *Cancers* **2020**, *12* (10), 3071. <https://doi.org/10.3390/cancers12103071>.
- (247) Krikun, G. The CXCL12/CXCR4/CXCR7 Axis in Female Reproductive Tract Disease: Review. *Am J Reprod Immunol* **2018**, *80* (5), e13028. <https://doi.org/10.1111/aji.13028>.
- (248) Zhou, W.; Guo, S.; Liu, M.; Burow, M. E.; Wang, G. Targeting CXCL12/CXCR4 Axis in Tumor Immunotherapy. **2019**, 22.
- (249) Cancer Genome Atlas Research Network; Kandoth, C.; Schultz, N.; Cherniack, A. D.; Akbani, R.; Liu, Y.; Shen, H.; Robertson, A. G.; Pashtan, I.; Shen, R.; Benz, C. C.; Yau, C.; Laird, P. W.; Ding, L.; Zhang, W.; Mills, G. B.; Kucherlapati, R.; Mardis, E. R.; Levine, D. A. Integrated Genomic Characterization of Endometrial Carcinoma. *Nature* **2013**, *497* (7447), 67–73. <https://doi.org/10.1038/nature12113>.

BIBLIOGRAFÍA

- (250) Talhouk, A.; McConechy, M. K.; Leung, S.; Li-Chang, H. H.; Kwon, J. S.; Melnyk, N.; Yang, W.; Senz, J.; Boyd, N.; Karnezis, A. N.; Huntsman, D. G.; Gilks, C. B.; McAlpine, J. N. A Clinically Applicable Molecular-Based Classification for Endometrial Cancers. *Br J Cancer* **2015**, *113* (2), 299–310. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.190>.
- (251) Li, B.-L.; Wan, X.-P. Prognostic Significance of Immune Landscape in Tumour Microenvironment of Endometrial Cancer. **2020**, *11*.
- (252) Concin, N.; Matias-Guiu, X.; Vergote, I.; Cibula, D.; Mirza, M. R.; Marnitz, S.; Ledermann, J.; Bosse, T.; Chargari, C.; Fagotti, A.; Fotopoulou, C.; Gonzalez Martin, A.; Lax, S.; Lorusso, D.; Marth, C.; Morice, P.; Nout, R. A.; O'Donnell, D.; Querleu, D.; Raspollini, M. R.; Sehouli, J.; Sturdza, A.; Taylor, A.; Westermann, A.; Wimberger, P.; Colombo, N.; Planchamp, F.; Creutzberg, C. L. ESGO/ESTRO/ESP Guidelines for the Management of Patients with Endometrial Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* **2021**, *31* (1), 12–39. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2020-002230>.
- (253) Alexa, M.; Hasenburg, A.; Battista, M. J. The TCGA Molecular Classification of Endometrial Cancer and Its Possible Impact on Adjuvant Treatment Decisions. *Cancers (Basel)* **2021**, *13* (6). <https://doi.org/10.3390/cancers13061478>.
- (254) Yen, T.-T.; Wang, T.-L.; Fader, A. N.; Shih, I.-M.; Gaillard, S. Molecular Classification and Emerging Targeted Therapy in Endometrial Cancer: *International Journal of Gynecological Pathology* **2020**, *39* (1), 26–35. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000585>.
- (255) van den Heerik, A. S. V. M.; Horeweg, N.; Nout, R. A.; Lutgens, L. C. H. W.; van der Steen-Banasik, E. M.; Westerveld, G. H.; van den Berg, H. A.; Slot, A.; Koppe, F. L. A.; Kommoss, S.; Mens, J. W. M.; Nowee, M. E.; Bijmolt, S.; Cibula, D.; Stam, T. C.; Jurgenliemk-Schulz, I. M.; Snyers, A.; Hamann, M.; Zwanenburg, A. G.; Coen, V. L. M. A.; Vandecasteele, K.; Gillham, C.; Chargari, C.; Verhoeven-Adema, K. W.; Putter, H.; van den Hout, W. B.; Wortman, B. G.; Nijman, H. W.; Bosse, T.; Creutzberg, C. L. PORTEC-4a: International Randomized Trial of Molecular Profile-Based Adjuvant Treatment for Women with High-Intermediate Risk Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Cancer* **2020**, *30* (12), 2002–2007. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2020-001929>.
- (256) Chen, P.; Yang, Y.; Zhang, Y.; Jiang, S.; Li, X.; Wan, J. Identification of Prognostic Immune-Related Genes in the Tumor Microenvironment of Endometrial Cancer. *Aging (Albany NY)* **2020**, *12* (4), 3371–3387. <https://doi.org/10.18632/aging.102817>.
- (257) Hinshaw, D. C.; Shevde, L. A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res* **2019**, *79* (18), 4557–4566. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>.
- (258) Friel, A. M.; Sergent, P. A.; Patnaude, C.; Szotek, P. P.; Oliva, E.; Scadden, D. T.; Seiden, M. V.; Foster, R.; Rueda, B. R. Functional Analyses of the Cancer Stem Cell-like Properties of Human Endometrial Tumor Initiating Cells. *Cell Cycle* **2008**, *7* (2), 242–249. <https://doi.org/10.4161/cc.7.2.5207>.
- (259) Nieto, J. C.; Canto, E.; Zamora, C.; Ortiz, M. A. Selective Loss of Chemokine Receptor Expression on Leukocytes after Cell Isolation. *PLoS ONE* **2012**, *7* (3), 8.
- (260) Cruz-Samperio, R.; Jordan, M.; Perriman, A. Cell Augmentation Strategies for Cardiac Stem Cell Therapies. *Stem Cells Transl Med* **2021**, *10* (6), 855–866. <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0489>.

- (261) Tu, T. C.; Nagano, M.; Yamashita, T.; Hamada, H.; Ohneda, K.; Kimura, K.; Ohneda, O. A Chemokine Receptor, CXCR4, Which Is Regulated by Hypoxia-Inducible Factor 2 α , Is Crucial for Functional Endothelial Progenitor Cells Migration to Ischemic Tissue and Wound Repair. **2016**, 11.
- (262) Fedorko, A. M.; Kim, T. H.; Broaddus, R.; Schmandt, R.; Chandramouli, G. V. R.; Kim, H. I.; Jeong, J.-W.; Risinger, J. I. An Immune Competent Orthotopic Model of Endometrial Cancer with Metastasis. *Heliyon* **2020**, 6 (5), e04075. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04075>.
- (263) Pillozzi, S.; Fortunato, A.; De Lorenzo, E.; Borrani, E.; Giachi, M.; Scarselli, G.; Arcangeli, A.; Noci, I. Over-Expression of the LH Receptor Increases Distant Metastases in an Endometrial Cancer Mouse Model. *Front. Oncol.* **2013**, 3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00285>.
- (264) Unno, K.; Ono, M.; Winder, A. D.; Maniar, K. P.; Paintal, A. S.; Yu, Y.; Wei, J.-J.; Lurain, J. R.; Kim, J. J. Establishment of Human Patient-Derived Endometrial Cancer Xenografts in NOD Scid Gamma Mice for the Study of Invasion and Metastasis. *PLoS One* **2014**, 9 (12), e116064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116064>.
- (265) Chen, H.-Y.; Chiang, Y.-F.; Huang, J.-S.; Huang, T.-C.; Shih, Y.-H.; Wang, K.-L.; Ali, M.; Hong, Y.-H.; Shieh, T.-M.; Hsia, S.-M. Isoliquiritigenin Reverses Epithelial-Mesenchymal Transition Through Modulation of the TGF- β /Smad Signaling Pathway in Endometrial Cancer. *Cancers* **2021**, 13 (6), 1236. <https://doi.org/10.3390/cancers13061236>.
- (266) Haldorsen, I. S.; Popa, M.; Fonnes, T.; Brekke, N.; Kopperud, R.; Visser, N. C.; Rygh, C. B.; Pavlin, T.; Salvesen, H. B.; McCormack, E.; Krakstad, C. Multimodal Imaging of Orthotopic Mouse Model of Endometrial Carcinoma. *PLoS ONE* **2015**, 10 (8), e0135220. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135220>.
- (267) Winship, A. L.; Van Sinderen, M.; Donoghue, J.; Rainczuk, K.; Dimitriadis, E. Targeting Interleukin-11 Receptor- α Impairs Human Endometrial Cancer Cell Proliferation and Invasion *In Vitro* and Reduces Tumor Growth and Metastasis *In Vivo*. *Mol Cancer Ther* **2016**, 15 (4), 720–730. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0677>.
- (268) Konings, G.; Saarinen, N.; Delvoux, B.; Kooreman, L.; Koskimies, P.; Krakstad, C.; Fasmer, K.; Haldorsen, I.; Zaffagnini, A.; Häkkinen, M.; Auriola, S.; Dubois, L.; Lieuwes, N.; Verhaegen, F.; Schyns, L.; Kruitwagen, R.; ENITEC Consortium; Xanthoulea, S.; Romano, A. Development of an Image-Guided Orthotopic Xenograft Mouse Model of Endometrial Cancer with Controllable Estrogen Exposure. *IJMS* **2018**, 19 (9), 2547. <https://doi.org/10.3390/ijms19092547>.
- (269) Popli, P.; Richters, M. M.; Chadchan, S. B.; Kim, T. H.; Tycksen, E.; Griffith, O.; Thaker, P. H.; Griffith, M.; Kommagani, R. Splicing Factor SF3B1 Promotes Endometrial Cancer Progression via Regulating KSR2 RNA Maturation. *Cell Death Dis* **2020**, 11 (10), 842. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03055-y>.
- (270) Cabrera, S.; Llauradó, M.; Castellví, J.; Fernandez, Y.; Alameda, F.; Colás, E.; Ruiz, A.; Doll, A.; Schwartz, S.; Carreras, R.; Xercavins, J.; Abal, M.; Gil-Moreno, A.; Reventós, J. Generation and Characterization of Orthotopic Murine Models for Endometrial Cancer. *Clin Exp Metastasis* **2012**, 29 (3), 217–227. <https://doi.org/10.1007/s10585-011-9444-2>.

BIBLIOGRAFÍA

- (271) Doll, A.; Gonzalez, M.; Abal, M.; Llauro, M.; Rigau, M.; Colas, E.; Monge, M.; Xercavins, J.; Capella, G.; Diaz, B.; Gil-Moreno, A.; Alameda, F.; Reventos, J. An Orthotopic Endometrial Cancer Mouse Model Demonstrates a Role for RUNX1 in Distant Metastasis. *Int. J. Cancer* **2009**, *125* (2), 257–263. <https://doi.org/10.1002/ijc.24330>.
- (272) Hanekamp, E. E.; Gielen, S. C. J. P.; van Oosterhoud, S. A.; Burger, C. W.; Grootegoed, J. A.; Huikeshoven, F. J.; Blok, L. J. Progesterone Receptors in Endometrial Cancer Invasion and Metastasis: Development of a Mouse Model. *Steroids* **2003**, *68* (10–13), 795–800. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2003.08.002>.
- (273) Kato, M.; Onoyama, I.; Yoshida, S.; Cui, L.; Kawamura, K.; Kodama, K.; Hori, E.; Matsumura, Y.; Yagi, H.; Asanoma, K.; Yahata, H.; Itakura, A.; Takeda, S.; Kato, K. Dual-specificity Phosphatase 6 Plays a Critical Role in the Maintenance of a Cancer Stem-like Cell Phenotype in Human Endometrial Cancer. *Int. J. Cancer* **2020**, *147* (7), 1987–1999. <https://doi.org/10.1002/ijc.32965>.
- (274) Healey, G. D.; Pan-Castillo, B.; Garcia-Parra, J.; Davies, J.; Roberts, S.; Jones, E.; Dhar, K.; Nandan, S.; Tofazzal, N.; Piggott, L.; Clarkson, R.; Seaton, G.; Frostell, A.; Fagge, T.; McKee, C.; Margarit, L.; Conlan, R. S.; Gonzalez, D. Antibody Drug Conjugates against the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE), a Novel Therapeutic Target in Endometrial Cancer. *J. Immunotherapy Cancer* **2019**, *7* (1), 280. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0765-z>.
- (275) Gentilin, E.; Minoia, M.; Bondanelli, M.; Tagliati, F.; Degli Uberti, E. C.; Zatelli, M. C. Growth Hormone Differentially Modulates Chemoresistance in Human Endometrial Adenocarcinoma Cell Lines. *Endocrine* **2017**, *56* (3), 621–632. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-1085-4>.
- (276) Humber, C. E.; Tierney, J. F.; Symonds, R. P.; Collingwood, M.; Kirwan, J.; Williams, C.; Green, J. A. Chemotherapy for Advanced, Recurrent or Metastatic Endometrial Cancer: A Systematic Review of Cochrane Collaboration. *Annals of Oncology* **2007**, *18* (3), 409–420. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl417>.
- (277) López-Gil, J. C.; Martín-Hijano, L.; Hermann, P. C.; Sainz, B. The CXCL12 Crossroads in Cancer Stem Cells and Their Niche. *Cancers (Basel)* **2021**, *13* (3). <https://doi.org/10.3390/cancers13030469>.
- (278) Miller, D. S.; Filiaci, V. L.; Mannel, R. S.; Cohn, D. E.; Matsumoto, T.; Tewari, K. S.; DiSilvestro, P.; Pearl, M. L.; Argenta, P. A.; Powell, M. A.; Zweig, S. L.; Warshal, D. P.; Hanjani, P.; Carney, M. E.; Huang, H.; Cella, D.; Zaino, R.; Fleming, G. F. Carboplatin and Paclitaxel for Advanced Endometrial Cancer: Final Overall Survival and Adverse Event Analysis of a Phase III Trial (NRG Oncology/GOG0209). *J Clin Oncol* **2020**, *38* (33), 3841–3850. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01076>.
- (279) Vermij, L.; Horeweg, N.; Leon-Castillo, A.; Rutten, T. A.; Mileskin, L. R.; Mackay, H. J.; Leary, A.; Powell, M. E.; Singh, N.; Crosbie, E. J.; Smit, V. T. H. B. M.; Creutzberg, C. L.; Bosse, T. HER2 Status in High-Risk Endometrial Cancers (PORTEC-3): Relationship with Histotype, Molecular Classification, and Clinical Outcomes. *Cancers* **2020**, *13* (1), 44. <https://doi.org/10.3390/cancers13010044>.
- (280) Slomovitz, B. M.; Jiang, Y.; Yates, M. S.; Soliman, P. T.; Johnston, T.; Nowakowski, M.; Levenback, C.; Zhang, Q.; Ring, K.; Munsell, M. F.; Gershenson, D. M.; Lu, K. H.; Coleman,

- R. L. Phase II Study of Everolimus and Letrozole in Patients With Recurrent Endometrial Carcinoma. *JCO* **2015**, 33 (8), 930–936. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3401>.
- (281) Von Hoff, D. D.; Mita, M. M.; Ramanathan, R. K.; Weiss, G. J.; Mita, A. C.; LoRusso, P. M.; Burris, H. A.; Hart, L. L.; Low, S. C.; Parsons, D. M.; Zale, S. E.; Summa, J. M.; Youssoufian, H.; Sachdev, J. C. Phase I Study of PSMA-Targeted Docetaxel-Containing Nanoparticle BIND-014 in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* **2016**, 22 (13), 3157–3163. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2548>.
- (282) Zuckerman, J. E.; Gritli, I.; Tolcher, A.; Heidel, J. D.; Lim, D.; Morgan, R.; Chmielowski, B.; Ribas, A.; Davis, M. E.; Yen, Y. Correlating Animal and Human Phase Ia/Ib Clinical Data with CALAA-01, a Targeted, Polymer-Based Nanoparticle Containing siRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, 111 (31), 11449–11454. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411393111>.
- (283) Longmire, M.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Clearance Properties of Nano-Sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Considerations and Caveats. *Nanomedicine* **2008**, 3 (5), 703–717. <https://doi.org/10.2217/17435889.3.5.703>.
- (284) Garnett, M. C.; Kallinteri, P. Nanomedicines and Nanotoxicology: Some Physiological Principles. *Occup Med (Lond)* **2006**, 56 (5), 307–311. <https://doi.org/10.1093/occmed/kql052>.
- (285) Bai, X.; Wang, J.; Mu, Q.; Su, G. In Vivo Protein Corona Formation: Characterizations, Effects on Engineered Nanoparticles' Biobehaviors, and Applications. *Front Bioeng Biotechnol* **2021**, 9, 646708. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.646708>.
- (286) Ventola, C. L. Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. *P T* **2017**, 42 (12), 742–755.
- (287) Busillo, J. M.; Benovic, J. L. Regulation of CXCR4 Signaling. *Biochim Biophys Acta* **2007**, 1768 (4), 952–963. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.11.002>.
- (288) Tabernero, J.; Shapiro, G. I.; LoRusso, P. M.; Cervantes, A.; Schwartz, G. K.; Weiss, G. J.; Paz-Ares, L.; Cho, D. C.; Infante, J. R.; Alsina, M.; Gounder, M. M.; Falzone, R.; Harrop, J.; White, A. C. S.; Toudjarska, I.; Bumcrot, D.; Meyers, R. E.; Hinkle, G.; Svrzikapa, N.; Hutabarat, R. M.; Clausen, V. A.; Cehelsky, J.; Nochur, S. V.; Gamba-Vitalo, C.; Vaishnaw, A. K.; Sah, D. W. Y.; Gollob, J. A.; Burris, H. A. First-in-Humans Trial of an RNA Interference Therapeutic Targeting VEGF and KSP in Cancer Patients with Liver Involvement. *Cancer Discovery* **2013**, 3 (4), 406–417. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0429>.
- (289) Vilos, C.; Morales, F. A.; Solar, P. A.; Herrera, N. S.; Gonzalez-Nilo, F. D.; Aguayo, D. A.; Mendoza, H. L.; Comer, J.; Bravo, M. L.; Gonzalez, P. A.; Kato, S.; Cuello, M. A.; Alonso, C.; Bravo, E. J.; Bustamante, E. I.; Owen, G. I.; Velasquez, L. A. Paclitaxel-PHBV Nanoparticles and Their Toxicity to Endometrial and Primary Ovarian Cancer Cells. *Biomaterials* **2013**, 34 (16), 4098–4108. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.034>.
- (290) Ebeid, K.; Meng, X.; Thiel, K. W.; Do, A.-V.; Geary, S. M.; Morris, A. S.; Pham, E. L.; Wongrakpanich, A.; Chhonker, Y. S.; Murry, D. J.; Leslie, K. K.; Salem, A. K. Synthetically Lethal Nanoparticles for Treatment of Endometrial Cancer. *Nature Nanotech* **2018**, 13 (1), 72–81. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0009-7>.

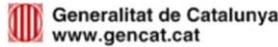
BIBLIOGRAFÍA

- (291) Ding, J.; Zhang, X.; Chen, C.; Huang, Y.; Yu, X.; Li, X. Ultra PH-Sensitive Polymeric Nanovesicles Co-Deliver Doxorubicin and Navitoclax for Synergetic Therapy of Endometrial Carcinoma. *Biomater Sci* **2020**, *8* (8), 2264–2273. <https://doi.org/10.1039/d0bm00112k>.
- (292) Attia, M. F.; Anton, N.; Wallyn, J.; Omran, Z.; Vandamme, T. F. An Overview of Active and Passive Targeting Strategies to Improve the Nanocarriers Efficiency to Tumour Sites. *J Pharm Pharmacol* **2019**, *71* (8), 1185–1198. <https://doi.org/10.1111/jphp.13098>.
- (293) Danhier, F. To Exploit the Tumor Microenvironment: Since the EPR Effect Fails in the Clinic, What Is the Future of Nanomedicine? *Journal of Controlled Release* **2016**, *244*, 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.015>.
- (294) Pandit, S.; Dutta, D.; Nie, S. Active Transcytosis and New Opportunities for Cancer Nanomedicine. *Nat. Mater.* **2020**, *19* (5), 478–480. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-0672-1>.
- (295) Sindhvani, S.; Syed, A. M.; Ngai, J.; Kingston, B. R.; Maiorino, L.; Rothschild, J.; MacMillan, P.; Zhang, Y.; Rajesh, N. U.; Hoang, T.; Wu, J. L. Y.; Wilhelm, S.; Zilman, A.; Gadde, S.; Sulaiman, A.; Ouyang, B.; Lin, Z.; Wang, L.; Egeblad, M.; Chan, W. C. W. The Entry of Nanoparticles into Solid Tumours. *Nat. Mater.* **2020**, *19* (5), 566–575. <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2>.
- (296) Wilhelm, S.; Tavares, A. J.; Dai, Q.; Ohta, S.; Audet, J.; Dvorak, H. F.; Chan, W. C. W. Analysis of Nanoparticle Delivery to Tumours. *Nat Rev Mater* **2016**, *1* (5), 16014. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>.
- (297) de Bono, J. S.; Concin, N.; Hong, D. S.; Thistlethwaite, F. C.; Machiels, J.-P.; Arkenau, H.-T.; Plummer, R.; Jones, R. H.; Nielsen, D.; Windfeld, K.; Ghatta, S.; Slomovitz, B. M.; Spicer, J. F.; Yachnin, J.; Ang, J. E.; Mau-Sørensen, P. M.; Forster, M. D.; Collins, D.; Dean, E.; Rangwala, R. A.; Lassen, U. Tisotumab Vedotin in Patients with Advanced or Metastatic Solid Tumours (InnovaTV 201): A First-in-Human, Multicentre, Phase 1-2 Trial. *Lancet Oncol* **2019**, *20* (3), 383–393. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30859-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30859-3).
- (298) Tsurutani, J.; Iwata, H.; Krop, I.; Jänne, P. A.; Doi, T.; Takahashi, S.; Park, H.; Redfern, C.; Tamura, K.; Wise-Draper, T. M.; Saito, K.; Sugihara, M.; Singh, J.; Jikoh, T.; Gallant, G.; Li, B. T. Targeting HER2 with Trastuzumab Deruxtecan: A Dose-Expansion, Phase I Study in Multiple Advanced Solid Tumors. *Cancer Discov* **2020**, *10* (5), 688–701. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1014>.
- (299) Tymon-Rosario, J.; Zeybek, B.; Santin, A. D. Novel Antibody-Drug Conjugates: Current and Future Roles in Gynecologic Oncology. *Curr Opin Obstet Gynecol* **2021**, *33* (1), 26–33. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000642>.
- (300) Shan, N.; Zhou, W.; Zhang, S.; Zhang, Y. Identification of HSPA8 as a Candidate Biomarker for Endometrial Carcinoma by Using ITRAQ-Based Proteomic Analysis. *Onco Targets Ther* **2016**, *9*, 2169–2179. <https://doi.org/10.2147/OTT.S97983>.
- (301) Kaneta, Y.; Tsukazaki, K.; Kubushiro, K.; Aoki, R.; Sakayori, M.; Ueda, M.; Nozawa, S. Effect of Gelonin Immunoconjugate with Monoclonal Antibody MSN-1 to Endometrial Adenocarcinoma on Antigen-Producing Tumor Cells *in Vivo*. *Japanese Journal of Cancer Research* **1998**, *89* (5), 583–588. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1998.tb03301.x>.

- (302) Qi, L.; Nett, T. M.; Allen, M. C.; Sha, X.; Harrison, G. S.; Frederick, B. A.; Crawford, E. D.; Glode, L. M. Binding and Cytotoxicity of Conjugated and Recombinant Fusion Proteins Targeted to the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor. *Cancer Res* **2004**, *64* (6), 2090–2095. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-3192-2>.
- (303) Zhang, Y.; Xu, F.; Liang, H.; Cai, M.; Wen, X.; Li, X.; Weng, J. Exenatide Inhibits the Growth of Endometrial Cancer Ishikawa Xenografts in Nude Mice. *Oncol Rep* **2016**, *35* (3), 1340–1348. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4476>.
- (304) Jia, L.-T.; Zhang, L.-H.; Yu, C.-J.; Zhao, J.; Xu, Y.-M.; Gui, J.-H.; Jin, M.; Ji, Z.-L.; Wen, W.-H.; Wang, C.-J.; Chen, S.-Y.; Yang, A.-G. Specific Tumorcidal Activity of a Secreted Proapoptotic Protein Consisting of HER2 Antibody and Constitutively Active Caspase-3. *1. 2003*, *7*.
- (305) Xu, Y.-M.; Wang, L.-F.; Jia, L.-T.; Qiu, X.-C.; Zhao, J.; Yu, C.-J.; Zhang, R.; Zhu, F.; Wang, C.-J.; Jin, B.-Q.; Chen, S.-Y.; Yang, A.-G. A Caspase-6 and Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2) Antibody Chimeric Molecule Suppresses the Growth of HER2-Overexpressing Tumors. *J Immunol* **2004**, *173* (1), 61–67. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.1.61>.
- (306) Wang, L.-F.; Zhou, Y.; Xu, Y.-M.; Qiu, X.-C.; Zhou, B.-G.; Wang, F.; Long, H.; Chen, X.; Yang, T.-T.; Ma, B.-A.; Fan, Q.-Y.; Yang, A.-G. A Caspase-6 and Anti-HER2 Antibody Chimeric Tumor-Targeted Proapoptotic Molecule Decreased Metastasis of Human Osteosarcoma. *Cancer Investigation* **2009**, *27* (7), 774–780. <https://doi.org/10.1080/07357900802427935>.
- (307) Konno, T.; Kohno, T.; Kikuchi, S.; Shimada, H.; Satohisa, S.; Saito, T.; Kondoh, M.; Kojima, T. Epithelial Barrier Dysfunction and Cell Migration Induction via JNK/Cofilin/Actin by Angubindin-1. *Tissue Barriers* **2020**, *8* (1), 1695475. <https://doi.org/10.1080/21688370.2019.1695475>.
- (308) Khireghesh, M. R.; Sharifi, J.; Safari, F.; Akbari, B. Immunotoxins and Nanobody-Based Immunotoxins: Review and Update. *J Drug Target* **2021**, 1–15. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2021.1894435>.

VIII. ANEXOS

1. APROBACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL POR LA GENERALITAT DE CATALUNYA



GENERALITAT DE CATALUNYA

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

RESOLUCIÓ

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

Identificació de l'expedient

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

Antecedents

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

Fonaments de dret

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

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

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

Resolució

Per tant, resolc:

1. Informar Favorablement la sol·licitud d'autorització del projecte d'experimentació que es relaciona a continuació:

Títol: "Evaluación de nanoconjugados para terapia dirigida en modelos murinos de cáncer de páncreas, endometrio y glioblastoma"

Responsable del projecte: Maria Virtudes Céspedes Navarro

Usuari: Institut Català de Ciències Cardiovasculars

Instal·lació on es realitzarà el projecte: Institut Català de Ciències Cardiovasculars – Institut de Recerca de l'Hospital de Sta Creu i St Pau

2. Assignar al projecte el núm. d'ordre: 10234
3. Autoritzar la realització d'aquest projecte d'experimentació durant cinc anys a partir de la data de signatura d'aquesta resolució. En el moment que es disposi d'un mètode validat alternatiu a l'ús d'animals per a qualsevol dels procediments que integren el projecte, aquesta autorització quedarà suspesa i sense efecte.
4. Realitzar l'avaluació retrospectiva, d'acord amb l'informe de l'òrgan habilitat, al finalitzar el projecte o com a màxim als 5 anys de l'autorització d'aquest.

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

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

El director general de Polítiques Ambientals i Medi Natural

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

0G6PC1014N6UMQQ96R6I7YKBC7SP88AD

2. PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN APLICADO EN LOS MODELOS ANIMALES

Parámetros a puntuar en la supervisión animal

1. Pérdida de peso *

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

2. Aspecto físico

- 0) Normal.
- 1) Deshidratación, delgadez.
- 2) Pelo no brillante o despeinado. Palidez. Cianosis.
- 3) Encorvamiento. Emaciación.

3. Signos clínicos

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

4. Alteraciones de conducta

- 0) Ninguna.
- 1) Incapacidad de moverse con normalidad.
- 2) Imposibilidad de llegar a la comida/bebida. Aislamiento del resto de los animales de la jaula.
- 3) Inconsciente o comatoso. Intención de "escondarse" en la viruta. No responde a estímulos (moribundo).

5. Tamaño del tumor por bioluminiscencia (inoculación ortotópica).

- 0) No hay señal.
- 1) Tamaño del tumor de 1-10% del volumen abdominal.
- 2) Tamaño del tumor de 11-19% del volumen abdominal.
- 3) Tamaño del tumor de 20% del volumen abdominal. *

6. Tamaño del tumor por palpación (inoculación ortotópica).

- 0) No se nota al tacto.
- 1) Tacto del tamaño de una lenteja
- 2) Tacto del tamaño de un garbanzo
- 3) Tacto mayor al de un garbanzo. Se observa distensión abdominal.

ANEXOS

7. Heridas

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

Puntuación total y toma de decisiones

Los valores marcados con un asterisco (*) no afectan al estado del animal, según se ha comprobado en estudios previos.

Cuando haya más de un parámetro con un valor de 3, automáticamente todos los valores de 3 pasarán a valorarse como 4.

Puntuación	Conclusión	Decisión
De 0 a 6 puntos	Posible dolor o angustia.	Potencial necesidad de uso de analgésicos
De 6 a 12 puntos	Existencia de dolor o angustia	Administración de analgésicos paliativos
De 12 a 18 puntos	Dolor o angustia grave	Potencial necesidad de sacrificio del animal
De 18 a 28 puntos	Dolor o angustia muy graves	Sacrificio obligado Potencial necesidad de fin del procedimiento.

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

- El tamaño de la masa tumoral, aun no llegando a un tamaño considerado crítico, influye en las demás funciones corporales, o bien causa dolor y/o sufrimiento prolongado
- La pérdida de peso corporal es mayor al 20% con respecto al peso basal o de un control.
- Existen signos de emaciación, aun sin pérdida de peso global
- Hay ulceración o infección en el lugar de implantación
- Hay trauma autoinflingido persistente y con afectación de la calidad de vida del animal.